

Keskushermostossa sijaitsevan lääkekohteen tehoseulomiseen liittyviä erityispiirteitä

Tuomas Pylkkö
Helsingin Yliopisto
Farmasian Tiedekunta
Farmaseuttisen biologian osasto
Toukokuu 2013



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty		Laitos/Institution– Department	
Farmasia		Farmaseuttinen biologia	
Tekijä/Författare – Author			
Tuomas Pylkkö			
Työn nimi / Arbetets titel – Title			
Keskushermostossa sijaitsevan lääkekohteen tehoseulomiseen liittyviä erityispiirteitä			
Oppiaine /Läroämne – Subject			
Farmakognosia			
Työn laji/Arbetets art – Level	Aika/Datum – Month and year	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages	
Pro Gradu	Toukokuu 2013	92 + 4 liitettä	
Tiivistelmä/Referat – Abstract			
<p>Keskushermosto on muista kudoksista tehokkaasti eristetty kudos, ja tästä johtuen keskushermostokandidaattien on täytettävä erittäin tiukka joukko fysikaalisia ja kemiallisia ominaisuuksia. Työssä kuvataan menetelmiä, joiden avulla voidaan valita todennäköisemmin keskushermoston lääkekehitykselle olennaisia yhdisterakenteita.</p> <p>Tutkielmassa myös esitetään, että pienmolekyylien täyttämä kemiallinen avaruus on niin laaja, ettei välttämättä ole käytännöllistä seuloa sitä kohdentamattomasti. Lisäksi mahdollinen este lääkekehitykselle on se, että useat kaupallisesti saatavilla olevat kemialliset yhdisteet ovat keskenään hyvin samanlaisia. Tästä johtuen työssä tarkastellaan myös muutamia uusia tapoja tuottaa molekyyilejä ja niiden merkitystä lääkekehitykselle.</p> <p>Kokeellisessa osuudessa tutkittiin erään aiemmin kehitetyn immunosorbenttimääritysmenetelmän soveltuvuutta tehoseulontamenetelmäksi optimoinnin, miniatyrisoinnin ja automatisoinnin avulla. Tämä menetelmä mittaa erään fibroblastissa ekspressoidun tyrosiinikinaasireseptorin aktiivisuutta. Kyseisen hermokasvutekijäreseptorin ja sen luonnollisen ligandin, aivoperäisen hermokasvutekijän on osoitettu olevan tärkeissä rooleissa aiemmin kehitettyjen masennuslääkkeiden vaikutusmekanismeissa. Toimivalla tehoseulontamenetelmällä voisi mahdollisesti löytää joko agonistisia, tai antagonistisia TrkB-reseptoriin vaikuttavia pienmolekyyilejä. Nämä voisivat olla hyödyllisiä lääkkeitä masennukseen ja ahdistukseen.</p> <p>Työssä myös osoitettiin, että TrkB-reseptoriin suunnattu ELISA-menetelmä on mahdollista suorittaa miniatyrisoituna ja automatisoituna, mikä parantaa huomattavasti sen soveltuvuutta seulontakäyttöön. Alkuperäinen menetelmä suoritettiin 24-kuoppalevyllä, siirtäen näytteet toiselle levyille mittausta varten. Menetelmäkehityksen myötä menetelmä pystyttiin toteuttamaan 96-kuoppalevymittakaavassa ja suorittamaan koko menetelmä samalla levyllä ilman näytteiden siirtoa.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords			
Tehoseulonta, TrkB, Psykenlääkkeet, Miniatyrisointi, Automatisointi			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Farmasian tiedekunta, farmaseuttisen biologian osasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			
Ohjaajat: Päivi Tammela ja Tomi Rantamäki			



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty		Laitos/Institution– Department	
Faculty of Pharmacy		Division of Pharmaceutical Biology	
Tekijä/Författare – Author			
Tuomas Pyykkö			
Työn nimi / Arbetets titel – Title			
High-throughput screening for central nervous system targets			
Oppiaine /Läroämne – Subject			
Pharmacognosy			
Työn laji/Arbetets art – Level	Aika/Datum – Month and year	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages	
Master's Thesis	May 2013	92 + 4 appendices	
Tiivistelmä/Referat – Abstract			
<p>It is well known that the central nervous system is a highly isolated tissue. Because of this the physico-chemical criteria to be met by an orally administered central nervous system drug are very strict. This work describes methods that can be used to select drug candidates and screening collections that have a higher possibility of being relevant to central nervous system drug development projects.</p> <p>This work also argues that small molecular space is so vast that it is difficult to imagine any progress without focusing screening collections in some way or another. Given that most available commercial compounds are very similar in some respects, it is very much possible that this presents a bottle-neck for the progress of drug development as a whole. Therefore, research on novel methods for compound production are also evaluated.</p> <p>In addition, this work describes the miniaturization and automation of a previously published ELISA-based assay. This assay measures the activation of a tyrosine kinase receptor (TrkB), expressed in a fibroblast cell line. The receptor, and it's endogenous ligand, Brain-derived neurotrophic factor, have been linked to the mechanism of action of previously discovered medical interventions used in the treatment of depression. Such an assay can be used to discover either small molecule agonists or antagonists acting upon the receptor. These molecules could possibly be clinically relevant in the treatment of depressive disorders and anxiety.</p> <p>It is demonstrated that it is indeed possible to miniaturize and automate the method, making it significantly more suitable for high-throughput screening. The original method was carried out in 24-well plates, transferring the samples to another plate for measurement. The new design uses 96-well plates and performs the entire process on the same plate.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords			
High-Throughput screening, TrkB, CNS Drugs, Miniaturization, Automation			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Faculty of Pharmacy, Division of Pharmaceutical Biology			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			
Supervisors: Päivi Tammela and Tomi Rantamäki			

Sisällysluettelo

1 Johdanto.....	2
2 Tehoseulonta osana lääkekehitystä.....	3
2.1 Automatisoitu kokeellinen työ ja kombinatorinen räjähdys.....	5
2.2 Kombinatorisen räjähdysvaikutuksen vaikutus tehoseulontaan ja lääkekehitykseen.....	7
3 Seulontakokeelman luominen keskushermostossa olevaa kohdetta varten.....	8
3.1 Suodattaminen fysikaaliskemiallisten ominaisuuksien perusteella.....	8
3.2 Moniparametrisen aineiston suodattamisen haasteista.....	11
3.3 Pareto-optimoinnista ja haluttavuusfunktioiden käyttämisestä.....	13
3.4 Yhdistekokeelmien optimoiminen kokonaisuudessaan.....	17
3.5 TrkB-hermokasvutekijäreseptorin ominaispiirteitä lääkekehityksen kannalta	20
3.5.1 Reseptorin löytäminen ja sen toiminnan tutkimushistoria.....	20
3.5.2 Reseptorin suhde mielialasairauksiin.....	21
3.5.3 Yhdistekokeelman luomisesta erityisesti TrkB-reseptorille.....	23
4 Molekyylien monimuotoisuuteen liittyvästä tutkimuksesta.....	24
4.1 Perinteinen kombinatorinen kemia ja sen ongelmat.....	25
4.2 Luonnosta eristettyjen ja synteettisten yhdisteiden merkitys lääkekehityksessä	26
4.2.1 Synteettisten ja luonnosta eristettävien yhdisteiden eroista.....	27
4.2.2 Valmiiksi validoituja ja etuoikeutettuja yhdisterakenteita.....	29
4.2.3 Luonnon yhdisteet ovat ”valmiiksi validoituja ja etuoikeutettuja”.....	31
4.3 Monimuotoisuuteen tähtäävä synteesi (diversity oriented synthesis).....	35
4.4 Monimuotoisuussynteessin soveltuvuus lääkekehitykseen.....	36
4.5 Monimuotoisuussynteesi biologiasta lähtien (biology oriented synthesis).....	43
5 Kokeellisen työn tarkoitus ja tausta.....	46
5.1 Materiaalit ja menetelmät.....	49
5.1.1 Materiaalit.....	49
5.1.2 Solupohjaisen anti-fosfo-tyrosiinimäärityksen kuvaus.....	50
5.2 Menetelmän tarkastelu eri kokoisilla kuoppalevyillä.....	52
5.3 Levyn päällystämisen tutkiminen.....	53
5.4 Lyysispuskurin valinta ja konsentraation määrittäminen.....	53
5.5 Solujen kasvattaminen kiinni levyihin ja solujen käyttäminen suspensioina.....	54
5.6 Solujen määrän vaikutuksen tutkiminen.....	55
5.7 Solususpensio Hankin puskuroidussa suolaliuoksessa elatusaineen sijaan.....	55
5.8 Inkubaatioajan pituus aivoperäisellä hermokasvutekijällä.....	55
5.9 Menetelmän siirto kokonaisuudessaan mittauslevylle.....	56
5.10 Mittausajan vaikutuksen tarkasteleminen.....	56
5.11 Menetelmän nopeuttamisen yrittäminen inkubaatiovaiheita lyhentäen.....	57
5.12 Aivoperäisen hermokasvutekijän annosvasteen määrittäminen.....	57
5.13 Levyn sisäisen sekä levyjen välisen toistettavuuden arviointi.....	57
5.14 Dimetyylisulfoksidiherkkyuden arviointi.....	58
5.15 Tulosten käsittely.....	58
6 Tulokset ja niiden tarkastelu.....	60
6.1 Menetelmän tarkastelu eri kokoisilla kuoppalevyillä.....	60
6.2 Levyn päällystämisen tutkiminen.....	61
6.3 Lyysispuskurin valinta ja käytettävän konsentraation määrittäminen.....	62
6.4 Solujen kasvattaminen kiinni levyihin ja solujen käyttäminen suspensioina.....	63
6.5 Solujen määrän vaikutuksen tutkiminen.....	64
6.6 Solususpensio Hankin puskuroidussa suolaliuoksessa elatusaineen sijaan.....	65

6.7 Inkubaatioajan pituus aivoperäisellä hermokasvutekijällä.....	66
6.8 Menetelmän siirto kokonaisuudessaan mittauslevylle.....	67
6.9 Mittausajan vaikutuksen tarkasteleminen.....	67
6.10 Menetelmän nopeuttamisen yrittäminen inkubaatiovaiheita lyhentäen.....	68
6.11 Aivoperäisen hermokasvutekijän annosvasteen määrittäminen.....	70
6.12 Levyn sisäisen sekä levyjen välisen toistettavuuden arviointi.....	72
6.13 Dimetyylisulfoksidiherkkyden arviointi.....	75
6.14 Tuloksien tulkinta.....	77
7 Yhteenvetoa ja johtopäätöksiä.....	81

LIITTEET:

- LIITE 1 NP++-puskurin koostumus
- LIITE 2 ELISA menetelmän kuva
- LIITE 3 Materiaalit ja laitteet
- LIITE 4 Solujen elatusaineen koostumus ja solujen jakamisen ohje

1 Johdanto

Tässä työssä käsitellään tehoseulontamenetelmien käyttämistä lääkekehityksessä, erityisesti uusien keskushermostosairauksien hoitojen etsimisen näkökulmasta. Tarve keskushermostosairauksien uusille lääkehoidoille lisääntyy maailmanlaajuisesti ihmisten eläessä yhä vanhemmiksi (Ferri ym. 2005). Keskushermoston sairauksiin kohdistuva lääkekehitys on kuitenkin ollut suhteellisen epämenestynyt ala. Tufts-raportti¹ (2005) arvioi, että noin 11 % kaikista lääkeryhmistä ja vain 7 % keskushermoston hoitamiseen tarkoitetuista lääkekandidaateista selviää kliinisestä kehittelystä markkinoille asti (Pangalos ym. 2007). Lisäksi keskushermoston lääkkeiden kehitysprojektit kestävät keskimäärin pidempään kuin muilla lääkekehityksen aloilla (Pangalos ym. 2007). Työssä pohditaan muun ohessa sitä, miten tehoseulontamenetelmät voivat vaikuttaa tähän tilanteeseen.

Työn kokeellisessa osassa esitellään aivoperäisen hermokasvutekijän (BDNF) reseptoriin (TrkB) kohdistuva seulontamenetelmä. Kyseisen reseptorin on aiemmassa kokeellisessa tutkimuksessa osoitettu liittyvän kliiniseen masennukseen ja aiemmin hyväksytyihin masennuslääkkeiden vaikutusmekanismeihin. Miniatyrisoinnin ja automatisoinnin avulla pyritään sovittamaan tehoseulontaan eräs aiemmin julkaistu immunosorbenttimääritysmenetelmä (LIITE 2).

Tätä ennen käydään läpi keskushermostoon vaikuttavien pienmolekyylien seulontaan liittyviä asioita kuten 1) tapoja rajata molekylaarista hakuavaruutta keskushermostolle suunnitellun lääkekandidaatin näkökulmasta ja 2) tapoja luoda lääkkeellisesti olennaisia molekyylikandidaatteja. Nämä ovat tärkeitä asioita, sillä niiden pohtimisen avulla voidaan tehostaa lääkeaineiden etsimistä erittäin laajasta pienmolekyyliavaruudesta. Kokeellisen osuuden menetelmän luonteen takia kirjallisuuskatsauksessa keskitytään enimmäkseen lähestymistapaan, jossa kokonaisia yhdisteitä seulotaan bioteknisesti rakennettuun solupohjaiseen *in vitro*-malliin. Tällöin lähdetään liikkeelle siitä, että on olemassa jokin lääkeinterventioon jo aiemmin validoitu fysiologinen kohde. Tämän

¹ Bostonissa Tufts-yliopistossa toimiva lääketutkimuksen keskus.

lähestymistavan lisäksi paljon tutkimusta on myös tehty biokemiallisista, fenotyypisistä ja yhdistesirpaleisiin perustuvista tehoseulontamenetelmistä.

2 Tehoseulonta osana lääkekehitystä

Tehoseulontamenetelmien avulla tutkitaan kokeellisesti suuria määriä yhdisteitä rinnakkain. Näin pyritään löytämään lääkkeellisesti olennaiseen fysiologiseen molekyyliin sitoutuvia yhdisterakenteita, joiden uskotaan olevan hyödyllisiä lääkekehityksessä. Suurinta osaa näin löytyvistä yhdisterakenteista ei voi suoraan käyttää lääkkeinä, vaan niitä on kehiteltävä edelleen (kuva 1). Voidaan myös luoda lopulta lääkekandidaatteja saadun rakenteellisen tiedon avulla. Kokemuksesta tiedetään hyvin harvan seulottavan molekyylin olevan lääkkeen kehityksen näkökulmasta hyödyllinen, kenties vain noin yksi miljoonasta (Oprea 2002; Hann ja Oprea 2004). Tehoseulontamenetelmien avulla pyritään siis saamaan alustavaa kokeellista tietoa lääkekohteeseen sitoutuvista kemiallisista rakenteista, ja tätä alustavaa tietoa voidaan käyttää lääkekandidaattien luomiseen.

Seulonta	1 000 000
Osumat	2000
Aktiivit	1200
Johtomolekyylit	50-200
Lääkekandidaatit	10
Lääke	1

Current Opinion in Chemical Biology

Kuva 1: Tehoseulonta lääkekehitysprojektin lähtökohtana. Ensin löydetään tehoseulonnassa reseptoriin vaikuttavia yhdisteitä. Näistä osa osoittautuu virheellisiksi (osumiksi, jotka eivät todellisuudessa ole biologisesti aktiiveja). Seuraavaksi todellisista aktiiveista kehitetään johtomolekyylisarja, eli sarja molekyyliä, joista voi helposti pieni muunnoksia luoda lääkekandidaatteja kliinisiin tutkimuksiin. Kliinisissä tutkimuksissa osa kandidaateista hyväksytään. Kuva suomennettu teoksesta Hann ja Oprea 2004

Ensimmäisiä menetelmiä alettiin käyttämään 90-luvulla, ja alkuvaiheissa useat lääkeyritykset päättivät yksinkertaisesti kokeilla lähes kaikkia omistamiaan yhdisteitä projektejensa kohteita vastaan (Rankovic ym. 2010). Yhdistekokoelmat koostuivat aivan aluksi sadoista tuhansista yhdisteistä ja tämän jälkeen jopa miljoonista (Mayr ja Bojanic 2009). Myöhemmin on ymmärretty, että joko seulottavien kokoelmien olisi oltava paljon suurempia tai vaihtoehtoisesti enemmän kohdennettuja, jotta todennäköisyys löytää sattumalta hyödyllinen yhdiste olisi merkitsevän suuri (Mayr ja Fuerst 2008; Rankovic ym. 2010). Samalla menetelmistä on tullut kehittyneempiä sekä hienovaraisempia, ja niitä on opittu sopeuttamaan paremmin koko lääkekehitysprosessiin (katso esimerkiksi Mayr ja Bojanic 2009). Käytännössä tämä usein tarkoittaa useampaa seulontavaihetta, tai kokeellista seulontaa edeltävää laskennallista esivaihetta (Mayr ja Bojanic 2009). Lisäksi on alettu tutkimaan tapoja, joilla voisi tuottaa laadukkaampia synteettisiä yhdisteitä (Schreiber 2009).

Tehoseulontaa käytetään edelleen paljon, sillä esimerkiksi Swinneyn ja Anthonyn (2011) lääkekehityksen muutoksia tarkastelevassa katsausartikkelissa 45 uuden vaikutusmekanismin molekyyliä viidestäkymmenestä (90 %) löytyi tehoseulontamenetelmiä käyttäneissä projekteissa. Lisäksi viime vuonna Euroopan komissio päätti rahoittaa julkisen seulontakeskuksen (European Lead Factory²), jossa olisi 500 000 yhdisteen kokoelma (Laursen 2012; Baker 2013; Mullard 2013). Tämä päätös on kuitenkin herättänyt kritiikkiä, sillä aiempaa vastaavanlaista projektia Yhdysvalloissa pidetään yleisesti epäonnistuneena (Laursen 2012, Baker 2013, Mullard 2013). Seulontamenetelmien hyödyllisyydestä yleensäkin on jo pitkään esitetty nuivia näkemyksiä, joissa usein vedotaan odotettua huonompaan menestykseen (Lahana 1999; Kokel ym. 2010; Laursen 2012; Mullard 2013).

Tehoseulonnan lopullinen päämäärä on tuottaa tietoa, jonka avulla voidaan suunnitella johtomolekyylejä. Johtomolekyyleiksi kutsutaan sellaisia molekyyliä, joita voidaan helposti hienosäätää synteettisesti (Oprea ym. 2001). Ne ovat yleensä lopullisia markkinoituja lääkkeitä pienempiä yhdisterunkoja, joita muokkaamalla etsitään parasta

2 Tästä keskuksesta käytettiin aiemmin myös nimeä European Screening Center.

mahdollista kokonaisuutta, ottaen huomioon kaikki eri vaatimukset lääkkeelle. Usean markkinoilla olevan lääkeyhdisteen taustalta löytyy tällainen aikaisempi analoginen johtomolekyyli-versio, josta lääkekemistit ovat optimoineet varsinaisen lääkeyhdisteen. Rekisteröityjen lääkeyhdisteiden ja johtomolekyylien on havaittu poikkeavan toisistaan; rekisteröidyistä lääkkeistä vain noin 54 % täyttivät ne ominaisuudet, joita johtomolekyyliellä on havaittu olevan keskimäärin (Verheij 2006). Nykyään monet kemiallisia yhdisteitä lääkekehitykseen tarjoavista yrityksistä pyrkivät tarjoamaan ainoastaan sellaisia yhdisteitä, joiden ominaisuudet eivät poikkea paljon ominaisuuksista joita on tutkimuksissa havaittu lääkkeillä ja johtomolekyyliellä. Tutkimustieto lääkkeiden ja johtomolekyylien fysikaaliskemiallisista ominaisuuksista on hyvin tunnettua (näistä tarkemmin katso kappale 4.4).

2.1 Automatisoitu kokeellinen työ ja kombinatorinen räjähdys

Pelkistetysti tehoseulonnan voisi ajatella olevan tapa pyrkiä löytämään uusia reseptorimolekyyliin kiinnittyviä lääkeaineita kokeilemalla suuria määriä erilaisia kemiallisia yhdisteitä rinnan, poimien hyödylliset yhdisteet hyödyttömistä. Samoin lääkekehityksen ideaalina voidaan pitää pyrkimystä selvittää kaikkien mahdollisten lääkkeellisten molekyyli- muotojen vuorovaikutukset ihmisen vaikutettavissa olevien fysiologisten molekyylien kanssa (Kell 2012). Tilanne siis muistuttaa sitä että anatomian ideaali oli selvittää ihmisen kaikki anatomiset rakenteet ja niiden toiminta. Kyseinen vuorovaikutuksien matemaattinen joukko sisältää äärellisen määrän alkioita, ja siten ongelmakenttä kokonaisuudessaan on yksinkertaisempi kuin monissa tieteissä, joissa käsitellään äärettömästi numeroituvia tai ylinumeroituvia joukkoja. Nämä ajatukset yhdistellen voisi ajatella kaikkien molekyylien kaikkien lääkkeellisten vaikutusten olevan löydettävissä, kun erimuotoisia yhdisteitä kokeillaan automatisoidusti erilaisiin kohteisiin.

Näin ei kuitenkaan ole, ja eräs merkittävä syy tälle on se, että muutamasta alkupalikasta saa luotua epäkäytännöllisen suuria määriä molekyyliä (niin sanottu kombinatorinen

räjähdyks). On arvioitu, että enintään 30-atomisia, hiiltä, typpeä, happea ja rikkiä sisältäviä synteettisesti mahdollisia molekyyliä voisi luoda 10^{62} (Bohacek ym. 1996)³ (algoritmista jolla voi ottaa näytteitä tästä avaruudesta katso Virshup ym. 2013). Laskelma on hyvin suuntaa antava⁴, mutta on selvää, että vaikka Bohacekin ym. (1996) käyttämiä parametrejä muokkasi miten, määrä on oleva valtava. Jos kaikkia muotoja valmistettaisiin edes 100 mg kokonaisuuden massa ylittäisi koko havaittavissa olevan maailmankaikkeuden massan (Hoylen arvio: 8×10^{52} kg, katso Kragh 1999, s. 212) noin 125 000-kertaisesti. On melko varmaa, ettei kaikkia näitä (Bohacekin ym. 1996) molekyyliä ole mahdollista valmistaa koskaan, ja ettei suurimmalla osalla niistä ole lääkeominaisuuksia.

Tämä määrä on myös aivan eri kertaluokkaa jo tunnettujen yhdisteiden määrän kanssa: Beilstein-tietokannassa⁵, jonne on luokiteltu kaikki tähän asti tunnetut kemikaalit on vain noin 10^7 yhdistettä, eli määrä joka vastaa noin 10^{-53} % Bohacekin esittämästä määrästä. Lääkekehityksessä olevissa kokoelmissa ei useinkaan ole näinkään monta yhdistettä. Esimerkiksi *European lead factory* sisältää aikanaan 500 000 yhdistettä, ja suurimmassa olemassa olevassa virtuaalisessa tietokannassakin on vain noin miljardi yhdistettä (Blum ja Reymond 2009). Kun lääkekehitykseen on mahdollista luoda vain rajallinen määrä kaikista mahdollisista yhdisteistä, niin voidaan kysyä kuinka todennäköistä on, että valittu osa kokonaisuudesta sisältää olennaisia yhdisterakenteita?

Wintner ja Moallemi (2000) ovat arvioineet, että yhdistelmäkokoelma, joka hyvin todennäköisesti sisältäisi yhden nanomolaarisella pitoisuudella jokaiseen lääkekohteeseen sitoutuvan yhdisteen, olisi koostuttava vähintään 24 miljoonasta yhdisteestä. Ajatuksen taustalla on aika raju pelkistys, sillä voisi väittää, että harvoin yksittäisestä osumayhdisteestä on paljoakaan hyötyä. Ei myöskään ole kuin epätarkkoja arvioita kaikkien lääkekohteiden määrästä ja avaruudellisesta muodosta (Overington ym. 2006; Paolini ym. 2006)⁶. Joka tapauksessa, jos 10^{62} yhdisteen kokonaisuudesta

3 Laskun perusteet esitetty kyseisen teoksen alaviitteessä a.

4 Lääkkeissä on toki hyödynnetty muitakin atomeja, kuten halogeeneja.

5 <https://www.reaxys.com/>

6 Puhumattakaan siitä, että joka päivä voi muodostua uusi virus, ja sitä kautta uusi lääkevaikutuskohde

tarkastellaan kaikkia niitä 10^7 (tai jopa pienempiä) yhdisteen näytteitä, joita siitä voisi ottaa satunnaisvalinnalla, niin 99.9 % niistä ei sisällä ainoatakaan näistä 24 miljoonasta lääkkeellisesti hyödyllisestä yhdisteestä. Olemassa olevia synteettisiä yhdisteitä ei kuitenkaan ole luotu pienmolekyyliavaruudesta tällä tavoin satunnaisesti. Ja periaatteessa jos tapa jolla ne on luotu eroaa perustavanlaatuisesti tavasta, jolla fysiologiset vaikutuskohdat muodostuvat, on mahdollista että todennäköisyys on vielä pienempi kuin satunnaisvalinnalla. Synteettinen kemia on kuitenkin jo alusta asti perustunut osittain biosynteesien matkimiseen, joten bioaktiivisten yhdisteiden joukon voisi kuvitella olevan osittain yhtäläinen synteettisten yhdisteiden joukon kanssa.

2.2 Kombinatorisen räjähdysen vaikutus tehoseulontaan ja lääkekehitykseen

Tämä kombinatoriseen räjähdyseseen liittyvä käytännön ongelma voi osaltaan selittää Scannell ym. (2012) havainnon, jonka mukaan lääkekehitykseen liittyvät kokeelliset menetelmät ja tekniikat ovat tehostuneet monin keinoin 50-luvulta, mutta uuden yhdisteen todennäköisyys läpäistä kliiniset kokeet on pysynyt vakiona. Teknologisia parannuksia ovat olleet muun muassa: kombinatorisen kemian kehitys (800-kertainen tehon lisäys), seuraavan sukupolven sekvensointimenetelmät (miljardikertainen), proteiinin rakenteen selvittäminen (300-kertainen) ja tietysti tehoseulontamenetelmät (Scannell 2012, s. 191).

Myös taloudelliset sijoitukset lääkekehitykseen ovat suurentuneet huomattavasti, mutta uusien lääkekeksintöjen suhde sijoitettujen resurssien määrään on heikentynyt mainittuna tarkasteluajankohtana 80-kertaisesti (Williams 2011; Scannell ym. 2012). Scannellin näkemyksen mukaan syyn tähän on se, että lääkeviranomaisvalvonta on tarkentunut ja sen läpäiseminen hankaloitunut. Lisäksi hänen mukaansa sellaisten validoitujen lääkekohteiden määrä on koko ajan supistunut, jotka pystyvät kilpailemaan jo olemassa olevien hyvien hoitojen kanssa. Suurin osa lääkekehityksistä lopetetaan puutteellisen tehon tai haittavaikutuksien seurauksena. (Kola ja Landis 2004). Mitä enemmän populaatiossa on variaatiota, eli mitä heterogenisemmin näyte vastaa hoitoon,

sen suuremmat näytteet on otettava, jotta tilastollinen voima säilyy (Yamanaka ym. 2006).

Lisäksi on kuitenkin vaikea kuvitella tehokkaimmankaan teknologian pystyvän tehostamaan prosesseja riittävästi aiemmin esitettyyn ideaaliin nähden, jotta kaikki fysiologian ja pienmolekyylien väliset yhteisvaikutukset voitaisiin kokeellisesti varmistaa ikään kuin automaattisesti; jopa miljardikertainen tehonlisäys on tässä yhteydessä pientä. Keskeiseksi tehtäväksi lääkekehitykseen liittyvässä seulonnassa muodostuu siis pikemminkin keksiä keinoja, joiden avulla vältetään tekemästä niin paljon turhia kokeita kuin suinkin mahdollista. Turhia kokeita voidaan luultavasti rajata pois sekä ymmärtämällä paremmin fysiologisia prosesseja ja tautimekanismeja, että toisaalta lääkekandidaattisten yhdisteiden rakenteiden muodostumisen tapoja. Kun tämä on huomattu, monet lääkeyritykset ovat alkaneet keskittyä enemmän kohdennettuihin seulontoihin, joissa seulottavien yhdisteiden kokoelma on luotu tiettyjä kohteita tai niiden ryhmiä varten (Ford ym. 2004; Rankovic 2010).

3 Seulontakokoelman luominen keskushermostossa olevaa kohdetta varten

3.1 Suodattaminen fysikaaliskemiallisten ominaisuuksien perusteella

Useammat tutkimukset ovat esittäneet joillekin molekyylien ominaisuuksille rajoja, joista poikkeaminen oletettavasti pienentää lääkekandidaatin mahdollisuuksia toimia oraalisesti annettuna lääkkeenä (Taulukko 1). Vastaavia sääntöjä käytetään tässä työssä myöhemmin arvioimaan uusien synteesimenetelmien kykyä tuottaa lääkkeellisesti hyödyllisiä yhdisteitä. Esimerkiksi kanonisoituneen lääkkeellisyyskriteeristön mukaan (Lipinski ym. 2001) kun vähintään kaksi heidän esittämänsä kriteeriä (Taulukko 1) ei täyty lääkekandidaatilta, mahdollisuudet että kandidaatti toimisi suullisesti annosteltavana lääkkeenä ovat lähes olemattomat. Aiemmassa tutkimuskirjallisuudessa on löydetty näitä raja-arvoja tarkastelemalla sekä lääkeyhdisteiden että muiden

yhdisteiden ominaisuuksista luotuja tietokantoja. Tässä kirjallisuudessa on myös oletettu, että parhaimpia tapoja rikastaa hyödyllisten yhdisteiden osuutta seulontakokeelmissa on suodattaa pois niitä yhdisteitä, joiden voidaan turvallisesti olettaa olevan hyödyttömiä.

Taulukko 1: Erilaisia fysikaaliskemiallisia raja-arvoja koostettuna useasta eri tutkimuksesta. Teoksesta Paolini ym. (2006)

	MW	PSA (Å ²)	HBA	HBD	log P	rotatable bonds	no. of atoms	charge
Lipinski (1997)	≤ 500		0 to 10	0 to 5	≤ 5.0			
Ghose (1999)	160 to 480				-0.4 to +5.6		20 to 70	
Oprea Drug-Like (2000)			2 to 9	0 to 2		2 to 8		
Egan (2000)		≤ 130			-1.0 to +5.8			
Walters (2000)	200 to 500	≤ 120	0 to 10	0 to 5		0 to 8	20 to 70	-2 to +2
Oprea Lead-Like (2001)	≤ 450		0 to 8	0 to 5	-3.5 to +4.5			
Veber (2002)		≤ 140				0 to 10		
REOS (2002)	200 to 500		0 to 10	0 to 5	-5.0 to +5.0	0 to 8		-2 to +2
Martin (2005)		≤ 150						

Keskushermoston lääkkeistä on myös tehty analyysyjä, pyrkien löytämään hyödyllistä tietoa aikaisemmin lääkkeiksi hyväksytyistä yhdisteistä (Pajouhesh ja Lenz 2005). Tätä työtä on motivoinut se, että aivoveriестeen läpäisevyyden kokeellinen varmistaminen on erittäin työlästä. Keskushermosto on tunnetusti muusta fysiologiasta hyvin eristetty kudos, jonka takia noin 98 % suolistosta systeemivierenkiertoon pääsevistä lääkkeistä ei kuitenkaan pääse keskushermostoon (Pardridge 2005).

Österborg ja Norinder (2000) ovat osoittaneet vetysidoksiin kykenevien rakenteiden⁷ määrän korreloivan erittäin voimakkaasti yhdisteen aivoveriестeen läpäisykyvyn kanssa. Tutkimuksessa esitetään yksinkertaisiksi nyrkkisäännöiksi, että 1) todennäköisyys läpäistä aivoveriестe on suuri jos vetysidoksiin kykenevien rakenteiden määrä on viisi tai pienempi⁸ ja 2) jos laskennallisesta logP:stä vähennetään rakenteiden määrä ja saadaan positiivinen numero⁹, niin kokeellinen LogBBB¹⁰ on luultavasti positiivinen.

7 Käytännössä molekyylissä olevan happi tai typpi

8 $(N + O) \leq 5$

9 $\log P - (N+O) > 0$

10 On mahdollista määrittää kokeellisesti radiokemiallisin menetelmin yhdisteen todellinen suhteellinen jakautuminen keskushermostoon ja muuhun kudokseen. LogBBB:llä tarkoitetaan tässä numeroa, joka on logaritmi yhdisteen aivokonsentraatiosta jaettuna verikonsentraatiolla.

Van de Waterbeemd ym. 1998) ovat osoittaneet, että keskushermostoon menevien rekisteröityjen lääkkeiden polaarinen pinta-ala on usein alle 90 \AA^2 ja molekyyli­massa alle 450. Clark (1999) on tutkinut keskushermostolääkkeitä ja esittänyt seuraavan lineaarisen suhteen ($n=57$, $r=0,819$, $s=0,455$, $F=112.4$) LogBBB:n ja polaarisen pinta­alan (PPA) sekä laskennallisen logP:n välillä :

$$\text{LogBBB} = (-0.0148 \pm 0.001)\text{PPA} + (0.152 \pm 0.036)\text{LogP} + (0.139 \pm 0.073)$$

Edellä mainittujen lääkkeellisyys­suodattimien lisäksi on olemassa lukuisia ”käänteisiä” suodattamia, joilla voidaan poistaa kokoelmista haitallisiin ominaisuuksiin yhdistettyjä yhdisteitä ja perusrunkoja. Johnson ym. (2009) ovat osoittaneet lääkkeiden olevan metabolisesti vakaita ja epätoksisia tietyllä kolmion muotoisella alueella kaksiulotteisessa avaruudessa (molekyyli­paino, logD). On osoitettu että rengasrakenteet ja sp^3 -hiilien määrä ovat tärkeitä ominaisuuksia lääkkeille (Lovering ym. 2009; Ritchie ja Macdonald 2009). Hughes ym. (2008) ovat osoittaneet että tietty alue kaksiulotteisessa avaruudessa ($\text{logP} > 3$ ja polaarinen pinta-ala $< 75 \text{ \AA}^2$) on myrkyllisten tai haitallisten yhdisteiden rikastama. Lisäksi on rakennettu suodattimia, jotka poistavat kokoelmista monisitoutuneisuuteen liitettyjä rakenteita sisältäviä yhdisteitä (Baell ja Holloway 2010).

Lipinski-sääntöjen noudattaminen ei kuitenkaan itsessään takaa yhdisteen olevan lääke, jonka ansiosta sääntöjen avulla kykenee luokittelemaan satunnaisen joukon lääkkeitä ja ei-lääkkeitä melko huonosti (katso esimerkiksi Rankovic ym. 2010). Frimurer ym. (2000) luokittelivat lääkkeitä ja ei-lääkkeitä Lipinski-suodattimilla, jolloin säännöt luokittelivat lääkkeitä noin 66 % lääkkeiksi, ja ei-lääkkeistä peräti 74 % lääkkeiksi¹¹. Myös Segall (2012) on tehnyt aiheesta pienen luokittelukokeen, jossa luokiteltiin Lipinski-kriteeristöllä kahdenlaisia rekisteröityjä lääkkeitä. Näistä osa oli suullisesti annettavia ja toinen osa muita teitä annettavia rekisteröityjä lääkkeitä (taulukko 2). Näiden tietojen valossa voidaan melko turvallisesti väittää, että kaikkia fysikaaliskemiallisiin ominaisuuksiin perustuvia kriteerejä on voinut käyttää

¹¹ Lääkkeiden tiedot MACCS-II Drug Data Report-tietokannasta, muiden ei-lääkkeiden tiedot Available Chemicals Directory-tietokannasta

korkeintaan suuntaa antavasti.

Taulukko 2: Lipinskin sääntöjen soveltaminen 1191 viranomaisen hyväksymään oraaliseen ja ei-oraaliseen lääkkeeseen. (Segall 2012)

	yksi tai ei yhtään rikottua kriteeriä	Enemmän kuin yksi
Oraalinen	709	59
Ei Oraalinen	333	90

3.2 Moniparametrinen aineiston suodattamisen haasteista

Suuresta valikoimasta yhdisteitä voidaan pyrkiä luomaan oleellisempi kokoelma suodattamalla. Suodattaminen voidaan tehdä algoritmisesti usealla eri aiemmin mainitun kaltaisella ehdolla peräkkäin. Tällöin hylätään aina joukko, joka ei läpäise edellistä ehtoa siirryttäessä seuraavaan ehtoon. Oheinen taulukko esittää eräässä todellisessa lääkekehitysprojektissa käytettyjä suodattamia (Taulukko 3). Suodatukseen käytettävät ehdot voidaan luoda mistä tahansa molekyylistä lasketuista tai kokeellisesti hankituista arvoista, joilla arvioidaan muun muassa ruoansulatuskanavasta imeytymisen, myrkyllisyyden, tai tehon mahdollisuutta. Suodatusta voidaan myös tehdä ennen tai jälkeen tehoseulonnan (Rankovic 2010).

Suodattamisella on kuitenkin useampia niiden käyttöä rajoittavia ominaisuuksia. Ensinnäkin suodattimien varsinaisten kriteerien on lähes poikkeuksetta perustuttava asiantuntijatietoon. Tällöin jokaisella erillisellä lääkekehitysprojektilla on omat ehdot suodatukselle, jotka opitaan tuntemaan vasta projektin edetessä. Toiseksi suodattimien välille voi muodostua ristiriitoja niin, että yksi tiukka suodatus ei jätä seuraavalle mielekäästä variaatiota mitä suodattaa (monet fysikaaliskemialliset ominaisuudet korreloivat keskenänsä). On mahdollista kehittää suhteellisen järkeviltä näyttävät suodatussäännöt, jotka poistavat lopulta kaikki yhdisteet. Ongelmia tuo vielä se, ettei useinkaan ole tilastollisesti arvioitu jotakin luottamusväliä suodattimen käyttämälle

arvolle. Ei ole selvää, onko näin yksinkertainen suodattimen käyttämä arvo mielekäs, vaan kuten muissakin tilastollisissa ongelmissa olisi mielekkäämpää arvioida jokin luottamusväli rajalle.

Kenny ja Montanari (2013) ovat tarkastelleet useita julkaisuja liittyen fysikaaliskemiallisiin lääkkeellisyyskriteereihin. Osa näistä julkaisuista tulee analyysissään täysin vastakkaisiin päätelmiin tarkastellessaan muun muassa molekyyli­massan vaikutusta yhdisteiden monisitoutuneisuuteen¹². He päättelevätkin, ettei suodatinsääntöjä tulisi soveltaa liian voimakkaasti kuten usein ilmeisesti tehdään. Laskennalliset ja kokeelliset arvot sisältävät tunnetun tai tuntemattoman virhemarginaalin, paitsi kun on kyseessä jokin yksiselitteinen ominaisuus, kuten vaikkapa atomien määrä. Tavanomainen rinnakkaisten vertauksien ongelma esiintyy suodattamisessa niin, että jos nämä suodattimet itse jokainen toimisivat vaikkapa 90 % varmasti, niin todennäköisyydet luokitella oikein halutun kaltainen yhdiste koko kriteerien joukolla on suhteellisen alhainen (35 %)¹³.

Taulukon (3) suodatinkokonaisuus siis todennäköisemmin hylkää kuin hyväksyy mielekkään yhdisteen siinäkin ideaalitapauksessa, että jokainen kriteeri on 90 % luotettava, ja että niiden luotettavuudet ovat toisistaan riippumattomat. Bayesin teoreemasta ja biologisesti epäolennaisten yhdisteiden suuresta lähtökohtaisesta suhteesta hyödyllisiin seuraa, että suodatinjoukolla todennäköisyydet hyväksyä yhdisteitä joita ei toivota ovat aina merkittävän suuret. Ne ovat ainakin riittävän suuret, jotta lopullinen joukko suodatettuja yhdisteitä varmasti sisältää monin kerroin enemmän hyödyttömiä yhdisteitä kuin hyödyllisiä.

12 Englanniksi *promiscuity*, tarkoittaa sitä kuinka moneen eri fysiologiseen vaikutuskohteeseen kyseinen yhdiste vaikuttaa samanaikaisesti.

13 Suodattamia on taulukossa kymmenen. Olettaen jokaisen olevan 90 % tarkka, ja virheiden olevan riippumattomia toisistaan, tällöin $p=0,9^{10} = 35 \%$.

Taulukko 3: Erään lääkekehitysprojektin käyttämiä kriteereitä yhdisteille johtomolekyylien valitsemisen yhteydessä. Teoksesta Segall (2011).

Ominaisuus	Kriteeri
Farmakologiset	
Potenssi kohteeseen (k_i)	<100 nM
Selektiivisyys verrattuna ei-haluttuihin kohteisiin	> 100 kertainen
Fysikaaliskemialliset	
LogP	<4
Liukoisuus veteen	< 100 μ M
Molekyylipaino	< 450 Da
Imeytymiseen liittyvät	
Caco-2-läpäisevyys	> $10 \cdot 10^{-6}$ cm/s
Puhdistuma maksan mikrosomeissa	<25 μ l/min/mg proteiinia
P-glykoproteiini siirron puute	<3
Turvallisuuteen liittyvät	
Ei P450-välitteisiä vuorovaikutusta	>1 μ M
Ei vuorovaikutusta hERG:n kanssa	> 10 mM
Sytotoksisuus HepG2-sokuissa	> 1mM

3.3 Pareto-optimoinnista ja haluttavuusfunktioiden käyttämisestä

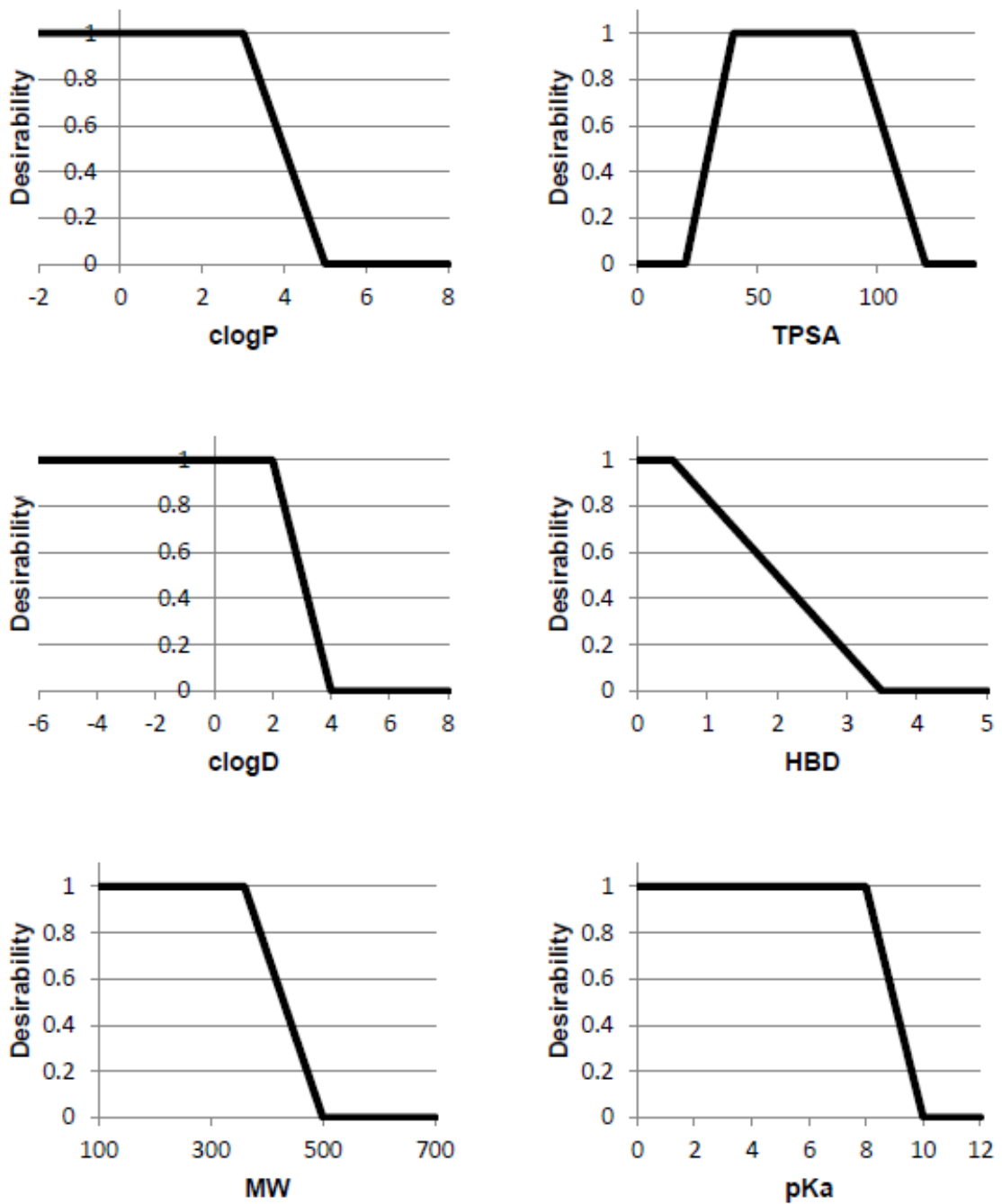
Eräs hyvin yksinkertainen ratkaisu tällaiseen tilanteeseen on yhdistää useampi parametri yhteen muuttuun. Tällöin voidaan tarkastella yhdisteiden hyödyllisyyttä kahden muuttujan rajapinnassa. Kuitenkin kun pyritään optimoimaan useampi ominaisuus yhtäaikaaisesti on mahdollista, ettei ole vain yhtä parasta yhdistelmää, vaan useampi eri lailla optimaalinen yhdiste, jolloin voidaan turvautua Pareto-tehokkuuden laskemiseen. Pareto-tehokkuus on peliteoreettinen kriteeri, jonka täyttävät joukon alkioit eivät voi parantaa asemaansa huonontamatta asemaansa toisaalla (Kell 2012). Pareto-vyöhykkeellä olevat joukon alkioit ovat joka ulottuvuudessa optimaaleja siten, ettei yksikään toinen alkio ole niitä parempi jokaisessa ulottuvuudessa, vaikka saattaakin olla eräissä. Vyöhykkeeltä lääkekehittelijä voi valita vaihtoehtoja, joista jokainen on varmasti jollakin tavalla parhaimmista.

Käsite voidaan myös yleistää, jotta se olisi tietorikkaampi ja hyödyllisempi siten, että jokaiselle alkiolle annetaan sijoitus, jolloin 0-sijoituksessa olevaa arvoa ei yksikään muu piste ole kaikkialla parempi, 1-sijoituksessa olevia arvoja ehdottomasti parempi on vain yksi muu piste ja niin edelleen (Nicolaou ym. 2012). Menetelmän avulla voidaan asettaa alkiot ordinaalijärjestykseen. Tämä voi olla hyvä asia kun ei vaikkapa tunneta mitään tapaa painottaa jotakin tiettyä fysikaaliskemiallista ominaisuutta. Pareto-vyöhykkeen pisteiden määrä kasvaa eksponentiaalisessa suhteessa käytettyjen parametrien (ulottuvuuksien) määrään, ja lääkekehityksessä usein käytetään useampaa (jopa kymmeniä) parametrejä. Tätä ongelmaa voi yrittää ratkaista summamuuttujien luomisen avulla (Kruisselbrink ym. 2009). Lisäksi alkioiden valintaa vaikeuttaa jos muuttujissa on sisäistä epävarmuutta, jolloin ordinaalijärjestyksen toteuttamiseen tarvitaan lisäsääntöjä.

Ratkaisuna kaikkiin moniparametrisiin optimointiongelmiin voidaan käyttää haluttavuusindeksiä, joka perustuu jokaiselle parametrille muuntofunktion avulla annettuun haluttavuusarvoon. Ensin parametrit muunnetaan samalle asteikolle keskenään käyttäen muuntofunktioita (yleensä arvoksi välillä 0-1), ja sitten ne yhdistetään yhdeksi indeksiksi, joka kuvaa kyseistä alkiota (tässä kemiallista yhdistettä) (Derringer 1994). Jokainen parametri voi saada aivan omanlaisen muuntofunktion ja lääkekehityksessä käytetään usein lopullisen indeksin muotona joko muunnoksien tuloa tai summaa:

$$D \equiv \frac{1}{k} \sum_{i=1}^k d_i, D \equiv \left(\prod_{i=1}^k d_i \right)^{\frac{1}{k}}$$

Wager ym. (2010) ovat esittäneet keskushermostolle suunniteltujen lääkkeiden osalle tällaiset muuntofunktiot (kuvassa 2), joiden he uskovat ennustavan kandidaatin mahdollisuuksia kliinisissä kokeissa. Tukeakseen väitettä he osoittavat usean jo käytössä olevan keskushermostolääkkeen ja -kandidaatin omaavan korkean keskushermostolääkehaluttavuusindeksin. He lisäksi antavat muutaman esimerkin toksisuus- ja ensimmäisistä kliinisistä kokeista läpäisseistä kandidaateista. Nämä eivät



Kuva 2: Esimerkkejä muuntofunktioista keskushermoston lääkekehityksen haluttavuusindeksiä varten (Wager 2010). CLogP = laskennallinen LogP, CLogD = laskennallinen LogD, MW = molekyylimassa, TPSA = arvioitu polaarinen pinta-ala, HBD = vetysidoksen vastaanottavien rakenteiden määrä, pKa = emäksisen ryhmän pKa.

aivan täytä muualla kirjallisuudessa julkaistuja lääkkeellisyysarvoja, mutta saavat kuitenkin korkean keskushermostolääkehaluttavuusindeksin. Haluttavuusindeksiin perustuva moniparametrinen optimointi on joustavaa ja voi auttaa laajentamaan tutkittavaa kemiallista avaruutta menemättä kuitenkaan liikaa rajojen yli täysin hyödyttömälle alueelle. Lisäksi menetelmällä saadaan eri yhdisteet intervalliasteikolle, ja voidaan tarkastella onko eräs yhdiste parempi kuin toinen, mutta myös *kuinka paljon parempi* se on (Segall ym. 2009).

Myös on mahdollista yhdistää laskuihin mittausvirhe tai sen arvio. Voidaan esimerkiksi valita yhdisteitä, joiden hajontapalkki on ylempänä kuin toisen yhdisteen. Voidaan myös piirtää yhdisteet kuvaajaan, jossa toisella akselilla on vaikutuksen koko ja toisella mittausvarmuus, kuten geenienilmentymiskokeissa on tapana (esimerkiksi tulivuorikuvaajalla). Silloin kuin jokin arvo puuttuu kokonaan, on mahdollista asettaa arvon luotettavuudeksi nolla, tai pyytää arvio asiantuntijalta (Segall 2012). Muutoin arvoille lasketaan luotettavuus esimerkiksi käyttäen perinteisiä frekventistisiä menetelmiä (kuten keskivirhe). Yhdisteet joiden haluttavuusindeksiä ei voida helposti erottaa toisistaan, voidaan mahdollisesti uudelleen arvioida lisäkriteerin avulla, tai vaihtoehtoisesti pyrkiä laskemaan jokin indeksiin vaikuttavista arvoista luotettavammin. Tulokset voidaan myös järjestää ainoastaan luotettavuuden perusteella ja valita näistä parhaat.

Haluttavuusindeksiin voi helposti lisätä mitä tahansa muita arvoja. Esimerkiksi myöhemmin tässä työssä käsiteltävät Feher ja Schimdt (2003) esittämät mittarit molekyylin stereokemialliselle monimuotoisuudelle antavat arvon välillä 0-1. Tämän mittarin voisi helposti yhdistää suoraan Wagerin ym. (2010) ilmoittamaan indeksiin keskushermostolle suunnatuille lääkekandidaateille.

3.4 Yhdistekokoelmien optimoiminen kokonaisuudessaan

Mistä tahansa kokoelmasta on mahdollista valikoida pieniä ryhmiä hyvin monilla tavoilla. Esimerkiksi 100 yhdisteen kokoelmasta voidaan valita biljoonittain erilaisia 10 yhdisteen joukkoja:

$${}^nC_r = \binom{n}{r}, \binom{100}{10} = 1,73 \times 10^{13}$$

Usein on tarkoituksenmukaista kokeilla toisiinsa nähden mahdollisimman erilaisia rakenteita, jolloin ei turhaan tutkita lähes yhdenmukaisia yhdisteitä (Hudson 1996, Gobbi ja Lee 2003). Samalla rakenneanalyyttiset osumat kuitenkin lisäävät tulosten luotettavuutta antaen myös mahdollisesti alustavaa tietoa yhdisteen rakenteen ja sen biologisen aktiivisuuden suhteesta. Koska kokeiltavien yhdisteiden joukon koko on aina äärellinen, mitä alhaisemmaksi samankaltaisuuden hylkäysraja asetetaan, sitä pienempi valitun joukon sisäinen monimuotoisuus on oleva.

Vakiintunut tapa arvioida yhdisteiden samankaltaisuutta on luoda molekyylien rakenteista kuvaavia lukuja, joiden samankaltaisuutta verrataan Tanimoto-vakiolla¹⁴ (Bertelli 2012). Nämä molekyyliä kuvaavat luvut ovat useimmiten yksinkertaisia numerosarjoja bittimuodossa, jossa jokaiselle rakenteelliselle ominaisuudelle määritellään totuusarvo (Nikolova ja Jaworska 2003). Tällöin ei kuitenkaan oteta huomioon molekyylien rakenteiden avaruudellisia koordinaatteja. Toisin sanoen nämä luvut eivät kuvaa molekyylien kolmiulotteista topologiaa, vaikka tällaistakin on mahdollista kuvastaa (Feher ja Schmidt 2003). Tanimoto-vakio puolestaan on eräänlainen indeksi, jonka on esittänyt Rogers ja Tanimoto (1960). Vakio kahden pisteen välillä (a ja b) k-ulottuudessa määritellään seuraavasti:

¹⁴ Samanlaisia toisistaan hiukan eroavia indeksejä on olemassa useampia.

$$T \equiv \frac{\sum_{j=1}^k a_j \times b_j}{(\sum_{j=1}^k a_j^2 + \sum_{j=1}^k b_j^2 - \sum_{j=1}^k a_j \times b_j)}$$

Vakiolla voidaan verrata kahta joukkoa molekyyilejä tai kahta molekyyliä, sillä niiden kuvaukset ovat bittien joukkoja. Vakiintuneeseen tapaan kuuluu pitää kahta yhdistettä joilla $T \geq 0,85$ rakenteellisesti riittävän samanarvoisina, jolloin ne luultavasti ovat myös biologisesti samoin aktiiveja. Seulontakokoelmia suunniteltaessa voi siten vain kylmästi jättää mahdollinen yhdiste kokoelman ulkopuolelle silloin kuin se on tämän kriteerin mukaan samankaltainen jonkin jo aiemmin valitun yhdisteen kanssa (Martin ym. 2002).

Raja-arvoksi on vakiintunut 0,85, sillä eräässä tutkimuksessa osoitettiin, että arvon ylittävillä yhdisteillä on 80 % todennäköisyys olla aktiivisia samaan kohteeseen (Brown ym. 1998). Myöhemmin on kuitenkin osoitettu, että käytäntöön johtaneissa tutkimuksissa käytettiin puutteellista lähtöaineistoa, jossa useimmat yhdisteet olivat jo lähtökohtaisesti rakenteellisesti samanlaisia. Paremmalla aineistolla tutkittuna on todettu todennäköisyyden olevan alhaisempi (luokkaa 30 %)(Martin ym. 2002). On myös olemassa esimerkkejä, joissa suurestakaan rakenteellisesta samankaltaisuudesta ei seuraa mitään samankaltaisuutta biologisessa aktiivisuudessa (Nikolova ja Jaworska 2003).

Martinin ym. (2002) tarkastelemisissa analyyseissä on käytetty Daylight-kuvaajaa¹⁵, jonka he uskovat olevan hyvä kuvaamaan yhdisteiden samankaltaisuutta syntetisoitavuuden näkökulmasta, muttei biologisen samankaltaisuuden suhteen. Biologisen samankaltaisuuden suhteen on luultavasti niin, että sen ja rakenteen välisen yhteyttä selittää useampi tekijä, eikä edellä mainitun kaltaisilla tavoilla määritelty rakenteiden samankaltaisuus selitä siitä kuin noin 43 % (Martin ym. 2002). Martin ym. arvioivat syyn tähän olevan siinä, ettei Daylight-kuvaaja kuvaa hyvin sitä intuitiivista samankaltaisuutta, jonka kemistit havaitsevat, ja että rakenteellinen samankaltaisuus määriteltynä Daylight-kuvauksin ei aina (vaikkakin usein) takaa samanlaista biologista

¹⁵ Daylight Chemical Informations Systems-yhtiön luoma menetelmä.

<http://www.daylight.com/dayhtml/doc/theory/theory.finger.html>

aktiivisuutta. Tämä ei ole varsinaisesti yllättävää, sillä Daylight-kuvaus on suhteellisen pelkistävä.

Muita vastaavanlaisia, mutta hivenen kehittyneempiä luokittelumenetelmiä on myös käytetty. Esimerkiksi menetelmä, jossa alkion ympärille luodaan pallomainen (tai pallon moniulotteinen vastine) alue, jonka oletetaan sisältävän rakenteellisesti samanlaiset yhdisteet (englanniksi *sphere exclusion*)(Hudson ym. 1996). Jokaisesta rajatusta alueesta otetaan sitten vain rajallinen määrä edustajia.

Hudsonin ym. (1996) menetelmä valitsee aina seuraavan yhdisteen satunnaisesti, mutta on mahdollista myös valita seuraava rykelmän edustaja siten, että lopputulos kattaa mahdollisimman laajasti koko alkuperäisen alan (Gobbi and Lee 2003) Kaikkien näiden etäisyyksimittareihin perustuvien luokittelumenetelmien teho laskee eksponentiaalisesti ulottuvuuksien määrän nähden (Willett 1999; Gobbi ja Lee 2003), jolloin usein joudutaan turvautumaan ulottuvuuksia vähentäviin menetelmiin kuten peruskomponenttianalyysi tai lineaarinen diskriminanttianalyysi.

Gillet ym. (2002) ovat esittäneet tavan yhdistää Pareto-optimointi ja evoluutionaarinen algoritmi yhdistekokoelman optimointiin. Kyseinen menetelmä valitsee Pareto-optimoinnin avulla yhdisteitä, joista sitten muodostetaan synteettisin muunnoksia uusia yhdisteitä, jotka puolestaan altistetaan taas optimoinnille. Optimaalisuus lasketaan yhdistekokoelman ominaisuuksien perustella: rakenteellinen monimuotoisuus, lääkkeenomaisuus (käyttää molekyylipainoa ja vetysidoksien määrää ja luonnetta apuna) ja reagenssien hinta (kun ei valita valmiiksi olevista yhdisteistä, vaan harkitaan niiden luomista). Evolutionaariset algoritmit kykenevät löytämään pienessä ajassa hyvän ratkaisun, mutta eivät välttämättä parasta ratkaisua (Jones 1990). Tämä johtuu siitä, etteivät ne välttämättä löydä kuin paikallisen maksimin. Ne ovat kuitenkin laskennallisesti tehokkaampia kuin perinteiset optimointialgoritmit.

3.5 TrkB-hermokasvutekijäreseptorin ominaispiirteitä lääkekehityksen kannalta

3.5.1 Reseptorin löytäminen ja sen toiminnan tutkimushistoria

TrkB-reseptori on eräiden hermokasvutekijöiden signaalia välittävä tyrosiinikinaasireseptorien joukko (Huang ja Reichardt 2001). Ensimmäinen hermokasvutekijä, NGF, löytyi vahingossa kun hermosolujen kasvua tutkivassa projektissa käsiteltiin käärmeenmyrkyllä soluja (myrkyn sisältämien fosfodiesterasien takia) (Levi-Montalcini 1986). Tällöin huomattiin käsittelyn lisäävän hermosolujen kasvua. Myrkystä eristettiin myöhemmin hermokasvutekijä (Nerve Growth Factor, NGF) ja sen rakenne selvitettiin 70-luvulla (Levi-Montalcini 1986).

NGF:n on osoitettu sitoutuvan TrkA-reseptoriin, joka kuuluu samaan perheeseen TrkB-reseptorin kanssa (Huang ja Reichardt 2001). TrkB:hen puolestaan sitoutuu muun muassa aivoperäinen hermokasvutekijä (Haniu et al. 1997). TrkB-reseptoria koodaava suhteellisen suuri (350 000 emäsparia) *NTRK2*-geeni (9q22.1 kromosomi) löydettiin ihmisestä seulomalla cDNA-tietokantoja, homologiamallinnuksella¹⁶ ja Northern Blot-analyysillä ilmentyvää mRNA:ta vastaan (Nakagawara ym. 1995). Vaihtoehdoisen silmukoinnin ja muiden translaation jälkeisten muutoksien avulla geeni tuottaa mahdollisesti jopa 36 erilaista proteiinia ihmisessä (Luberg ym. 2010). Osalta näistä puuttuu fosforyloituvia domeeneja tai solukalvoon sitova domeeni. Ne saattavat kuitenkin toimia solun sisällä toisten proteiinien kanssa, dimerisoitua täysmittaisen TrkB-reseptorin kanssa, tai poistaa vapaita hermokasvutekijöitä solujen ulkopuolisesta tilasta (Luberg ym. 2010). TrkB-reseptoria ilmentyy sekä keskus- että ääreishermostossa (Huang ja Reichardt 2001).

Täysmittainen TrkB (kaavio kuvassa 3) dimerisoituu aktivoituessaan itsensä kanssa, jonka seurauksena tapahtuu autofosforylaatiota reseptorin solunsisäisissä osissa olevissa tyrosiinitähteessä (Huang ja Reichardt 2001). TrkB-kasvutekijäreseptorin aktivointi

¹⁶ Sekvenssien yhtäläisyys hiirellä, rotalla ja ihmisellä noin 93 %.

johtaa ainakin kolmen eri polun kautta¹⁷ muun muassa CREB-välitteiseen geenien ilmentymisen muutokseen (Huang ja Reichardt 2001). Reseptorin yhteisvaikutukset hermostossa ovat monimutkaisia. Esimerkiksi pro-hermokasvutekijät vaikuttavat sen kautta vastakkaisella tavalla kuin valmiit hermokasvutekijät, ja TrkB voi muodostaa komplekseja muiden proteiinien kanssa.

3.5.2 Reseptorin suhde mielialasairauksiin

Hermokasvutekijöiden aikaansaamia vaikutuksia – uusien solujen syntyä, erilaistumista, eloonjäämistä ja synaptista muovautuvuutta välittää muun muassa TrkB-reseptori (Huang ja Reichardt 2001). Masennuksen hermokasvutekijähypoteesin mukaan tunnetut masennuslääkkeet saavat mahdollisesti vaikutuksensa aikaiseksi BDNF-TrkB-järjestelmän kautta. Useassa katsausartikkelissa on tarkasteltu kokonaisuudessaan masennuksen hermokasvutekijähypoteesia (Groves 2007; Castrén ja Rantamäki 2010). Tärkeimpiä tutkimuksia, joiden yleisesti uskotaan yhdistävän hermokasvutekijäreseptorit masennuksen patologiaan ovat seuraavia. On osoitettu, että masennus usein (mutta ei aina) voi aiheuttaa sekä hermoston alueiden surkastumista että hermoverkkojen poikkeuksellista toimintaa, ja että nämä molemmat voidaan lääkeinterventiolla normalisoida (Chen ym. 2008; Feder ym. 2009). Jatkuva sosiaalispsykologinen stressi aiheuttaa jyrsijöiden aivoissa atrofiaa CA3-pyramidaalisten neuronien apikaalisissa dendriiteissä (Magarinos ym. 2011). Masennuspotilailla on lisäksi osoitettu olevan alentuneita BDNF-seerumipitoisuuksia (Karege et al. 2005; Molendijk et al. 2011). Lisäksi useat tunnetut masennuslääkkeet saavat aikaiseksi lisääntyneen BDNF:n biosynteesin (Nibuya ym. 1996; Molteni ym. 2006). Lähes kaikkien masennuslääkkeiden tiedetään lisäksi lisäävän TrkB-reseptorin fosforylaatiota hiiren aivoissa (Rantamäki ym. 2007). Hermosolujen aktiivisuus itsessään on ilmeisesti apoptoosia estävä (*in vitro*), vaikkakaan tämän merkitystä kehittyneessä elävässä hermostossa ei ole vielä kunnolla tutkittu (Léveillé ym. 2010). Masennuksen hermokasvutekijähypoteesin uskottavuutta vahvistaa se, että jo olemassa

17 PI3-kinaasi/Akt, Ras/MAPK-kaskadi ja IP3-riippuvainen Ca²⁺-vapautuminen.

olevat masennuslääkkeet nostavat BDNF:n tasoja jyrksijöissä (Nibuya ym. 1995). On havaittu, että perinteiset masennuslääkkeet vaikuttavat vähemmän BDNF-poistogeenisiin hiiriin (Monteggia ym. 2007).

Eläinmalleissa on myös osoitettu yhteyksiä hermokasvutekijöiden ja käyttäytymisen välillä. BDNF:ää yli-ilmentävät hiiret osoittavat avuttomuutta pakotetussa uinnissa (*forced swim test*)¹⁸ (Govindarajan ym. 2006), ja toisaalta BDNF-poistogeeniset hiiret ilmentävät korostunutta masennuksentyyppistä käytöstä (Monteggia ym. 2007).

3.5.3 Yhdistekokoelman luomisesta erityisesti TrkB-reseptorille

Seulottavan yhdistekokoelman voisi luoda käyttäen hyväksi tietoa luonnollisen ligandin (BDNF) sitoutumisesta reseptoriin. Ei kuitenkaan ole saatavilla proteinikiteytystä, jossa itse aivoperäinen hermokasvutekijä olisi sitoutunut TrkB-reseptoriin. Tästä huolimatta hermokasvutekijöiden luonnollista sitoutumiskohtaa on tutkittu useammassa eri tutkimuksessa.

Täysmittaisen reseptorin luonnollisiksi ligandeiksi ovat osoittautuneet hermokasvutekijät BDNF, NT-3 ja NT-4 pintaplasmoniresonanssi-mittauksissa (Naylor ym. 2002). Haniu ym. (1997) ovat osoittaneet muun muassa pintaplasmoniresonanssimittauksilla ja aminohappojen järjestystä muuttaen, että BDNF sitoutuu itsenäisesti kahteen erilliseen kohtaan TrkB-reseptorissa: 1) kolmanteen leusiinirikkaaseen motiiviin, aminohappotähteet 103-181 ja 2) immunoglobuliinintyyppiseen motiiviin, tähteet 342–394.

¹⁸ Klassinen farmakologinen (behavioristinen) koeasetelma, jossa koe-eläin asetetaan uimaan 15 minuutin ajaksi astiaan, josta ei ole poispääsyä. Seuraavana päivänä asetelma toistetaan ja mitataan hiiren käyttämä aika uimiseen. Kokeen tulkinnasta on kiistely, sillä kuten kaikissa behavioristisissa asetelmissa, on vaikea aukottomasti todistaa käytöksen ja mielen tilan välinen oletettu syy-yhteys. Vaihtoehtoinen selitys on esimerkiksi, että hiiri joko oppii tai muuten vaan osaa käyttäytyä tilanteeseen nähden rationaalisesti.

Windisch ym. (1995) ovat ilmaisseet nämä kaksi osaa reseptorista erikseen ja osoittaneet kolmannen leusiinirikkaan motiivin (muttei immunoglobuliinidomeenin) sitoutuvan kaikkiin kolmeen TrkB-reseptoriin sitoutuvaan hermokasvutekijään. He arvelevat leusiinirikkaan domeenin mahdollistavan immunoglobuliinityyppisen domeenin toiminnan, joka puolestaan saa aikaan varsinaiset biologiset seuraamukset, vaikka nimenomaan sitoutumiskohtana leusiinirikas domeeni olisi tärkeämpi. Heidän mielestään tätä tukee aikaisempi Ip ym. (1993) tutkimus, jossa huomattiin, että immunoglobuliinidomeenin mutatoiminen ei estä BDNF:n sitoutumista, mutta vähentää siitä seuraavia morfologisia muutoksia (Windisch ym. 1995). Näyttää olevan niin, että eri ligandit voivat aktivoida reseptorin eri tavoilla, sillä tyrosiinitähteiden mutatoiminen vaikuttaa eri lailla onko TrkB-aktivointi BDNF vain NT-4:n välittämä (Cunningham ym. 1997).



Kuva 3: Täyspitkän TrkB-reseptorin domeenit. C = kysteiinirikas alue, Leu = Leusiinirikas alue, IG = immunoglobuliinityyppinen alue. Kuva on suomennos kuvasta teoksessa Luberg (2010).

TrkB-reseptorista on toisaalta olemassa kiteytys erään toisen hermokasvutekijän NT-4:n kanssa, sekä neljä eri kiteytystä, jossa TrkB-reseptoriin sitoutunut pienmolekyylinen antagonisti on kuvattu (Bertrand ym. 2012). ANA-12 on TrkB-estäjä, mutta se ei ilmeisesti sitoudu samaan kohtaan reseptoria kuin BDNF (Cazorla ym. 2011). Cazorla ym. (2011) käyttivät kiderakennetietoa reseptorista, ja seuloivat virtuaalisesti johtomolekyylisuodatetun joukon yhdisteitä. Näistä he valitsivat parhaimmat, ja kokeilivat näitä ELISA-pohjaisella menetelmällä. Parhaimmasta he etsivät uudelleen tietokannoista analogeja perusrungon avulla, löytäen 14, joista eräs oli suhteellisen aktiivinen.

Antagonistien lisäksi on olemassa julkaisuja, joissa kuvataan agonistisia flavonoideja (Jang ym 2010; Liu ym. 2010; Devi ja Ohno 2012; Mantilla ja Ermilov 2012). Ilmaiseksi jaettavilla ohjelmilla kuten LigBuilderilla olisi mahdollista rakentaa seulontakokoelma käyttäen hyväksi näitä rakenteita. 7,8-dihydroksiflavoni ja Jang ym. 2010 esittämät muut heikommin sitoutuvat flavonoidit soveltunevat eriomaisesti perusrungosta uusia yhdisteitä luovalle menetelmälle, jonka esittivät Renner ym. (2009).

4 Molekyylien monimuotoisuuden liittyvästä tutkimuksesta

Eräs ongelma seulontamenetelmissä on se, että vaikka kaikista olemassa olevista yhdisteistä osattaisiin valita parhaat yhdisteet kohdennettuihin seulontahankkeisiin, niin tästä ei ole kovinkaan paljon hyötyä, mikäli kaikki yhdisteet, joista voidaan valita ovat laadultaan heikkoja. Jos esimerkiksi joukko josta valinta tehdään sisältää liian keskenään samanlaisia yhdisteitä (verrattuna koko alaan, jota halutaan tutkia), niin niistä valikoiminen erilaisilla menetelmillä on luultavasti melko hyödytöntä. Tämän takia tässä kappaleessa keskustellaan hivenen erilaisista saatavilla olevien yhdisteiden lähteistä.

4.1 Perinteinen kombinatorinen kemia ja sen ongelmat

Kombinatorisen kemian menetelmiä on käytetty molekyyliarakenteiden tuottamiseen ainakin 1980-luvulta asti (Furka 1995). Näissä menetelmissä molekyyllivektorin voidaan antaa reagoida reagenssin kanssa (vakio), tai toisen molekyyllivektorin kanssa, jolloin valmistettavien kemiallisten muotojen määrä lisääntyy hyvin nopeasti (Szostak 1997) (Pieczenik 1999). Molekyyli muodot voidaan puhdistaa esimerkiksi kiinteän faasin kemialla eristämällä osia kiinteästä faasista eri reagensseille (Furka 1995), nestekromatografialla (Rankovic ym. 2010) fluorileimauksella (Morton ym. 2009), tai leimaamalla nukleotideilla yhdisteet, jolloin halutut yhdisteet voidaan myöhemmin selvittää

sekvenssointimenetelmillä (Deng ym. 2012). Näillä kombinatorisilla synteessin menetelmillä saadaan nopeasti ja edullisesti paljon erilaisia molekyyliuotoja.

Kombinatoristen menetelmien kehittäminen on myös saanut aikaiseksi kehitystä muilla rinnakkaisaloilla, esimerkiksi parempien ja nopeampien puhdistus- ja erottelumenetelmien kehittymisen (Rankovic ym. 2010). Kombinatorinen asenne on myös vaikuttanut kemian teoriaan. Muutama ryhmä on pyrkinyt myös etsimään täysin uusia kemiallisia reaktioita, tai saamaan kokeellista tietoa reaktioiden toiminnasta teorian rinnalle tehoseulontamenetelmin (Montgomery 2011), (Robbins ja Hartwig 2011)(Cabrera-Pardo ym. 2013)).

Kuitenkin jo 1990-luvulla oli selvää, ettei summittainen suurien kombinatoristen kokoelmien seulonta ollut osoittautunut kovinkaan tehokkaaksi lääkekehityksessä. Lahana (1999) kertoo eräästä varhaisesta kansainvälisestä konferenssista, jossa lääkeyhtiöiden edustajia pyydettiin arvioimaan montako johtomolekyyliä heidän yrityksensä olivat tuottaneet puhtaasti kombinatorisella kemialla ja tehoseulonnalla. Yksikään edustaja ei voinut sanoa yrityksensä onnistuneen luomaan ainuttakaan. Myöhempi katsaus mainitsee ainoastaan yhden uuden lääkemolekyylin, joka on luotu puhtaasti kombinatorisen kemian ja seulonnan avulla: sorafenibi¹⁹, jolle lääkeyhtiö Bayer sai hyväksynnän Yhdysvaltojen lääkeviranomaiselta (FDA) vuonna 2005 (Newman ja Cragg 2012). Heikon menestyksen seurauksena moni yritys muutti seulontafilosofiaansa enemmän suuntaan, jossa pyrittiin luomaan niin sanottuja kohdennettuja yhdistekokoelmia (Rankovic 2010). Samaan aikaa julkaistiin useita tutkimuksia niistä fysikaalis-kemiallisista ominaisuuksista, joita on havaittu aiemmin hyväksytyillä lääkkeillä tai toisaalta entisillä johtomolekyyyleillä, ajatuksena parantaa synteessimenetelmiä tuottamaan enemmän yhdisteitä, joilla on historiallisesti olennaiseksi osoittautuneita ominaisuuksia (lääkkeistä katso Lipinski 2001, johtomolekyyleistä katso Rishton 2003 tai Hann ja Oprea 2004).

¹⁹ Multikinaasi-inhibiittori, jonka kohteita ovat mm. RAF kinaasi, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR-beta, KIT, and FLT-3.

4.2 Luonnosta eristettyjen ja synteettisten yhdisteiden merkitys lääkekehityksessä

Syntetisoimisen lisäksi lääkekehitykseen soveltuvia kemiallisia yhdisteistä voidaan luoda eristämällä niitä luonnosta. Luonnosta myös saadaan yhdisterakenteita, joiden synteesi alusta lähtien olisi kallista ja hankalaa. Eräs pitkäkestoinen keskustelun aihe lääkekehityksessä ja tietysti erityisesti farmakognosiassa on keskustelu luonnosta eristettävien yhdisteiden tärkeydestä lääkkeiden lähteenä (Gullo ym. 2006); Newman ja Cragg 2007; Ganesan 2008; Khanna ja Ranganathan 2011; Newman ja Cragg 2012).

Monia luonnon eliöitä ei ole tutkittu lääkekehityksen näkökulmasta lähes ollenkaan (Lam 2007); meren eliöt: Faulkner ym. (2004); hyönteiset: Dossey (2010), ja suurin osa lajeista kuolee sukupuuttoon ennen kuin niitä ehditään kuvata biologisesti (Wilson 2002). Taloustieteilijät ovat jopa luoneet malleja, joilla ennustetaan jäljellä olevien huonosti tunnettujen lajien kokonaisarvo todennäköisyysteoreettisesti (katso Craft ja Simpson 2001).

Historiallisesti katsottuna luonnosta eristetyillä yhdisteillä on selvästi ollut suuri rooli uusien lääkevaikutuksien löytymisessä. Tästä johtuen useat tutkijat esittävätkin niiden olevan tärkeimpiä lähteitä lääkkeille (Manly 2009, Newman ja Cragg 2007, Ganesan 2008). Ehkä perinpohjaisin ja tunnetuin katsaus asiaan on Newmanin ja Craggin (2007) 2010, jossa on tutkittu yli 25 vuoden ajalta kaikki uudet rekisteröidyt lääkeaineet ja syöpien hoidon osalta 50 vuoden ajalta. Tässä julkaisussa kirjoittajat ovat sitä mieltä, että 1) luonnosta eristetyt yhdisteet ovat olleet merkittävässä roolissa, ja 2) siksi niitä tulisi edelleen tutkia enemmän (Newman ja Cragg 2007) sen sijaan, että pyritään kombinatorisella kemialla luomaan laajoja yhdistekokoelmia, joiden biologinen merkitys saattaa olla olematon. Katsauksen mukaan 36 % uusien vaikutustapojen lääkkeistä tuli luonnontuotteista tai niiden muunnoksista. Tämä on suurin piirtein sama suhde kuin kaikkien historian aikana keksittyjen lääkkeiden kohdalla (Swimmeny ja Anthony 2011). Toisin sanoen, kirjoittajien mukaan synteettinen kemia ei ole tarkasteluajankohtana (1980-luvun alusta 2000 luvulle) saanut aikaan juurikaan tuloksia ja sen takia lääkkeitä tulisi etsiä enemmän luonnosta (Newman ja Cragg 2007). Nämä

tulokset eivät ole muuttuneet samojen kirjoittajien päivitetystä uudemmassa versiossa samasta katsauksesta (Newmann ja Cragg 2012).

4.2.1 Synteettisten ja luonnosta eristettävien yhdisteiden eroista

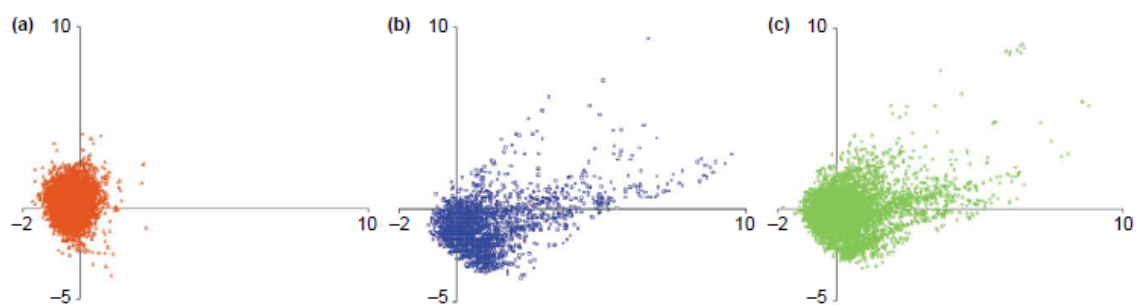
Moni tutkimus on tukenut näkemystä, jonka mukaan synteettisellä kemialla tuotetut saatavilla olevat kaupalliset yhdisteet ovat monin tavoin keskimäärin yksinkertaisempia kuin luonnosta eristetyt lääkkeiksi hyväksytyt yhdisteet. Lisäksi ne ovat keskimäärin yksinkertaisempia kuin kaikki hyväksytyt lääkkeet yhteensä alkuperästä riippumatta Lovering ym. (2009) ovat mitanneet eri lääkekehityskaaren vaiheissa olevien yhdisteiden ominaisuuksia ja todenneet lääkkeiden käyttävän muun muassa enemmän kolmiulotteista avaruutta ympärillään kuin saatavilla olevat kaupalliset (synteettiset) yhdisteet.

Feher ja Schmidt (2003)²⁰ vertasivat luonnontuotteita, synteettisiä aineita ja lääkeaineita toisiinsa fysikaaliskemiallisten ominaisuuksiensa osalta. Tuloksien perusteella näyttäisi siltä, että synteettiset yhdisteet ovat 1) suhteellisen epäkiraalisia, joka johtunee kiraalisten aineiden erottamisen teknisestä haasteellisuudesta, 2) niissä on keskimäärin kaksi vapaasti kiertyvää sidosta enemmän kuin luonnontuotteissa ja lääkeaineissa, joka puolestaan johtunee synteettisten menetelmien tavasta yhdistellä osia kovalenttisin sidoksin, ja 3) ne sisälsivät keskimäärin vähemmän renkaita, mutta enemmän yhdistyneitä rengasrakenteita. Rekisteröidyt lääkkeet ovat siis jossakin mielessä stereokemiallisesti enemmän luonnosta eristettävien, kuin synteettisten yhdisteiden kaltaisia.

On lisäksi mielenkiintoista huomata luonnosta eristettyjen rekisteröityjen lääkkeiden joukon olevan Lipinskin-sääntöjä rikkovien yhdisteiden rikastama (Ganesan 2008). Feher ja Schimdt (2003) myös suorittivat peruskomponenttianalyysin suuresta määrästä erilaisia fysikaaliskemiallisia muuttujia näille eri lähteistä saatujen yhdisteiden joukoille

²⁰ Analyysissä käytetty tieto on otettu muutamista kaupallisista tietokannoista. Luonnontuotteiden osalta: BioSPECS, ChemDiv ja InterBioScreen, synteettisten aineiden osalta: Maybridge ja ChemDiv.

(kuva 4). Peruskomponenttien ominaisvektorien he olettavat kuvaavan suhteellista monimuotoisuutta yleensä, ja näin ollessa synteettiset yhdisteet peittävät huomattavasti pienemmän alueen monimuotoisuusavaruudesta kuin luonnosta eristetyt yhdisteet. Myöhemmin Ertl ja Schuffenhauer (2008) tulivat samankaltaisiin tuloksiin suuremmalla aineistolla (n=130 000). Näiden lisäksi Lipkus ym. (2008) ovat osoittaneet, että suurin osa olemassa olevista synteettisistä molekyyleistä perustuvat samoihin perusrunkoihin. Itse asiassa, suhde perusrunkojen ja niistä johdettujen molekyylihuotojen välillä noudattaa kutakuinkin potenssilakia, jonka kirjoittajat epäilevät johtuvan taloushistoriallisista syistä. Noin 24 miljoonan orgaanisen yhdisteen joukosta puolet on rakennettu käyttäen 0,25 % prosenttia kaikista koskaan käytetyistä molekyylien perusrungoista. Yhdisteiden ja perusrunkojen mittakaavattoman verkostoitumisen voidaan ajatella johtuvan siitä, että lääkekehittelyprosessissa on ne kaksi perusfunktiota, jotka Barabásin-Albertin mallin mukaan tarvitaan mittakaavattoman verkoston muodostumiselle: 1) uusia yhteyksiä muodostuu molekyylien verkostoon (uusien synteettisten keksimisen kautta) ja 2) ne muodostuvat siten, että uudet suosivat jo hyvin yhdistyneitä entisiä molekyyliä (edelliset rungot) (Barabási ja Albert 1999). Tällöin kaikkien perusrunkoihin liittyvien muunnoksien määrän jakauma on potenssilain mukainen, eli muutama yleiseen perusrunkoon liittyy lähes kaikki muunnokset, kun useampaan perusrunkoon liittyy vain muutamia.



Kuva 4: Feher ja Schmidtin (2003) suorittaman peruskomponenttianalyysin tuloksia. A) synteettisten aineiden osalta (n=13 506) B) luonnosta eristettyjen yhdisteiden osalta (n=3287) ja C) (lääkkeiden osalta (n=10 968). Kuvassa akseleilla kahden ensimmäisen peruskomponentin ominaisvektorit, jotka osoittavat, että perinteiset synteettiset yhdisteet ovat keskenään enemmän samanlaisia kuin muut yhdisteryhmät.

4.2.2 Luonnon yhdisteet ovat ”valmiiksi validoituja ja etuoikeutettuja”

On selvää että luonto käyttää vain häviävän pientä määrää kaikista mahdollisista molekylaarisista muodoista sekä allelopaattisten kasvimetaboliittien osalta että eliöiden (lääkekehityksessä ihmisen) fysiologisten molekyylien osalta. Kun Árpád Furka löysi kymotrypsinogeeni B:n rakenteen laski hän 245 tähteestä tehtävien mahdollisten proteiinien lukumääräksi 10^{390} (Furka 1995). Voidaan olettaa ettei suurinta osaa näistä voi ilmentyä edes kerran maailmankaikkeudessa, sillä vain pieni osa niistä mahtuisi sinne. Kaikkien tunnettujen eliöiden geenien tuottamien proteiinien määrä on vain luokkaa 10^4 - 10^5 eliö kohden (Schad ym. 2011) ja Lachance ym. (2010) ovat arvioineet kaikkien luonnontuotteiden kokonaisuudeksi noin 10^6 - 10^7 , joka on häviävän pieni määrä suhteessa siihen mitä potentiaalisesti olisi rakennettavissa näistä alkupaloista.

Luonnosta eristetyt bioaktiiviset yhdisteet myös käyttävät rajatun osansa käytettävissä olevista perusrungoista. (Ertl ym. 2006) tutkivat 150 000 bioaktiivisen luonnosta otetun yhdisteen perusrunkoja, löytäen yhteensä 780 erilaista perusrunkoa. Luotuaan virtuaalisen kokoelman, jossa oli pienmolekyyliminaisuudet täyttäviä aromaattisia perusrunkoja 600 000 he osoittivat bioaktiivisten perusrunkojen olevan kapeasti jakautuneita koko virtuaaliseen avaruuteen nähden.

Lisäksi bioaktiiviset yhdisteet muodostivat toisistaan irrallaan olevia saarekkeita. Kirjoittajat huomauttavat että monet muodot ovat eliöille synteettisesti saavuttamattomissa, vaikka ne voisivatkin olla bioaktiivisia. Evoluutio ei pysty hyppäämään helposti täysin tuntemattomaan uuteen muotoon (vrt. Jacob 1977). He myös arvelevat koko virtuaalisen kokonaisuuden olevan niin laaja, ettei elämä välttämättä ikinä tarvitse niin laajaa muotojen kokonaisuutta (Ertl ym. 2006).

Suurin osa mahdollisista domeeniyhdistelmistäkään ei ilmenny luonnossa (Dunn 2010) ehkä juuri siksi, että evoluutiolla on taipumus rakentaa jo olemassa olevien muotojen päälle (Williams 1992 Jacob 1977). Esimerkiksi tässäkin työssä tutkittu reseptoriperhe kuuluu proteiinikinaasisignaalointiin, joka on säilynyt *Escherichia coli*lta ihmiselle

(Manning ym. 2002, Schlessinger 2010)). Usein sanotaankin luonnontuotteiden olevan ”valmiiksi validoituja”.

Toinen luonnontuotteiden ominaisuus on niiden taipumus sisältää niin sanottuja ”etuoikeutettuja rakenteita”. Bentsodiatsepiinejä ja peptidimimeettejä tutkinut B.E Evans käytti käsitettä *privileged structure* perusrakenteista, joista voi rakentaa (yksinkertaisesti lisäämällä funktionaalisia ryhmiä synteettisen kemian menetelmin) useampaan reseptoriproteiiniin sitoutuvia muotoja. Näiden rakenteiden on väitetty olevan olemassa, sillä biokemiallisessa synteessissä eliöiden monien rakentajaproteiinien on kyettävät tarrautumaan rakenneosiin (Breinbauer ym. 2002). Luonnontuotteiden usein väitetään sisältävän paljon ”etuoikeutettuja rakenteita” johtuen niiden biosynteettisestä rakentumisesta eliöissä (esim. (Breinbauer ym. 2002, s. 2883)(Kattava nykykatsaus: Welsch ym. 2010). Breinbauer ym. (2002) väittääkin olevan hyvin mahdollista, että bentsodiatsepiinirakenteiden kaltaisia, harvoihin domeeneihin hyvin sopeutuneita etuoikeutettuja rakenteita löytyy enemmän luonnollisista ligandeista, luonnon pyrkiessä käyttämään näitä rakenteita mahdollisimman tehokkaasti. Kemiallisia yhdistekokoelmia onkin suunniteltu ”etuoikeutettujen rakenteiden” perusteella (Nicolaou ja Pfefferkorn 2000). Seuraavaksi Breinbauer ym. (2002, s. 2884) pohtivatkin kuinka (muista eliöistä otetuilla) luonnontuotteilla on niin usein yllättäviä vaikutuksia ihmiseen ja toisaalta miksi niistä saadaan useimmin osumia seulonnassa kuin tavanomaisista synteettisistä kokoelmista. Breinbauerin mukaan on kaksi eri mahdollisuutta: 1) sattuma, tai 2) ne ovat suunnitellusti kohdennettuja näihin fysiologisiin rakenteisiin (tai niiden homologeihin).

Monilta fysiologiselta ominaisuudeltaan kasvien viholliset ovat samankaltaisia ja useammat luonnosta löytyneet farmakologisesti aktiiviset yhdisteet ovat erityisesti kasvissyöjien solujakautumiseen, solunseinämän eheyteen, ruoansulatukseen, tai hermostoon vaikuttavia aineita, kuten nisäkkäisiin vaikuttavia hermomyrkkijä (kasvialkaloidit ja muun muassa myrkyt käärmeistä ja sammakoista) (Fraenkel 1965.). Liikkumaan kykenemättöminä eliöinä kasvit tarvitsevat niitä enemmän kuin esimerkiksi nisäkkäät (Harborne ja Williams 2000).

4.2.3 Luonnosta eristettyjen yhdisteiden soveltuvuus lääkekehitykseen

Vaikka historiallisesti olisikin totta, että suurin osa lääkeaineista on löydetty luonnosta tai sitä matkimalla, tästä ei tietenkään vielä suoraan seuraa että lääkeaineita edelleen kannattaa etsiä ensisijaisesti luonnosta. On nimittäin mahdollista, että lääkkeitä on aiemmin löydetty luonnosta suhteellisen paljon johtuen muiden vaihtoehtojen puutteesta (esimerkiksi ei osattu seuloa järjestelmällisesti tai molekyyylimallintaa laskennallisesti). On myös mahdollista, että helpoiten luonnosta löydettävät ja sen parhaimmat antimet lääkekehitykselle on jo käytetty (niin sanottu *low hanging fruits*-ilmiö katso Scannell ym. 2012). On myös mahdollista, että luonnonaineissa on jokin hyvin yleinen fysikaaliskemiallinen ominaisuus, jonka siirtäminen uusiin synteettisiin yhdisteisiin olisi helpompaa ja kustannustehokkaampaa kuin luonnonaineiden eristäminen. Tällainen tekijä voisi olla vaikkapa rakenteen stereokemiallinen monimuotoisuus (ks. kappale 4.3). Monesti luonnosta eristäminen on työlästä ja eristettyä rakennetta on myös usein muokattava edelleen, jotta siitä on lääkkeeksi (Von Nussbaum ym. 2006). Näistä seikoista ei tosin myöskään seuraa, etteikö luonnosta eristettyjä yhdisteitä kannattaisi käyttää lainkaan lääkekehityksessä.

Luonnosta eristettyjen yhdisteiden vuorovaikutuksien kohteita ihmisfysiologiaan on tutkittu laskennallisesti. Dančik ja Seiler (2010) ovat osoittaneet luonnonaineiden kohdeproteiinien olevan usein lukuisammin biologisesti verkostoituneita kuin keskivertoproteiinit tai tauteihin liittyvät proteiinit. Tämä ei sinänsä ole yllättävää, sillä allelopatia on tehokasta kohdentaa viholliseläinten proteiiniverkoston keskeisiin proteiineihin, sillä keskeisyyden tiedetään korreloivan välttämättömyyden²¹ kanssa (Jeong ym. 2001, He ja Zhang 2006). Tautigeenien koodaamien proteiinien on osoitettu olevan keskitasoisesti verkostoituneita muihin proteiineihin (Jimenez-Sanchez ym. 2001; Goh ym. 2007; Feldman ym. 2008; Cai ym. 2010). Toisin sanoen sellaisia geenejä, joiden muuntuminen korreloi tautien ilmentymisen kanssa ihmispopulaatiossa,

²¹ Tässä sanalla ”välttämätön” tarkoitetaan jonkin eliön elintoiminnoille välttämätöntä ominaisuutta, tarkoittaen sitä, että tämän ominaisuuden puuttuessa eliö ei kykene elämään.

on vähemmän verkostoitumisasteen korkeimmassa ja matalamassa päässä. Tämäkin tuntuu luonteelta, sillä luultavasti aina kun ongelma kohdistuu korkeasti verkostoituneeseen (välttämättömään) proteiiniin, eliö ei ole kovin elinkelpoisen (Jimenez-Sanchez ym. 2001). Vastaavasti alhaisesti verkostoitunut fysiologinen molekyyli ei välttämättä aiheuta mitään huomattavaa toiminnallista muutosta kun sen toiminta on häiriintynyt. Analyysi (Dančik ja Seiler 2010) tehtiin vertaamalla tietoja 1) ihmisen proteiinien vuorovaikutuksesta, 2) luonnontuotteista ja niiden kohteista, sekä 3) muuntuneesta fysiologiasta sairauksissa²². Lisäksi he analysoivat olemassa olevia pienmolekyylilääkeaineita valikoiden näistä sellaisia lääkkeitä, joiden kohdeproteiineina ei ollut jonkin tunnetun luonnontuotteen vaikutuskohde²³. Nämäkin tulokset tukivat sitä näkemystä, että jo olemassa olevista rekisteröidyistä lääkeaineista – pois lukien ne jotka vaikuttavat tunnettuihin luonnonaineiden kohteisiin – suurimman osan kohteet ilmentävät lähempänä tautigeenien kuin luonnonaineiden ilmentämää verkostoitumisprofiilia (Kuva 5). Kirjoittajat uskovatkin tuloksien viittaavan siihen suuntaan, että yleensä luonnontuotteet vaikuttavat vähän sairauteen liittyviin proteiineihin.

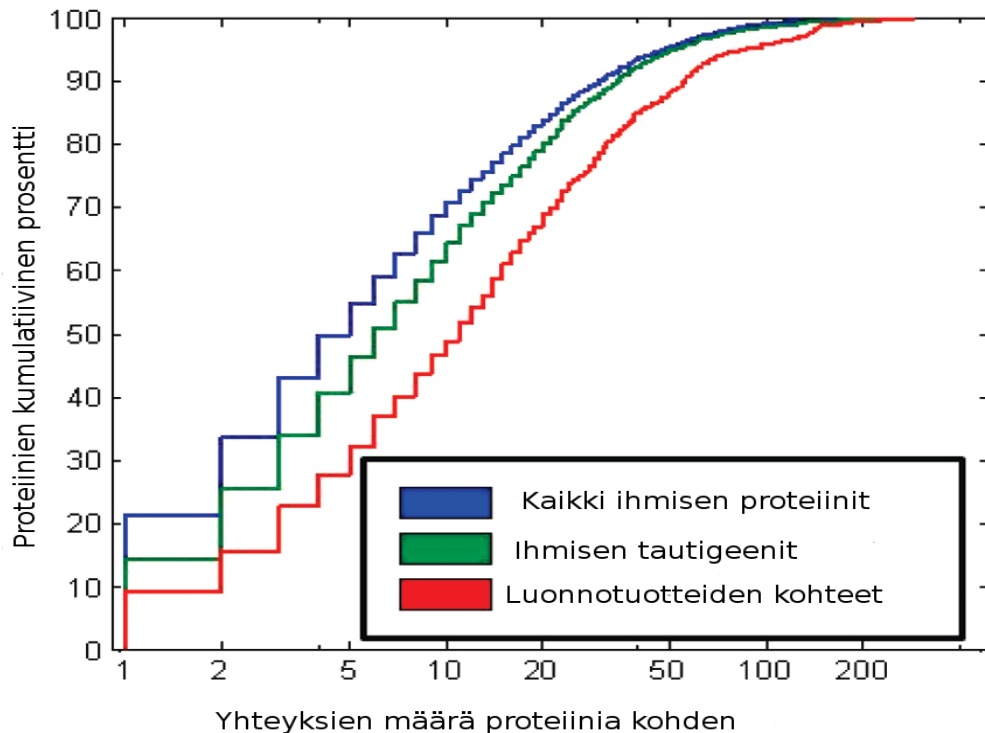
Mikäli yllä olevat päätelmät pitävät paikkansa, tämä voi myös osaltaan selittää sitä, että suurin osa biologiseen tietoon perustuvista kombinatorisen kemian synteessimenetelmistä (Kappale 4.5) ovat löytäneet lähinnä modulaattoreita monimutkaisiin biologisiin mekanismiverkostoihin kuten Wnt-signaalointiin²⁴ ja solusyklin sääntelyyn. Nämä rakenteethan perustuvat kasvien sekundaarimetaboliittien perusrungoille, ja luonnosta eristettyjen bioaktiivisten yhdisteiden joukko lienee sellaisten yhdisteiden rikastama, jotka vaikuttavat kasvissyöjien keskeisiin fysiologisiin toimintoihin.

22 Ihmisen proteiinien vuorovaikutuksien tieto otettiin STRING-tietokannasta. Tieto luonnontuotteista kaupallisesta GVKBio:n tietokannasta. Tieto sairauksista yhden nukleotidin muunnoksien tietokannasta ja listaus taudeista ja niihin liittyvien geenien sijainnista kromosomeissa OMIM Morbid Mapista..

23 Tiedot otettiin ChEMBL-tietokannasta ja DrugBankista.

24 Kyseessä on banaanikärpäselältä (*Drosophila melanogaster*) ihmiselle asti säilyneestä signaalijärjestelmästä, joka välittää solujen pintareseptorien viestiä soluliman läpi solun tumaan, jossa muuntelee geenien ilmentymistä.

Jos kasvien sekundäärimetaboliitit ja muut luonnonaineet ovat enimmäkseen allelopatiaa varten, on mahdollista ettei niistä löydy hyödyllisiä terapioida kaikkiin eri tarpeisiin. Ehkä on syytä olettaa niistä löytyvän parhaiten vierasperäisten sairautta aiheuttavien muiden eliöiden tuhoamiseen hyödyllisiä kemiallisia yhdisteitä (esimerkiksi mikrobi-, sieni- ja loislääkkeet). Luonnosta eristettyjen yhdisteiden hyödyllisyyttä korostaa sekin että fysiologiseen alkuperään vaikuttamattomilla yhdisteillä on mahdollista muokata sairauksien oireita (neuroleptit, analgeetit). Kaikkien lääkkeiden vaikutusmekanismit eivät myöskään suinkaan perustu proteiinien välisiin vuorovaikutuksiin millään tavalla (esimerkiksi luonnosta eristetyt kontaktilaksatiivit).



Kuva 5: Yhteenveto ihmisen geenituotteiden keskinäisten yhteyksien kumulatiivisista jakautumisista. Kaikki geenit ($n=8799$, mediaani=5, keskiarvo=11,7) sinisellä, sairauksiin liittyvät geenit ($n=2681$, mediaani= 6, keskiarvo 14,0) vihreällä ja luonnotuotteiden kohteiden geenit ($n=946$, mediaan=11, keskiarvo=22,5) punaisella. Teoksesta Dančik ja Seiler 2010.

Erityisesti mielialasairauksien osalta on epätodennäköistä että niiden aiheuttaja olisi yksittäisen nukleotidien muunnos, johon vaikuttamalla voisi parantaa sairaus.

Kirjoittajat tarkastelevat myös monigeenisiiä sairauksia, mutta edelleen mielialasairauksien osalta ei ole selvää mitkä geeniryhmät jos mitkään aiheuttavat niitä (Hettema 2010). On huomattava tutkimuksen (Dančik ja Seiler 2010) kirjoittajien itse olevan monimuotoisuussynteetien tutkijoita, ja että kaikissa edellä mainituissa kemoinformaattisissa tutkimuksissa on käytetty lähteinä kaupallisia tietokantoja, joiden ominaisuuksia määrittelee (ja siten aineistoa rajaa) tietyt käytännön seikat.

Synteettisten rakenteiden osalta rajaavia tekijöitä lienevät synteetimenetelmien kehittyminen, kun taas luonnontuotteiden osalta luonnosta löydettyjen matriisien ominaisuudet ja eristysteknologian kehitys, sekä ihmisen elämää (sivilisaation) läheisyydessä olleet ekosysteemit. Koska luokittelumenetelmät kuten peruskomponenttianalyysi antavat eri tuloksia eri aineistolla, on syytä miettiä miten hyvin luonnosta eristettyjen rakenteiden tietokannasta (rajallinen ja puutteellinen otos) voidaan päätellä ylipäättään mitään luonnontuotteista kokonaisuudessaan.

4.3 Monimuotoisuuteen tähtäävä synteesi (*diversity oriented synthesis*)

Koska perinteiset synteettiset yhdisteet ovat olleet rakenteellisesti yksinkertaisia ja menestyneet huonosti lääkekehityksessä, monet ovat tutkineet menetelmiä luoda monimuotoisempia yhdisteitä. Muun muassa Schreiberin tutkimusprojekti Broad-instituutissa²⁵ ja Springin projekti Cambridgessa ovat pyrkineet kehittämään menetelmiä, joilla saavutetaan enemmän rakennemonimuotoisuutta (Schreiber 2009) (Galloway ym. 2010).

Menetelmät pääosin koostuvat vanhoista kombinatorisen kemian metodeista, mutta korostavat reaktioita, jotka tuottavat kiraalikeskuksia, yhdistyneitä renkaita ja muita epätavanomaisia rakenteita (Ciolli 2002). Niissä pyritään myös käyttämään mahdollisimman kattavasti erilaisia perusrunkoja, jolloin kombinatorisen kemian avulla

25 MIT:n ja Harvardin yhteinen instituutti joka keskittyy perustutkimukseen (lähinnä genomiikassa ja bioinformatiikassa) ja tutkimuslöytöjen soveltamiseen lääkekehitykseen. Samanlaisia menetelmiä on myöhemmin harjoitettu myös pienissä määrin muualla

saadaan katettua laajempi fysikaaliskemiallinen avaruus. On osoitettu, että perusrunko vaikuttaa yhdisteen uloimpia ryhmiä enemmän yhdisteen monimuotoisuuteen (Ciolli 2000).

Samasta laitoksesta tulevan Mortonin ym. menetelmä ei myöskään käytä reaktiotuotteiden puhdistamiseen kromatografiaa, vaan fluorileimausta. Fluorileimatut yhdisteet menettävät rengasreaktiossa fluorinsa, jonka jälkeen kiinteänfaasinerottelulla poistetaan kaikki reaktioiden sivutuotteet, jossa on edelleen fluori paikallaan (Morton ym. 2009).

4.4 Monimuotoisuussynteesin soveltuvuus lääkekehitykseen

Clemons ym. (2010) loivat useasta lähteestä hankituista yhdisteistä kolme erilaista yhdisteryhmää: 1) kaupalliset²⁶ (n=6153), 2) monimuotoiset²⁷ (n=6623) ja 3) luonnossa ilmeneviä yhdisteitä (n=2477). Seuraavaksi he arvioivat jokaisen ryhmän aineiden monimuotoisuuden ja ajoivat ne 100 proteiinia vastaan mikrosirutekniikalla (Kuvat 6 ja 7). Proteiinit edustivat 145 erilaista domeeniluokitusta InterPro-tietokannan mukaan.

Mittarit monimuotoisuutta varten oli pyritty suunnittelemaan siten, ettei satunnainen atomin lisääminen ja sitä kautta koon suurentaminen itsessään tuota lisää monimuotoisuutta. Mittareina käytettiin stereogeenisten hiiliatomien suhdetta kaikkiin hiiliatomiin (suhdeluku välillä 0-1) sekä sp^3 -hybridisoituneiden hiilien suhdetta sp^3 - ja sp^2 -hybridisoituneiden hiilien summaan.

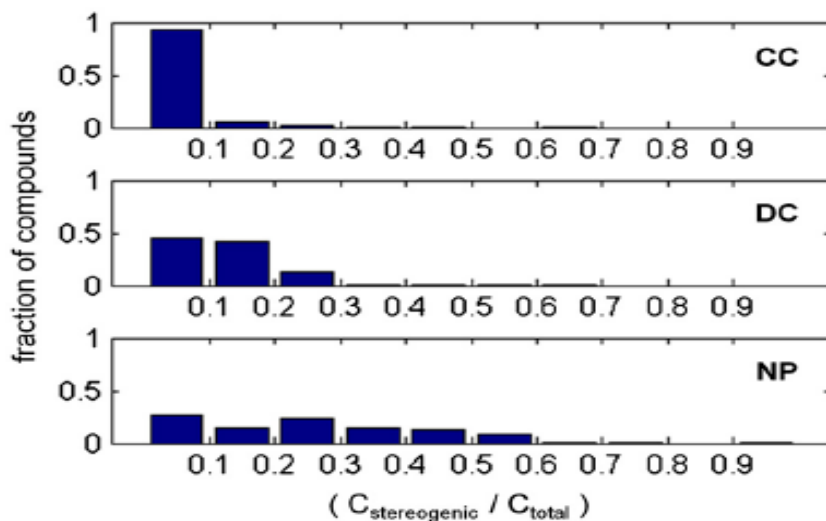
Tuloksista nähdään muun muassa stereokemiallisesti yksinkertaisten yhdisteiden sitoutuvan useampaan proteiiniin, oletettavasti koska nämä sidokset ovat epäspesifejä (Kuva 7). Ja käänteisesti, että stereokemiallisesti monimuotoiset yhdisteet sitoutuvat useimmin spesifimmin yhteen kohteeseen. Kaikkiaan 26 % monimuotoisuussynteesin yhdisteistä sitoutuivat johonkin proteiiniin mikrosirussa, mutta vain 23 % kaupallisista

²⁶ Yhdisteet valmistettiin: Chemdiv, Maybridge ja TimTec.

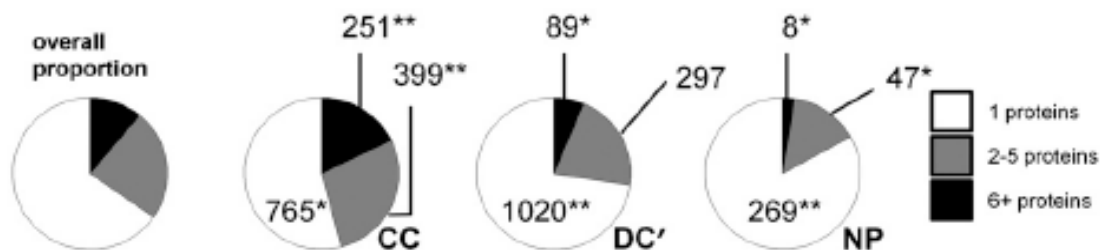
²⁷ Yhdisteet tulivat useasta akateemisesta laboratoriosta, jotka kuuluvat NIGMS Centers of Excellence in Chemical Methodology and Library Development-verkostoon, johon myös kirjoittajien oma laboratorio kuuluu.

synteettisistä yhdisteistä ja 13 % luonnontuotteista. Samalla kuitenkin monisitoutuvia yhdisteitä on kirjoittajien mukaan vähinten monimuotoisuussynteesin yhdisteissä, jos niistä vähennetään pois muutama ongelmallinen ryhmä, jotka syntyivät eräistä yksittäisistä synteesispoluista.

Periaatteessa tällainen aineiston muuntaminen analyysin jälkeen vähentää tuloksien objektiivisuutta, mutta kirjoittajien tarkoitus lieneekin ollut osoittaa, että epähaluttu monisitoutuneisuus seuraa yksittäisistä synteesispoluista. Näitä polkuja voidaan välttää jatkossa, ainakin luotaessa yhdisteitä lääkekehityskäyttöön. Kirjoittajien mukaan siis perinteiset kaupalliset yhdisteet olivat stereokemiallisesti liian yksinkertaisia, eli niissä on monisitoutuneisuutta, joka ei ole keskittynyt mihinkään tiettyihin helposti poistettaviin ryhmiin. Toisaalta heidän mielestään luonnosta eristettävät yhdisteet ovat liian kiraalisia, eli ne eivät kovinkaan usein sitoudu mihinkään.



Kuva 6: Kolmesta eri lähteestä otettujen kemiallisten yhdisteiden stereokemiallinen monimuotoisuus. Mittana on käytetty kaikkien stereokemiallisten hiilien suhdetta hiilien kokonaismäärään. Pystyakselilla on jokaisen monimuotoisuusarvon saaneiden yhdisteiden frekvenssi. CC= perinteisiä kaupallisia synteettisiä yhdisteitä, DC=monimuotoisuuteen tähtäävän synteesin yhdisteitä, ja NP=luonnosta eristettyjä yhdisteitä. Clemons ym. (2010)



Kuva 7: Kolmesta eri lähteestä otettujen yhdisteiden sitoutumisspesifisyys proteiineja vastaan. Yhdisteitä on tarkasteltu kolmen eri spesifisyyskategorian avulla (1, 2-5 ja enemmän kuin 6 sitoutumiskohdetta) . ** merkitsee odotettua suurempaa suhdetta, * pienempää. CC = kaupalliset yhdisteet NP = luonnosta eristetyt yhdisteet DC' = monimuotoisuuden tähtävien synteesiprojektien yhdisteitä, joista on poistettu eräs poikkeuksellisesti sitoutuva spironindoksoliperusteinen ryhmä. Clemons ym. (2010).

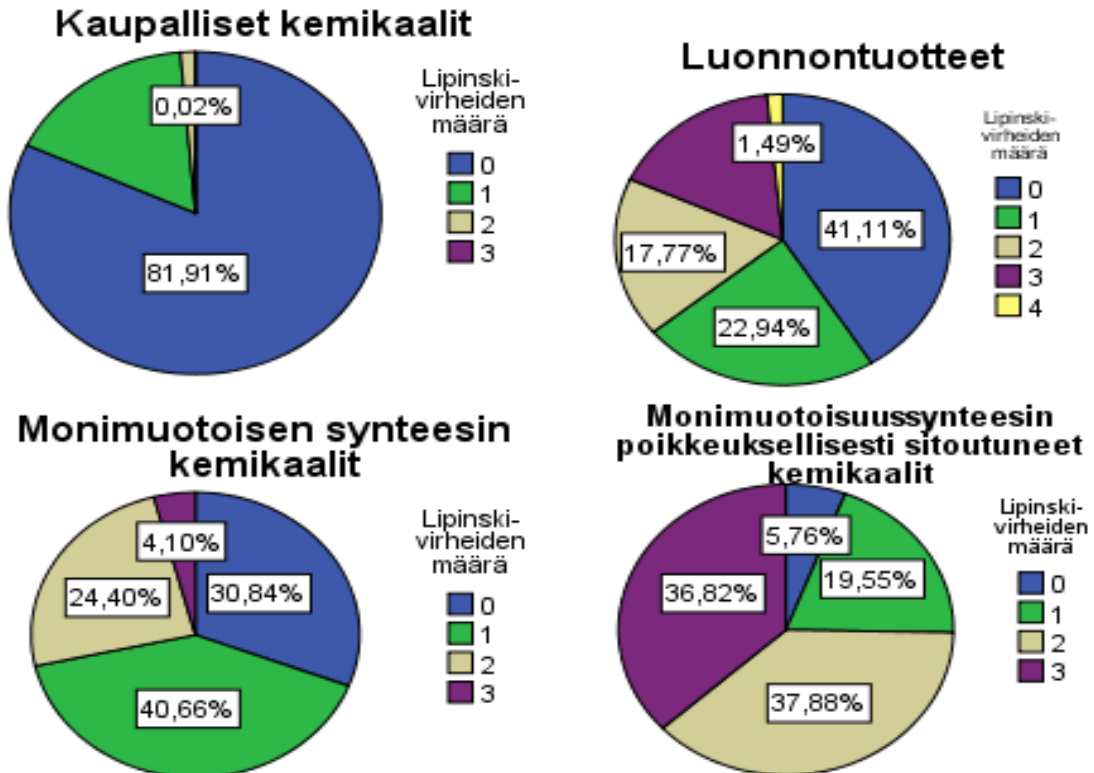
Lääkekehityksen näkökulmasta tästä analyysistä (Clemons ym. 2010) jää kuitenkin mietityttämään muutama asia, joita on mahdollista tarkastella artikkelin elektronisessa liitteessä olevan aineiston avulla. Itse artikkelista ei selviä onko monimuotoisuussynteesin yhdisteillä – tai niiden osalla jotka sitoutuvat täsmällisesti pieneen määrään proteiineja – hyviä lääkeominaisuuksia. Vai saavuttavatko ne kenties monimuotoisuutensa tavoilla, jotka tekevät niistä samalla myös huonoja lääkekandidaatteja erityisesti suullisen annostelun ollessa kyseessä.

Suorittamalla peruskomponenttianalyysi Clemons ym. (2010) antamista 4-ulotteisesta kompleksisuusarvoista voidaan luoda monimuotoisuutta kuvaava yksiulotteinen vektori joka selittää 83 % koko variaatiosta. Mittarien antamat arvot korreloivat keskenään aineiston osalta merkitsevästi (kuva 10). Kun tämä ominaisvektori piirretään kolmiulotteiseen koordinaatistoon samojen yhdisteiden molekyylipainon²⁸ ja laskennallisen logP-arvon²⁹ kanssa huomataan, että monimuotoisuussynteesin yhdisteet ovat selvästi stereokemiallisesti monimuotoisempia kuin luonnosta eristetyt yhdisteet ja kaupalliset yhdisteet. Samalla huomataan niillä olevan osittain huonot fysikaaliskemialliset ominaisuudet suullisesti annosteltaville lääkkeille (kuvassa 11). Mitään suoraa korrelaatiota ei monimuotoisuuden ja lääkkeellisyyden välillä ole, mutta perinteisiä kaupallisia molekyyliä näyttäisi erottavan muista ryhmistä niiden taipumus

28 Laskettu ChemmineR-ohjelmalla

29 Arvioitu XLogP-ohjelmalla

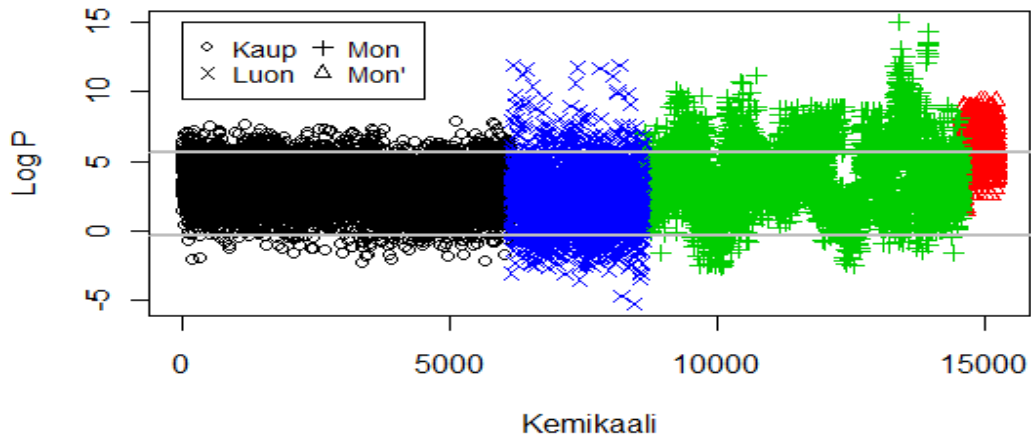
olla selkeästi klassisten lääkkeellisyyden arvojen sisällä (katso kuva 9).



Kuva 8: Clemons ym. (2010) aineisto Lipinski-sääntöjen rikkomisen mukaan. Kuvassa on esitetty jokaisesta Clemons ym. (2010) luomasta yhdisteryhmästä ne suhteelliset osuudet, jotka rikkovat tietyn määrän kriteerejä. Aineiston yhdisteiden Lipinski-kriteerien täytyminen on laskettu Chemistry Development Kitillä. Kaupalliset synteettiset yhdisteet enimmäkseen eivät tule hylätyksi kriteeristön mukaan, kun taas kaikissa muissa ryhmissä yhdisteet ovat jakautuneet tasaisemmin jokaiseen ryhmään.

Clemonsin ym. (2010) aineistosta olisi voinut ensin suodattaa pois lääkekehityksen näkökulmasta hyödyttömät yhdisteet, sekä monimuotoisuussynteesin yhdisteiden osalta, että myös kaupallisten synteettisten yhdisteiden osalta. Tällöin tulokset olisivat olleet enemmän oleellisia näkökulmasta jota kirjoittajat pyrkivät edistämään (lääkekehitys). Jos tarkastelee perinteisten kaupallisten yhdisteiden listaa, siellä on paljon yhdisteitä, joita tuskin kukaan käyttäisi lääkekehitykseen millään tavalla³⁰.

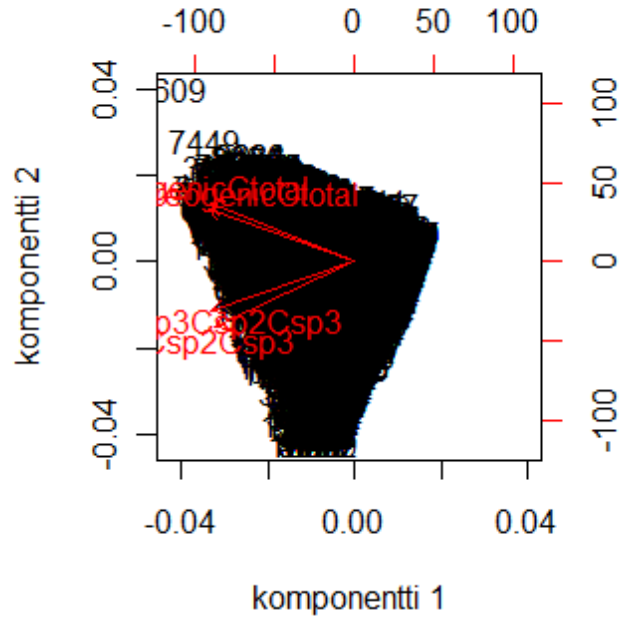
³⁰ Muun muassa yhdisteitä, jotka ovat niin pieniä, etteivät ne välttämättä sovellu edes sirpalemenetelmiin, monisitoutuneisuuteen ja toksisuuteen taipuvaisia rakenteita.



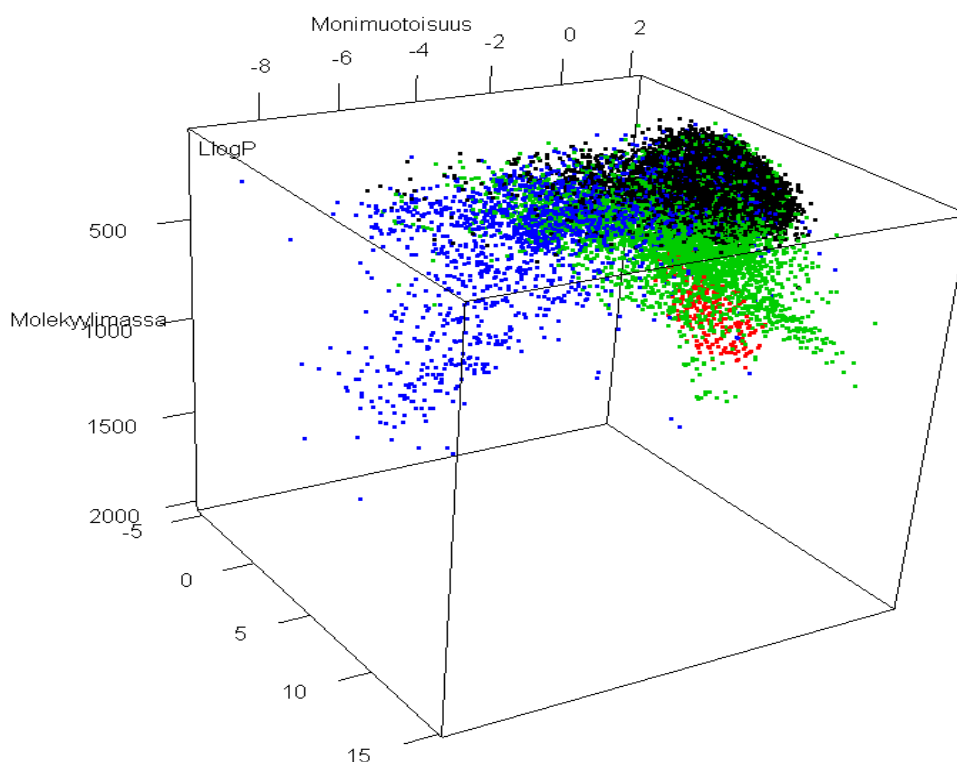
Kuva 9: Clemons ym. tutkima aineisto ja sen logP-arvot. Kuvassa on piirretty ne logP-arvojen rajat, joita pidetään yleisesti lääkkeellisyyden rajoina (arvot teoksesta Ghose 1999). Kaup= yhdisteet, jotka oli hankittu synteettisiä yhdisteitä valmistavilta yrityksiltä. Luon= yhdisteet jotka oli hankittu luonnosta eristettyjä yhdisteitä kauppaavilta yrityksiltä. Mon= DOS-metodologialla tuotettuja yhdisteitä eri julkaisuista ja Mon'= pieni joukko poikkeuksellisesti sitoutuvia monimuotoisuussynteeseillä tuotettuja yhdisteitä. Kaikista eri tavoista rikkoo lääkkeellisyyskriteerejä logP ylittämistä voidaan pitää pahimpana, ja kuvasta näkee suuren osa monimuotoisuussynteeseillä valmistetuista yhdisteistä ylittävän logP-ylärajan.

On mielenkiintoista huomata, että kaupallisista lähteistä ostetut yhdisteet ovat fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksiensa suhteen hyvin orjallisesti niiden rajojen sisällä, joita yleisesti pidetään lääkkeellisinä. Tämä johtunee pääosin siitä, että valmistajilla on ollut paineita pitää valikoimissaan tuotteita, jotka ovat kirjallisuudessa aiempina vuosina esitettyjen kriteerien rajoissa. Polaarisen pinta-alansa suhteen monimuotoisuusprojektien yhdisteet ovat enemmän perinteisten lääkeaineiden kriteerien mukaisia, eikä juuri yksikään ole yli 200 \AA^2 (ei kuvaa). Myöhemmin Dimova ym. (2012) suorittivat tarkemman analyysin monisitoutuneisuuden ja rakenteiden välillä samasta aineistosta ja löysivät tiettyjä minimaalisia muunnoksia, jotka saattoivat muuttaa yhdisteen sitoutumisasteen yhdestä proteiinista lähes 90 eri proteiiniin. Toisin sanoen vaikka perusrungon muuttaminen muuttaa monimuotoisuutta enemmän, itse sitoutuminen fysiologiseen proteiiniin ei näyttäisi noudattavan mitään näin ennakoitavaa

säännönmukaisuutta.



Kuva 10: Clemons ym. (2010) antamien tietojen korrelaation analyysi. Neljä eri monimuotoisuutta kuvaavaa muuttujaa korreloivat voimakkaasti keskenään koko aineiston osalta. Kaksi erilaista tapaa laskea avaruudellinen monimuotoisuus on ilmoitettu sekä yhdisteiden, että niiden perusrunkojen osalta.



Kuva 11: Clemons ym. 2010 aineiston yhdisteiden monimutkaisuus ja lääkkeelliset ominaisuudet. Kuvassa on Clemons ym. (2010) antamat tiedot monimutkaisuudesta suhteutettuna samoista yhdisteistä laskettuihin lääkkeellisyyteen liittyviin fysikaaliskemiallisiin ominaisuuksiin. Musta = synteettiset kaupalliset yhdisteet, sininen = luonnosta eristetty yhdisteet, vihreä=monimutkaisuuteen tähtäävän synteetin yhdisteet. Punainen = poikkeuksellisesti sitoutuva spironindoksoliperusteinen ryhmä. Kuvasta huomaa, ettei monimutkaisuus itsessään korreloi huonojen lääkeominaisuuksien kanssa.

4.5 Monimutkaisuussynteesi biologiasta lähtien (*biology oriented synthesis*)

Max Planck-instituutissa on suunniteltu monimutkaisuuteen pyrkiviä projekteja ammentaen luonnossa ilmentyvien orgaanisten aineiden rakenteista. Tähän työhön on kuulunut myös proteiinireseptorien onkaloiden luokittelu rakennesamankaltaisuuden perusteella (Koch m. 2005). Luonnontuotteidenkin luokittelua on kokeiltu, mutta tutkijat pitävät parempana ratkaisuna puun muodostamista iteroituvien sääntöin, jotka ensin poistavat yhdisteistä uloimmat funktionaaliset ryhmät, ja sitten vähentävät

renkaita tietyssä järjestyksessä.

Koch ym. (2005) ottivat yhdisteitä tietokannasta jossa oli 171 045 luonnontuotetta, pyrkivät järjestelemään nämä luokkiin käyttäen Jarvis-Patrick-luokittelua ja samanlaisuuden mittana Tanimoto-vakiota (samanlaisuuden rajana $0,9 \geq$). Kyseistä luokittelumenetelmää on pidetty hyvänä molekyylien luokitteluun, ja sen tiedetään soveltuvan hyvin aineistoon, jonka ei oleteta sisältävän epäsymmetrisiä ryhmittymiä (esimerkiksi eivät ole kolmessa ulottuvuudessa pallomaisia). Luonnosta eristettyjen yhdisteiden Jarvis-Patrick-luokittelu ei kuitenkaan onnistunut hyvin. kirjoittajat ajattelevat tämän viittaavan siihen, että yhdisteet ovat keskenään riittävän erilaisia, jottei niitä ole mielekästä luokitella edellä mainitulla tavalla (toisin kuin perinteiset synteettiset yhdisteet).

Samassa julkaisussa ilmoitetaan myös luonnosta eristettyjen yhdisteiden luokittelu puuhierarkiaan käyttäen perusrunkoja. Tällöin jokainen rakenne voidaan asettaa alisteiseksi korkeammalle rakennetasolle ja rakennetasot järjestellä monimuotoisuuden perusteella hierarkkisesti. Luokittelussa lähdetään liikkeelle synteetikemistin näkökulmasta, ja voidaan ajatella sen kuvastavan jonkinlaista luonnontuotteiden syntetisoitavuuden systemaattista puuta. Noin 90 % näistä yhdisteistä oli rengasrakenteisia (eniten oli 2-4-renkaisia rakenteita) ja näiden laskennallinen van der Wals-tilavuus oli 100-500 Å³ sekä keskiarvo 250 Å³, eli suhteellisen samansuuruisia kuin proteiinien onkalot (Nayal ja Honig 2006). Koch ym. ehdottavat että kyseistä luokitusta voi hyödyntää usealla tavalla kombinatorisen kokoelmien suunnittelussa: 1) niitä voidaan käyttää kokoelman muodostamiseen aloittamalla eräästä luonnontuotteen rakenteesta ja sen sukulaisrakenteista, tai 2) voidaan hakea halutun luonnontuotteen rakenteesta alkeellisempi rakennemuoto, jonka pohjalta pyrkii rakentamaan uusia suurempia molekyyliä, jättäen tilaa myöhemmille muunnoksille.

Julkaisusta jää epäselväksi kuinka tehokasta edellä mainittu toimintatapa varsinaisesti on, sillä luokittelu ei perustu esimerkiksi biologiseen aktiivisuuteen, biokemiaan tai evoluutioon. Tällöin oletettavasti riittävän kauan menemällä päästään mistä tahansa

puurakenteen pisteestä yhteen renkaaseen, ja on sanomattakin selvää, että siitä voi syntetisoida paljon biologisesti täysin epärelevanttejä rakenteita. Ei ole tutkimustietoa siitä kuinka tietyn tasomäärän (vaikkapa yhden) aleneminen vaikuttaa biologisesti epäolennaisten rakenteiden määrään tai jopa biologisen aktiivisuuden katoamiseen kokonaan. Kyseiset kirjoittajat kyllä löysivät 11β HSD-estäjän³¹ analysoimalla glykyrrettiinihappoa (5 rengasta), ottamalla siitä pentasyklisen alarakenteen palaamalla puussa taaksepäin 2-rengastasolle, vaihtamalla toiseen saman tason rinnakkaisrakenteeseen, ja rakentamalla tästä yhdistekokoelman (n=162). Koch ym. itsekin huomauttavat, että vaikka teoriassa voisi olla parempi käyttää luokitteluun tietoa biologisesta aktiivisuudesta, vain muutamalle tuhannelle yhdisteelle koko käytetyssä aineistossa löytyy tieteellisestä kirjallisuudesta bioaktiivisuustietoa, ja tämän tiedon laatu on kovin vaihtelevaa.

BIOS-periaatteita on sovellettu käytäntöön useissa tutkimuksissa. Esimerkiksi Basu ym. (2011) ovat suunnitelleet kohdennetun yhdistekokoelman biologisesti olennaisen perusrunkojen (*scaffold*) ympärille näin muodostaen yksi-, kaksi- ja kolmirenkaisia oksepaneja. Tämän jälkeen kirjoittajat seuloivat yhdisteet Wnt:tia³² vasten Wnt3a-proteiinin läsnä ollessa, poimien joukosta aktiivisimmat. Parhaiden aktiivien perusteella he tutkivat rakenneaktiivisuussuhdetta. Löydökset tuskin ovat kliinisesti olennaisia, mutta kuten kirjoittajat ilmaisevat, Wnt-säätelyn manipuloimisen mahdollisuus voi olla avuksi kokeellisessa tutkimuksessa. Leßman ym. loivat solusykliin vaikuttavia yhdisteitä kehitettyään erään kiinteässä faasissa toteutettavan enantiomeeriselektiivisen synteesin (Leßmann ym. 2007). He ottivat lähtörakenteeksi alfa-beta-saturoitumaton gamma-laktonirakenteen, jonka tiedetään ilmentyvän luonnossa ilmentyvissä yhdisteissä, erityisesti solujakautumista estävissä yhdisteissä, immunosuppressanteissa ja proteiinifosfataaseissa.

31 11-Betahydroksisteroididehydrogenaasientsyymiperhe katalysoi biokemiallisesti olennaisiin reaktioihin kykenemättömistä stereoidisista esituotteista aktiivisia stereoideja.

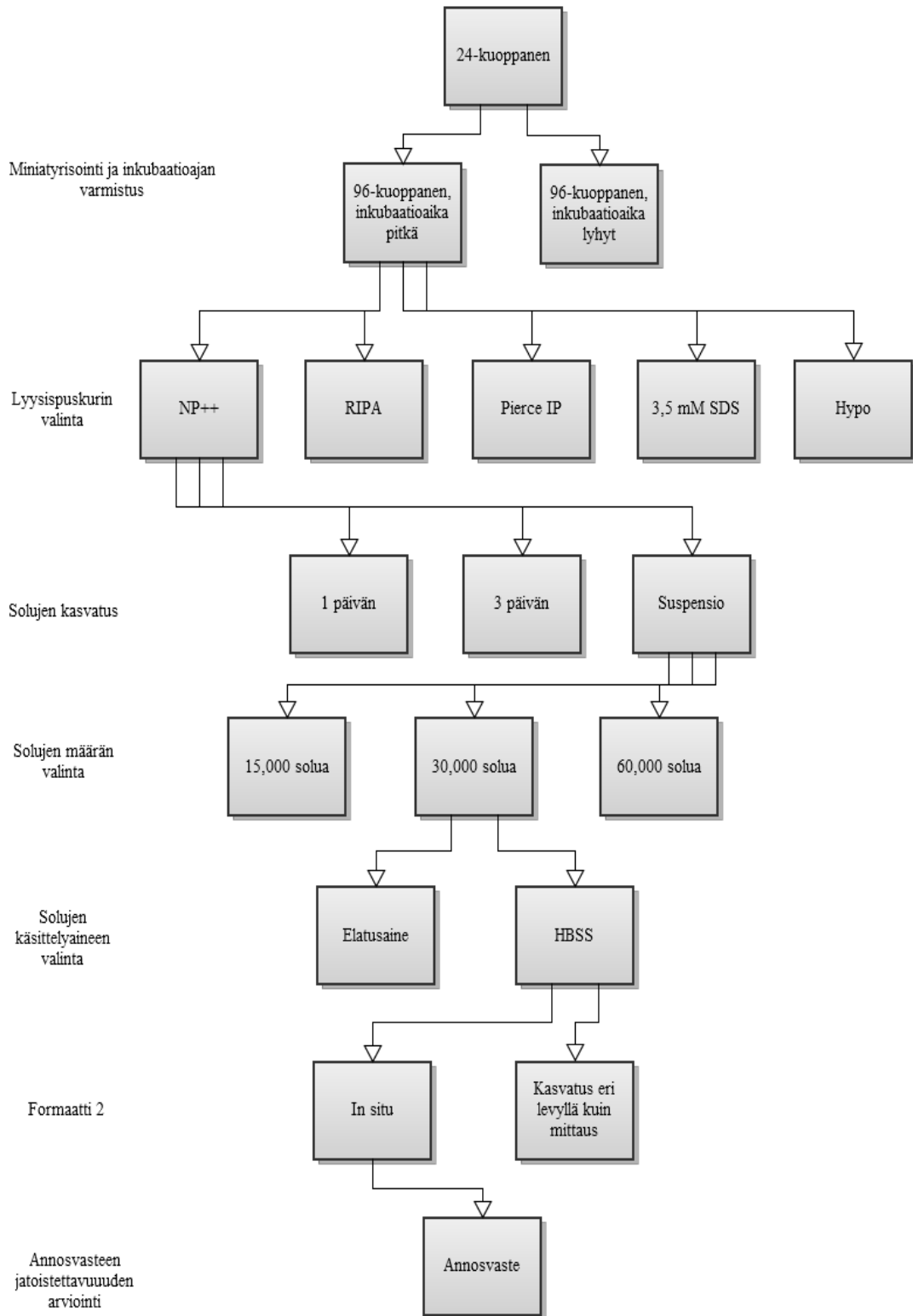
32 Wnt-proteiinit sitoutuvat solujen seinämillä oleviin reseptoriproteiineihin ja vaikuttavat mm. solujen välisiin vuorovaikutuksiin sikiönkehityksessä.

Kuten Bon ja Waldman huomauttavat BIOS-lähtöinen synteesi ja yhdisterakennepuun oksien välinen hyppely ei kuitenkaan tuota kaikkia olemassa olevia rekisteröityjä lääkkeitä (2010: 1109). Esimerkiksi menetelmällä ei voisi tuottaa monia jo olemassa olevia morfiinijohdannaisia, sillä ei ole morfiinista johdettua nelirenkaista luonnontuotetta (Wetzel ym. 2011). Täten Schuffenhauer ym. (2007) loivat 13 uutta sääntöä, joilla voidaan luotettavammin luoda kattorakenteita (*parent scaffold*). Uudet säännöt eivät vaadi alirakenteiden olevan todellisesti luonnossa ilmentyviä. Kiinteillä säännöillä on se etu luokittelualgoritmeihin, että ne tuottavat saman tuloksen riippumatta käytetystä aineistosta, eli jos aineistoon lisätään tulevaisuudessa uusia yhdisteitä, tulokset eivät muutu. Wetzelin ym. (2011) mukaan iteroituvien sääntöjen luotu puu myös sallii ”ihmisen kognitiolle sopivan skaalauksen”

5 Kokeellisen työn tarkoitus ja tausta

Seuraavaksi esitetään TrkB-reseptorille suunnitellun immunosorbenttimääritysmenetelmän (LIITE 2) miniatyrisointi ja automatisointi Biomek-työasemalla. Tämän muunnellun version toivottiin soveltuvan tehoseulontaan, joten ensisijaisesti pyrittiin toteuttamaan menetelmä Biomek-työasemalle soveltuvalla 96-kuoppalevyllä. Optimoinnin yleisinä tavoitteina oli 1) työmäärän vähentäminen ja kulujen alentaminen ja 2) työn tarkkuuden parantaminen automaatiolla ja robotiikalla ja 3) menetelmän nopeuttaminen.

Työn eri osavaiheet on esitetty tarkemmin kuvassa 12. Ensimmäisessä vaiheessa varmistettiin, että aiemmin 24-kuoppalevyillä tehty menetelmä ylipäättään toimii 96-kuoppalevyillä. Seuraavaksi varmistettiin kuinka pitkään soluja on inkuboitava hermokasvutekijän kanssa. Tämän jälkeen etsittiin sopiva lyysispuskuri, sillä reseptoreiden vapauttaminen soluista on perusedellytys reseptoreiden aktiivisuuden mittaamiselle immunosorbenttimetelmissä. Näiden jälkeen kokeiltiin solujen kasvattamisen ajan vaikutusta menetelmään, sekä mahdollisuutta käyttää soluja suspensiossa (sen sijaan että niitä kasvatettaisiin kuoppalevyyn). Sitten kokeiltiin levyn



Kuva 12: TrkB--seulontamenetelmän optimointivaiheet.

kuopissa olevien solujen määrän vaikutusta menetelmään. Elatusaineen käsittelyn hankaluuksien vuoksi katsottiin sopiiko yksinkertaisempi HBSS-liuos paremmin solujen suspension vehikkeliksi kuin aiemmin käytetty elatusaine. Muutamaa yön yli tehtävää välivaihetta kokeiltiin lisäksi lyhentää tunnin kestäviksi. Lopulta yksinkertaistettiin menetelmää vielä kokeilemalla solujen käyttämistä suoraan mittauslevyllä, niin että kaikki vaiheet kasvattamista lukuun ottamatta tehtäisiin mittauslevyllä. Tämän yksinkertaistamisen toivottiin vähentävän mittavirheiden ja muiden varioivien tekijöiden määrää. Lopullisen version BDNF-annosvatetta tutkittiin, ja samalla varmistettiin menetelmän toistettavuutta.

5.1 Materiaalit ja menetelmät

5.1.1 Materiaalit

Kaikista työssä käytetyistä materiaaleista ja laitteista on tarkempi kuvaus liitteenä (LIITE 3).

Työssä käytettiin G418-resistenttejä³³ hiiren fibroblasteja (MG87), joihin oli pysyvästi transfektoitu rotan reseptori *NTRK2*-cDNA:lla. Solulinja on muunnelmä paljon käytetystä National Institute of Healthin (NIH) linjasta 3T3. Näitä säilytettiin nestetyypessä (10 % BCS DMEM) ja viljeltiin elatusaineessa (+37 °C, 5 % CO₂) maljoilla tai kuoppalevyillä (Elatusaineen koostumus: LIITE 4). On osoitettu etteivät nämä solut tuota omaa neurotrofiini-mRNA:ta (Vesa ym. 2000).

Solut jaettiin ohjeen mukaisesti 2 kertaa viikossa (LIITE 5). Kirjallisuudesta tiedetään tämän kaltaisten kasvutapahtumien noudattavan kutakuinkin logistista funktiota, ja hajonnan kasvavan pinta-alan suhteen ajan mukana, ainakin siihen asti kun negatiiviset

³³ G418 on aminoglykosidiantibiootti, jota käytetään usein laboratorioissa geenimuunneltujen solujen valikoimiseen. Solut, joiden perimä sisältää sinne laitetun geenin kuolevat merkitsevästi suuremmalla annoksella antibiootti kuin ne, joista rakenne on poistunut, jolloin on mahdollista pitää solulinja vapaana sellaisista soluista, joilla ei ole toivottua ominaisuutta (siirretty geeni).

palauteprosessit kasvavat merkittäviksi (resurssien pula alkaa rajoittamaan kasvua)³⁴. MG87-solut alkavat kasvamaan päällekkäin saavutettuaan täyden konfluenssin.

Solujen stimuloinnissa käytettiin rekombinanttitekniikalla (*Escherichia coli*) tuotettua matuuria ihmisen BDNF:ää, jota säilytettiin pakastimessa (-70 °C) käyttöä edeltävään päivään, jolloin ne siirrettiin toiseen pakastimeen (-20 °C). Käyttöön otettaessa BDNF sulatettiin huoneenlämmössä ja liuotettiin fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen (PBS) tai Hankin puskuroituun suolaliuokseen (HBSS), jossa oli 1 % naudan seerumista eristettyä albumiinia (BSA). Lisäksi käytettiin seuraavia vasta-aineita: anti-pan-Trk (sc-11, 1:500 laimennos Optacoat-liuoksessa) anti-fosfotyrosiinivasta-aine (MCA2472 1:10000 laimennos biotinyloinnin suoritti Outi Nikkilä Neurotieteen tutkimuskeskuksessa), strepavidini-piparjuuriperoksidaasi, luminolireagenssi.

Automaattiseen nesteenkäsittelyyn käytettiin Biomek-työasemaa. Levyjen pesemiseen levynpesijää ja PBS-T-liuosta (0,05% Tween 20 PBS-liuoksessa). Solujen määrän mittaamiseen hemosytometriä. Työssä käytettiin myös sentrifugia ja levynravistelijaa.

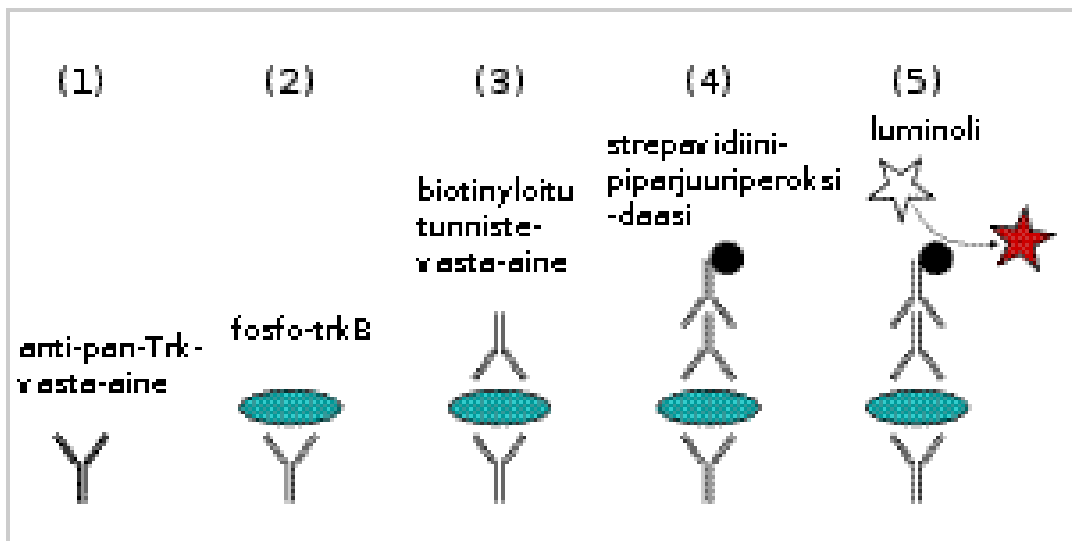
5.1.2 Solupohjaisen anti-fosfo-tyrosiinimäärityksen kuvaus

Liitteessä 2 kuvattu menetelmä perustuu vuonna 1971 kehitettyyn entsyymivälitteiseen immunosorbenttimääritysmenetelmään (ELISA) (Engvall ja Perlman 1971). Erilaisissa ELISA:an perustuvissa menetelmissä käytetään tunnistettavaan molekyyliin sitoutuvia vasta-aineita (Crowther 2001). Tähän vasta-aineeseen on liitetty entsyymi, joka reagoiessaan substraattinsa kanssa aiheuttaa jonkin signaalin. Tässä nimenomaisessa ELISA-versiossa signaali on mitattavaa valoa, ja tunnistettava muoto fosforyloitunut TrkB-tyrosiinikinaasi. Nykyään on saatavilla satoja erilaisia fosfoaminohappovasta-aineita, jotka tunnistavat tietyn fosforyloituneen aminohapon. Niitä voidaan käyttää yhdessä jonkin erottavaan menetelmään (esimerkiksi geelielektroforeesin) kanssa. Tällöin kyetään erottelemaan näytteessä mahdollisesti olevat useat samankaltaiset

34 Kasvua mallintavista yhtälöistä katso tarkemmin Kilian ym. (2008).

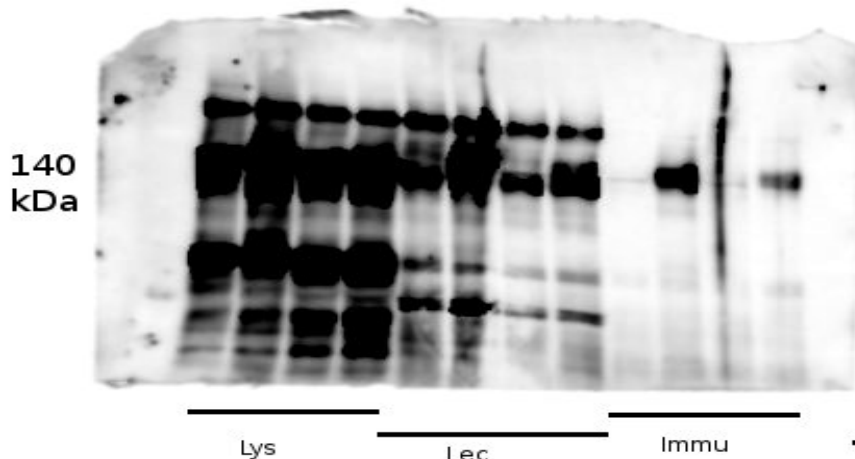
yhdisteet joihin vasta-aine sitoutuu.

ELISA, toisin kuin elektroforeettisiin erottelumenetelmiin perustuvat menetelmät, mahdollistaa tehoseulonnan kuoppalevyillä. Tässä työssä esitetyssä menetelmässä aktiivinen reseptori tunnistetaan monoklonaalisella hiiren vasta-aineella, joka tunnistaa fosforyloituneita tyrosiinitähteitä. Kyseinen vasta-aine on biotinyloitu ja sen signaalia vahvistetaan sitomalla erittäin spesifisti streptavidiini-piparjuuriperoksidaasi biotinyloituun vasta-aineeseen. Streptavidiniin liitetty peroksidaasi puolestaan katalysoi lopullisessa liuoksessa olevan luminolin hapetusta, prosessia, joka saa aikaan mitattavaa luminesenssiä (kuva 13). Aivan aluksi näytettä kuitenkin rikastutetaan toisella vasta-aineella, joka on kiinnitettyä levyn pintaan. Tämän tarkoitus on vähentää häiritsevää signaalia muista fosforyloituneista rakenteista, joita varsinainen tunnistamiseen käytettävä vasta-aine muutoin tunnistaisi. Nämä eivät sitoudu levyn pohjassa olevaan vasta-aineeseen ja peseytyvät pesuvaiheessa pois levystä.



Kuva 13: Työssä käytetty versio ELISA-menetelmästä (niin sanottu Sandwich-ELISA). Kohdassa 1 sidotaan Trk-reseptoreita tunnistavaa vasta-ainetta levyn pintaan. Seuraavaksi näyte siirretään levyyn, jolloin fosforyloituneet reseptorit sitoutuvat levyyn kiinni. Levy pestään, jolloin kaikki sitoutumatta jääneet molekyylit poistuvat. Kohdassa 3 toisella vasta-aineella tunnistetaan fosforyloituneet tyrosiinit. Näihin liitetään entsyymi kohdassa 4. Lopulta (kohta 5) levyyn asennetaan entsyymin katalysoima reagenssi, jonka ansiosta syntyy signaali jonka voimakkuus korreloi aktivoituneiden reseptorien kanssa.

Menetelmä on suhteellisen tarkka, eikä taustasignaalia tule paljon muista proteiineista. Kuvassa 14 esitetään SDS-PAGE-ajo, jossa näytteitä on ajettu ilman puhdistustoimenpiteitä, lektiinipresipitaation kanssa, ja ELISA-menetelmässä käytetyillä vasta-aineilla. Lektiinit sitoutuvat hiilihydraattirakenteisiin ja niitä voidaan käyttää muun muassa puhdistamaan seoksesta glykoproteiineja. TrkB:n stabiloituminen solukalvolle vaatii glykosylaatiota, ja solun ulkoinen domeeni on noin 33 % hiilihydraatteja (Haniu ym. 1995). Vasta-aine joka sitouttaa Trk-reseptoreita (sc-11) ottaa mukaansa vähintään ei-haluttua signaalia näytteestä (Kuva 14).



Kuva 14: Menetelmän primäärivasta-aineen rikastamiskyvyn tarkkailua. Kuvassa SDS-PAGE-ajo, Lys=puhdistamattomia lyysattuja soluja. Lec=Lektiinipresipitaatio, ja Immu=primäärivasta-aineen avulla rikastettu. Levyn pintaa sidottava vasta-aine (Immu) estää useamman muun proteiinin häiritsevää signaalia. Koska nämä muut proteiinit eivät sitoudu levynpohjaan (vasta-aineen avulla) ne poistuvat kun levy pestään inkubaation jälkeen.

5.2 Menetelmän tarkastelu eri kokoisilla kuoppalevyillä

Aikaisemmin kehitettyä menetelmää (LIITE 2) suoritettiin 24-, 48-, ja 96-kuoppalevyillä. Näiden läpinäkyvien kasvatuslevyjen kuoppiin siirrettiin kasvatusmaljalta TrkB-

transfektoituja MG87-fibroblasteja, siten että yön yli oltuaan inkubaattorissa (+37 °C, 5 % CO₂) olivat solut kiinnittyneitä levyyn ja levyt konfluentteja. Soluja stimuloitiin BDNF-liuoksilla (5 - 50 ng/mL) ja PBS:llä 30 minuutin ajan (+37 °C, 5 % CO₂). Seuraavaksi levyt siirrettiin jäille (noin 25 minuuttia), kuopat imettiin tyhjiksi, ja solut huuhdeltiin PBS:llä sekä hajotettiin NP++-puskurilla (LIITE 1). Tämän jälkeen näytteet raavittiin pipetinkärjellä irti levyn pohjasta ja siirrettiin pipetillä edellisenä päivänä valmistetulle, anti-pan-Trk-vasta-aineella (sc-11) päällystetylle (1:500), 96-kuoppalevyille (tämä valkoinen mittauslevy oli päällystyksessä ravistelijalla yön yli +4 °C). Näitä nyt päällystettyjä ja hajotettujen solujen suspensiolla annosteltuja levyjä pidettiin ravistelijalle +4 °C lämmössä yön yli. Seuraavana päivänä levyt pestiin neljä kertaa pesuliuksella (PBS-T) ja käsiteltiin tunniste-vasta-aineella (1:1000) ravistellen jälleen yön yli +4 °C lämmössä. Sitä seuraavana päivänä levyt jälleen pestiin (neljä kertaa PBS-T:llä) ja käsiteltiin streptavidini-piparjuuriperoksidaasilla (1:10 000). Viimeisenä päivänä levyt pestiin vielä kertaalleen (neljä kertaa PBS-T:llä), jonka jälkeen annosteltiin luminoli ja tehtiin luminesenssimittaus 1000 millisekunnin ajan kuoppaa kohden Varioskan-laitteella.

5.3 Levyn päällystämisen tutkiminen

Aiemmin päällystysuhde oli arvioitu, mutta nyt sen merkitystä haluttiin tarkastella tarkemmin. Valkoinen 96-kuoppalevy (mittauslevy) päällystettiin anti-TrkB-vasta-aineella (sc-11) eri laimennoksilla (1:250, 1:500, 1:1000) kuten edellä. Tämän jälkeen levy jaettiin osiin pitkittäin ja jaoksiin pipetoitiin erilaisia laimennoksia (50 µl näyte ja 150 µl vehikkeli PBS) sekä BDNF-stimuloituja (30 minuuttia, 20 ng/mL) puskurilla hajotettuja, TrkB-transfektoituja fibroblasteja, että täysin vastaavasti stimuloituja soluja ilman TrkB-reseptoria. Tämän jälkeen menetelmä suoritettiin loppuun kuten edellä.

5.4 Lyysipuskurin valinta ja konsentraation määrittäminen

Käytetty menetelmä edellyttää solujen hajottamista lyysispuskuriliuoksella ja solujen mekaanista hankaamista irti levyistä. Aiemmin laboratoriossa oli käytetty NP++-puskuria, jonka epäiltiin olevan mahdollisesti riittämätön, sillä solut näyttivät käsittelyn jälkeenkin suhteellisen eheiltä mikroskoopilla tarkasteltaessa. Ensin tarkasteltiin lyysispuskurien (RIPA, NP++, hypo. Pierce IP, 3,5 nM SDS) vaikutusta mikroskoopin avulla, joista valittiin kaksi parasta silmämääräisesti.

Sitten kokeiltiin edellä valittujen puskurien (RIPA:n ja NP++:n) eroa kvantitatiivisesti käyttämällä niitä itse tutkitussa menetelmässä. Täten samalle levyille stimuloitiin soluja (30 000 kuopassa) sekä BDNF:llä (50 ng/mL), että PBS:llä (kontrolli) ja nämä solut hajotettiin näillä eri puskureilla. Muutoin protokolla suoritettiin loppuun kuten edellä. Näin pyrittiin selvittämään onko jompikumpi puskuriliuos selvästi toista parempi ja mikä on suspensiofaasin interaktio puskurin kanssa.

Solususpensio – toisin kuin levyille kiinnitetyt solut – sisältää aina nestefaasin, joka laimentaa puskuria ja saattaa heikentää sen tehoa. Kun oli päätetty tutkia solususpension käyttöä (katso kohta 5.5), päätettiin kokeilla myös väkevämpää lyysispuskuriliuosta. Samalla levyllä suoritettiin sama menetelmä käyttäen toisella puolella aiemmin mainittua NP++-puskuria ja toisella puolella puolet vähemmän vettä sisältävää NP++-liuosta. Soluja (suspensiossa läpinäkyvässä 96-kuoppalevyssä) stimuloitiin 30 minuutin ajan BDNF:llä (50 ng/mL) ja PBS:llä (kontrolli). Sitten nämä hajotettiin ja siirrettiin päällystetylle (1:500) mittauslevylle, ja muut vaiheet suoritettiin loppuun kuten edellä.

5.5 Solujen kasvattaminen kiinni levyihin ja solujen käyttäminen suspensioina

Läpinäkyvälle 96-kuoppalevyille kasvatettiin Trk-B-transfektoituja fibroblasteja (20 000 kuoppaa kohden), antaen niiden kasvaa tässä yhden yön yli. Toiseen täysin vastaavaan levyyn laitettiin 10 000 solua ja niiden annettiin kasvaa 3 päivää. Kolmanteen vastaavaan levyyn siirrettiin maljasta irrotettuja soluja (20 000 kuopassa), joiden ei annettu kiinnittyä levyyn laisinkaan, vaan tämä levy käytettiin välittömästi solujen

annostelun jälkeen. Näitä kaikkia stimuloitiin sekä BDNF:llä (50ng/mL) että PBS:llä. Viimeinen levy käsiteltiin sekin lyysispuskurilla jäällä, mutta mekaanista irrotusta pipetin kärjellä ei suoritettu, vaan koko näyte puskureineen siirrettiin päällystettyyn valkoiseen mittauslevyyn. Tästä eteenpäin menetelmä suoritettiin loppuun kuten edellä. Näiden kokeiden avulla haluttiin arvioida ovatko muut vähemmän työläät tavat valmistaa soluja stimulointia varten, yhtä varteenotettavia kuin aikaisemmin käytetty tapa, jossa niitä kasvatetaan kolme päivää.

5.6 Solujen määrän vaikutuksen tutkiminen

Aiemman kokemuksen perusteella oletettiin menetelmän lopullisen vasteen kasvavan solujen lukumäärää nostamalla. Samalla haluttiin kuitenkin pitää solujen kasvattaminen niin vähäisenä kuin mahdollista resurssien ja työajan säästämiseksi. Näistä syistä johtuen päätettiin kokeilla solumäärän vaikutusta mittausvasteeseen annostelemalla samalle läpinäkyvälle 96-kuoppalevyille solususpensiota erilaisin laimennoksien, (15 000 - 60 000 solua kuoppaa kohden) jotka altistettiin samoille olosuhteille. Nämä stimuloitiin BDNF:llä (50 ng/mL, 30 minuuttia), hajotettiin ja pidettiin jäällä, kunnes siirrettiin edellisenä päivänä päällystettyyn mittauslevyyn, ja jatkettiin menetelmä loppuun jälleen kuten edellä.

5.7 Solususpensio Hankin puskuroidussa suolaliuoksessa elatusaineen sijaan

Solujen käsitteleminen HBSS-suspensiossa on monella tapaa käytännöllisempää kuin niiden käsitteleminen elatusainesuspensiossa. Esimerkiksi HBSS, joka ei juurikaan sisällä muuta kuin ioneja vesiliuoksessa, ei vaahtoa pipetoitaessa samoin kuin sokereita ja aminohappoja sisältävä elatusaine. Tällainen eroavaisuus voi vaikuttaa olennaisesti menetelmän soveltuvuuteen automatisoituun nesteenkäsittelyyn.

Tahdottiin selvittää vaikuttaako se menetelmän mittausvasteeseen, jos soluja pitää stimuloinnin ajan HBSS:ssä elatusaineen sijaan. Samalle päällystetylle (1:500)

valkoiselle 96-kuoppalevyllä siirrettiin sekä BDNF- (50 ng/mL), että HBSS-stimuloituja fibroblasteja sekä elatusainesuspensiossa ja HBSS-suspensiossa (30 000 kuopassa, toisella puolella levyä solut HBSS-suspensiossa ja toisella elatusainesuspensiossa). Menetelmä suoritettiin muutoin loppuun kuten edellä.

5.8 Inkubaatioajan pituus aivoperäisellä hermokasvutekijällä

Koska ei ollut selkeää tietoa inkubaatioajan vaikutuksesta vasteeseen tässä menetelmässä, tutkittiin asiaa vertailemalla eri pituisia stimulaatioaikoja muutoin vastaavissa olosuhteissa.

Soluja stimuloitiin suspensiossa BDNF:llä (5 ng/mL ja 50 ng/mL) 96-kuoppalevyllä sekä 30, että 40 minuutin ajan, jonka jälkeen solut hajotettiin ja annosteltiin päällystetylle mittauslevylle. Toisessa levyssä verrattiin myös 30 minuutin inkubaatiota viiden minuutin inkubaatioon.

5.9 Menetelmän siirto kokonaisuudessaan mittauslevylle

Tehoseulontamenetelmissä on luonnollisesti, ettei ole välivaiheita joita ei voida automatisoida. Miniatyrisoinnissa nesteiden pintaominaisuudet alkavat vaikuttamaan paljon, sillä pinta-alan suhde tilavuuteen kasvaa merkitsevästi. Tämän takia haluttiin kokeilla olisiko mahdollista suorittaa kaikki menetelmän vaiheet yhdellä levyllä (mittauksessa käytetty valkoinen 96-kuoppalevy). Solususpensiot (HBSS:ssä) annosteltiin suoraan päällystetylle mittauslevylle ja inkuboitin siinä (50 ng/ml BDNF, ja HBSS). Tämän jälkeen solut hajotettiin puskurilla suoraan levyllä jäällä. Protokolla suoritettiin muutoin loppuun kuten edellä. Tätä verrattiin aiemmin suoritettuun menetelmään, jossa solut ensin annostellaan ensimmäiselle levyllä stimuloitavaksi ja puskurilla hajotettavaksi, ja vasta tämän jälkeen siirretään mittauslevylle.

5.10 Mittausajan vaikutuksen tarkasteleminen

Peirce reagenssimanuaalissa oli ilmoitettu signaalin olevan vakaa 30 minuutin ajan sekoittamisesta. Kuitenkin päätettiin katsoa onko se jollakin hetkellä selvästi kaikista parhaimmillaan. Täten soluja stimuloitiin BDNF:llä mittauslevyllä (50 ng/mL), suoritettiin menetelmä loppuun muutoin kuten edellä. Tämän jälkeen suoritettiin mittaus 10-40 minuuttia loppureagenssin lisäämisestä.

5.11 Menetelmän nopeuttamisen yrittäminen inkubaatiovaiheita lyhentäen

Menetelmän eräs selvä heikkous on sen kesto, ja siksi pyrittiin selvittämään voisiko sitä lyhentää inkubaatioaikoja lyhentämällä. Kolme levyä tehtiin samalla kertaa kaikenpuolin vastaavasti, paitsi että toisessa sekä kolmannessa levyssä menetelmän viimeisimmät inkubaatioajat (tulevina päivinä) lyhennettiin. Toisessa levyssä lyhennettiin vain yksi inkubaatio ja kolmannessa molemmat. Perinteisesti inkubaatio oli tapahtunut ravistelijalla yön yli +4 °C lämmössä, kun lyhennetyt inkubaatiota tehtiin ravistelijalla huoneenlämmössä tunnin ajassa.

5.12 Aivoperäisen hermokasvutekijän annosvasteen määrittäminen

Haluttiin selvittää BDNF:n annosvaste menetelmässä. Päälystetylle mittauslevylle, johon oli annosteltu 20 000 Trkb-transfektoitua fibroblastia HBSS:ssä, annosteltiin BDNF:ää eri annoksilla. Annoksen valittiin siten, että arvioitiin yhtälön tuleva keskipiste hivenen oletettua EC_{50} -arvoa (25 ng/mL) ylemmäksi, ja otettiin 3 mittauspistettä (20, 50, 80 100 ng/mL) sen molemmin puolin. Lisäksi levyistä poistettiin kaikista reunimmaisista kuopista käytöstä, jotta reunailmiöt häiritsevät vähemmän arviointia (n=6). Protokolla suoritettiin muutoin loppuun kuten edellä.

5.13 Levyjen sisäisen sekä levyjen välisen toistettavuuden arviointi

Menetelmän toistettavuuden ja luotettavuuden arvioimiseksi, suoritettiin kaksi koetta. Ensimmäisessä laitettiin eri puolille päällystettyä mittauslevyä samoilla BDNF-annoksilla (100 ng/ml) stimuloituja soluja (20 000 solua kuopassa). Tämän jälkeen edettiin kuten edellä.

Toisessa kokeessa taas valmistettiin kaksi samanlaista annosvastelevyä täysin samoilla annoksilla (20-100 ng/mL) ja samoissa olosuhteissa. Näiden kokeiden avulla oli tarkoitus selvittää ilmeneekö levyissä variaatiota levyn paikan mukaan, ja minkälainen variaatio mittauksissa on, jos menetelmän tekee sama ihminen saman protokollan mukaan. Näissä kokeissa seurattiin NIH:n Assay Guidance Manual-ohjetta.

5.14 Dimetyylisulfoksidiherkkyyden arviointi

Seulonnessa käytettäviä yhdisteitä säilytetään ja annostellaan usein dimetyylisulfoksidiliuoksina (DMSO), jonka takia menetelmän luotettavuutta lisää DMSO:n vaikutuksen tunteminen. Pinnoitetulle (1:500) Optiplat-levylle siirrettiin 20000 solua kuoppaan. Soluja stimuloitiin (30 min) 100 ng/ml BDNF:llä. Lisäksi luotiin rinnakkainen levy, johon lisättiin lisäksi 1 % tilavuudesta DMSO:ta, seuraten Assay Guidance Manualia. Tämän jälkeen protokolla suoritettiin loppuun. Tarkoituksena oli selvittää aiheuttaako DMSO muutoksia mittaustuloksiin millään tavalla, esimerkiksi olemalla haitallinen soluille.

5.15 Tulosten käsittely

Menetelmien ja sen eri muunnoksien laadun arviointiin on käytetty tehoseulontakirjallisuudessa yleisesti käytettyjä vaikutuksen koon mittareita: Z' , S/N, S/B (Zhang ym. 1999; Bollini ym. 2002).

$$Z' = \frac{|\mu_s - \mu_t| - (3\sigma_s + 3\sigma_t)}{|\mu_s - \mu_t|} \quad S/B = \frac{\mu_s}{\mu_t} \quad S/N = \frac{(\mu_s - \mu_t)}{\sqrt{\sigma_s^2 + \sigma_t^2}}$$

Varianssistabiloivia muunnoksia on käytetty tarvittaessa, ja kun Levenen testi tai muu syy sai epäilemään suurta heteroskedastisuutta³⁵ käytettiin Welch–Satterthwaite-yhtälöä.

Yhtäläisyyden arvioimiseen on käytetty Schuirmannin TOST-testiä³⁶ seuraten Wellekin (2003, s. 12) suosituksia yhtäläisyysrajojen valitsemisessa. Tämä on periaatteessa yhtä kuin suorittaa kaksi yksisuuntaista Studentin t-testiä. Wellekin mukaan lähes aina kannattaa tehdä koe molempiin suuntiin, vaikka lähtökohtaisesti on suurta syytä olettaa, ettei esimerkiksi DMSO:n lisääminen yleensä parantaisi minkään solumenetelmän vaikutusta.

Varianssianalyysiin on käytetty Jonkheere-Tepstra-testiä (Neuha 1998) tai Kruskall-Wallis-testiä ja soveltuvia *post hoc*-analyysyjä. Hecke (2012) on osoittanut Kruskall-Wallis-testin olevan klassista varianssianalyysiä voimakkaampi, kun jakaumat eivät ole samankaltaisia. Myös Mann-Whitney-Wilcoxon-kokeella on osoitettu $3/\pi$ asymptoottinen tehokkuus normaaliuden vallitessa (Lehmann 1999), mutta nämä ovat huomattavasti parempia mittauspisteiden jakautuessa parametrisille menetelmille sopimattomilla tavoilla. Jonkheere-Tepstra-testiä on käytetty kun vaikutuksen suunnan on perustellusti voinut olettaa olevan yksisuuntainen.

Levyn paikkavaikutuksien ollessa läsnä usein minkään sovitetun mallin residuaalit eivät ole normaalisti jakautuneita. Näiden vaikutuksien analyysissä on käytetty Tukeyn mediaanipuhdistusalgoritmia (Tukey 1977)

35 Varianssien lineaarisen yhdistämisen vaikutus vapausasteeseen arvioitu Welch–Satterthwaite-yhtälöllä.

36 Suoritetaan kaksi yksisuuntaista t-testiä erikseen sekä alarajalle että ylärajalle.

Annosvaste yhtälön luomisessa sovitettiin neliparametrinen logistinen yhtälö (Findlay ja Dillard 2007) Levenberg–Marquardt-algoritmilla. Sama yhtälö sovitettiin samaan aineistoon myös käyttäen Koenkerin (2005) kuvaamaa kvantiiliregressioanalyysimenetelmiä. Nämä ovat paitsi robusteja, ne myös antavat jonkinlaista osviittaa ennustettujen pisteiden mahdollisesti virheestä.

Kaikissa laatikkokuvioissa on seurattu Tukeyn (1977) käytäntöjä. Esimerkiksi niissä esitetään laatikon pituus kvartaalien välisenä alueena ja puolitoista kertaa tämä alue viiksien reunoina siten että ulkopuolelle jäävät mittauspisteet on merkitty ympyrällä. Kaikissa keskiarvoja käyttävissä kuvaajissa on sen sijaan käytetty keskivirhettä palkkien hajonnan ilmaisemiseen.

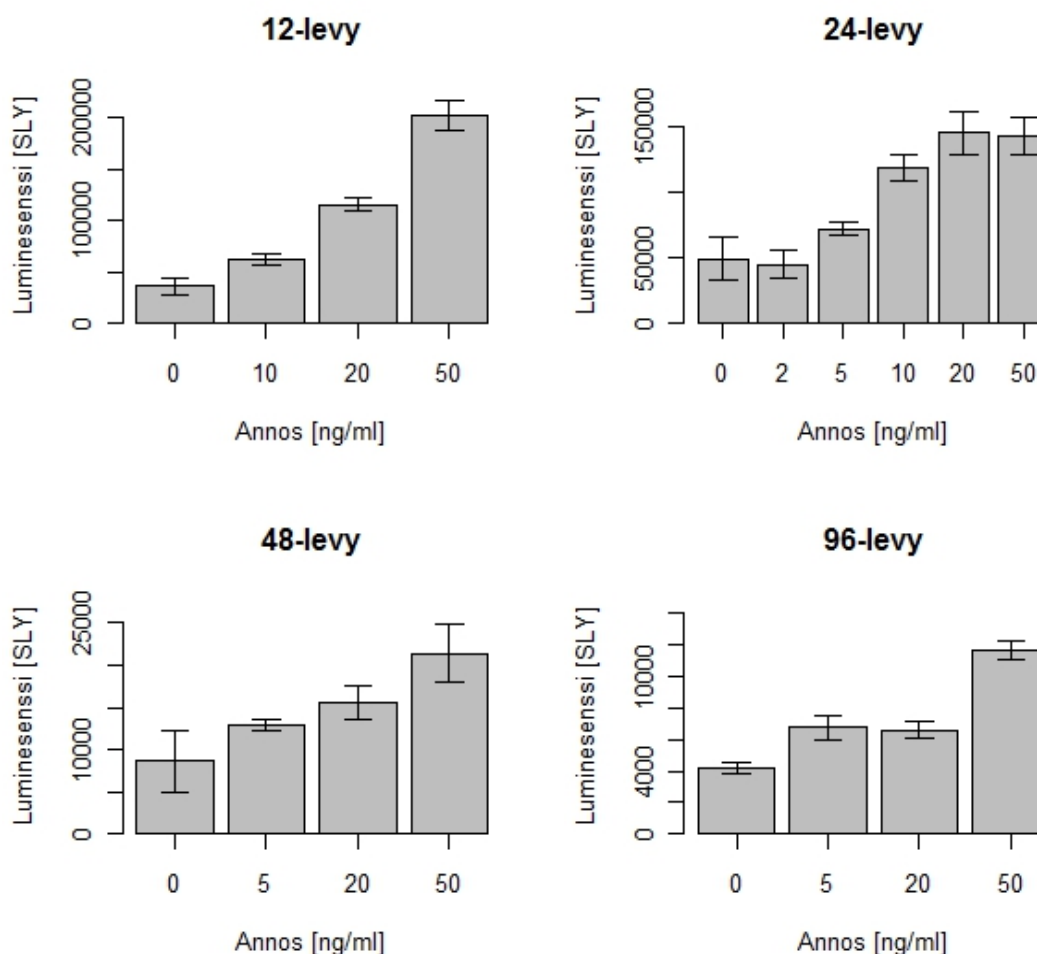
6 Tulokset ja niiden tarkastelu

6.1 Menetelmän tarkastelu eri kokoisilla kuoppalevyillä

Soluja kasvatettiin pinta-alan perusteella yhtä tiheästi sekä 12-, 24-, 48- että 96-kuoppaisille levyille ja stimulointiin BDNF:llä (2-50 ng/mL, 30 min). Tämän jälkeen mittaus suoritettiin vanhan protokollan mukaisesti loppuun. Vaste pienenee selvästi kuoppakoon pienetessä, silti vaste on edelleen nähtävissä kaikissa versioissa (Kuva 15).

6.2 Levyn päällystämisen tutkiminen

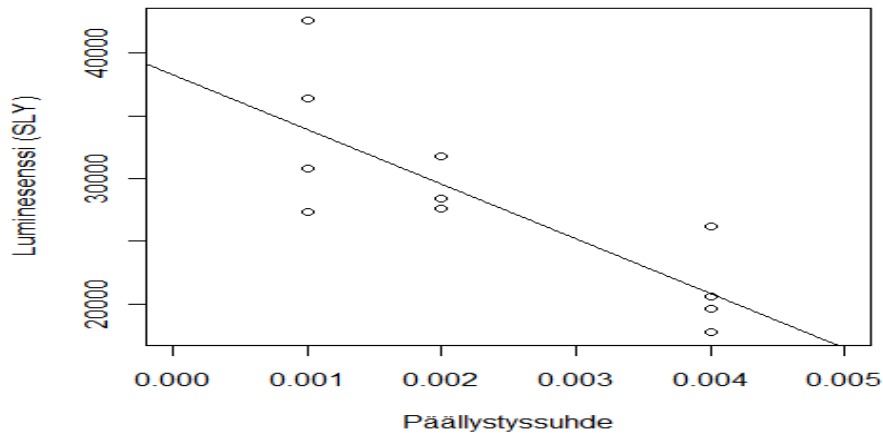
Päällystyksessä käytettävän vasta-aineen määrän vaikutusta ei varsinaisesti tunnettu, vaikka edellinen protokolla (LIITE 2) oli havainnut, että 1:500 toimi.



Kuva 15: BDNF annoksien vasteita erilaisilla annoksilla ja erilaisilla levyillä. Levyt oli kasvatettu konfluenteiksi soluilla, ja kuoppien koot ovat pienempiä levyillä joissa niitä on enemmän. Kuoppien pohjien pinta-alat selvitettiin valmistajien katalogeista niiden verkkosivuilla. Suhteellinen luminesenssivaste on aina pienempi kuopan pohjan pinta-alan pienetessä, mutta menetelmä toimii edelleen.

Sama levy päällystettiin eri suhteilla (1:1000 – 1:250), jonka jälkeen kuoppiin annosteltiin homogenisoituja BDNF-stimuloituja (30 minuuttia, 20 ng/mL) solususpensioita (50 µl näyte ja 150 µl PBS). Suspensioissa oli sekä TrkB-transfektoituja fibroblasteja, ja myös vastaavia kontroleja, joista puuttui Trk-B-reseptori. Päällystysuhteen ja vasteen välillä oli lineaarinen korrelaatio (kuvassa 16) ($R^2 = 0,62$ $p = 0,001$), mutta taustakohinan määrään (kuopista, joissa ei reseptoria) ja

päälystysuhteen välillä ollut mitään assosiaatiota havaittavissa ($R^2=-0,09047$ $p=0,69$).



Kuva 16: Päälystysuhteen vaikutus koko menetelmän signaalin vahvuuteen. Vaste lineaarinen suhteessa päälystysuhteeseen tutkitulla alueella $R^2= 0,62$ $p=0,001$. Soluja stimuloitiin 50 ng/ml BDNF annoksella.

6.3 Lyysispuskurin valinta ja käytettävän konsentraation määrittäminen

Aiemmat havainnot olivat herättäneet epäilyksiä solujen hajottamiseen käytettävän puskurin tehokkuudesta, joten vaihtoehtoja etsittiin. Ensin tarkasteltiin mikroskoopin avulla soluja kuudessa eri lyysispuskurissa (RIPA, NP++, hypo. Pierce IP, 3,5 nM SDS). Tämän jälkeen valittiin silmämääräisesti tehokkaimman näköiset kaksi (RIPA, NP++) tarkempaan tarkasteluun.

Samalla levyllä yhtäläisissä olosuhteissa (30 000 solua, inkubaatioaika 30 minuuttia) mitattiin RIPA++³⁷ ja NP++-lyysispuskurien vaikutus lopulliseen signaaliin sekä solujen

³⁷ Merkinnällä ++ tarkoitetaan tässä että myös RIPA-puskuriin oli lisätty NP++-liuoksessa olevat fosfataasien estäjät.

ollessa kasvatuselatusaineessa suspensiossa että niiden ollessa HBSS-suspensiossa. RIPA++-puskurin kohdalla lopullista vastetta oli lähes mahdoton erottaa taustasignaalista [$z'=-17$ (kasvatusliuos) ja $z'=-0,5$ (hbss)]. Syy tähän oli se, että kontrollikuoppien arvot olivat nousseet merkitsevästi. Lisäksi RIPA-mittaukset sisälsivät – tuntemattomaksi jääneestä syystä – paljon poikkeavia arvoja, jopa soluttomissa kontrollikuopissa. Puskurin ja suspensiofaasin välillä ei näyttänyt olevan mitään vuorovaikutusta.

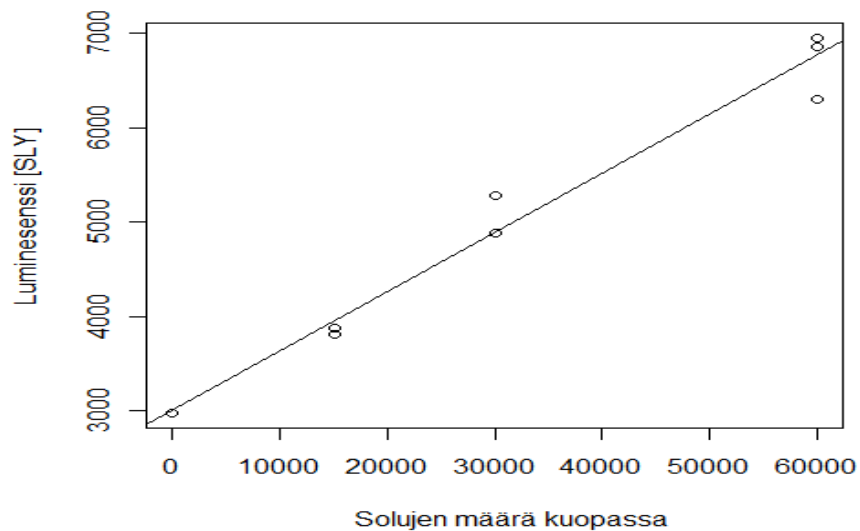
Kun menetelmä muutettiin siten, että kuoppalevyille kiinnittyneiden solujen sijaan käytettiin soluja suspensiossa (katso kappale 6.4), niin täysin vastaavanlaisen lyysispuskurin konsentraatio alenee huomattavasti sen joutuessa kosketuksiin suspensiofaasin kanssa. Näin ollen haluttiin kokeilla, onko signaalia mahdollista parantaa käyttämällä samaa lyysispuskuria väkevämpänä, siten että lopullinen konsentraatio kuopassa olisi sama kuin alkuperäisessä menetelmässä. Luotiin kaksi muutoin yhteneväistä levyä, mutta toisessa annosteltiin kaksinkertainen konsentraatio lyysispuskuria (NP++'). Muutoin menetelmä suoritettiin loppuun protokollan mukaisesti. Merkitsevää eroa näiden kahden käsittelyn välillä ei kuitenkaan pystynyt havaitsemaan ($T_{13,5}=0,68$, $p=0,52$ Pr=0,098).

6.4 Solujen kasvattaminen kiinni levyihin ja solujen käyttäminen suspensioina

Haluttiin tutkia voiko soluja annostella levyille suspensiona ja stimuloida suoraan siinä – sen sijaan että niiden olisi antanut kasvaa kiinni levyyn. Kaksi levyä suoritettiin muutoin yhtäläisesti, mutta toisessa elatusainesuspensiota (20 000 solua kuopassa) ja toisessa kiinnitettyjä soluja, jotka olivat olleet yön yli inkubaatiokaapissa (20 000 solua kuopassa), tilastollisissa analyysissä osoitettiin yhtäläisyys ($TOST_{11,39} = -0.25 - 0.71$, $\alpha=0,05$, $\epsilon=0,74$, $p=0,041$). Suspensiolevyn dynaaminen ala oli hivenen suurempi ($S/N_{3\text{ päivää}} = 1,5$, $S/N_{1\text{ päivä}} = 1,77$ ja $S/N_{\text{suspensio}} = 2.073$).

6.5 Solujen määrän vaikutuksen tutkiminen

Solujen käyttäminen suspensiossa mahdollistaa hyvinkin erilaisten solumäärien annostelun kuoppiin, joten solujen määrän vaikutusta vasteeseen haluttiin tutkia. Täten samalle levylle samoissa olosuhteissa pipetoitiin eri määriä soluja suspensioissa (15000 – 60000 solua per kuoppa). Tämän jälkeen menetelmä suoritettiin loppuun kuten edellä. Solujen määrän ja vasteen välillä vallitsi lineaarinen korrelaatio ($r^2=0,99$, $p=0,003$) mittausalueella (kuva 17.)



Kuva 17: Solujen määrän vaikutus mittausvasteeseen. Vaikutus on mitatulla alueella lineaarinen ($r^2=0,99$, $p=0,003$). Kuoppalevyyn istutettiin soluja, 0, 15 000, 30 000 ja 60 000, ja näitä stimuloitiin PBS:llä (=0 kuvaajassa) ja BDNF:llä (50 ng/ml, 40 min). Vaste on lineaarinen alueella. $N=8$.

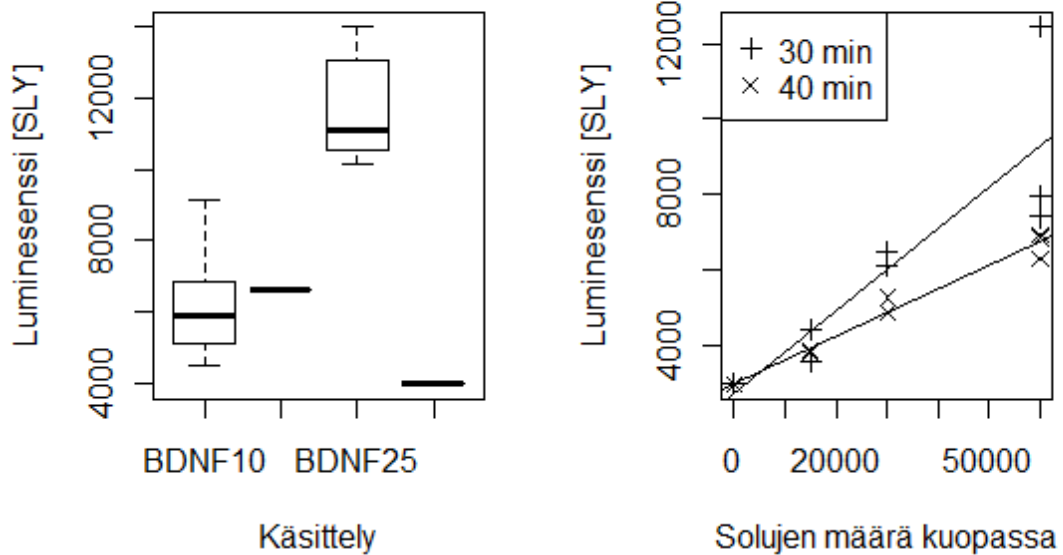
6.6 Solususpensio Hankin puskuroidussa suolaliuoksessa elatusaineen sijaan

Ei ollut tietoa siitä, selviytyisivätkö solut käsittelyn ajan HBSS-suspensiossa elatusainesuspension sijaan. Siksi yhdellä levyllä suoritettiin samoissa olosuhteissa koe, jossa jokaisessa kuopassa oli 20 000 MG-87-solua, toisella puolella levyä elatusaineessa, ja toisella puolella elatusaine oli korvattu HBSS:llä. Menetelmä suoritettiin muutoin loppuun kuten edellä. Näiden eri käsittelyjen todettiin olevan yhtäläisiä ($TOST_{11,71} = -0,21 - 0,72$ (95 % LV), $\varepsilon=0,74$, $p=0,043$, $n=8$).

6.7 Inkubaatioajan pituus aivoperäisellä hermokasvutekijällä

Inkubaatioaikaa tarkasteltiin siten, että samalle levyille annosteltiin sama annos (50 ng/ml) BDNF:ää eri aikoina, mutta lopetettiin kaikkialla yhtäaikaaisesti, siten että osassa kuopista aine oli kuopissa kokonaisuudessaan pidempään. Lyhyempi viiden minuutin inkubaatio johti alempaan signaaliin, kun taas 40 minuutin jälkeen signaali oli aina alempi kuin 30 minuutin.

Kymmenen minuutin inkubaation ($z'=-5,1$) jälkeinen vaste oli merkitsevästi alempi verrattuna 25 minuutin ($z'=0,6$) $U=36$, $p=0,002$, $n=6$. Kun toisella levyllä verrattiin 30 minuutin inkubaatiota 40 minuutin inkubaatioon, olivat keskiarvot kaikissa kohdissa suuremmat 30 minuutin ($R^2=0,7$, $\beta=2725$, $F=17,56$, $p=0,005$) kuin 40 minuutin kohdalla ($R^2=0,96$, $\beta=3022$, $F=213,4$ $p= 6 \times 10^{-6}$) (kuva 18).



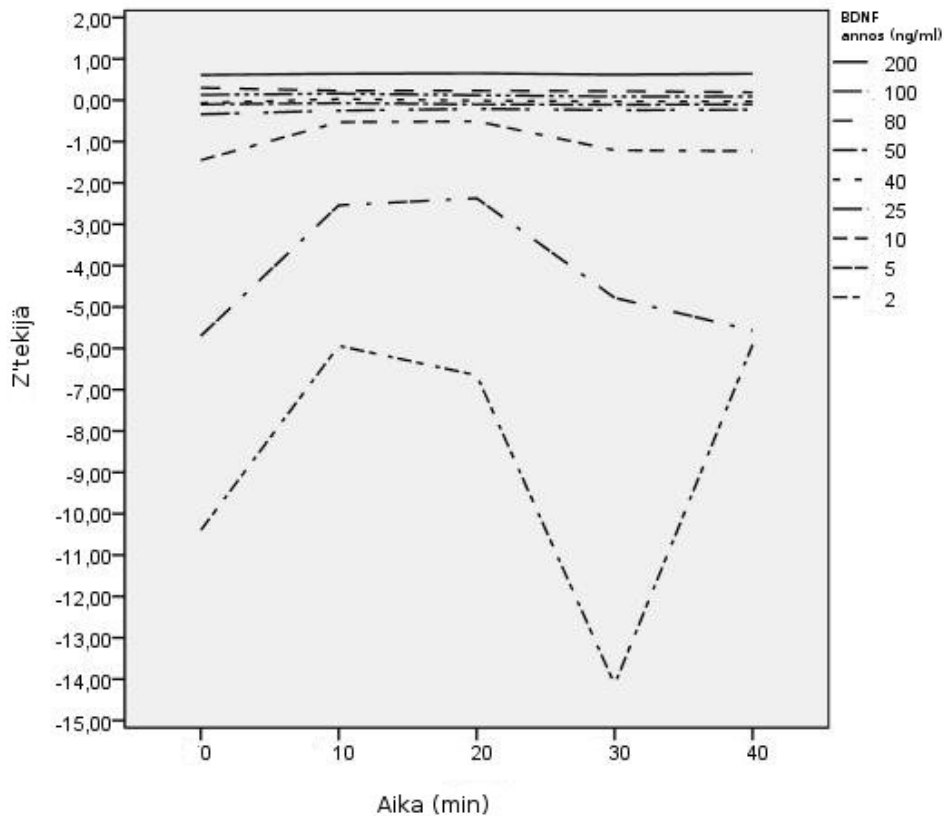
Kuva 18: Inkubaatioajan vaikutus mittausvasteeseen. Vasemmalla sekä kymmenen että 25 minuutin inkubaatio (rinnakkain BDNF 50 ng/ml ja kontrolli, PBS). Oikealla 30 ja 40 minuutin inkubaatioajan ja solumäärän vaikutus. Tulokset vaikuttavat viittaavan siihen, että 25 minuuttia on parempi kuin kymmenen minuutin aika, ja että kun inkubaatio aika pitenee 40 minuuttiin alkaa tulos jo heiketä.

6.8 Menetelmän siirto kokonaisuudessaan mittauslevylle

Kokeiltiin myös mahdollisuutta tehdä suoraan päällystellä levyllä sekä solujen stimuloiminen hermokasvutekijällä, että hajottaminen lyysispyskurilla. Kun 30 000 solua kuopassa stimuloitiin 50 ng/mL BDNF:llä saatiin menetelmälle $z'=-0,2$. Tätä verrattiin edelliseen levyyn, jossa oli käytetty samoja olosuhteita, mutta jossa stimuloiminen ja hajottaminen tehtiin erillisellä levyllä. Mittausala oli suurempi *in situ*-menetelmällä kuin perinteisellä ($U=48$, $p=0,0007$).

6.9 Mittausajan vaikutuksen tarkasteleminen

Peirce:n reagenssin ohjekirjaseen mukaisesti signaali on kutakuinkin vakaa 10-30 min sekoittamisesta, mutta ei ollut tiedossa, onko jokin hetki optimaalisin. Tästä syystä samaa levyä mitattiin eri ajankohtina sekoitushetkestä. Signaali on vakaa ja parhaimmillaan 10-20 minuuttia sekoittamisen jälkeen (Kuva 19)



Kuva 19: Mittausajan vaikutus signaalin vahvuuteen. Eri annoksilla (2-50 ng/ml BDNF) stimuloitujen solujen mittauksista lasketut z'-tekijät eri aikapisteissä (0-40 minuuttia).

6.10 Menetelmän nopeuttamisen yrittäminen inkubaatiovaiheita lyhentäen

Kolme levyä valmistettiin samoista reagensseista samana päivänä. Ensimmäinen levy suoritettiin kuten aiemminkin, toisen levyn kohdalla yksi inkubaatio lyhennettiin 1 tuntiin huoneenlämmössä, ja kolmannessa levyssä sekä ensimmäinen, että toinen inkubaatio lyhennettiin molemmat tuntiin huoneenlämmössä. Mittausvaste (kuvassa 20) heikentyi menetelmää nopeutettaessa ($J=23$, $p=5,628 \times 10^5$)³⁸. Suoritettiin *post hoc*-analyysi (Siegel & Castellan 1988)³⁹. Tämän perusteella näyttää siltä, että menetelmä joka on kahdesti lyhennetty on selvästi huonompi, ja vaikka tilastollinen voima ei riitä sitä toteamaan niin myös vain kertaalleen lyhennetty menetelmä on huonompi (Taulukko 4). Kertaalleen nopeutetussa menetelmässä mittauksien hajonta on suurempi sen lisäksi että mediaanit ovat alhaisempia.

6.11 Aivoperäisen hermokasvutekijän annosvasteen määrittäminen

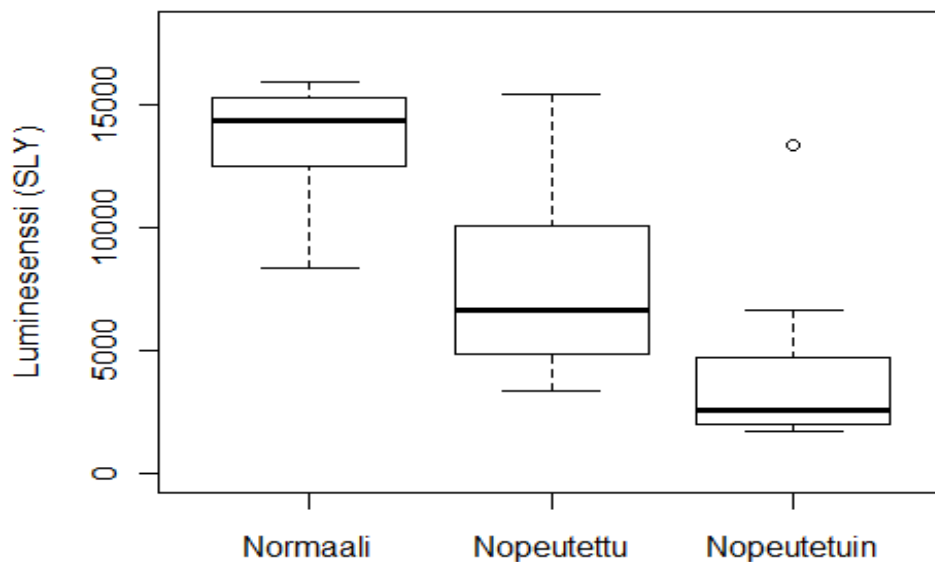
Haettiin BDNF:n alustava annosvaste-yhtälö menetelmässä. Mittauspisteistä valittiin NIH:n ohjeen (Assay Guidance Manual) mukaan vain mediaanit jokaisessa eri annoskoossa. Mediaanit sovitettiin 4-parametriseen logistiseen yhtälöön,

$$Y = D + \frac{(A - D)}{(1 + (\frac{x}{C})^B)}$$

käyttäen Levenberg–Marquardt-algoritmia (Kuva 21). Sovitteen mukainen EC₅₀ oli 21,2 mg/ml.

³⁸ Perustuu laskelmiin yksisuuntaisen Kruskal-Wallis ja ANOVA varianssianalyysien väliseen suhteellisen asymptoottiseen tehokkuuteen (Lehmann 1999: 169).

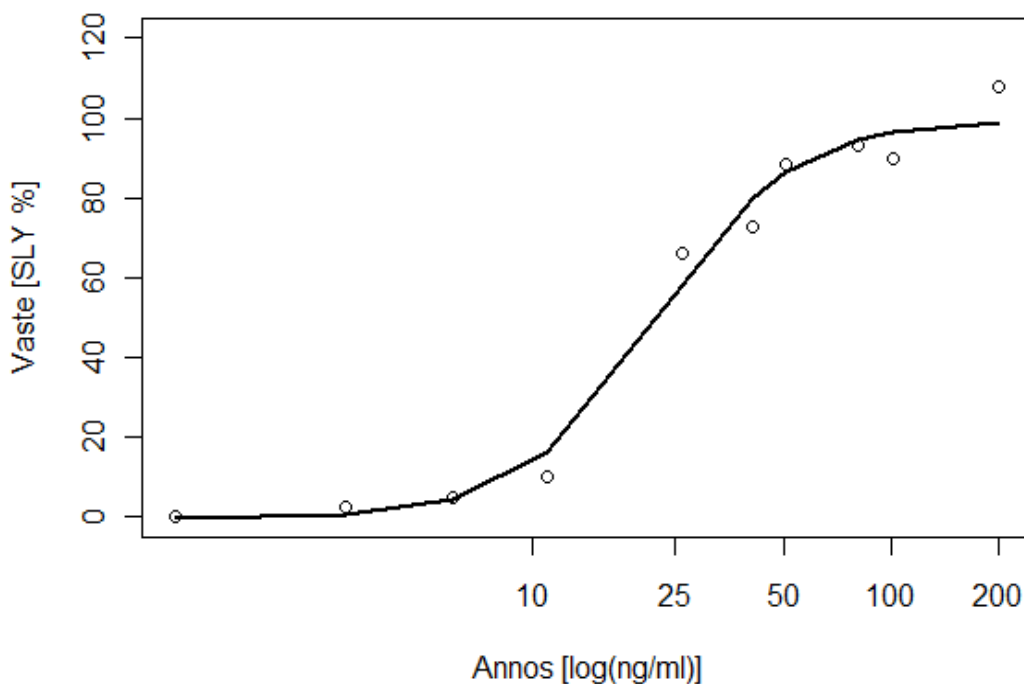
³⁹ Kyseinen koe tunnetaan nykyään myös nimellä Nemenyi-Damico-Wolfe-Dunn-testi.



Kuva 20: Inkubointien nopeutuksien vaikutus vasteeseen. Nopeutettu = toinen inkubointi lyhennetty yön yli kestävästä tuntiin huoneen lämmössä, Nopeutetuin = sekä toinen että kolmas inkubointi nopeutettu yön yli kestävästä tuntiin huoneenlämmössä. Soluja stimuloitiin BDNF:llä 50ng/mL 30 minuuttia. Omat taustat (stimuloitu HBSS:llä) vähennetty (n=8). Kaikki nopeutetut menetelmän versiot ovat merkitsevästi heikompia kuin alkuperäinen.

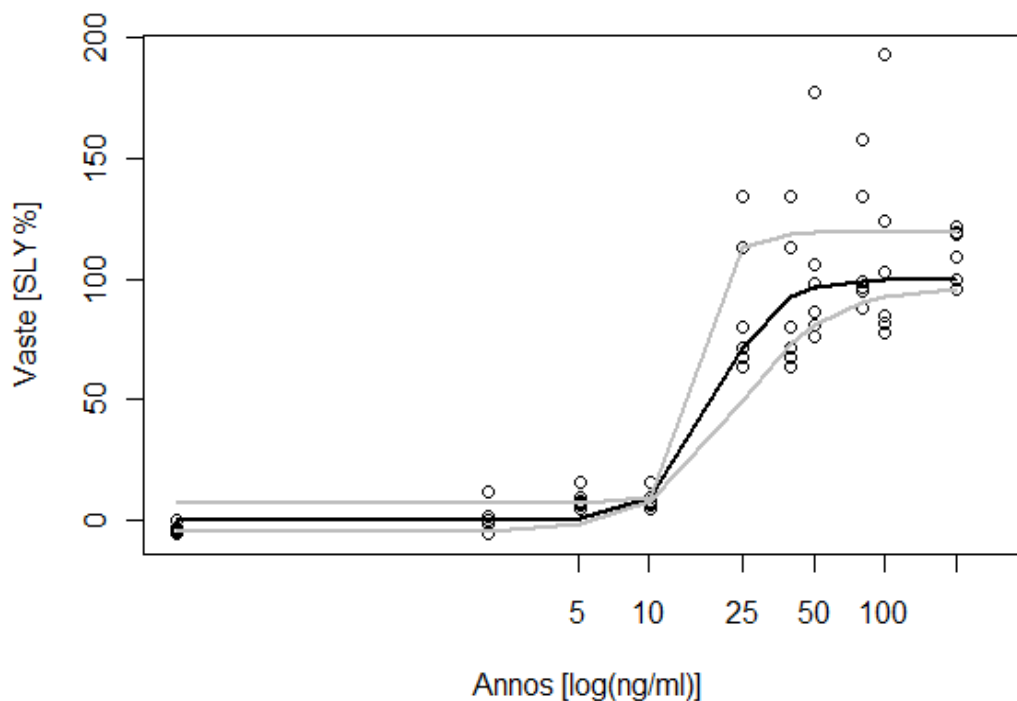
Taulukko 4: Nemenyi-Damico-Wolfe-Dunn-testin tuloksia. Nopeutettu=yksi inkubaatio lyhennetty, Nopeutetuin = kaksi erillistä inkubaatiota lyhennetty

	Nopeutetuin - Normaali	Nopeutetuin - Nopeutettu	Nopeutettu - Normaali
p	0	0,2	0,146



Kuva 21: ELISA-menetelmän BDNF-annosvaste. Neliparametrinen logistinen yhtälö sovitettuna jokaisen mittauspisteen mediaaniin. $R^2=0,984$, suhteellinen keskivirhe: 12,9 %. Yhtälöstä päätelty $EC_{50}=21.2$ mg/ml

Edellä olevan perusteella ei saa hyvää käsitystä keskiannoksen arvion virheestä (esimerkiksi luottamusväliä). Hyvin saman tyyppisiin tuloksiin voi päästä sovittamalla sama yhtälö kvantiileihin (käyttäen kaikkia mittauspisteitä). Kun sovitettiin mediaani ja ylempi ja alempi kvartiili saatiin näiden yhtälöiden EC_{50} -arvoiksi: 23,6 ng/ml, 19,4 ng/ml ja 16,9 ng/ml (kuvassa 22)



Kuva 22: Lisää ELISA-menetelmän BDNF-annosvasteesta. Neliparametrinen logistinen yhtälö sovitettuna käyttäen aineiston kaikkia mittauspisteistä ($n=6$) kvantiiliregressioanalyttisin menetelmin (Koenker 2005). Mustalla mediaaniin sovitettu käyrä ja harmaalla kvartiilit. Arvioidut EC_{50} -arvot: 23,6 ng/ml, 19,4 ng/ml ja 16,9 ng/ml

6.12 Levyn sisäisen sekä levyjen välisen toistettavuuden arviointi

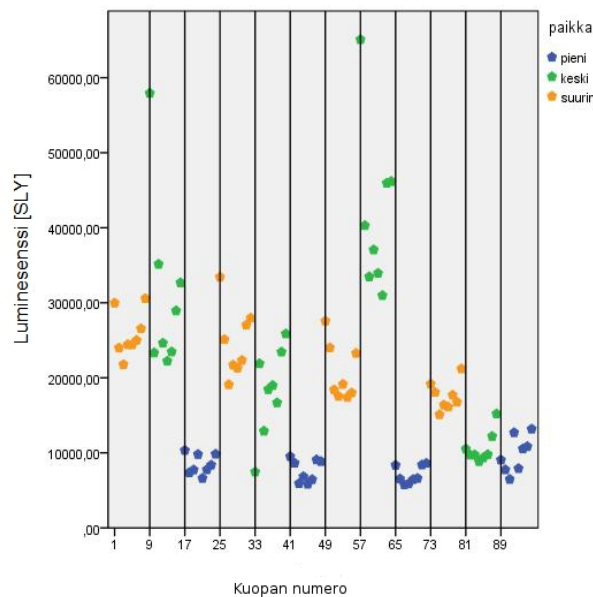
Edellä olevien mittaustuloksien perusteella eri levyillä mitattujen tulosten välillä oli eroja. Nämä molemmat on visuaalisesti havainnoitavissa noudattamalla NIH:n ohjetta. Reunailmiötä arvioitiin mediaanipuhdistuksella, algoritmilla joka vähentää mediaanin aina iteroituvasti jokaisesta rivistä tai kolumnista (Tukey 1977). Jäljelle jäävä tulos kertoo siitä, kuinka paljon suurempi tai pienempi mittaustulos kyseisessä rivissä tai sarakkeissa on suhteessa siihen mitä siitä olisi oletettavissa mikäli niissä tapahtuisi ainoastaan normaalijakautunutta stokastista muuntelua.

Taulukko 5: Mediaanipuhdistuksen tuloksia. Ylempänä rivit ja alempana sarakkeet levystä. Levyssä oli vasemmalla oletettua suurempia mittaustuloksia, mutta myös ylhäällä ja alhaalla. Jokaisessa pisteessä on soluja stimuloitu maksimiannoksella eli 100 ng/mL BDNF:ää.

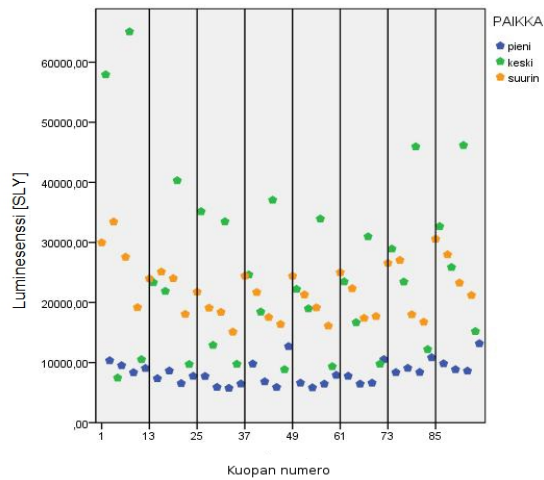
6426,9	1629,9	-2637,7	-1190,4	-807,4	-592,6	592,6	4632,8
--------	--------	---------	---------	--------	--------	-------	--------

4173,1	1895,9	-1890,2	-4487,1
--------	--------	---------	---------

Mittausvaste on siis reunoilla oletettavissa olevaa korkeampi ja heikkenee vasemmalta oikealle (taulukko 5). Mittauspisteet piirrettiin kuvaan, siten että levyn jokainen kuoppa piirrettiin sekä rivi- että sarakejärjestyksessä. Kuvista näkee visuaalisesti saman ilmiön, joka on laskettu taulukossa 5. Koska reunimmaisissa kuopissa ilmenee korkeampia arvoja kuin voisi olettaa, ovat kuvassa 26 jokaisessa viivoilla rajatuissa rykelmissä reunimmaisat arvot korkeampia kuin muualla. Samoin kuvasta 25 näkee, että levyn loppua lähestyttäessä mittausvasteet ovat alempia annoksien pysyessä samoina.



Kuva 23: Levyn paikkavaikutuksia. Levy jaettiin sarakkeittain jaoksiin, ja jaoksissa olevia soluja stimuloitiin vuorotellen pienillä (25 ng/mL) keskikokoisilla (50 ng/mL) ja suurilla annoksilla (100 ng/mL). Tämän jälkeen menetelmä suoritettiin tavanomaisesti mittaukset ja jokaisen kuopan vaste piirrettiin kuvaajaan järjestyksessä edeten sarake kerrallaan



Kuva 24: Lisää levyn paikkavaikutuksista. Levy jaettiin sarakkeittain jaoksiin, ja jaoksissa olevia soluja stimuloitiin vuorotellen pienillä (25 ng/mL) keskikokoisilla (50 ng/mL) ja suurilla annoksilla (100 ng/mL). Tämän jälkeen menetelmä suoritettiin tavanomaisesti mittaukset ja jokaisen kuopan vaste piirrettiin kuvaajaan järjestyksessä edeten rivi kerrallaan

Saman päivänä suoritettiin kaksi samalaista annosvastelevyä siirtämällä solususpensiota stimuloitavaksi ja lyysattavaksi suoraan päällystetylle mittauslevylle. Näissä käytettiin täsmälleen samoja reagenssejä ja olosuhteita. Levyjen tuloksien välillä oli eroja. Ensimmäisen levyn maksimiannoksen vasteesta mitattu z' -tekijä oli 0,65. Toisessa levyssä oli havaittavissa korkeampi taustasignaali ($z'=-0,044$), myös soluttomista kontrollikuopista.

6.13 Dimetyylisulfoksidiherkkyuden arviointi

Menetelmän haluttiin sietävän DMSO:ta, sillä kaikki tehoseulontayhdistekokoelmien yhdisteet ovat lähes aina DMSO-kantaliuoksina. Osoitukseksi menetelmän DMSO-sietokyvystä, samalle levylle tehtiin sekä BDNF-stimulointi (50 ng/ml), että stimulointi

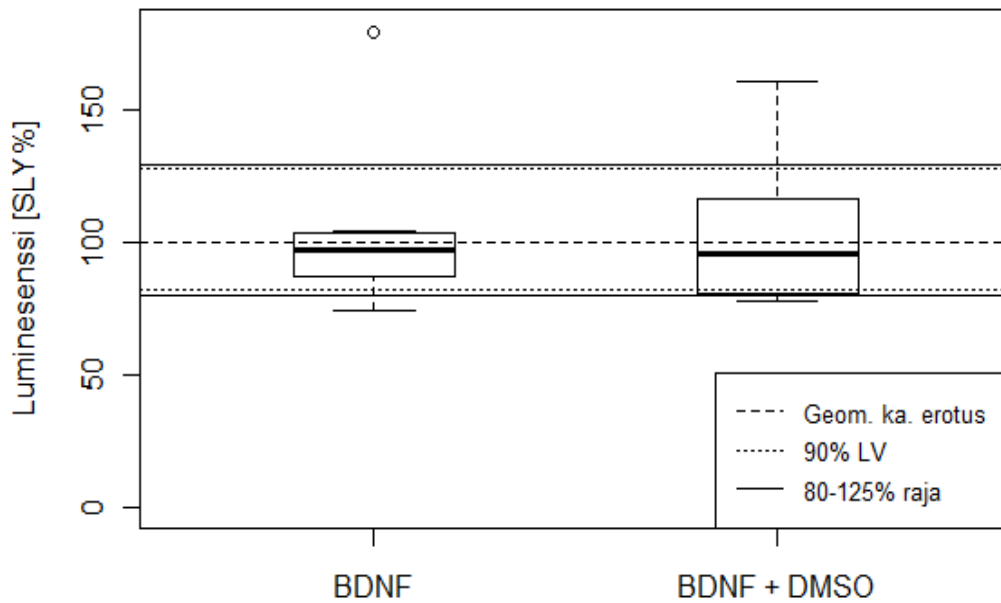
BDNF:llä (50 ng/ml) DMSO:n (1 %) ollessa läsnä. Suoritettiin TOST_{13,97}, 90 % LV geometristen keskiarvojen suhteelle = (13897,35 – 21603,47 ε = 0,23 p=0,05). Lisäksi *Bootstrap*-menetelmällä (10 000 iteraatiota) arvioitu harha-korjattu 95 % luottamusväli mediaanille olivat lähes yhdenmukaiset ja 95 % luottamusväli BDNF-käsittelylle (13288 - 19659) on täysin BDNF + DMSO-käsittelyn vastaavan 95 % luottamusvälin sisällä (14420 – 17285).

Kun suspensiofaasina oli HBSS, TOST-analyysissä eikä epäparametrisessä arvioinnissa (Meier 2010)⁴⁰ riittänyt tilastollinen voima (0,29 ja 0,16) päättämään onko ero merkitsevä vai ei (ei kuvaa). Jos taas luomme bootstrapilla mediaanien 95 % luottamusvälit, ne näyttäisivät olevan suhteellisen lähellä toisiaan (11739 - 20224 BDNF ja 11613 - 14708 BDNF + DMSO).

6.14 Tuloksien tulkinta

Työssä on osoitettu, että on mahdollista suorittaa miniatyrisoituna aiemmin kuvattu ELISA-menetelmä (liite 2). ELISA:a on sanottu vaikeasti miniatyrisoitavaksi (Inglese ym. 2007), ja menetelmän pienentäminen edelleen voisi olla vielä vaikeampaa. On osoitettu myös, että menetelmän voi vaihtoehtoisesti suorittaa käyttäen solususpensioita joko erillisellä omalla levyllään, josta ne siirretään mittausvaiheessa mittauslevylle, tai tehden koko käsittelyn suoraan pinnoitetulla mittauslevyllä.

⁴⁰ Voima-analyysin suoritettiin arvioimalla vaadittavat parametrit bootstrap-menetelmällä ja sitten käyttämällä normaaliaprossimaatiota ja tietoa Mann-Whitney-testin suhteellisesta asympotoottisesta voimasta.



Kuva 25: Menetelmän DMSO-sieto. Käsittely (20 000 MG-87 solua elatusainesuspensiossa) sekä 50ng/mL BDNF (BDNF) että 50ng/mL BDNF ja 1 % DMSO (BDNF +DMSO). Käsittelyjen ei todettu eroavan toisistaan merkittävästi (enemmän kuin 80-125 % = $\ln(4/5)-\ln(5/4)$, 90 % luottamusväli geometristen keskiarvojen suhteelle = 13897,35 – 21603,47, $p=0,05$, $n1=n2=8$. Kuvassa merkitty molemmat keskiarvot, niiden erotuksien luottamusraja ja kriteeri.

In situ-suspensiomenetelmällä on selvästi sekä etunsa että omat haasteensa. Levyn pintaan kiinnittyneitä soluja käyttävä menetelmä aiheuttaa pientä (kenties merkityksetöntä) kontaminaatiota kuoppien välillä, kun soluja irrotetaan jokaisesta kuopasta samalla pipettikärjellä. Ei myöskään ole selvää kuinka tehokkaasti ja tasalaatuisesti tämä työläs manuaalinen irrotus toimii. Lisäksi kun solususpensio annostellaan ja hajotetaan suoraan mittauslevyllä vältytään kokonaan yhdeltä näytteensiirtovaiheelta, joka aiheuttaa myös ei-toivottua teknistä variaatiota mittaustuloksiin. Edelleen tulokset ovat parempia, sillä kun vältetään solujen kasvattaminen inkubaattorissa, myös reunakuopista haihtuvan nesteen aiheuttama

variaatio eliminoidaan (ks. esim. Tammela 2004, s. 50-51) ja solut satunnaistetaan kaikkiin kuoppiin. Suspension käyttämisen huonoin puoli on, ettei pieneen määrään nestettä saa kovin helposti ja luotettavasti suuria määriä soluja, kun taas levyn pintaan kiinnittyneet solut ovat tiiviisti kuopan pohjassa kiinni. Signaalia voi olla vaikea saada riittävän selkeäksi näissä olosuhteissa; on erittäin mahdollista, että menetelmän toistettavuuskokeissa havaitut ongelmat johtuvat tästä.

Soluja irrotettaessa trypsiinillä huomattiin niiden kasaantuvan yhteen silmin nähtävästi. Yhteen kasaantuneita soluja sisältävä solususpensio ei varmastikaan ole homogeeninen, ja sen sisältämät solut mahdollisesti sedimentoituvat nopeammin, aiheuttaen pitoisuuksien hallitsemisen hankaluuksia. Vaikka suspensiota pyrittiin sekoittelemaan pipetoimalla sitä edestakaisin ennen näytteiden laittamista levyille, toimenpide ei mahdollisesti ollut riittävä. Solujen yhteen kasaantumista pyrittiin myös vähentämään käyttämällä sentrifugia hellävaraisemmin (400 kierrosta minuutissa), rajallisella menestyksellä. Tosin parempiakin tapoja saattaisi olla olemassa (vaikkapa jokin suodatus). Reunailmiöitä mahdollisesti aiheutti inkubaatiokaapin levyille tuottama lämpögradientti (Esser ei päiväystä). Vaikka solujen stimulaatioon käytetty hermokasvutekijä lämmitettiin huoneenlämpöön, poikkeaa huoneenlämpö edelleen inkubaationlämmöstä (37 °C). Levyt voivat myös absorboida valoa, joka vapautuu mittauksen yhteydessä (Quigley 2008). Kenties levyjen pimeä käsittely, sekä inkubaationesteiden esilämmittäminen 37 °C lämpöön vähentäisivät vielä edelleen näitä ongelmia.

Näissä edellä mainituissa olosuhteissa yksittäiset mittaukset eivät ole itsenäisiä, samanlaisesti jakautuneita satunnaismuuttujia, eivätkä keskeisen raja-arvolauseen ehdot toteudu. Yhtenäisen normaalijakauman sijaan voidaan ajatella levyn yhden rivin kuoppien mittausten muodostavan multimodaalisen jakauman⁴¹. Kun lisäksi reunoja on vähemmän kuin ei-reunoja, saadaan vino yhteisjakauma. Tätä tukee myös myöhemmin levyjen tasalaatuisuuden arvioimiseksi tehdyt kokeet, sekä normaalikvantiili-kvantiilikuviot. Ongelma on sikäli mielenkiintoista, että perinteisissä frekventistisissä

41 Jokainen mittauspisteiden mittausvirhe vaihtelee omissa jakaumassaan, ja kokonaisjakauma on niiden summajakauma.

metodioppaissa yleensä sanotaan, ettei tällaista aineistoa voi pelastaa mitenkään, ja etteivät mittarit kuten z'-tekijä ole luotettavia tällaisella aineistolla. Sama ongelma on kuitenkin lähes kaikilla solupohjaisilla menetelmillä aina.

Paras tapa välttää ongelma lienee satunnaistaminen ja suurten näytekokojen käyttäminen itse menetelmän kehittelyvaiheessa. Olisi hyvä ainakin kerran laskea z'-tekijä siten että kontrolliksi ja vasteeksi asetetaan puolet koko levystä satunnaistettuna, muuten z'-tekijä on luultavasti harhainen, sillä aineiston jakauma poikkeaa merkittävästi normaalista (Sui ja Wu 2007). Toinen vaihtoehto on olla käyttämättä kyseistä arvoa, ja korvata se jollakin robustilla vaikutuksen koon mittarilla. Tällaisen arvon laskeminen on helppoa, mutta kyseisen arvon vertailukelpoisuuden arvioiminen muissa projekteissa tehtyihin vastaaviin saattaa olla hankalaa. Z'-tekijän arvo muuttuu hyvin radikaalisti residuaalien jakauman perusteella joten samasta aineisto josta saa negatiivisen z'-arvon voi saada jopa 0,5 ylittävän arvon logaritimuunnoksen jälkeen. Ongelmaan on esitetty useampia ratkaisuja, joista jokainen on hivenen epäintuitiivinen. Kuitenkin jo 1970-luvulla esitettiin hyvin selkeitä ja ennen kaikkea intuitiivisia tutkinnallisen aineistoanalyysin menetelmiä, joilla voidaan ratkaista kaikki ne ongelmat joihin z'-tekijä on suunniteltu. Yksinkertaisimmillaan tämä tarkoittaa vain aineiston asiallista visualisointia, sillä esimerkiksi laatikkokuviot on alunperin suunniteltu sopiviksi tähän tarkoitukseen.

Jos menetelmää halutaan parantaa edelleen niin että erottuvuus on suurempi, helpoin tapa tehdä tämä on lisäämällä solujen määrää kuopassa, sillä solujen kasvattaminen on suhteellisen helppoa ja edullista. Työssä myös osoitettiin että solujen määrä on ainoa tekijä, joka luotettavasti ja lineaarisesti⁴² suurentaa mittaustavetta (vaikuttamatta juuri lainkaan taustasignaaliin). On yleisesti tunnettua asia, että miniatyrisoiminen saattaa aiheuttaa reagenssien määrän lisäämisen tarvetta (Mayr ja Bojanic 2009).

Lineaarisen regressionanalyysin suorittaminen pinnoitussuhteen arvioimisen kohdalla on kyseenalaista, sillä residuaalit eivät olleet normaalisti jakautuneita, eikä ole selvä että

⁴² Tämä pätee nimenomaan tutkitulla alueella. Ei ole syytä olettaa, että solujen määrän vaihtelun vaikutus olisi lineaarinen kaikilla mahdollisilla arvoilla.

suhde on lineaarinen mittausalalla ja mittauspisteiden pieni määrä ei anna hyvää tietoa virheestä. Toisaalta tarkoitus ei ollut löytää riittävän hyvää mallia vaikkapa ennustamiseen, vaan arvioida suuntaa antavasti näiden muuttujien välistä suhdetta. Tuskin on kovin väärin väittää, että suhde 1:500 on parempi valinta kuin 1:250, siitäkin riippumatta, että suuremman suhteen päällystysuspension käyttäminen ei lisää taustasignaalia mitattavissa olevin määrin. Pienemmän suhteen käyttämisen (1:1000) suhteen taas ei ole mitään hyvää syytä, sillä tausta ei vähene, eikä voida ajatella olevan riittävää tilastollista voimaa löytää eroa näistä kahdesta.

Lyysispuskurin vahvuutta ei arvioitu samalla levyllä, vaan kahdella erillisellä (jotka tosin oli valmistettu samoista suspensioista ja niin samoin tavoin kuin mahdollista), ennen kuin tiedossa oli kuinka hyvä toistettavuus on eri levyjen välillä. Mutta jos konsentraation kaksinkertaistaminen ei aiheuta mitään mitattavaa eroa (virhemarginaalin suuruudesta riippumatta), niin tuskin sen käyttäminen on oikeutettua. Lyysispuskuri käyttäytyi mitattavissa määrin samoin, oli sitten solususpension nestefaasi elatusainetta, tai yksinkertaisempaa HBSS-liuosta. HBSS-liuos, toisin kuin elatusaine, ei vaahtoa Biomek-työaseman pipettien sekoittaessa tai injisoidessa sitä. Solut hajotetaan hyvin pian stimuloimisen jälkeen, jonka ansiosta ne näyttävät pärjäävän yhtä hyvin HBSS-liuoksessa kuin elatusaineessa.

Inkubaatio aivoperäisellä hermokasvutekijällä on tässä mallissa syytä tehdä noin 30 minuutin ajan. DMSO:n käyttö ei näyttäisi aiheuttava merkitseviä ongelmia kun annostellaan hermokasvutekijää. Kuopan koko tilavuus myös uhkaa täytyä, jos solususpensiota käytetään 100 μ L tilavuudessa ja myöhemmin injisoidaan sama tilavuus stimulointisuspensiota ja vielä lopuksi lyysispuskuria. RIPA on mahdollisesti liian voimakas lyysidetergentti kyseessä olevaan määrittelyyn, eikä siksi sovi hyvin MG-87 soluihin perustuvaan ELISA-määrittelyyn. NP+++on parempi mutta ei välttämättä edelleenkään paras mahdollinen vaihtoehto. Menetelmä on hidas, ja yksi sykli kestää viikon suorittaa. Tässä ehdotetut nopeuttamismenetelmät kuitenkin heikensivät signaalia liiaksi. Kymmenenkin levyn tekeminen yhtäaikaaisesti mahdollistaisi vain 960 yhdisteen tutkimisen viikossa. Kustannustehokkaampaa ja järkevämpää olisi käyttää Taguchi-

metodologiaa useamman ominaisuuden optimoimiseen samanaikaisesti. Z'-tekijä ja vastaavat vaikutuksen koon mittarit voisi arvioida myös satunnaistetusta suuremmasta näytteestä.

7 Yhteenvetoa ja johtopäätöksiä

Lääkekehityksen menestys perustuu keskeisesti uusien ei-haitallisten ja kliinisesti olennaisten lääkevaikutusten löytämiselle. Useampia lääkekehitykseen liittyviä prosesseja on ollut mahdollista tehostaa biotekniikan ja robotiikan avulla viime vuosina. Mutta on kuitenkin todennäköisestä, ettei kaikista keskeisintä asia uusien vaikutusmekanismien löytämiselle, eli satunnaishavaintojen tekemistä ja abduktiivista päättelyä näistä havainnoista, voida helposti teknisin menetelmin tehostaa.

Tämän ilmiön taustalla on muun muassa niin sanottu kehysongelma sen laajimmassa merkityksessään (katso Dreyfus 1992: 289): 1) kuinka päättelyprosessi voidaan rajata vain oleelliseen alaan, kun oleellisuus on holistista, rajaamatonta ja kontekstiriippuvaista ja 2) kuinka kuvata propositiologiikalla kyseistä oleellista kontekstia. Uusi abduktoitu päätelmä ei seuraa mistään säännöistä ja perustuu rajaamattomaan kontekstuaaliseen liitännäistietoon. Abduktiolle voidaan antaa seuraava määritelmä: selityksen A abduktio hämmästyttävän huomion B vallitessa, on yhtä kuin päätellä että A on todennäköisesti totta, sillä silloin B olisi ikään kuin itsestään selvää (Peirce 1903).

Toistaiseksi vain hyvin tarkasti rajatun kontekstin sisällä (eikä avoimessa kontekstissa) on onnistuttu käyttämään tekoälyä sekä hypoteesien rakentamiseen että niiden kokeilemiseen (molekyylibiologiassa (King ym. 2009), fysiikassa esim. (Schmidt ja Lipson 2009). Tosin niin sanotuilla syvöppimisen menetelmillä on tehty alkeellista lääkekehitystäkin (Lohr 2013). Tämä abduktiivinen järkeily on myös sen taustalla, että useat kommentoijat ovat esittäneet lääkekehityksen erityisesti psyykenlääkkeiden ja mielialalääkkeiden kohdalla edenneen sattuman avulla (Healy 1997; Ban 2006; Meyeres

2008)⁴³. Kuitenkaan tieteellinen edistys ei varsinaisesti perustu sattumalle. Ban siteeraa Pasteuria: ”havaintojen pelikentällä sattuma suosii vain hyvin valmistautuneita”⁴⁴(Ban 2006).

Toinen historiallisesti keskeinen asia psyykelääkkeiden kehityksessä on ollut mahdollisuus tarkkailla yhteyttä annoksen ja käyttäytymisen välillä. Yhteyttä ei voi enää tutkia kuin eläinmalleilla, vaikka ei varsinaisesti ole mielekästä ajatella eläimien kykenevän masentumiseen ja muihin mielialahäiriöihin. Tästä syystä käytettävissä olevat eläinmallit mallintavat varsinaisesti jotain masennuksen liitännäis- tai oheisilmiötä, kuten stressiä. Eli parhaimmatkin eläinmallit soveltuvat huonosti mielialalääkkeiden kehitykseen (Agid ym. 2007; Castrén ja Rantamäki 2010; Gaiteri 2011). Useampi eri kirjoittaja uskoo lääkekehityksen suurimman ongelman olevan että tautimallit ovat puutteellisia ja kohteet huonosti tunnettuja (Kola ja Landis 2004; Palmer ja Stephenson 2005; Pangalos ym. 2007; Pritchard 2008; masennuksen kohdalla esim. Einat ja Manji 2006 tai Agid ym. 2007). Millanin (2008) mielestä niin sanottu rationaalinen (automatoitu ja redusoitu) lääkekehittäminen on jopa hidastanut eläinmallien kehittelyä. Kola (2004) huomauttaa, että alimmat onnistumisluvut lääkekehityksessä ovat juuri syöpähoidoissa ja keskushermoston terapioiden, joissa molemmissa on hänen mukaansa heikot eläinmallit. Tätä tilanne pahentaa vielä se että hyvin moni julkaistu tutkimus osoittautuu myöhemmin joko puutteelliseksi tai väärennöksi (Ioannidis 2005).

Voi olla että tästä syystä johtuu myös niin sanottujen fenotyypiset seulontamenetelmien viimeaikainen menestys löytämään uusiin vaikutusmenetelmiin perustuvia keskushermostolääkkeitä (Swinney ja Anthony 2011) On olemassa myös käyttäytymisfenotyypisiä seulontamenetelmiä, jotka soveltuvat mielialasairauksien tutkimiseen (Kokel ym. 2010; Rihel ym. 2010; Brennan 2011; Steenbergen ym. 2011;

43 Kirjoittaja mainitsee seuraavat: litium, anksiolyytit meprobamaatti klooridiazepoksidi, neuroleptit: klooripromatseeni, masennuslääkkeet: imipramiini iproniattsidi, kalium bromidi ja kloraalihydraatti jne.

44 Oma suomennokseni. Alkuperäinen: Dans les champs de l'observation, le hasard ne favorise que les esprits préparés

Parker ym. 2012), ja näissä menetelmissä todennäköisyydet huomata sattumalta yhteys annostelun ja *käyttäytymisen* välillä ovat luonnollisesti suuremmat. Näillä menetelmillä tosin on mahdollista tutkia vain satoja tai korkeintaan tuhansia yhdisteitä kerrallaan, kun perinteisissä tehoseulontamenetelmissä voidaan tutkia miljoonia tai jopa miljardeja.

Tästä syystä edelleen on käyttöä yksinkertaisemmille *in vitro*-menetelmiin perustuville seulontamenetelmille. Toki on niin, ettei niillä pelkästään voida kehittää lääkkeitä. Mutta näitä menetelmiä voidaan yhdistää muihin menetelmiin.

Keskushermostoon kulkevien yhdisteiden määrä on pieni. Niillä on oltava suhteellisen pieni polaarinen pinta-ala. Polaarinen pinta-ala korreloi voimakkaasti vetysidoksien luovuttajien kanssa, jonka ansiosta keskushermostolääkkeissä on oltava rajallinen määrä typpi- ja happiatomeja.

Molekyylimuotoja joita voisi luoda synteettisen kemian menetelmin lääkekehitykseen on liian monta. Lisäksi näyttäisi olevan niin, että suurin osa sekä perinteisen synteettisen kemian, että kombinatorisen kemian valmistamista molekyyleistä perustuisi suuresti samoihin perusrunkoihin ja että niillä lisäksi olisi synteettisistä menetelmistä seuraavia ominaisuuksia, joiden ansiosta ne poikkeavat paljon luonnontuotteista ja myös rekisteröidyistä lääkkeistä.

Vaikka usein ajatellaan luonnontuotteiden olevan ”biologisesti validoituja”, niin luonnontuotteillakin on mahdollisesti ominaisuuksia, jotka eivät ole lääkkeellisesti optimaalisia, sillä luonnontuotteet muodostuvat tiettyjen biosynteettisten reittien kautta ja useat tunnetut luonnosta eristetyt yhdisteet muodostuvat allelopatiaa varten. Toisaalta kaikkien kuvattujen luonnontuotteiden joukko ei ole satunnaisotanta koko luonnontuotteiden joukosta, vaan pikemminkin sen alijoukko, joka on valikoitunut enimmäkseen niistä tuotteista, jotka ovat olleet ”lähellä sivilisaatiota”. Biologiasta ammentavat monimuotoisuusparadigmat ovat onnistuneet luomaan kokoelmia, joiden keskimääräinen osumaprosentti on parempi kuin mitä voisi olettaa sattumalta. Kuitenkaan näillä menetelmillä ei ole ainakaan vielä tuotettu ainuttakaan lääkettä, vaan

lähinnä tieteellisiksi työkaluiksi sopivia suhteellisen alhaisen affiniteetin molekyyliä, jotka kohdistuvat keskeisiin solmukkeisiin mikrobin tai ihmisen proteiini-proteiiniverkostossa.

Mielialasairauksien syyksi ei ole voitu osoittaa jotakin perintökijää tai biologista mekanismia, niiden osittaisesta perinnöllisyydessä huolimatta. Useat meta-analyysit, joissa on tutkittu mahdollisia perimätekijöitä ei olla onnistuttu löytämään näyttöä tietyille perimäaineille (Burmeister ym. 2008; Hetteima 2010; Ripke ym. 2013). Geenien ilmentymistä tutkivat projekti eivät ole myöskään tuottaneet vankkaa näyttöä (Sibille ym. 2004). Ei myöskään ole niin että masennuslääkkeiden aiheuttama biologinen vaste olisi masennuksen vastakohta morfologisessa tai geneettisessä mielessä (Gaiteri ja Sibille 2011). Kuitenkin jos useammat jo aiemmin löydetty mielialalääkkeet saavat aikaiseksi tavalla tai toisella TrB-aktivaatiota, on mahdollista, että reseptoriin suoraan vaikuttamalla voidaan hoitaa mielialasairauksia.

Kirjallisuusluettelo

Agid Y, Buzsáki G, Diamond DM, Frackowiak R, Giedd J, Girault J-A, Grace A, Lambert JJ, Manji H, Mayberg H, Popoli M, Prochiantz A, Richter-Levin G, Somogyi P, Spedding M, Svenningsson P, Weinberger D: How can drug discovery for psychiatric disorders be improved? *Nature reviews. Drug discovery* 6(3): 189–201, 2007

Baell JB, Holloway G a: New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *Journal of medicinal chemistry* 53(7): 2719–40, 2010

Baker M: Europe bets on drug discovery. *Nature* 494(7435): 20, 2013

Ban T: The role of serendipity in drug discovery. *Dialogues in clinical neuroscience (C)*: 335–344, 2006

Bon RS, Waldmann H: Bioactivity-guided navigation of chemical space. *Acc Chem Res* 43(8):1103-14, 2010

Barabási A, Albert R: Emergence of scaling in random networks. *Science* 286(5439): 509–12, 1999

- Basu S, Ellinger B, Rizzo S, Deraeve C, Schürmann M, Preut H, Arndt H-D, Waldmann H: Biology-oriented synthesis of a natural-product inspired oxepane collection yields a small-molecule activator of the Wnt-pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(17): 6805–10, 2011
- Bertrand T, Kothe M, Liu J, Dupuy a, Rak a, Berne PF, Davis S, Gladysheva T, Valtre C, Crenne JY, Mathieu M: The crystal structures of TrkA and TrkB suggest key regions for achieving selective inhibition. *Journal of molecular biology* 423(3): 439–53, 2012
- Bertelli, F: What Does an HTS File of the Future Look Like? Kirjassa: Management of Chemical and Biological Samples for Screening Applications. s. 275–304. 1. painos. Toim. Wigglesworth M, Wood T. Wiley-VCH Verlag & Co. Weinheim. 2012
- Blum LC, Reymond J-L: 970 million druglike small molecules for virtual screening in the chemical universe database GDB-13. *Journal of the American Chemical Society* 131(25): 8732–3, 2009
- Bohacek RS, McMartin C, Guida WC: The art and practice of structure-based drug design: a molecular modeling perspective. *Medicinal research reviews* 16(1): 3–50, 1996
- Bollini S, Herbst JJ, Gaughan GT, Verdoorn T a, Ditta J, Dubowchik GM, Vinitzky A: High-throughput fluorescence polarization method for identification of FKBP12 ligands. *Journal of biomolecular screening* 7(6): 526–30, 2002
- Breinbauer R, Vetter IR, Waldmann H: From protein domains to drug candidates-natural products as guiding principles in the design and synthesis of compound libraries. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 41(16): 2879–90, 2002
- Brennan CH: Zebrafish behavioural assays of translational relevance for the study of psychiatric disease. *Reviews in the neurosciences* 22(1): 37–48, 2011
- Brown RD, Bures MG, Martin YC: Similarity and Cluster-Analysis Applied to Molecular Diversity. *Chemical Abstracts* (2) 1995
- Burmeister M, McInnis MG, Zöllner S: Psychiatric genetics: progress amid controversy. *Nature reviews. Genetics* 9(7): 527–40, 2008
- Cabrera-Pardo JR, Chai DI, Liu S, Mrksich M, Kozmin S: Label-assisted mass spectrometry for the acceleration of reaction discovery and optimization. *Nature Chemistry* 5(5): 423–427, 2013
- Cai JJ, Borenstein E, Petrov D: Broker genes in human disease. *Genome biology and evolution* 2: 815–25, 2010

- Castrén E, Rantamäki T: The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. *Developmental neurobiology* 70(5): 289–97, 2010
- Cazorla M, Prémont J, Mann A, Girard N, Kellendonk C, Rognan D: Identification of a low – molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice. *Screening* 121(5), 2011
- Chen F, Madsen TM, Wegener G, Nyengaard JR: Changes in rat hippocampal CA1 synapses following imipramine treatment. *Hippocampus* 18(7): 631–9, 2008
- Ciolfi C: Diversity-oriented synthesis. 2002. Saatavissa Internetissä: <http://www.chem.wisc.edu/areas/organic/studsemin/ciolfi/Ciolfi-abs.pdf>
- Clark DE: Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 2. Prediction of blood-brain barrier penetration. *Journal of pharmaceutical sciences* 88(8): 815–21, 1999
- Clemons P, Bodycombe NE, Carrinski H, Wilson JA, Shamji AF, Wagner BK, Koehler AN, Schreiber SL: Small molecules of different origins have distinct distributions of structural complexity that correlate with protein-binding profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(44): 18787–92, 2010
- Craft A, Simpson R: The value of biodiversity in pharmaceutical research with differentiated products. *Environmental and Resource Economics* 1–17, 2001
- Crowther, JR: *The ELISA Guidebook*. 2. painos. Humana Press, New Jersey 2000
- Cunningham ME, Stephens RM, Kaplan DR, Greene L: Autophosphorylation of activation loop tyrosines regulates signaling by the TRK nerve growth factor receptor. *The Journal of biological chemistry* 272(16): 10957–67, 1997
- Dančák V, Seiler KP, Young DW, Schreiber SL, Clemons PA: Distinct biological network properties between the targets of natural products and disease genes. *Journal of the American Chemical Society* 132(27): 9259–61, 2010
- Deng H, O’Keefe H, Davie CP, Lind KE, Acharya R a, Franklin GJ, Larkin J, Matico R, Neeb M, Thompson MM, Lohr T, Gross JW, Centrella P, O’Donovan GK, Bedard KLS, Van Vloten K, Mataruse S, Skinner SR, Belyanskaya SL, Carpenter TY, Shearer TW, Clark M a, Cuozzo JW, Arico-Muendel CC, Morgan B: Discovery of highly potent and selective small molecule ADAMTS-5 inhibitors that inhibit human cartilage degradation via encoded library technology (ELT). *Journal of medicinal chemistry* 55(16): 7061–79, 2012

Derringer G: A Balancing Act : Optimizing a Product ' s Properties. Quality Press 6: 51–58, 1994

Devi L, Ohno M: 7,8-dihydroxyflavone, a small-molecule TrkB agonist, reverses memory deficits and BACE1 elevation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 37(2): 434–44, 2012

Dimova D, Hu Y, Bajorath J: Matched molecular pair analysis of small molecule microarray data identifies promiscuity cliffs and reveals molecular origins of extreme compound promiscuity. *Journal of medicinal chemistry* 55(22): 10220–8, 2012

Dossey AT: Insects and their chemical weaponry: new potential for drug discovery. *Natural product reports* 27(12): 1737–57, 2010

Dreyfus H: What Computers Still Can't Do: A Critique of Artificial Reason. MIT Press. Cambridge 1992

Einat H, Manji HK: Cellular plasticity cascades: genes-to-behavior pathways in animal models of bipolar disorder. *Biological psychiatry* 59(12): 1160–71, 2006

Ertl P, Schuffenhauer A: Cheminformatics analysis of natural products: lessons from nature inspiring the design of new drugs. *Prog Drug Res* 66: 219-35, 2008

Ertl P, Jelfs S, Mühlbacher J, Schuffenhauer A, Selzer P: Quest for the rings. In silico exploration of ring universe to identify novel bioactive heteroaromatic scaffolds. *Journal of medicinal chemistry* 49(15): 4568–73, 2006

Faulkner JD, Newman DJ, Cragg GM: Investigations of the marine flora and fauna of the Islands of Palau. *Natural product reports* 21(1): 50–76, 2004

Feder A, Nestler Eric J, Charney DS: Psychobiology and molecular genetics of resilience. *Nature reviews. Neuroscience* 10(6): 446–57, 2009

Feher M, Schmidt JM: Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. *Journal of chemical information and computer sciences* 43(1): 218–27, 2003

Feldman I, Rzhetsky A, Vitkup D: Network properties of genes harboring inherited disease mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(11): 4323–8, 2008

Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczufca M: Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366(9503): 2112–7, 2005

- Findlay JW, Dillard RF: Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays. *The AAPS journal* 9(2): e260–7, 2007
- Ford MG, Pitt WR, and Whitley DC: Selecting compounds for focused screening using linear discriminant analysis and artificial neural networks. *Journal of molecular graphics & modelling* 22(6): 467–72, 2004
- Fraenkel GS: The Raison d' Etre of Secondary Plant Substances. 129(i): 1466–1470, 1959
- Frimurer TM, Bywater R, Naerum L, Lauritsen LN, Brunak S: Improving the odds in discriminating “drug-like” from “non drug-like” compounds. *Journal of chemical information and computer sciences* 40(6): 1315–24, 2000
- Furka A: History of Combinatorial Chemistry. *Drug Development Research* 36(1): 1–12, 1995
- Gaiteri C, Sibille E: Differentially expressed genes in major depression reside on the periphery of resilient gene coexpression networks. *Frontiers in neuroscience* 5(August): 95, 2011
- Galloway WRJD, Isidro-Llobet A, Spring DR: Diversity-oriented synthesis as a tool for the discovery of novel biologically active small molecules. *Nature communications* 1(6): 80, 2010
- Ganesan A: The impact of natural products upon modern drug discovery. *Current opinion in chemical biology* 12(3): 306–17, 2008
- Gillet VJ, Khatib W, Willett Peter, Fleming PJ, Green DVS: Combinatorial library design using a multiobjective genetic algorithm. *Journal of chemical information and computer sciences* 42(2): 375–85, 2002
- Gobbi A, Lee M-L: DISE: directed sphere exclusion. *Journal of chemical information and computer sciences* 43(1): 317–23, 2003
- Govindarajan A, Rao BSS, Nair D, Trinh M, Mawjee N, Tonegawa S, Chattarji S: Transgenic brain-derived neurotrophic factor expression causes both anxiogenic and antidepressant effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(35): 13208–13, 2006
- Groves JO: Is it time to reassess the BDNF hypothesis of depression? *Molecular psychiatry* 12(12): 1079–88, 2007
- Gullo VP, McAlpine J, Lam KS, Baker D, Petersen F: Drug discovery from natural products. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 33(7): 523–31, 2006

- Haniu M, Montestrucque S, Bures EJ, Talvenheimo J, Toso R, Lewis-Sandy S, Welcher A, Rohde MF: Interactions between brain-derived neurotrophic factor and the TRKB receptor. Identification of two ligand binding domains in soluble TRKB by affinity separation and chemical cross-linking. *The Journal of biological chemistry* 272(40): 25296–303, 1997
- Hann MM, Oprea TI: Pursuing the leadlikeness concept in pharmaceutical research. *Current opinion in chemical biology* 8(3): 255–63, 2004
- Harborne JB, Williams C: Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55(6): 481–504, 2000
- He X, Zhang J: Why do hubs tend to be essential in protein networks? *PLoS genetics* 2(6): e88, 2006
- Hecke T: Power study of anova versus Kruskal-Wallis test. *Journal of Statistics and Management Systems* 15(2): 241–247, 2012
- Hettema J: Genetics of depression. *Focus* VIII(3): 316–322, 2010
- Hudson BD, Hyde RM, Rahr E, Wood J: Parameter based methods for Compound selection from chemical databases. *Quantative Structure-Activity Relationship (15)*: 285–289, 1996
- Huang EJ, Reichardt LF: Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual review of neuroscience* 24: 677–736, 2001
- Hughes JD, Blagg J, Price DA, Bailey S, Decrescenzo G a, Devraj R V, Ellsworth E, Fobian YM, Gibbs ME, Gilles RW, Greene N, Huang EJ, Krieger-Burke T, Loesel J, Wager TT, Whiteley L,
Zhang Y: Physiochemical drug properties associated with in vivo toxicological outcomes. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 18(17): 4872–5, 2008
- Healy D: *The Antidepressant Era*. 4. painos. Harvard University Press, Cambridge 1997
- Inglese J, Johnson RL, Simeonov A, Xia M, Zheng W, Austin CP, Auld DS: High-throughput screening assays for the identification of chemical probes. *Nature chemical biology* 3(8): 466–79, 2007
- Ioannidis JP: Why most published research findings are false. *PLoS medicine* 2(8): e124, 2005
- Jacob F: Evolution and tinkering. *Science* 196(4295): 1161–1166, 1977
- Jang S-W, Liu X, Yepes M, Shepherd KR, Miller GW, Liu Y, Wilson WD, Xiao G, Blanchi B, Sun YE, Ye K: A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities

by 7,8-dihydroxyflavone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(6): 2687–92, 2010

Jeong H, Mason SP, Barabási AL, Oltvai ZN: Lethality and centrality in protein networks. *Nature* 411(6833): 41–2, 2001

Jimenez-Sanchez G, Childs B, Valle D: Human disease genes. *Nature* 409(February): 853–855, 2001

Johnson TW, Dress KR, Edwards M: Using the Golden Triangle to optimize clearance and oral absorption. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 19(19): 5560–4, 2009

Jones G: Genetic and Evolutionary Algorithms. Haettu verkosta 19.05.2013: www.wiley.com/legacy/wileychi/ecc/samples/sample10.pdf

Karege F, Bondolfi G, Gervasoni N, Schwald M, Aubry J-M, Bertschy G: Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. *Biological psychiatry* 57(9): 1068–72, 2005

Kell DB: Scientific discovery as a combinatorial optimisation problem: how best to navigate the landscape of possible experiments? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 34(3): 236–44, 2012

Kenny PW, Montanari CA: Inflation of correlation in the pursuit of drug-likeness. *Journal of computer-aided molecular design* 27(1): 1–13, 2013

Khanna V, Ranganathan S: Structural diversity of biologically interesting datasets: a scaffold analysis approach. *Journal of cheminformatics* 3(1): 30, 2011

King RD, Rowland J, Oliver SG, Young M, Aubrey W, Byrne E, Liakata M, Markham M, Pir P, Soldatova LN, Sparkes A, Whelan KE, Clare A: The automation of science. *Science (New York, N.Y.)* 324(5923): 85–9, 2009

Koch M a, Schuffenhauer A, Scheck M, Wetzel S, Casaulta M, Odermatt A, Ertl P, Waldmann H: Charting biologically relevant chemical space: a structural classification of natural products (SCONP). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(48): 17272–7, 2005

Kokel D, Bryan J, Laggner C, White R, Cheung CYJ, Mateus R, Healey D, Kim S, Werdich A, Haggarty SJ, Macrae C a, Shoichet B, Peterson RT: Rapid behavior-based identification of neuroactive small molecules in the zebrafish. *Nature chemical biology* 6(3): 231–237, 2010

Kola I, Landis J: Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature reviews. Drug discovery* 3(8): 711–5, 2004

- Koenker R: Quantile Regression. 1. painos. Cambridge University Press, Cambridge 2005
- Kragh, H. Cosmology and Controversy: The Historical Development of Two Theories of the Universe. Princeton University Press. s. 212, 2. painos New Jersey 1999
- Kruisselbrink JW, Emmerich MTM, Thomas B, Bender A, Ijzerman AP, Horst E Van Der: Combining Aggregation with Pareto Optimization : A Case Study in Evolutionary Molecular Design. 453–467, 2009
- Lachance H, Wetzel S, Waldman H: The Role of Natural Products in Drug Discovery. Kirjassa: Lead Generation Approaches in Drug Discovery. s. 21-72. 1. painos. Toim. Rankovic Z, Morphy R, John Wiley and Sons Ltd. New Jersey 2010
- Lahana R: How many leads from HTS? Drug Discovery Today 4(10): 447–448, 1999
- Lam KS: New aspects of natural products in drug discovery. Trends in microbiology 15(6): 279–89, 2007
- Laursen L: Europe plans molecular screening center for translational research. Nature Medicine 18(4): 477–477, 2012
- Lehmann EL: Testing Statistical Hypotheses. 1. painos. Springer, 1999
- Leßmann T, Leuenberger MG, Menninger S, Lopez-Canet M, Müller O, Hümmer S, Bormann J, Korn K, Fava E, Zerial M, Mayer TU, Waldmann H: Natural Product-Derived Modulators of Cell Cycle Progression and Viral Entry by Enantioselective Oxa-Diels-Alder Reactions on the Solid Phase. Chemistry & Biology 14(4): 443–451, 2007
- Léveillé F, Papadia S, Fricker M, Bell KFS, Soriano FX, Martel M-A, Puddifoot C, Habel M, Wyllie DJ, Ikonomidou C, Tolkovsky AM, Hardingham GE: Suppression of the intrinsic apoptosis pathway by synaptic activity. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 30(7): 2623–35, 2010
- Levi-Montalcini R: The nerve growth factor: thirty-five years later. Nobel Lecture, 1986
- Lipinski C: Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. Journal of pharmacological and toxicological methods 44(1): 235–49, 2001
- Lipkus AH, Yuan Q, Lucas K a, Funk S a, Bartelt WF, Schenck RJ, and Trippe AJ: Structural diversity of organic chemistry. A scaffold analysis of the CAS Registry. The Journal of organic chemistry 73(12): 4443–51, 2008
- Liu X, Chan C-B, Jang S-W, Pradoldej S, Huang J, He K, Phun LH, France S, Xiao G, Jia Y, Luo HR, Ye K: A Synthetic 7,8-Dihydroxyflavone Derivative Promotes

Neurogenesis and Exhibits Potent Antidepressant Effect. *Journal of medicinal chemistry* 52(21): 8274–8286, 2010

Lohr S: And Now, From I.B.M., Chef Watson. *New York Times* 27.02.2013

Lovering F, Bikker J, and Humblet C: Escape from flatland: increasing saturation as an approach to improving clinical success. *Journal of medicinal chemistry* 52(21): 6752–6, 2009

Luberg K, Wong J, Weickert CS, Timmusk T: Human TrkB gene: novel alternative transcripts, protein isoforms and expression pattern in the prefrontal cerebral cortex during postnatal development. *Journal of neurochemistry* 113(4): 952–64, 2010

Magarinos A, Li C, Toth JG: Effect of brain-derived neurotrophic factor haploinsufficiency on stress-induced remodeling of hippocampal neurons. *Hippocampus* 21(3): 253–264, 2011

Manly SP: Natural-products or not? How to screen for natural-products. *Kirjassa: High Throughput Screening: Methods and Protocols*. s. 153–169. toim Janzen WP, Humana Press, New Jersey 2009

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S: The protein kinase complement of the human genome. *Science (New York, N.Y.)* 298(5600): 1912–34, 2002

Mantilla CB, Ermilov LG: The novel TrkB receptor agonist 7,8-dihydroxyflavone enhances neuromuscular transmission. *Muscle & nerve* 45(2): 274–6, 2012

Martin YC, Kofron JL, Traphagen LM: Do structurally similar molecules have similar biological activity? *Journal of medicinal chemistry* 45(19): 4350–8, 2002

Mayr LM, Bojanic D: Novel trends in high-throughput screening. *Current opinion in pharmacology* 9(5): 580–8, 2009

Mayr LM, Fuerst P: The future of high-throughput screening. *Journal of biomolecular screening* 13(6): 443–8, 2008

Meyeres MA: *Happy Accidents: Serendipity in Modern Medical Breakthroughs*. 1. painos. Arcade Publishing, New York 2007

Molendijk ML, Bus BA, Spinhoven P, Penninx BWJH, Kenis G, Prickaerts J, Voshaar RCO, Elzinga BM: Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in major depressive disorder: state-trait issues, clinical features and pharmacological treatment. *Molecular psychiatry* 16(11): 1088–95, 2011

- Molteni R, Calabrese F, Bedogni F, Tongiorgi E, Fumagalli F, Racagni G, Riva MA: Chronic treatment with fluoxetine up-regulates cellular BDNF mRNA expression in rat dopaminergic regions. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 9(3):3 07-17, 2006
- Monteggia LM, Luikart B, Barrot M, Theobald D, Malkovska I, Nef S, Parada LF, and Nestler Eric J: Brain-derived neurotrophic factor conditional knockouts show gender differences in depression-related behaviors. *Biological psychiatry* 61(2): 187–97, 2007
- Montgomery J: Chemistry. High-throughput discovery of new chemical reactions. *Science (New York, N.Y.)* 333(6048): 1387–8, 2011
- Morton D, Leach S, Cordier C, Warriner S, Nelson A: Synthesis of natural-product-like molecules with over eighty distinct scaffolds. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 48(1): 104–9, 2009
- Mullard A: European Lead Factory opens for business. *Nature Reviews Drug Discovery* 12(March): 173–175, 2013
- Nakagawara A, Liu XG, Ikegaki N, White PS, Yamashiro DJ, Nycum LM, Biegel J, Brodeur GM: Cloning and chromosomal localization of the human TRK-B tyrosine kinase receptor gene (NTRK2). *Genomics* 25(2): 538–46, 1995
- Nayal M, Honig B: On the nature of cavities on protein surfaces: Application to the identification of drug-binding sites. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 906(February): 892–906, 2006
- Naylor RL, Robertson AGS, Allen SJ, Sessions RB, Clarke AR, Mason GGF, Burston JJ, Tyler SJ, Wilcock GK, Dawbarn D: A Discrete Domain of the Human TrkB Receptor Defines the Binding Sites for BDNF and NT-4. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 507: 501–507, 2002
- Neuha M: Nonparametric Tests for Trend: Jonckheere's Test, a Modification and a Maximum Test. *Biometrical Journal* 40: 899–909, 1998
- Newman DJ, Cragg GM: Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of natural products* 70(3): 461–77, 2007
- Newman DJ, Cragg GM: Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products* 75(3): 311–35, 2012
- Nibuya M, Morinobu S, Duman RS: Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15(11): 7539–47, 1995

- Nibuya M, Nestler E J, Duman RS: Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16(7): 2365–72, 1996
- Nicolaou C a, Kannas C, Loizidou E: Multi-objective optimization methods in de novo drug design. *Mini reviews in medicinal chemistry* 12(10): 979–87, 2012
- Nicolaou K, Pfefferkorn J: Natural product-like combinatorial libraries based on privileged structures. 1. General principles and solid-phase synthesis of benzopyrans. *J. Am. Chem. Soc.* (9): 9939–9953, 2000
- Nikolova N, Jaworska J: Approaches to Measure Chemical Similarity– a Review. *QSAR & Combinatorial Science* 22(910): 1006–1026, 2003
- Von Nussbaum F, Brands M, Hinzen B, Weigand S, Häbich D: Antibacterial natural products in medicinal chemistry--exodus or revival? *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 45(31): 5072–129, 2006
- Oprea TI, Davis M, Teague SJ, Leeson PD: Is there a difference between leads and drugs? A historical perspective. *Journal of chemical information and computer sciences* 41(5): 1308–15, 2001
- Oprea TI: Current trends in lead discovery: are we looking for the appropriate properties? *Journal of computer-aided molecular design* 16(5-6): 325–34, 2002
- Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL: How many drug targets are there? *Nature reviews. Drug discovery* 5(12): 993–6, 2006
- Pajouhesh H, Lenz GR: Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2(4): 541–53, 2005
- Palmer AM, Stephenson FA: CNS drug discovery: challenges and solutions. *Drug news & perspectives* 18(1): 51–7, 2005
- Pangalos MN, Schechter LE, Hurko O: Drug development for CNS disorders: strategies for balancing risk and reducing attrition. *Nature reviews. Drug discovery* 6(7): 521–32, 2007
- Paolini G V, Shapland RHB, Van Hoorn WP, Mason JS, Hopkins AL: Global mapping of pharmacological space. *Nature biotechnology* 24(7): 805–15, 2006
- Pardridge W: The blood-brain barrier and neurotherapeutics. *Neurotherapeutics* 2(January): 1–2, 2005

Parker MO, Millington ME, Combe FJ, Brennan CH: Housing conditions differentially affect physiological and behavioural stress responses of zebrafish, as well as the response to anxiolytics. *PloS one* 7(4): e34992, 2012

Peirce CS: Harvard lectures on pragmatism. 1903. www.textlog.de/7664-2.html

Pieczenik G: Method and means for sorting and identifying biological information. *Yhdysvaltojen Patentti* 5,866,363, 1999

Quigley T: Going with the Glow. *Drug Discovery & Development* 11(11): 38-42 2008.

Rankovic Z, Jamieson C, Morphy R: High Throuput Screening Approach to Lead Discovery. Kirjassa: *Lead Generation Approaches in Drug Discovery*. s. 21-72. 1. painos. Toim. Rankovic Z, Morphy R, John Wiley and Sons Ltd. New Jersey 2010

Rantamäki T, Hendolin P, Kankaanpää A, Mijatovic J, Piepponen P, Domenici E, Chao M V, Männistö PT, Castrén E: Pharmacologically diverse antidepressants rapidly activate brain-derived neurotrophic factor receptor TrkB and induce phospholipase-Cgamma signaling pathways in mouse brain. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 32(10): 2152–62, 2007

Rihel J, Prober DA, Arvanites A, Lam K, Zimmerman S, Jang S, Haggarty SJ, Kokel D, Rubin LL, Peterson RT, Schier AF: Zebrafish behavioral profiling links drugs to biological targets and rest/wake regulation. *Science (New York, N.Y.)* 327(5963): 348–51, 2010

Ripke S, Wray NR, Lewis CM, Hamilton SP, Weissman MM, Breen G: A mega-analysis of genome-wide association studies for major depressive disorder. *Molecular psychiatry* 18(4): 497–511, 2013

Rishton GM: Nonleadlikeness and leadlikeness in biochemical screening. *Drug discovery today* 8(2): 86–96, 2003

Ritchie TJ, Macdonald SJF: The impact of aromatic ring count on compound developability--are too many aromatic rings a liability in drug design? *Drug discovery today* 14(21-22): 1011–20, 2009

Robbins DW, and Hartwig JF: A simple, multidimensional approach to high-throughput discovery of catalytic reactions. *Science (New York, N.Y.)* 333(6048): 1423–7, 2011

Rogers DJ, Tanimoto TT: A Computer Program for Classifying Plants. *Science* 132 (3434): 1115–1118, 1960

Scannell JW, Blanckley A, Boldon H, Warrington B: Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. *Nature reviews. Drug discovery* 11(3): 191–200, 2012

Schad E, Tompa P, Hegyi H: The relationship between proteome size, structural disorder and organism complexity. *Genome biology* 12(12): r120, 2011

Schlessinger J: Cell signaling by receptor-tyrosine kinases. *Cell* 103: 211–225, 2010
Schmidt M, and Lipson H: Distilling free-form natural laws from experimental data. *Science (New York, N.Y.)* 324(5923): 81–5, 2009

Schreiber SL: Organic chemistry: Molecular diversity by design. *Nature* 457(7226): 153–4, 2009

Schuffenhauer A, Ertl P, Roggo S, Wetzel S, Koch M, Waldmann H: The scaffold tree--visualization of the scaffold universe by hierarchical scaffold classification. *Journal of chemical information and modeling* 47(1): 47–58, 2007

Segall MD: Multi-parameter optimization: identifying high quality compounds with a balance of properties. *Current pharmaceutical design* 18(9): 1292–310, 2012

Sibille E, Arango V, Galfalvy HC, Pavlidis P, Erraji-Benchekroun L, Ellis SP, John Mann J: Gene expression profiling of depression and suicide in human prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 29(2): 351–61, 2004

Steenbergen PJ, Richardson MK, Champagne DL: The use of the zebrafish model in stress research. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 35(6): 1432–51, 2011

Sui Y, Wu Z: Alternative statistical parameter for high-throughput screening assay quality assessment. *Journal of biomolecular screening* 12(2): 229–34, 2007

Swinney DC, Anthony J: How were new medicines discovered? *Nature reviews. Drug discovery* 10(7): 507–19, 2011

Szostak J: Introduction: Combinatorial Chemistry. *Chemical reviews* 97(2), 1997

Tammela, P. Screening Methods for the Evaluation of Biological Activity in Drug Discovery. 2004. <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/far/farma/vk/tammela/>

Tukey J: Exploratory data-analysis. 1. painos. Addison-Wesley Publishing Company. New Jersey 1977

Van de Waterbeemd H, Camenisch G, Folkers G, Chretien JR, Raevsky O: Estimation of blood-brain barrier crossing of drugs using molecular size and shape, and H-bonding descriptors. *Journal of drug targeting* 6(2): 151–65, 1998

Verheij HJ: Leadlikeness and structural diversity of synthetic screening libraries. *Molecular diversity* 10(3): 377–88, 2006

Vesa J, Kruttgen A, Shooter EM: p75 reduces TrkB tyrosine autophosphorylation in response to brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 4/5. *The Journal of biological chemistry* 275(32): 24414–20, 2000

Virshup AM, Contreras-García J, Wipf P, Yang W, Beratan DN: Stochastic voyages into uncharted chemical space produce a representative library of all possible drug-like compounds. *Journal of the American Chemical Society*, 2013

Wager T, Hou X, Verhoest P, Villalobos A: Moving beyond Rules: The Development of a Central Nervous System Multiparameter Optimization (CNS MPO) Approach To Enable Alignment of Druglike Properties. *ACS Chemical Neuroscience* 1(6): 435–449, 2010

Wellek, S: *Testing Statistical Hypotheses of Equivalence*. 1. painos, Taylor & Francis, Hampshire 2003

Welsch ME, Snyder SA, Stockwell BR: Priviledged Scaffolds for Library Desing and Drug Discovery. *Curr Opin Chem Biol* 14(3): 347–361, 2010

Wetzel S, Bon RS, Kumar K, Waldmann H: Biology-oriented synthesis. *Angewandte Chemie* 50(46): 10800–26, 2011

Willett P: Dissimilarity-based algorithms for selecting structurally diverse sets of compounds. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology* 6(3-4): 447–57, 1999

Williams G: *Natural Selection: Domains, Levels, and Challenges*. Oxford University Press. New York. 1992.

Williams M: Productivity shortfalls in drug discovery: contributions from the preclinical sciences? *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 336(1): 3–8, 2011

Wilson EO: *The Future of Life*. 1. painos. Abacus, Lontoo. 2002.

Windisch JM, Marksteiner R, Lang ME, Auer B, Schneider R: Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 bind to a single leucine-rich motif of TrkB. *Biochemistry* 34(35): 11256–63, 1995

Wintner EA, Moallemi CC: Quantized surface complementarity diversity (QSCD): a model based on small molecule-target complementarity. *Journal of medicinal chemistry* 43(10): 1993–2006, 2000

Yamanaka T, Okamoto T, Ichinose Y, Oda S, Maehara Y: Methodological aspects of current problems in target-based anticancer drug development. *International journal of clinical oncology / Japan Society of Clinical Oncology* 11(3): 167–75, 2006

Zhang J-H, Chung T, Oldenburg K: A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *Journal of biomolecular screening* 4(2): 67–73, 1999

Österberg T, Norinder U: Prediction of polar surface area and drug transport processes using simple parameters and PLS statistics. *Journal of chemical information and computer sciences* 40(6): 1408–11, 2000

LIITE 1

REAGENTS

100 ML OF LYSIS-BUFFER (W/O PHOSPHATASE-INHIBITORS) = NP-lysis

3 M Tris-HCl, pH 8.0	670 μ l
5 M NaCl-solution	2740 μ l
0.5 M NaF-solution	9600 μ L = 9,6 ml
NP-40 (Nonidet 40)	1000 μ l = 1 ml
Glycerol	10000 μ l = 10 ml
MilliQ-water	ad 100 ml

5 ML OF LYSIS-BUFFER CONTAINING INHIBITORS = NP++

100 mM Na_3VO_4 (natriumortho- VO_4) -stock	100 μ l
Complete inhibitor mix (25 x stock)	200 μ l
Lysis-buffer	ad 5000 μ l

STRIPPING BUFFER

3 M Tris pH 6.8	20.8 ml
20% SDS	100 ml
Water	ad 1000 ml

For 50 ml add 350 microl beta-mercaptoEtOH

Fosfo-Trk ELISA for *in vitro* stimulation experimen

By: Tomi Rantamäki
Date: 3.7.2008

Day 1: Antibody coating

I. Preparation of the 96-well plate (OptiPlate 96 F HB, White, PerkinElmer)

- Antibodies
Anti-pan-Trk antibody (sc-11, 200 µl, **1:500** in Optacoat™, EY Laboratories)
- Seal the plate and incubate overnight on a shaker at +4°C

Day 2: Stimulations and sample incubation

I. Block with 2% BSA/PBS-T

- 2 h at RT (300 µl), shaker

II. Sample incubation

- Apply the cleared sample lysates from 24-well plates to the wells
- add 125 µl 3% BSA/PBS-T (+2mM Na₃VO₄)
- Fill the empty wells if needed
- Seal the plate and incubate on a shaker overnight at +4°C

Day 3: Phospho-Tyr antibody

I. Wash 4 times with the PBS-T

- 300 µl using the plate washer

II. pY antibodies

- clone PY20-biotin (200 µl, **1:1000** in 2% BSA/PBS-T; store at +4 °C)
- Seal the plate and incubate on a shaker at RT for 2 h OR at +4 °C over night

Day 3: Streptavidin-HRP

III. Wash 4 times with the PBS-T

- 300 µl using the plate washer

IV. anti-mouse-HRP antibody

- Streptavidin-HRP (200 µl, **1:10000** in 2% BSA/PBS-T; store at -20°C)
- Seal the plate and incubate on a shaker at RT for 1h OR at +4 °C over night

Day 3: ECL detection

I. Wash 4 times with the PBS-T

- 300 µl using the plate washer

II. Add 100 µl/well of premixed ECL reagent (1:1, Pierce)

- **Important note: make the reagent mix at RT 5-10 min before application!**

III. Count luminescence, 1 sec per well (at the DDCC, contact Päivi Tammela)

- analyze the results obtained 3 min after ECL administration

LIITE 3

Käytetyt materiaalit ja laitteet

Materiaali	Valmistaja
BDNF	Preprotech
MG87- Fibrablasti	Regeneron
PBS	Sigma
Optacoat-liuos	AlerCheck
MCA2472 (antifofotyrosiini)	ABD Serotec
BSA	Pierce
Trypsiini-EDTA	Invitrogen
Vesi	ks. laitteet
Tween 20	Sigma
HBSS	Sigma
sc-11 (anti-pan-Trk)	Santa Cruz Biotechnology
DMEM	Invitrogen

Laitteet	Valmistaja
Levynpesijä	Wallac platewash
Biomek-nesteenkäsittelyasema	Beckman Coulter
Varioskan Flash-levynlukija	Thermo Scientific
MilliQ-vedenpuhdistin	Millipore
Levyn ravistelijä Wallac Plate Shake	PerkinElmer

LIITE 4

Solujen elatusaineen koostumus ja jako-ohje.

Elatusaine:

haluttu määrä DMEM:ä (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

10 % kokonaistilavuudesta FCS (vasikan seerumi)

1 % kokonaistilavuudesta PS (penisilliini-streptomysiini)

1 % kokonaistilavuudesta L-glutamiinia

400g/mL konsentraatio G418

Jakaminen:

1. Tarkista solujen olevan laadukkaita mikroskoopilla. Poista sitten maljoista vanha elatusaine. Pese malja PBS:llä ja ime neste pois.
2. Annostele maljalle Trypsiini-EDTA:ta ja vie malja viideksi minuutiksi inkubaattoriin. Poista malja ja koputtele sitä kevyesti, niin että solut irtoavat levystä. Annostele ne 60 millilitraan elatusainetta.
3. Annostele tämä neste tasaisesti kuudelle uudelle maljalle
4. Vie uudet maljat takaisin inkubaattoriin