

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Biotekniikka

2014

Pekka Puolasmaa

MENETELMÄN KEHITYS TNF α - MODULAATTOREITA NEUTRALISOIVIEN VASTA- AINEIDEN OSOITTAMISEKSI IHMISEN SEERUMISSA



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Pekka Puolasmaa

MENETELMÄN KEHITYS TNF α - MODULAATTOREITA NEUTRALISOIVIEN VASTA- AINEIDEN OSOITTAMISEKSI IHMISEN SEERUMISSA

Autoimmuunisairaudessa potilaan immuunipuolustusjärjestelmään syntyy toimintahäiriö, ja se hyökkää terveitä soluja vastaan. Eräs tunnetuimpia autoimmuunisairauksia on nivelreuma, joka aiheuttaa potilaan nivelten kulumista, mahdollisesti pahojakin kipuja ja lopulta työkyvyttömyyttä sekä elämänlaadun merkittävää heikkenemistä. Autoimmuunisairauksien syntymekanismeja ei edelleenkaan tunneta eikä niille ole löydetty parantavaa hoitokeinoja. Oireiden hoito on kuitenkin kehittynyt viimeisten vuosikymmenien aikana huomasti biologisten lääkkeiden myötä.

Biologiset lääkkeet voivat olla esimerkiksi vasta-aineita, proteiineja tai peptidejä, jotka on tuotettu elävissä geenimuunnelluissa soluissa. Biologisten lääkeaineiden ongelma on se, että ihmisen immuunipuolustus voi reagoida niihin. Tällöin elimistössä muodostuu lääkkeeseen tarttuvia vasta-aineita, jotka voivat vaikuttaa lääkkeen toimintaan elimistössä tai täysin neutralisoida sen toiminnan. Immunogeenisyystutkimukset ovat siksi tärkeitä niin lääkkeen kehitysvaiheessa, kuin lääkkeen käyttöä seurattaessakin.

Nivelreumassa TNF α -proteiinin toimintaa estäviä biologisia lääkkeitä käytetään tapauksissa, joissa tavanomaiset hoidot eivät enää tehoa. Pääsääntöisesti potilaiden kunto kohenee huomattavasti, mutta noin kolmasosalla immunogeenisyysreaktiot estävät käytön jatkamisen. Tässä opinnäytetyössä kehitettiin Syrinx Bioanalyticsille analyysimenetelmää, jolla seeruminäytteestä voidaan kvantitatiivisesti määrittää bioaktiivinen lääke ja semi-kvantitatiivisesti lääkettä vastaan muodostuneet neutralisoivat vasta-aineet. Menetelmää voitaisiin tulevaisuudessa soveltaa sekä uusien vastaavien lääkkeiden immunogeenisyystutkimuksiin että nykyisillä lääkkeillä hoidettujen potilaiden monitorointiin.

Kehitettävä menetelmä perustuu tanskalaisen Biomonitor A/S:n alunperin kehittämään reportterigeenimenetelmään, jossa geenimuunnellut solut tuottavat lusiferaasia TNF α :n sitoutuessa solukalvolla oleviin reseptoreihin. Työssä tutkittiin menetelmän ominaisuuksia ja sen sopivuutta Syrinxin vaatimuksiin. Aikataulurajoitusten vuoksi kehitys jäi kesken, mutta työn aikana saatiin kerättyä tarpeeksi dataa, jotta kehitystä voidaan pitää järkevänä ja myöhemmin jatkaa.

ASIASANAT:

biologinen lääkeaine, vasta-aine, autoimmuunisairaus, nivelreuma, analyysimenetelmä, immunomääritys, immunogeenisyys, TNF, reportterigeeni, luminesenssi

Pekka Puolasmaa

DEVELOPMENT OF NEUTRALIZING ANTIBODY ASSAY FOR THE DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST TNF α MODULATORS IN HUMAN SERUM

In autoimmune diseases, the patient's immune system malfunctions and it starts attacking healthy cells. One of the most well-known diseases is rheumatoid arthritis which causes wear and possibly severe pain in the patient's joints leading to incapacity for work and significant reduction in the quality of life. The root causes for autoimmune diseases are still not understood and no cure has been found. Treatment of the symptoms, however, has seen a tremendous increase in efficiency over the last few decades due to the emergence of biological drugs.

Biological drugs can be, for example, antibodies, proteins or peptides which are manufactured in living cell cultures. The problem with biologicals is that the human immune system may react to them. This immune reaction causes the immune system to form anti-drug antibodies which may affect the behavior of the drug in the body, or even completely neutralize the drug. For this reason immunogenicity studies are important in both the development phase as well as for monitoring in the post-approval phase.

In rheumatoid arthritis TNF α modulating drugs are used when all the conventional treatments are inefficient. Generally, patients experience substantial improvement in their condition but for about a third, the immune reaction prevents the continuation of the treatment. The objective of this study was to develop an analysis method for Syrinx Bioanalytics to quantitatively assay bioactive drug and semi-quantitatively assay anti-drug neutralizing antibodies in serum samples. In future this assay could be used for immunogenicity trials for new drugs but also as a monitoring tool for patients treated with existing drugs.

The method is based on a reporter gene assay, originally developed by the Danish corporation Biomonitor A/S, where genetically modified cells produce luciferase as TNF α binds to the receptors on the cell membrane. The characteristics of the assay method as well as its suitability for use by Syrinx were studied. Due to timetable constraints, the development was not completed during the study but sufficient data was gathered for further development to be regarded as sensible.

KEYWORDS:

biological drug, antibody, autoimmune disease, rheumatoid arthritis, assay method, immunoassay, immunogenicity, TNF, reporter gene, luminescence

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO	7
1 JOHDANTO	8
1.1 Syrinx Bioanalytics	8
1.2 TEKES-rahoitus ja monitorointiprojekti	9
1.3 Autoimmuunisairaudet	9
1.4 Menetelmä	10
2 IMMUUNIREAKTIO JA IMMUNOGEENISYYS	11
2.1 Autoimmuunireaktio ja TNF α	11
2.2 Biologiset anti-TNF α -lääkkeet	11
2.3 Neutralisoivat vasta-aineet	13
3 MENETELMÄNKEHITYS	15
3.1 GLP	15
4 REPORTTERIGEENIMENETELMÄ SEKÄ <i>ILITE</i>[™] & DUAL-GLO[®] - TEKNOLOGIAT	16
4.1 Reportterigeenimenetelmä	16
4.2 <i>iLite</i> [™]	16
4.3 Bioluminesenssi	17
4.3.1 Dual-Glo [®]	17
5 LAITTEISTO, PROTOKOLLAT JA REAGENSsit	20
5.1 Victor	20
5.2 Reagenssit	20
5.3 Kitit vai solut - määritysprotokollan valinta	21
5.3.1 Soluprotokolla	23
5.3.2 Kittiprotokolla	24
6 TYÖN SUORITUS JA TULOKSET	26
6.1 Tutkittavat parametrit	26
6.2 Annos-vaste –käyrät ja määrittämisen kokeilu	26
6.2.1 Signaalitason ongelmat	26
6.2.2 TNF α :n annos-vaste –käyrä	27

6.2.3 Lääkkeen annos-vaste –käyrä	28
6.2.4 NAb annos-vaste –käyrä	29
6.2.5 Määrityksen toistettavuuden ongelmat – protokollan vaihto	30
6.3 Menetelmän tarkkuus ja NAb kontrollin toimivuus	32
6.4 Menetelmän häiriöalttius	36
6.4.1 Määrityksen tekeminen ei-aseptisesti ja ei-steriilillä kuoppalevyllä	36
6.4.2 Solujen käsittely	37
6.4.3 Inkubaatioajan muutos	38
7 POHDINTAA	41
7.1 Työn tavoitteiden onnistuminen	41
7.2 Henkilökohtainen merkitys	41
8 LÄHTEET	43

LIITTEET

- Liite 1. Raakasignaalit määrityksille
- Liite 2. Menetelmän tarkkuus
- Liite 3. Menetelmän häiriöalttius

KUVAT

Kuva 1: TNF α :n kiderakenne (Protein Data Bank in Europe 1990)	12
Kuva 2: TNF-estäjien rakennekaaviot (Tracey et al. 2008)	12
Kuva 3: <i>iLite</i> -määrityksen toimintaperiaate (Syrinx Bioanalytics Oy 2013)	19

KUVIOT

Kuvio 1. TNF α annos-vaste –käyrä	27
Kuvio 2. Lääkkeen annos-vaste –käyrä	29
Kuvio 3. NAb annos-vaste –käyrä	30
Kuvio 4: Standardisuora lääkkeelle eri seerumeissa soluprotokollalla.	31
Kuvio 5: Standardisuorat ja kontrollinäytteet lääkkeelle kittiprotokollalla.	32
Kuvio 6. Esimerkki tarkkuustestien tulosten kuvaajista	33
Kuvio 7. Tarkkuustestien standardisuorat ja lineaarinen sovitus	34
Kuvio 8. Solujen käsittelyn vaikutus signaaliin	38
Kuvio 9. Inkubaatioajan vaikutus tuloksiin.	39

TAULUKOT

Taulukko 1. Soluprotokolla	23
Taulukko 2. Kittiprotokolla	24
Taulukko 3. Tarkkuustestien pipetointikaavio	33
Taulukko 4. Tarkkuuslaskelmia	36
Taulukko 5. FL- ja RL-signaalien keskiarvot eri inkubaatioajoilla.	39

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO

CRO	Contract Research Organization, tutkimuspalveluja tarjoava yritys
DELFLIA	Dissociation Enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay
ECL	Electrochemiluminescence
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FL	Firefly Luciferase, tulikärpäsen lusiferaasi
GLP	Good Laboratory Practice
Kimeerinen vasta-aine	Vasta-aine, jossa on eläimestä ja ihmisestä peräisin olevia osia
Matriisi	Näytteen ”pohja”, eli kaikki muu paitsi itse analysoitava molekyyli. Esim. seerumi tai kasvatusmedium
NAb	(lääkkeen) Neutralisoiva vasta-aine
poolattu seerumi	Useista eri henkilöistä otettujen seeruminäytteiden sekoitus
RIA	Radioimmunoassay
RL	<i>Renilla</i> Luciferase, meriorvokin lusiferaasi
Spike	Näytteeseen lisättävä tietty määrä ainetta. Esim. TNF α -spike täytyy lisätä, jotta menetelmä toimii
TNF α	Tuumorinekroosifaktori-alfa
TR-FIA	Time-resolved Fluoroimmunoassay

1 JOHDANTO

Opinnäytetyön tavoitteena oli testata anti-TNF α -lääkevasta-aineiden määrittämiseen kehitetyn reportterigeenimenetelmän toimivuutta Syrinx Bioanalyticsin laboratoriossa ja soveltuvuutta yrityksen tarpeisiin. Tarkoitus ei ollut varsinaisesti saada menetelmää täysin käyttökuntoon, vaan tehdä alustavaa testausta myöhempää käyttöä varten. Mikäli menetelmä osoittautuu toimivaksi ja tarkoitukseen sopivaksi, se voidaan tulevaisuudessa validoida ja sisällyttää Syrinx Bioanalyticsin tarjoamiin palveluihin.

1.1 Syrinx Bioanalytics

Syrinx Bioanalytics on pieni, noin 14 henkeä työllistävä CRO bioanalytiikan alalla. Tämä tarkoittaa sitä, että Syrinx tuottaa tutkimustuloksia palveluina muille yritysasiakkaille, pääasiassa isoille lääkealan yrityksille. Projektit voivat olla esimerkiksi kliinisessä vaiheessa olevan uuden lääketutkimuksen potilasnäytteiden analysointia tai vaikkapa analyysimenetelmän kehitystä pre-kliinisen vaiheen tutkimuksia varten.

Syrinx oli alunperin Bayer Schering Pharman bioanalytiikkalaboratorio. Vuonna 2007 Bayer päätti lopettaa bioanalytiikan Suomessa. Kysyntää osaamiselle kuitenkin oli, ja päätettiin perustaa Syrinx Bioanalytics ostamalla laitteet ja vuokraamalla tilat Bayerilta.

Yritys tarjoaa erilaisia immunomäärityspalveluita mm. biologisten lääkkeiden, rokotteiden, vasta-aineiden ja biomarkkerien analysointiin. Tutkimuksiin on käytettävissä useita eri menetelmiä kuten radioimmunomääritys, DELFIA, pintaplasmoniresonanssi ja elektrokemiluminesenssi. Laboratorio on Suomen vanhin GLP-sertifioitu laboratorio (vuodesta 1991 alkaen).

Opinnäytetyö tehtiin määräaikaikaisessa työsuhteessa, jonka aikana tekijä työskenteli myös muissa yrityksen projekteissa. Opinnäytetyössä tehty projekti

oli osa laajempaa kokonaisuutta ja muidenkin projektien kanssa työskentely auttoi saamaan paremman yleiskuvan toiminnasta.

1.2 TEKES-rahoitus ja monitorointiprojekti

Tutkimusprojekti, johon opinnäytetyö sisältyy, on rahoitettu osittain TEKES-varoilla. Kun projekti saadaan päätökseen ja menetelmä toimivaksi, on tarkoituksena aloittaa reumapotilaiden monitorointiprojekti yliopistollisten keskussairaaloiden kanssa. Projektissa pyritään myöhemmin selvittämään menetelmän toimivuutta oikeilla potilailla.

1.3 Autoimmuunisairaudet

Autoimmuunisairaus tarkoittaa ihmisen oman immuunipuolustusjärjestelmän hyökkäystä kehon omia soluja ja kudoksia vastaan. Autoimmuunireaktion aiheuttavat pääasiassa virheellisesti toimivat lymfosyytit, eli T- ja B-solut. Virheellinen toiminta voi käynnistyä joko perintötekijöiden tai ulkoisten tekijöiden, kuten bakteerien ja viruksien, vaikutuksen vuoksi. Reaktion syntyä ei vielä tunneta kovin hyvin, koska siihen vaikuttavat hyvin monenlaiset eri asiat. Autoimmuunisairaus voi iskeä moniin eri kohtiin elimistössä. Eräitä tunnetuimpia sairauksia ovat nivel- ja selkärankareumat sekä psoriaasi.

Autoimmuunisairaudet etenevät tavallisesti hyvin hitaasti vuosien kuluessa, mutta hoitamattomina ne aiheuttavat kroonisia vaivoja, kuten kipua ja rauhasten vajaatoimintaa. Parantavaa lääkettä autoimmuunisairauksia vastaan ei ole, vaan hoito voi keskittyä joko itse autoimmuunireaktion hillitsemiseen tai siitä aiheutuvien oireiden hoitoon. Niiden ehkäisyyn ei myöskään ole varmaa keinoa, koska syntymekanismeja ei tunneta tarpeeksi.

Parhaiten tunnetuimpia autoimmuunisairauksia on nivelreuma (rheumatoid arthritis), joka nimensä mukaisesti vaikuttaa lähinnä nivelissä. Krooninen tulehdus nivelissä kuluttaa niitä ja aiheuttaa kipua. Nivelreuman hoitoon käytetään pääsääntöisesti metotreksaattia ja kortisonia, mutta myös

sulfasalatsiinia ja hydoksiklorokiiniä käytetään. Jos perinteisemmät hoidot eivät tehoa riittävän hyvin, voidaan ottaa käyttöön biologiset lääkkeet. Nämä ovat kuitenkin hyvin kalliita ja siksi käytössä vain vaikeammissa tapauksissa. (Kustannus Oy Duodecim 2013)

Nivelreuma on pitkälle edettyään pahasti elämää rajoittava tauti. Nivelkivut voivat viedä potilaan työkyvyn ja tehdä päivittäisistä askareistakin todella kivuliaita. Biologisilla lääkkeillä moni potilas voi saada useita vuosia lisää normaalia elämää.

1.4 Menetelmä

Opinnäytetyössä käytettiin reportterigeenimenetelmää, jossa geeniteknisesti muokattu syöpäsolulinja tuottaa kahta eri lusiferaasientsyymiä. Tulikärpäsensyymien tuotanto on riippuvainen solun pinnalla olevan TNF α -reseptorin signaalista ja *Renilla*-lusiferaasia solu tuottaa automaattisesti. Molemmat entsyymit toimivat erilaisten substraattien kanssa, joten niiden antamat signaalit voidaan mitata erikseen ja sen jälkeen normalisoida tulikärpäsensyymien tuotanto *Renilla*-lusiferaasi-signaalin suhteen. Näin estetään solujen määrän vaikutus signaalin voimakkuuteen. Näytettä analysoitaessa TNF α sitoutuu reseptoriin ja käynnistää lusiferaasituotannon. Jos näytteessä on lääkettä, se sitoo TNF α :n ja estää signaalin. Jos näytteessä on neutralisoivaa lääkeainetta, voi TNF α taas sitoutua reseptoriin ja solu tuottaa lusiferaasia .

2 IMMUUNIREAKTIO JA IMMUNOGEENISYYS

2.1 Autoimmuunireaktio ja TNF α

Nivelreumassa tällä hetkellä vielä tuntemattomasta syystä nivelkudoksia vastaan aktivoituneet T-lymfosyytit aktivoivat B-lymfosyyttejä sekä makrofageja ja muita nivelkudosten soluja tuottamaan vasta-aineita ja tulehdusvälittäjäaineita, kuten TNF α , IL-1 ja IFN- γ , kemokiineja ja matriisin metalloproteinaaseja.

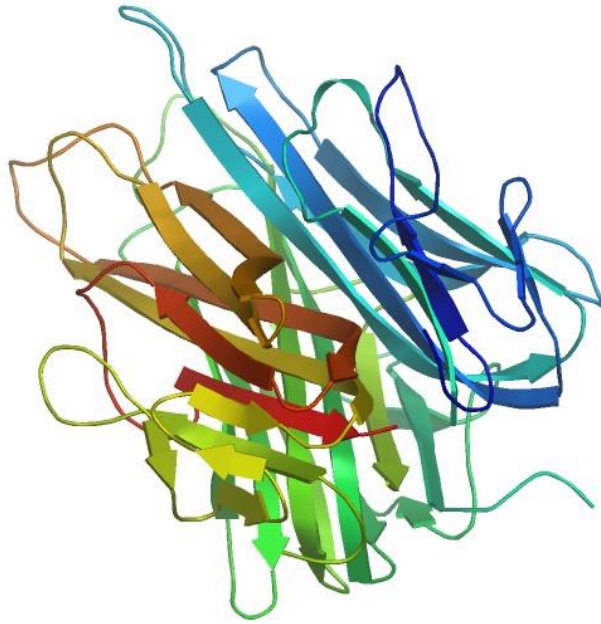
TNF α on 157:stä aminohaposta muodostuva trimeerinen sytokiini, eli solujen välisen viestinnän välittäjäaine (Kuva 1). Se voi olla kiinnittyneenä solun pintaan tai vapaana (Murphy 2012). TNF α tuotetaan solussa transmembraaniproteiininä, ja liukoinen muoto muodostuu, kun TACE (TNF Alpha Converting Enzyme) leikkaa sen irti proteolyttisesti. Sekä transmembraani- että liukoinen muoto ovat bioaktiivisia mutta sitoutuvat reseptoreihin hieman eri tavoin ja eri tilanteissa. (Wajant, Pfizenmaier, and Scheurich 2003)

Tutkimuksissa TNF α :n on havaittu olevan reumassa tulehdusvälittäjäaineiden ns. pääregulaattori. Kun TNF α sidottiin vasta-aineilla, laskivat myös muiden sytokiinien, kuten interleukiinien, pitoisuudet. (Feldmann and Maini 2003)

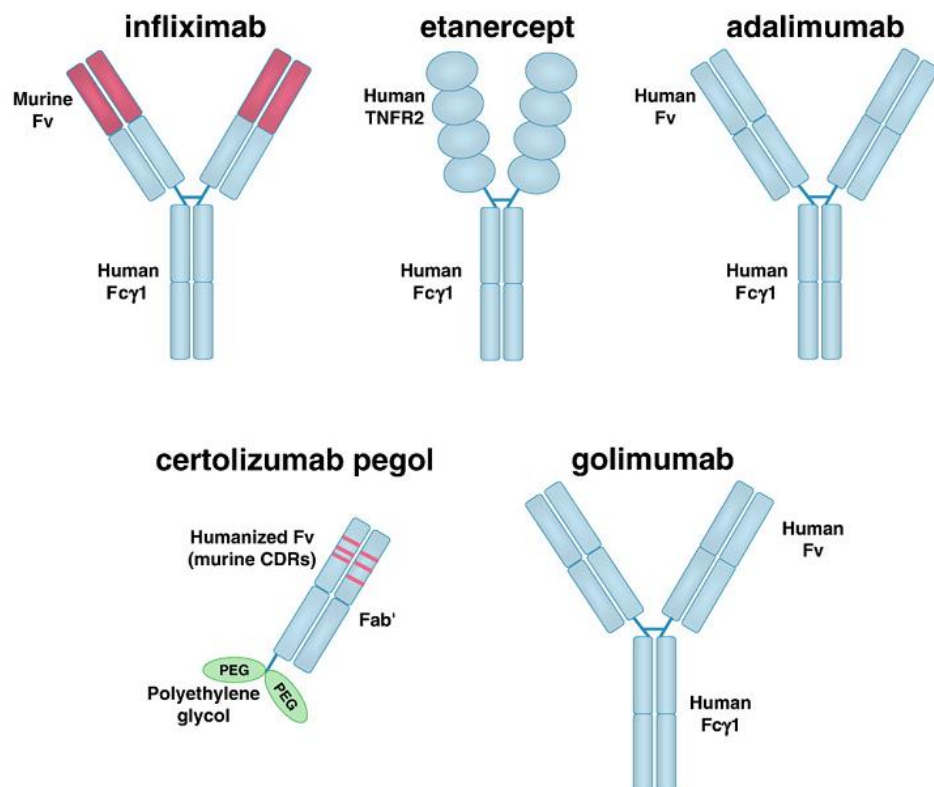
2.2 Biologiset anti-TNF α -lääkkeet

Reuman hoitoon on kehitetty useita biologisia lääkkeitä, jotka vaikuttavat immuunireaktioon eri tavoin. Erityisesti TNF α :n estämiseen on erilaisia lääkkeitä markkinoilla tällä hetkellä viisi (Kuva 2). Monoklonaaliset vasta-aineet (suluissa kauppanimi) infliximabi (Remicade), adalimumabi (Humira) ja golimumabi (Simponi) sekä TNF-reseptori-Fc-fuusioproteiini etanersepti (Enbrel) ja sertolitsumabipegoli (Cimzia), joka on polyetyleeniglykoliin liitetty monoklonaalisen vasta-aineen Fab'-osa. Lääkkeet eroavat toisistaan

rakenteensa lisäksi myös puoliintumisajoiltaan, affiniteeteiltaan ja sitomiltaan TNF-epitoopeilta. (Tracey et al. 2008)



Kuva 1: TNF α :n kiderakenne (Protein Data Bank in Europe 1990)



Kuva 2: TNF-estäjien rakennekaaviot (Tracey et al. 2008)

Lääkkeet muodostavat kompleksin verenkierrossa olevien TNF α -molekyylien kanssa. Tämän kompleksin stabiilisuus voi vaihdella paljonkin riippuen mm. lääkkeen ja TNF α :n konsentraatioista, mikä taas vaikuttaa lääkkeen yleiseen toimintaan elimistössä ja sen poistumiseen verenkierrosta. (Tracey et al. 2008)

Lääkkeet toimivatkin eri tavalla potilaasta riippuen, ja noin kolmannes biologisen TNF α -salpaajan käytön aloittavista potilaista ei saa ensimmäisestä annoskoosta riittävää kliinistä vastetta. Näissä tapauksissa annostusta aluksi nostetaan, ja lääke vaihdetaan jos nostamisestakaan ei ole apua. Tällöin kuitenkin kuluu hukkaan kallisarvoista aikaa potilaan tilan heiketessä, jolloin aiheutuu mahdollisesti parantumattomia nivelvaurioita. Potilaan monitorointi joko lääkkeen tai lääke-vasta-aineiden suhteen voisi auttaa korjaamaan hoitosuunnitelmaa nopeammin ja tarkemmaksi. Toisaalta, joillain potilailla on todettu verestä korkeitakin pitoisuuksia toimivaa lääkettä, vaikka kliininen vaste puuttuu täysin. Tällöin vaihto toiseen TNF α -salpaajaan tuskin edes auttaisi, vaan sairauden aiheuttaa todennäköisesti jokin muu mekanismi. (Bendtzen 2012)

Osalla potilaista aluksi hyvin toiminut lääke alkaa toimimaan heikommin tai lakkaa jopa kokonaan toimimasta. Jopa 50% potilaista menettää kliinisen vasteen jossain vaiheessa hoitoa. Tämä voi johtua hyvin monesta eri asiasta ja sen selvittäminen saattaa olla hankalaa. Suurin yksittäinen tekijä on kuitenkin lääkkeen immunogeenisyys ja sen aiheuttama lyhyempi lääkkeen puoliintumisaika tai aktiivisuuden putoaminen. (Bendtzen 2012)

2.3 Neutralisoivat vasta-aineet

Biologiset lääkkeet ovat tavanomaisia lääkkeitä huomattavasti isompia, orgaanisista molekyyleistä koostuvia biopolymeerejä, jotka on yleensä valmistettu ihmisoluilla tai muilla mikro-organismeilla. Koska ihmisen immuunijärjestelmä on kehittynyt torjumaan mm. vieraiden mikro-organismien ja niiden erittämien aineiden pääsyä elimistöön, voivat nämä lääkkeet aiheuttaa immuunireaktion tavanomaisia lääkkeitä helpommin. Elimistön tuottamat anti-lääkevasta-aineet voivat tarttuvat molekyyliin ja vaikuttavat sen

puoliintumisaikaan sekä muihin farmakokineettisiin ominaisuuksiin. Pääsääntöisesti lääkkeeseen tarttuvat vasta-aineet nopeuttavat lääkkeen poistumista elimistöstä ja annostusta pitää nostaa, tai ottaa lisäksi käyttöön immunosuppressiivinen lääke, jotta haluttu hoitovaste säilyisi (Tracey et al. 2008). Neutralisoivien vasta-aineiden tapauksessa ne tarttuvat lääkkeen aktiiviseen kohtaan, estäen sen toiminnan joko osittain tai kokonaan. Biologisten lääkkeiden kehityksessä vaaditaankin tarkkaa immunogeenisyystutkimusta mahdollisten vasta-aineiden muodostumisen ja niiden vaikutusten selvittämiseksi. (Shankar et al. 2008)

Tutkimuksissa on käynyt ilmi, että yleisesti kimeeriset vasta-aine-lääkkeet aiheuttavat enemmän immunogeenisyysreaktioita, kuin humanisoidut tai humaanit. Reumalääkkeiden tapauksessa infliximabin on todettu olevan selvästi immunogeenisempi, kuin etanerseptin ja adalimumabin. Jokaisella lääkkeellä on kuitenkin todettu olevan immunogeenisiä vaikutuksia osassa testijoukkoa. (Tracey et al. 2008)

Alhaisen lääkekonsentraation on todettu nostavan riskiä immuunireaktion ja lääke-vasta-aineiden syntyyn. Tämä on otettava huomioon tilanteessa, jossa lääkkeen hoitovaste on hyvä ja annostusta voitaisiin laskea. Tässä on kuitenkin oltava varovainen, jotta lääkkeen konsentraatio potilaan elimistössä ei laskisi immuunireaktion aiheuttavalle tasolle. (Mulleman et al. 2012) Biologisten reumalääkkeiden haitalliset sivuvaikutukset voivat olla pahojakin ja lääkkeiden rahalliset kustannukset ovat todella korkeat. Pienimmän tehokkaan annoksen löytäminen voisi laskea molempia tuntuvasti.

3 MENETELMÄNKEHITYS

Menetelmänkehitys bioanalytiikassa tarkoittaa jonkun molekyylin mittaamiseen valitun analyysimenetelmän parametrien ja raja-arvojen etsimistä kokeellisesti. Tarkoitukseen on julkaistu tieteellisiä artikkeleita, joissa kirjoittajat ovat laatineet kokemuksensa perusteella ohjeistuksia uusien menetelmien kehityksessä huomioon otettavista seikoista. (Gupta et al. 2007)

Uuden solupohjaisen NAb-mittaukseen soveltuvan menetelmän kehityksessä tulisi lähteä käytettävän solulinjan valinnasta haluttujen ominaisuuksien perusteella. Tutkittavasta analyytistä riippuen soluilta haluttu reaktio voi olla esimerkiksi kasvunopeuden muutos, proteiinin tuotanto, yhdisteiden fosforylaatio tai muu vastaava. *iLite* on kuitenkin näiltä osin jo valmis menetelmä, ja Syrinxille tehtäväksi jää menetelmän optimointi. Tässä vaiheessa määritetään muunmuassa reagenssien pitoisuudet, inkubointiajat, cut-point –rajat ja testataan menetelmän herkkyyttä, tarkkuutta sekä häiriönsietoa. (Gupta et al. 2007)

3.1 GLP

Työn luonteesta johtuen menetelmänkehitystä ei ole järkevää tehdä tiukasti GLP:n mukaisesti. Tuloksia ei vielä käytetä varsinaisiin kliinisiin tutkimuksiin vaan tarkoituksena on löytää toimivat lähtöarvot, joiden pohjalta menetelmä voidaan validoida käyttötarkoitukseensa. Tämän työn tapauksessa kokeet tehtiin samassa ympäristössä, näytteitä ja reagensseja säilytettiin samoin ja tulokset mitattiin samoilla laitteilla, joita käytetään myös GLP-tutkimuksissa. Eroina olivat lähinnä hieman vapaamuotoisempi dokumentaatio ja vkp:n ylittäneiden reagenssien tai välineiden käyttö silloin, kun se todettiin riskiltään merkityksettömäksi. GLP:n vaatimaa QA-tarkastusta tutkimukselle ei myöskään tehty. (Ristelä 2013)

4 REPORTTERIGEENIMENETELMÄ SEKÄ *iLite*TM & Dual-Glo[®] -TEKNOLOGIAT

4.1 Reportterigeenimenetelmä

Jotta lääke-vasta-aineiden havainnointi olisi luotettavaa ja havaintojen perusteella voitaisi tehdä järkeviä kliinisiä ratkaisuja, on analyysimenetelmän oltava luotettava ja pystyttävä havainnoimaan pienetkin pitoisuudet. Sitovien vasta-aineiden analysointiin on käytössä monia eri menetelmiä, kuten ELISA, TR-FIA, RIA ja ECL. (Shankar et al. 2008)

Neutralisoivien vasta-aineiden analysointi vaatii kuitenkin hieman erilaisen menetelmän, koska vasta-aineen pitää sitoutua lääkkeeseen juuri oikeaan kohtaan ollakseen vaikutukseltaan neutralisoiva. Tähän tarkoitukseen reportterigeenimenetelmä on hyvä valinta, sillä se mittaa aineiden varsinaista bioaktiivisuutta. Menetelmässä käytetään solulinjaa, joka on muokattu niin, että solukalvon pinnalla oleva reseptori käynnistää kohdemolekyyliin sitoutuessaan signaalinvälitysketjun, joka vuorostaan käynnistää lusiferaasi-entsyymin synteessin solussa. (Syrinx Bioanalytics Oy 2013)

TNF α :n määrittämiseen käytetyt solupohjaiset analyysit ovat aikaisemmin perustuneet TNF α :n sytotoksisuuteen tietyille solulinjoille, mutta nämä analyysit ovat aikaa vieviä, vaikeita standardoida ja alttiita häiriöille. Reportterigeenimenetelmällä pystytään kahdella hyvin samankaltaisella analyysillä määrittämään lääkkeen ja NAb:ien pitoisuus, se on nopeampi, herkempi ja vähemmän altis häiriöille. (Lallemand et al. 2011)

4.2 *iLite*TM

*iLite*TM on tanskalaisen CRO:n, Biomonitor A/S:n, kehittämä solupohjainen reportterigeenimääritys neutralisoivien anti-TNF α -lääkevasta-aineiden määrittämiseen seeruminäytteistä. Määrittystä varten ihmisestä peräisin olevaan

syöpäsoluminijään on transfektoitu tulikärpäsen, *Lampyridae*, ja meriorvokin, *Renilla reniformis* (vastedes FL ja RL), lusiferaasientsyymien reportterigeenit.

Solut tuottavat koko ajan jatkuvatoimisesti RL:a ja TNF α :n sitoutuessa solunkalvon reseptoreihin, käynnistyy signaalinvälitysketju FL:n tuottoa varten. Terveen potilaan tapauksessa FL signaali on korkea. Jos potilasta on lääkitty TNF α -estäjällä, näytteessä oleva lääke laskee signaalin alas sitomalla TNF α :n. Jos lääkitylle potilaalle on kehittynyt lääkkeen neutralisoivia vasta-aineita, sitoutuvat ne lääkkeen aktiiviseen kohtaan estäen sitä vuorostaan sitomasta TNF α :aa (Kuva 3). (Syrinx Bioanalytics Oy 2013)

4.3 Bioluminesenssi

Bioluminesenssin käytöllä on monia etuja muihin menetelmiin verrattuna. Biologisen matriisin käyttö aiheuttaa ylimääräistä taustaa entsyymaattisissa ja fluoresenssimittauksissa, mutta bioluminesenssin tausta on lähes olematon. Mitään valoa ei mittauksessa synny, jos entsyymiä tai substraattia ei liuoksessa ole. (Allard 2008)

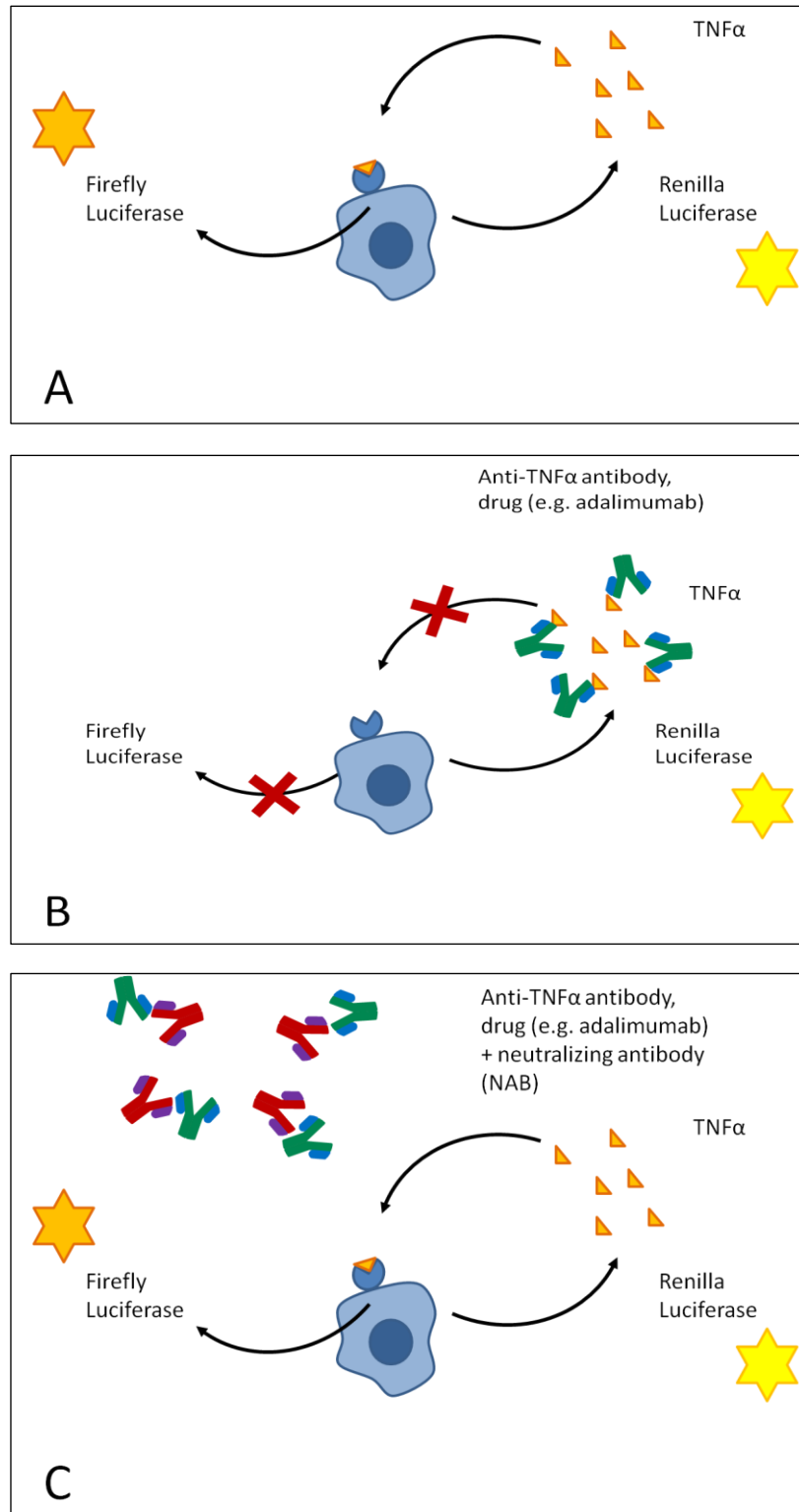
Tulikärpäsen lusiferaasi on yleisin biotekniikassa käytetty bioluminesenssin lähde herkkyytensä ja käytännöllisyytensä vuoksi. Lusiferaasi on 61 kDa monomeerinen entsyymi, joka tuottaa kelta-vihreää (550-570 nm) valoa katalysoidessaan kaksiosaisen hapettumisreaktion lusiferiini-substraatin kanssa. *Renilla*-lusiferaasi on 36 kDa monomeerinen entsyymi, joka tuottaa sinistä 480 nm valoa katalysoidessaan koelenteratsiinin hapettumisreaktion. Entsyymit toimivat samassa liuoksessa hyvin, sillä ne ovat kehittyneet täysin eri reittejä, ja katalysoivat erilaisten substraattien reaktioita. (Allard 2008)

4.3.1 Dual-Glo®

Dual-Glo® on yhdysvaltalaisen Promegan kehittämä teknologia, jolla voidaan tutkia eri aineiden vaikutusta solujen toimintaan. Yhden luminesenssisignaalin käyttö aiheuttaisi tuloksiin epätarkkuutta johtuen mahdollisista heikossa

kunnossa olevista tai kuolleista soluista ja tarkan tuloksen saamiseksi pitäisi määrittää solujen lukumäärä sekä niiden elinkelpoisuus. Kun FL:n tuotto sidotaan analyysin pitoisuuteen ja RL:ia tuotetaan jatkuvasti, pystytään FL-signaali normalisoimaan elävien solujen määrän suhteen. Tämä helpottaa tulosten analysointia huomattavasti. Entsyymejä koodaa cDNA, ja ne eivät vaadi mitään translaation jälkeisiä muokkauksia, joten ne ovat solulle yksinkertaisia valmistaa. Geeneihin on lisätty sopivat promootterit, jotta solu tuottaisi niitä oikeassa tilanteessa. (Allard 2008)

Dual-Glo-systeemi sisältää reagenssit solujen tuottamien lusiferaasientsyymien analysointia varten. FL-reagenssi hajottaa solut vapauttaen solunsisäiset entsyymit mediumiin, ja käynnistää FL-reaktion lusiferiinillä. FL-arvon lukemisen jälkeen lisätty RL-reagenssi sammuttaa FL-reaktion ja käynnistää RL-reaktion koelenteratsiinilla. Reagenssit on suunniteltu niin, että tavallisesti nisäkässolujen kanssa käytetty kasvatusmedium ei tarvitse mitään lisäkäsittelyä inkuboinnin päätyttyä. Signaali pysyy luettavalla tasolla kahden tunnin ajan. (Promega 2011)



Kuva 3: *iLite*-määrityksen toimintaperiaate (Syrinx Bioanalytics Oy 2013)

- A) TNF α sitoutuu reseptoriin ja solu tuottaa tulikärpäsen lusiferaasia.
- B) Lääke sitoo TNF α :n ja lusiferaasia ei muodostu.
- C) Neutralisoiva vasta-aine sitoo lääkkeen, jolloin vapaa TNF α sitoutuu reseptoriin ja lusiferaasia muodostuu.

5 LAITTEISTO, PROTOKOLLAT JA REAGENSIT

5.1 Victor

Kaikki mittaukset suoritettiin PerkinElmerin Victor 1420-monileimalukijalla. Myös PerkinElmerin EnVision-monileimalukijaa kokeiltiin, mutta eri laitteiden välillä ei todettu olevan merkityksellisiä eroja mittaustuloksissa. Victorilla voidaan mitata useilla eri menetelmillä, mutta opinnäytetyössä käytettiin ainoastaan luminesenssin mittausta. Laitteessa on runsaasti erilaisia säätömahdollisuuksia kuten mm. suodattimia, ravistelu, erilaiset mittaussajat ja aallonpituudet. Luminesenssin mittauksessa ei kuitenkaan ole mitään eksitaatio- ja emissiovaiheita tai muitakaan erikoisempia säätötarpeita ja protokolla oli yksinkertaisesti mitata jokaisesta halutusta kuopasta valoa yhden sekunnin ajan kaikilla aallonpituuksilla. Tietojärjestelmään sisältyy myös MultiCalc-laskentaohjelma, jolla on mahdollista esimerkiksi laskea tunnettujen standardien tulosten perusteella konsentraatiot mitatuille näytteille. Analyysissä luettiin kuitenkin ainoastaan raakasignaalit Excelliin, koska tulokset muodostuvat vasta kahden eri mittauksen perusteella.

5.2 Reagenssit

- Laimennospuskuri (RPMI 1640 medium + 10% Fetal Bovine Serum)
- Ihmisen seerumi (poolattua ja individuaaleja)
- rekombinantti TNF α
- anti-TNF α -lääke
- anti-lääkevasta-aine
- *iLite*TM-reportterisolut
- Dual-Glo[®] lusiferaasi- ja Stop&Glo-substraatit sekä -puskurit
- 96-kuoppalevy, kirkas, steriili
- CulturPlate 96, valkoinen, steriili

Laimennospuskuri, eli näytteiden ja reagenssien laimentamiseen käytetty solujen kasvatusmediumi, valmistettiin aina erikseen jokaisen määrittämiskerran alussa. TNF α -spike, lääke- ja lääkevasta-ainenäytteet laimennettiin varastoreagensseista jokaista määrittämystä varten paitsi silloin, kun haluttiin testata samoja näytteitä eri määrittämisyksissä. Dual-Glo lusiferaasireagenssia sekoitettiin 10 mL pullo kerrallaan; tarvittava Stop&Glo reagenssi valmistettiin jokaisessa määrittämisyksessä erikseen.

Määrittämiset päätettiin tehdä aseptisesti, koska kyseessä on solupohjainen menetelmä. Täyttä steriliteettiä ei kuitenkaan pidetty ehdottomana vaatimuksena, koska kolmen tunnin inkuboinnin aikana ei bakteerikasvua ehtisi juurikaan muodostua, ja lusiferaasireagenssien lisäys tapahtuu joka tapauksessa ei-aseptisesti. Steriiliyden vaikutusta päätettiin kuitenkin testata muiden määrittämysten ohessa.

5.3 Kitit vai solut - määrittämisyksien valinta

Biomonitor A/S myy tutkimuskäyttöön pelkkien kylmäkuivattujen *iLite*-solujen lisäksi infliksimabille, adalimumabille sekä etanerseptille erikseen kehitettyjä bioassay-kittejä lääkkeen bioaktiivisuuden kvantitatiiviseen määrittämiseen ja NAb-kittejä neutralisoivien vasta-aineiden seulonta- ja semi-kvantitatiivisiin määrittämiin. Ainoa Biomonitorin varsinainen oma komponentti määrittämisyksessä on solut ja niitä myydään yksinään käytettäväksi tutkimukseen laboratorion omien reagenssien kanssa. Kaikki muut tarvittavat reagenssit voi teoriassa korvata muualta saatavilla olevilla.

Pelkille soluille tarkoitettu määrittämisyksien protokolla poikkeaa jonkin verran kitiin protokollista reagenssien ja reaktiivilavuuden suhteen. Menetelmää lähdettiin kehittämään aluksi solujen protokollan pohjalta. Tämä perusteltiin sillä, että kitiin mukana toimitetaan Biomonitorin omat tuntemattomat reagenssit ja Syrixin kannalta olisi parempi, jos määrittämystä voisi soveltaa omiin käyttötarkoituksiin omilla tunnetuilla reagensseilla, ja tilata Biomonitorilta ainoastaan solut. Biomonitor myös myy eri kitit eri TNF α -modulaattoreille, ja omilla reagensseilla

olisi ehkä mahdollista kehittää määrityksille yhteinen pohja, jolloin eri lääkkeiden analysoimiseen ei tarvittaisi useita eri kittejä. Näiden lisäksi Syrinxillä oli valmiina yhden lääkkeen analysoimiseen tarkoitettuja kittejä, mutta koska menetelmä haluttiin aluksi kehittää toiselle lääkkeelle, otettiin kiteistä solut sekä Dual-Glo - reagenssit ja tilattiin loput reagenssit yleisiltä toimittajilta.

5.3.1 Soluprotokolla

Taulukko 1. Soluprotokolla

1	Tuodaan kaikki muut paitsi solut ja Dual-Glo-reagenssit huoneenlämpöön
2	Pipetoidaan näytteet yksittäisinä kirkaalle kuoppalevyille
3	Pipetoidaan TNF spike kaikkiin kuoppiin paitsi "Blank".
4	Esi-inkuboidaan levy 37 °C, 5 % CO ₂ 15 min ajan
5	Sulatetaan solut 37 °C vesihauteessa, sekoitetaan kääntelemällä (10 kertaa) ja laimennetaan laimennospuskurilla 1:2
6	Siirretään 2x 30 µL kirkaalta levyiltä duplikaateiksi valkoiselle levyille
7	Käännellään laimennettuja soluja 10 kertaa
8	Varovasti lisätään 20 µL soluja jokaiseen kuoppaan
9	Laitetaan levyille kansi ja sekoitetaan kevyesti heiluttamalla
10	Inkuboidaan 37 °C, 5 % CO ₂ 3 h ajan
11	Valmistetaan Dual-Glo Lusiferaasireagenssi ja Stop & Glo -reagenssi
12	Pipetoidaan monikanavapipetillä 50 µL Dual-Glo lusiferaasireagenssia, sekoitetaan pipetoimalla
13	Inkuboidaan 10 min huoneenlämmössä.
14	Luetaan FL-signaali Victorilla
15	Pipetoidaan monikanavapipetillä 50 µL Dual-Glo Stop & Glo –reagenssia, sekoitetaan pipetoimalla
16	Inkuboidaan 10 min huoneenlämmössä.
17	Luetaan RL-signaali Victorilla

Reagenssien tilavuudet duplikaateiksi jaon jälkeen valkoisella kuoppalevyllä:

- Seeruminäyte 5 µL
- Laimennospuskuri 10 µL
- TNF α -spike 15 µL
- *iLite*-solut 20 µL

Ohjeen protokollan mukaan pipetointi tehtäisiin suoraan valkoiselle kuoppalevyille, mutta jo ensimmäisten määritysten jälkeen tämä todettiin liian

vaivalloiseksi toimenpiteeksi käytetyillä tilavuuksilla. Siksi siirryttiinkin pipetoimaan isompi tilavuus esi-inkuboinnin ajaksi kirkkaalle levylle ja jakamalla se kahteen rinnakkaiseen valkoiselle levylle, kuten kittiprotokollassakin tehtiin. Reagenssien pipetointi kuoppiin tehtiin sarakkeittain, koska käytössä olevat monikanavapipetit olivat 8-kärkisiä.

5.3.2 Kittiprotokolla

Taulukko 2. Kittiprotokolla

1	Tuodaan kaikki muut paitsi solut ja Dual-Glo-reagenssit huoneenlämpöön
2	Pipetoidaan näytteet yksittäisinä kirkkaalle kuoppalevylle
3	Pipetoidaan TNF spike kaikkiin kuoppiin paitsi "Blank".
4	Esi-inkuboidaan levy 37 °C, 5 % CO ₂ 30 min ajan
5	Sulatetaan solut 37 °C vesihauteessa, sekoitetaan kääntelemällä (10 kertaa) ja laimennetaan laimennospuskurilla 1:5
6	Siirretään 2x50 µL kirkkaalta levyltä duplikaateiksi valkoiselle levylle
7	Käännellään laimennettuja soluja 10 kertaa
8	Varovasti lisätään 50 µL soluja jokaiseen kuoppaan
9	Laitetaan levylle kansi ja sekoitetaan kevyesti heiluttamalla
10	Inkuboidaan 37 °C, 5 % CO ₂ 3 h ajan
11	Valmistetaan Dual-Glo Lusiferaasireagenssi ja Stop & Glo –reagenssi
12	Pipetoidaan monikanavapipetillä 80 µL Dual-Glo lusiferaasireagenssia, sekoitetaan pipetoimalla
13	Inkuboidaan 10 min huoneenlämmössä.
14	Luetaan FL-signaali Victorilla
15	Pipetoidaan monikanavapipetillä 80 µL Dual-Glo Stop & Glo –reagenssia, sekoitetaan pipetoimalla
16	Inkuboidaan 10 min huoneenlämmössä.
17	Luetaan RL-signaali Victorilla

Reagenssien tilavuudet duplikaateiksi jaon jälkeen valkoisella kuoppalevyllä:

- Seeruminäyte + laimennospuskuri 2 μ L
- Laimennospuskuri 23 μ L
- TNF α -spike 25 μ L
- *iLite*-solut 50 μ L

Standardien ja TNF α -spiken valmistusta muutettiin siten, että lopullinen konsentraatio määrittäksessä pysyi samana. Toisin sanoen niistä tehtiin väkevämät konsentraatiot, koska ne laimenevat analyysissä enemmän.

6 TYÖN SUORITUS JA TULOKSET

6.1 Tutkittavat parametrit

Menetelmänkehityksessä suunniteltiin määritettäväksi seuraavaa:

- Annos-vaste –käyrät TNF α :lle, lääkkeelle ja NAb:lle sekä koukkuefekti
- Menetelmän herkkyys kahden operaattorin kanssa
- Menetelmän häiriöalttius
- Alustavat cut point –rajat lääkkeelle ja NAb:lle
- NAb-titrausmäärityksen testaus

6.2 Annos-vaste –käyrät ja määrittämisen kokeilu

Menetelmää lähdettiin aluksi tutkimaan määrittämällä annos-vaste –käyrät TNF α :n ja lääkkeen konsentraatioille. Tarkoituksena oli myös vain testata tilattujen reagenssien toimivuuden lisäksi määrittämisen sujumista käytännössä, koska tämältyyppistä määrittämistä ei ole aiemmin Syrinxillä tehty.

6.2.1 Signaalitason ongelmat

Ensimmäisten määrittämisen raakasignaalit olivat huomattavasti alhaisemmat, kuin Biomonitorin käyttöohjeissa annetut referenssiarvot. RL-raakasignaalit vaihtelivat välillä 40 000 - 60 000, ja Biomonitorin referenssiarvot olivat 300 000:n molemmien puolin. FL-raakasignaalit olivat myös matalampi, mutta ei yhtä isolla erolla. Suoritettiin muutamia ylimääräisiä koemäärittämiä, joilla pyrittiin selvittämään ongelman syytä. Myöhemmin ongelmaan myös pyydettiin Biomonitorin kommentit.

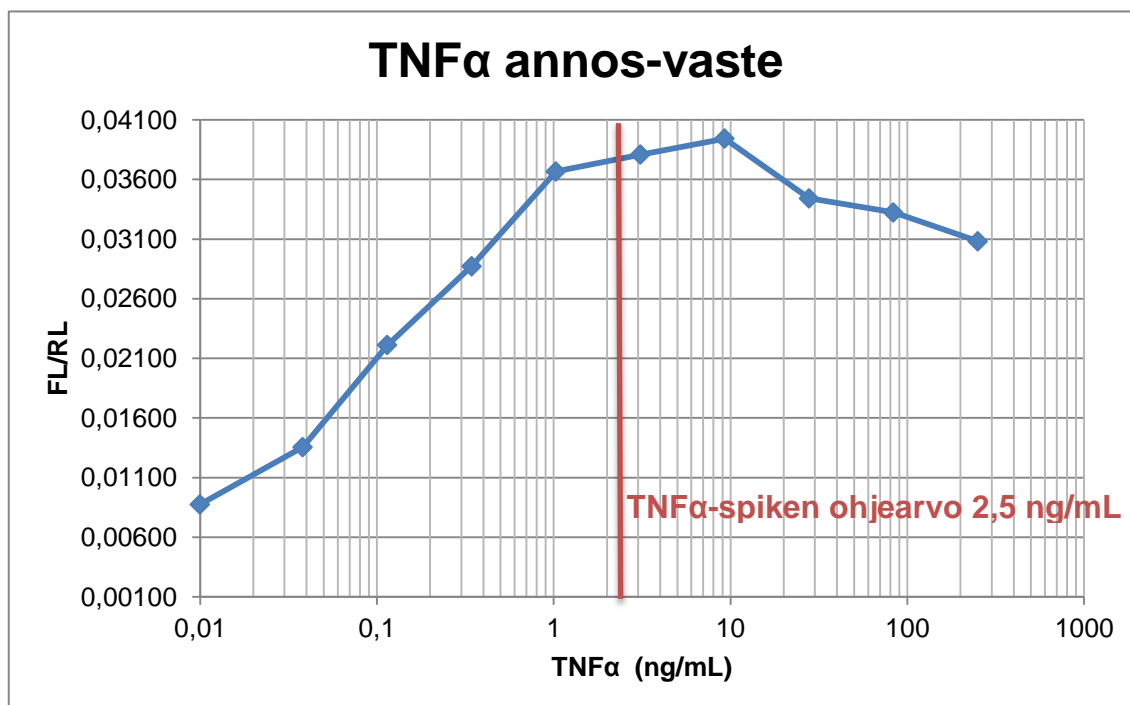
Ongelman selvittämiseksi kokeiltiin seuraavia keinoja:

- Solujen pitäminen inkubaatioajan pelkässä laimennospuskurissa seerumin mahdollisen vaikutuksen poissulkemiseksi
- Laimennospuskurin valmistukseen käytetyn FBS:n lämpöinaktivointi
- Mittauslaitteen vaihto

Yksikään kokeilluista keinoista ei nostanut signaalia referenssin tasolle. Biomonitorin vastauksen mukaan isotkin vaihtelut eri laboratorioiden välillä olivat kuitenkin odotettuja, ja heidän mielestään tuloksemme olivat kelvollisia. Tämän perusteella kehitystä päätettiin jatkaa.

6.2.2 TNF α :n annos-vaste –käyrä

Alun käytännön suorituksen kokeilujen ja signaalitaso-ongelman ratkaisun jälkeen TNF α :lle määritettiin annos-vaste käyrä kymmenellä 1:3 laimennoksella välillä 0,0381 – 750 ng/mL laimennospuskurissa (Kuvio 1).



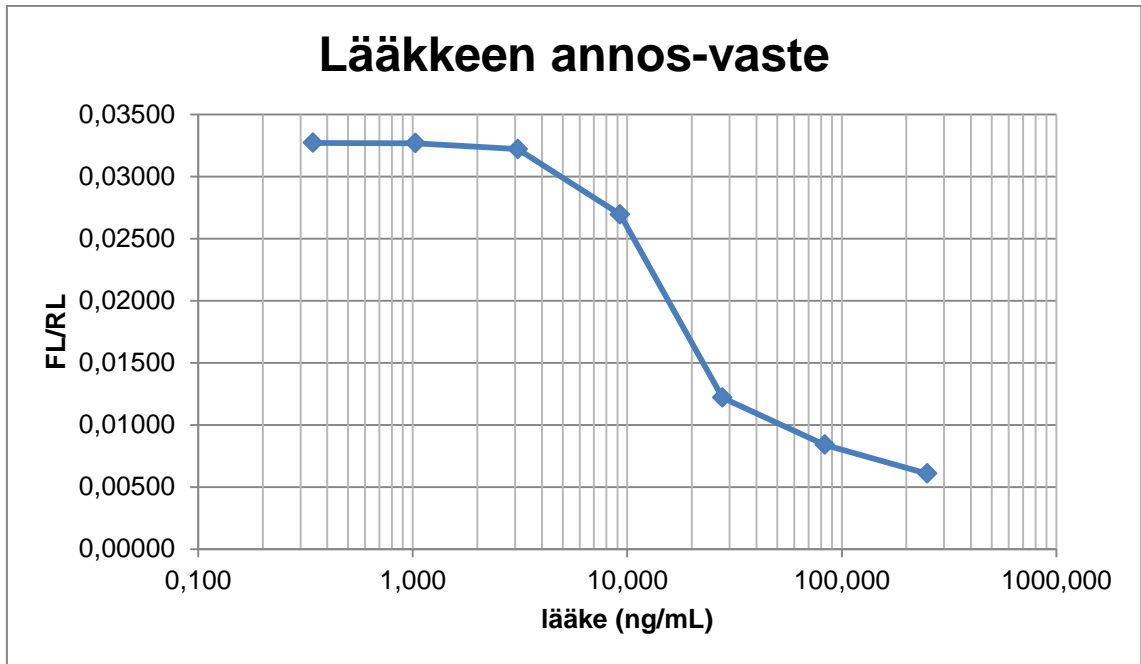
Kuvio 1. TNF α annos-vaste –käyrä

Solujen käyttöohjeessa oli annettu TNF α -spikelle konsentraatioksi 8,33 ng/mL (lopullinen konsentraatio määrityksessä 2,5 ng/mL) ja käyrän perusteella se on toimiva. Konsentraation nostaminen antaisi jonkin verran korkeampaa signaalia, mutta samalla muuttaisi lääkkeen vaikutusta signaaliin, ja siksi annettua arvoa ei lähdetty muuttamaan. Testaus oli kuitenkin hyvä tehdä, jotta varmistuttiin Syrixillä olevan TNF α :n toimivuudesta menetelmässä.

TNF α :lla näyttäisi olevan jonkin verran koukkuefektia, eli signaalin laskua hyvin suurilla pitoisuuksilla. Käytännön merkitystä koukkuefektillä tässä tapauksessa tuskin on, sillä TNF α :n pitoisuus veressä autoimmuunitautia sairastavallakaan (<50 pg/mL) ei ole lähellekään riittävän korkea nostamaan signaalia nollatason yläpuolelle. (Arican et al. 2005)

6.2.3 Lääkkeen annos-vaste –käyrä

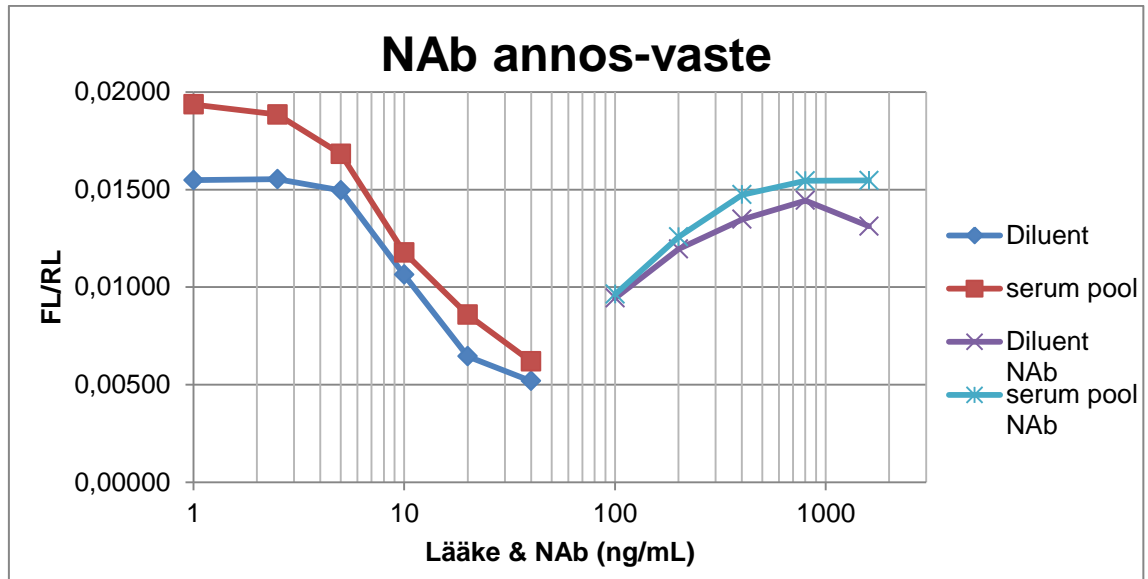
Lääkkeelle määritettiin annos-vaste –käyrä tekemällä 1:3 laimennossarja kymmenellä pisteellä välille 750 – 0,038 ng/mL laimennospuskuriin (Kuvio 2). Määrityksessä esiintyi rinnakkaisten näytteiden välillä omituisia CV-%-ongelmia, ja niiden osalta tulokset hylättiin. Kahden rinnakkaisnäytteen pitäisi antaa oikein pipetoituna lähes samat signaalit, mutta joissain tapauksissa ensimmäinen antoi matalampaa FL-signaalia ja korkeampaa RL-signaalia tai päinvastoin, jolloin rinnakkaisten normalisoidut FL/RL-arvot poikkesivat huomattavan paljon toisistaan. Tämän arveltiin johtuvan uuden menetelmän vielä aiheuttamista käytännön työskentelyn epätarkkuuksista. Sarjan keskiosa oli kuitenkin kelvollinen ja sen perusteella nähdään, että menetelmän lineaarinen alue osuu suurinpiirtein välille 3 – 100 ng/mL. Tämä sopii myös joitakin viikkoja määrityksen jälkeen päivitetyn kitin ohjeeseen, jossa standardeille käytettiin arvoja 2,5, 5, 10, 20, 30, 40 ng/mL. Nämä arvot valittiin myöhemmin myös oman määrityksen standardeiksi.



Kuvio 2. Lääkkeen annos-vaste –käyrä

6.2.4 NAb annos-vaste –käyrä

Syrinxillä oleva NAb on polyklonaalinen eläimestä immunisaatiolla saatu vasta-aineseos, joten sen toimivuudesta määrittämisessä ei ollut juurikaan tietoa. Oletettavaa oli kuitenkin, ettei sen affiniteetti olisi kovin vahvaa, joten käyrän konsentraatiot valittiin huomattavasti lääkkeen konsentraatioita korkeammiksi. NAb yksinään ei oletettavasti vaikuttaisi merkittävästi määrittäksen signaaliin, joten näytteisiin lisättiin 30 ng/mL lääke-spike. NAb-laimennossarja tehtiin 1:2 askelin välille 100 – 1604 ng/mL.



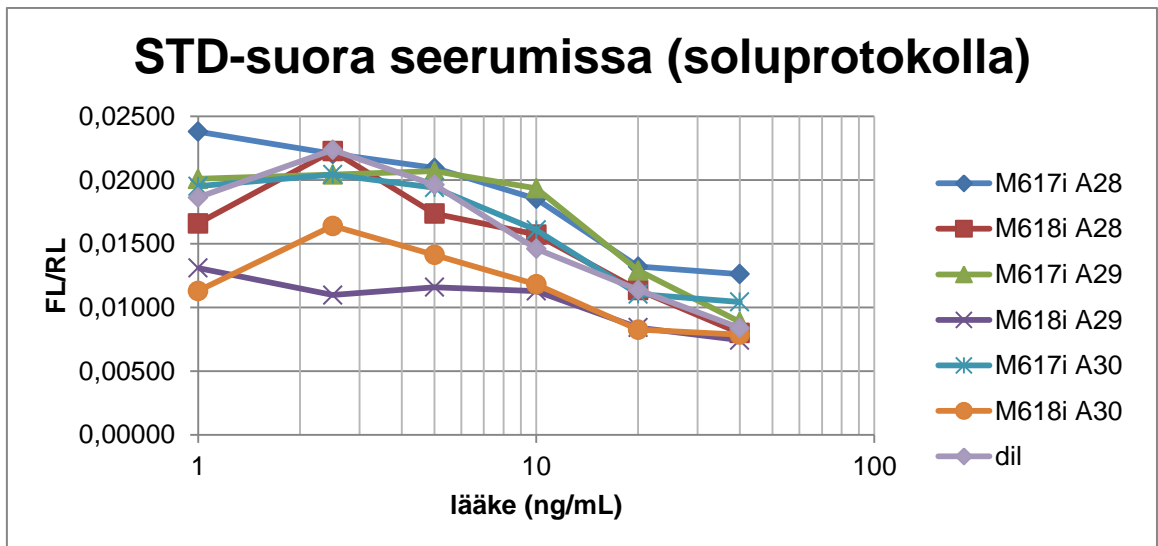
Kuvio 3. NAb annos-vaste –käyrä

Ensimmäisessä pisteessä lääke-blank, eli 0-konsentraatio, on merkitty logaritmisen asteikon vuoksi ykköseksi. Määrittäksessä tehtiin standardit sekä NAb-sarjat sekä seerumipooliin että laimennospuskuriin. Tuloksista huomataan, että NAb-sarja jäi hieman liian korkealle konsentraatiolle, mutta lineaarisen alueen voidaan kuvaajasta ekstrapoloiden arvioida osuvan suurinpiirtein välille 60 – 500 ng/mL, kun lääkespike on 30 ng/mL. Tuloksista nähdään myös, miten yleinen signaalitaso eroaa muista määrittäksistä (FL/RL > 0,03 lääkkeen annos-vaste –määrittäksessä vs 0,02 tässä määrittäksessä), vaikka sen pitäisi olla suurinpiirtein sama. Seerumi aiheuttaa myös selkeää matriisiefektiä antaen laimennospuskuria korkeampaa signaalia.

6.2.5 Määrittäksen toistettavuuden ongelmat – protokollan vaihto

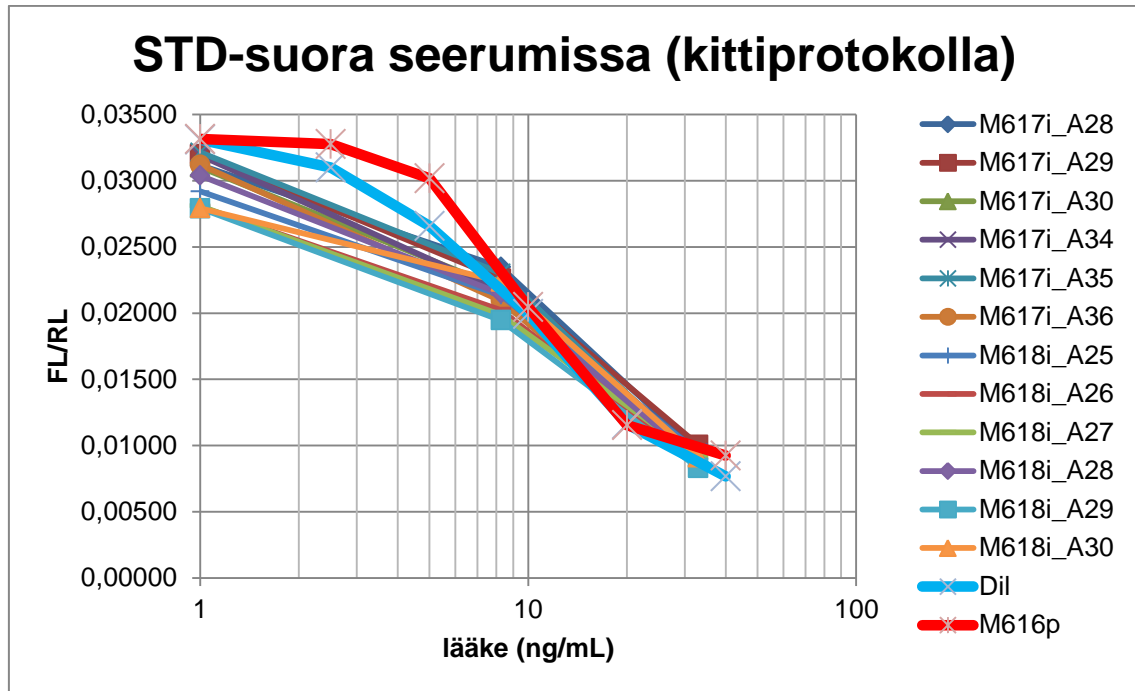
Soluprotokollan kanssa oli monissa seerumia ja lääkettä sisältävissä määrittäksissä ongelmia toistettavuuden kanssa. Välillä määrittäys toimi hyvin ja välillä erityisesti eri seerumeihin tehdyissä näytteissä oli suurtakin heittelyä. Protokollaa päätettiin muuttaa niin, että määrittäys tehtäisiin samalla tavalla, kuin kitin ohjeissa, mutta siihen käytettäisiin omia reagensseja. Soluprotokollassa seeruminäytteen laimennuskertoimen oli pienempi (1:10), kuin kitin protokollassa

(1:50), mikä saattoi aiheuttaa määrikyseen matriisiefektiä. Tämä tuli esille erityisesti tehtäessä sama standardisuora kuuteen eri individuaalimatriisiin, jolloin erot poolin, ja sekä matalimman että korkeimman signaalin antaneen individuaalin välillä olivat huomattavia (Kuvio 4). Menetelmää ei voi pitää kovin hyvänä, jos eri seerumit voivat vaikuttaa niin, että yhdellä individuaalilla signaali on minimissäänkin korkeampi, kuin toisella individuaalilla maksimissaan. Toinen syy vaihtaa protokollaa oli se, että isommalla laimennoskertoimella menetelmällä voitiin mitata seerumista lääkkeen konsentraatioita, jotka vastasivat paremmin kliinisissä kokeissa mitattuja potilasarvoja. Aiemmillä protokollalla korkean konsentraation näyte olisi tällä lääkkeellä mennyt reilusti yli menetelmän mittausalueesta.



Kuvio 4: Standardisuora lääkkeelle eri seerumeissa soluprotokollalla.

Kuviossa 4 on sama lääkekonsentraatio kuudessa eri individuaaliseerumissa, sekä laimennospuskurissa ilman seerumia. Ensimmäisessä pisteessä konsentraatio = 0, mutta se on merkitty kuvaajaan logaritmisena asteikon takia ykköseksi.



Kuvio 5: Standardisuorat ja kontrollinäytteet lääkkeelle kittiprotokollalla.

Kuviossa 5 on kuuden pisteen standardisuora seerumipoolissa ja laimennospuskurissa sekä kolme pistettä 12:ssa eri individuaalissa. Ensimmäisessä pisteessä konsentraatio = 0, mutta se on merkitty kuvaajaan logaritmisestä asteikon takia ykköseksi.

Protokollan vaihdon jälkeen signaalitasot olivat eri individuaalien sekä poolin välillä huomattavasti lähempänä toisiaan (Kuvio 5). Myös laimennospuskuriin tehty suora oli hyvin lähellä, vaikka matriisiefektiä esiintyi jonkin verran edelleen. Individuaaleista saatiin edelleen matalampaa signaalia pooliin verrattuna, mutta ero oli niin pieni, ettei sitä pidetty enää esteenä menetelmän toimivuudelle. Lupaavien tuloksien takia kehitystä päätettiin jatkaa kitin protokollalla.

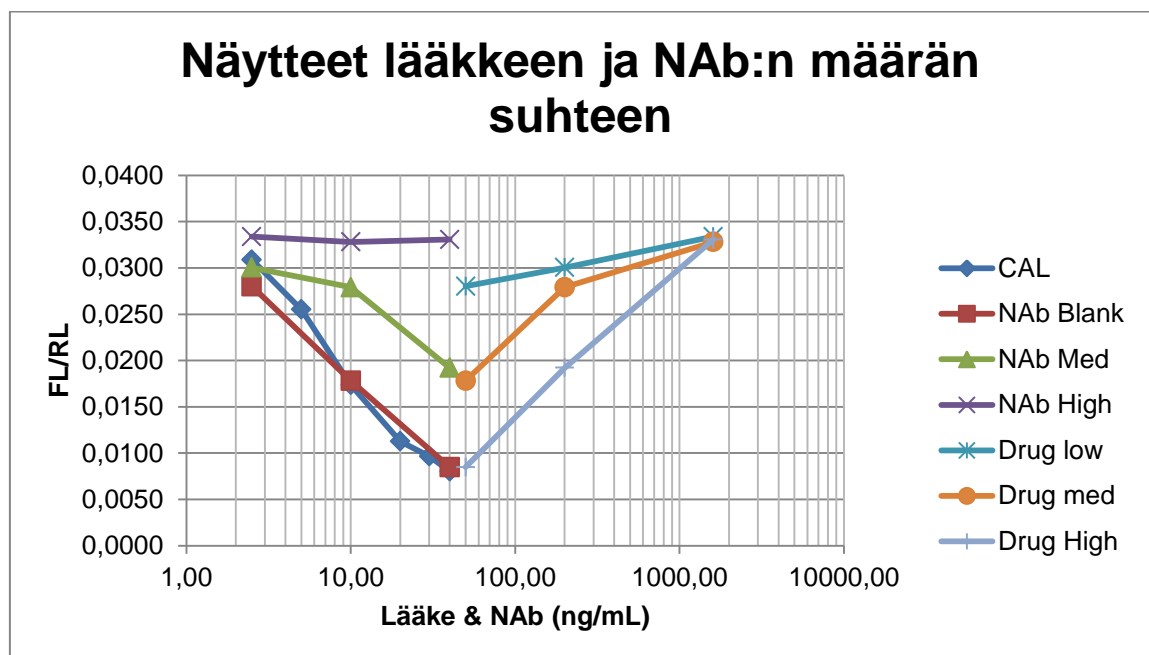
6.3 Menetelmän tarkkuus ja NAb kontrollin toimivuus

Protokollan vaihdon jälkeen testattiin menetelmän tarkkuutta määrittämisen sisällä ja määrittämisen sekä kahden eri operaattorin välillä. Samalla myös testattiin neutralisoivan vasta-aineen toimintaa eri lääke- ja vasta-aine-konsentraatioiden välillä. Valmistettiin standardisuora CAL A-F, matalan, keskikorkean, ja korkean

konsentraation kontrollit lääkkeestä, sekä nolla-, keskikorkean ja korkean konsentraation kontrollit NAb:sta. Pipetoitinti suoritettiin Taulukko 3 osoittamalla tavalla. Jokainen lääke-NAb-kontrollipari pipetoitiin levyille neljä kertaa etenemällä sarakkeittain. Sama analyysi suoritettiin kolme kertaa; kerran työn tekijän ja kaksi kertaa toisen henkilön toimesta. Analyysin suoritusstavan tarkoituksena oli saada hajontaa tuloksiin, jotta voitaisiin nähdä miten paljon arvot samalle konsentraatiolle voivat heitellä suoritusstavasta ja suorittajasta riippuen. Analyysi suoritettiin vertailun vuoksi kerran myös kitillä käyttäen samoja näytteitä mutta kitin reagensseja.

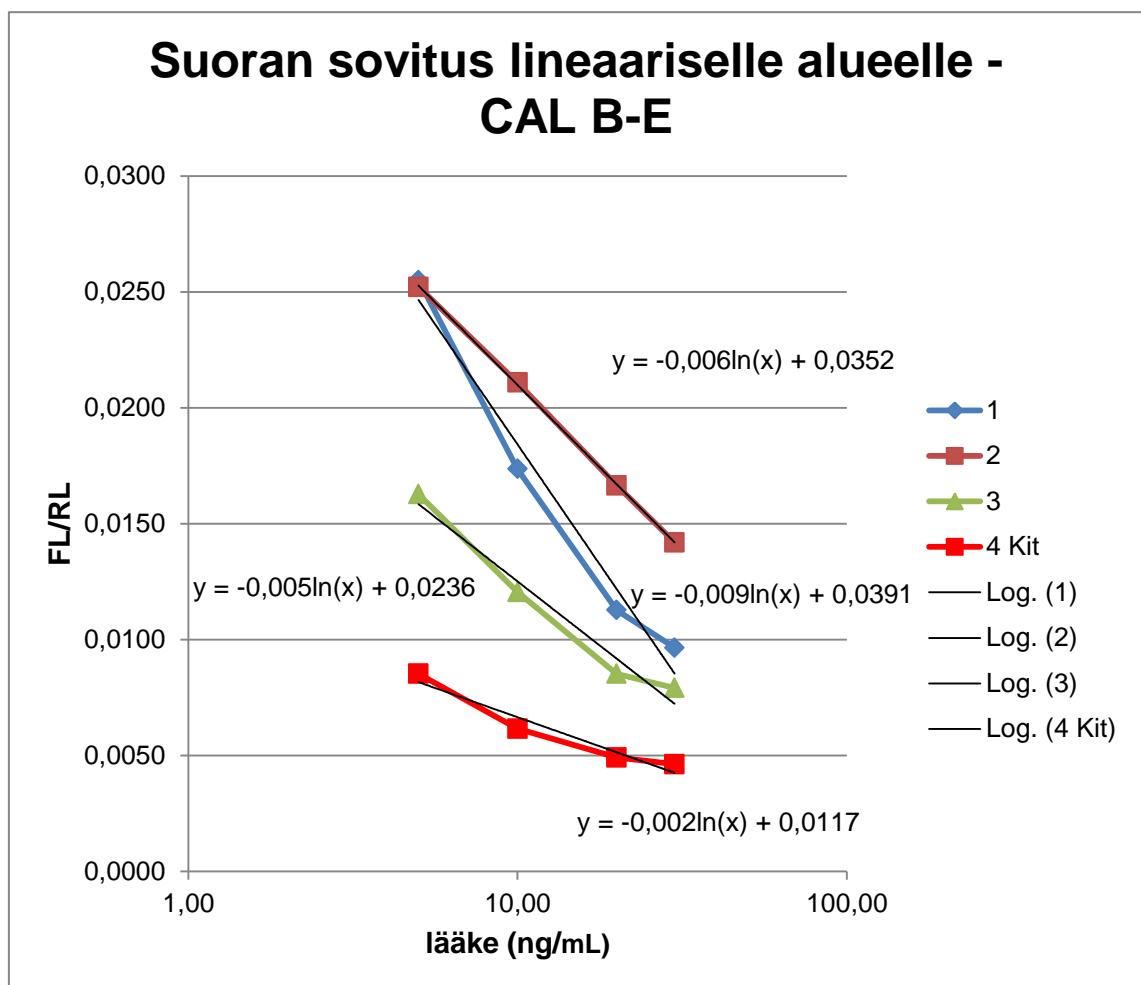
Taulukko 3. Tarkkuustestien pipetointikaavio

	1	3	5	7	9	11
A	RL blank	Low / Blank	High / High	Med / High	Low / High	High / Med
B	FL Blank	Med / Blank	Low / Blank	High / High	Med / High	Low / High
C	CAL A	High / Blank	Med / Blank	Low / Blank	High / High	Med / High
D	CAL B	Low / Med	High / Blank	Med / Blank	Low / Blank	High / High
E	CAL C	Med / Med	Low / Med	High / Blank	Med / Blank	
F	CAL D	High / Med	Med / Med	Low / Med	High / Blank	
G	CAL E	Low / High	High / Med	Med / Med	Low / Med	
H	CAL F	Med / High	Low / High	High / Med	Med / Med	



Kuvio 6. Esimerkki tarkkuustestien tulosten kuvaajista

Kuvio 6 on yhden tarkkuusanalyysin tuloksista, ja esittää miten lääkekonsentraation nousu vaikuttaa tietyssä NAb-konsentraatiossa, sekä päinvastoin miten NAb-konsentraation nousu vaikuttaa tietyssä lääkekonsentraatiossa. Kuvaajat käyttäytyvät odotetusti eli keskivahva NAb-konsentraatio vastustaa lääkkeen vaikutusta, mutta ei estä sitä kokonaan, ja korkea konsentraatio neutralisoi lääkkeen vaikutuksen täysin. Korkean NAb-konsentraation kaikkia muita näytteitä korkeammat signaalit ovat hieman erikoisia. NAb:n ei pitäisi vaikuttaa TNF α :n sitoutumiseen millään tavalla, vaan ainoastaan estää lääkkeen toimintaa. Tutkimuksessa käytetty NAb ei kuitenkaan ole monoklonaalista, joten siinä voi mahdollisesti olla jotain, joka vaikuttaa solujen antamaan signaaliin.



Kuvio 7. Tarkkuustestien standardisuorat ja lineaarinen sovitus

Kuvio 7 näyttää miten paljon eri määritysten signaalitaso voi erota toisistaan. Tämä ei kuitenkaan tarkoita, että tulokset olisivat käyttökelvottomia. Määrittelyn raakasignaali ei itsessään kerro vielä tuloksesta mitään vaan vasta standardisuoran lineaarisesta sovituksista takaisinpäin laskettu konsentraatioarvo antaa tuloksen. Signaalitason erot kertovat kuitenkin menetelmän häiriöalttiudesta ja solujen toimintaan perustuvan menetelmän vaihtelun suuruudesta. Matalalla signaalitasolla menetelmän tarkkuus kärsii, koska pienikin heittäminen signaalissa aiheuttaa ison virheen konsentraatiolaskussa. Biomonitorin ohjeessa konsentraatio lasketaan sovittamalla logaritminen suora standardisuoran lineaariselle osalle CAL B-E. Tämä näyttää aiheuttavan epätarkkuutta erityisesti isoilla lääkekonsentraatioilla, jolloin tulokseksi saadaan todellista matalampi konsentraatio. Lineaarisen sovituksen sijaan standardisuoralle voisi kokeilla neljän tai viiden pisteen logistista sovituksia, joka todennäköisesti vastaisi menetelmän käyttäytymistä paremmin.

Liitteessä 2 on laskettu kontrollinäytteiden (low, med, high) tulosten hajontaa ja tarkkuutta. Taulukossa 4 olevien tulosten perusteella ei menetelmää voi vielä pitää kelpollisena. Low-kontrolleista mitattu keskiarvo on ollut jopa 179 % todellisesta lääkkeen konsentraatiosta, ja tuloksissa on muutenkin runsaasti hajontaa. Menetelmän herkkyys ei nykyisellään riitä ainakaan Low-kontrollien toistettavaan mittaamiseen.

Taulukko 4. Tarkkuuslaskelmia

	1			2		
Todellinen arvo (µg/mL)	Low	Med	High	Low	Med	High
	0,125	0,5	2	0,125	0,5	2
keskiarvo	0,172	0,536	1,50	0,209	0,683	2,18
keskihajonta	0,0151	0,0730	0,0505	0,0261	0,213	0,459
CV %	8,8 %	13,6 %	3,4 %	12,5 %	31,1 %	21,1 %
ka/todellinen	138 %	107 %	75 %	167 %	137 %	109 %
	3			4 Kit		
Todellinen arvo (µg/mL)	Low	Med	High	Low	Med	High
	0,125	0,5	2	0,125	0,5	2
keskiarvo	0,223	0,568	1,41	0,134	0,770	1,37
keskihajonta	0,0451	0,0943	0,119	0,0413	0,189	0,320
CV%	20,2 %	16,6 %	8,4 %	30,9 %	24,5 %	23,3 %
ka/todellinen	179 %	114 %	71 %	107 %	154 %	69 %

6.4 Menetelmän häiriöalttius

Häiriönsietoa testattiin, jotta nähtäisiin voiko tuloksia käyttää, mikäli määrittelyn suorituksessa käy jotain protokollasta poikkeavaa. Samoilla reagensseilla tehtiin standardisuora eri levyille, joilla testattiin erilaisia häiriöitä.

6.4.1 Määrittelyn tekeminen ei-aseptisesti ja ei-steriilillä kuoppalevyllä

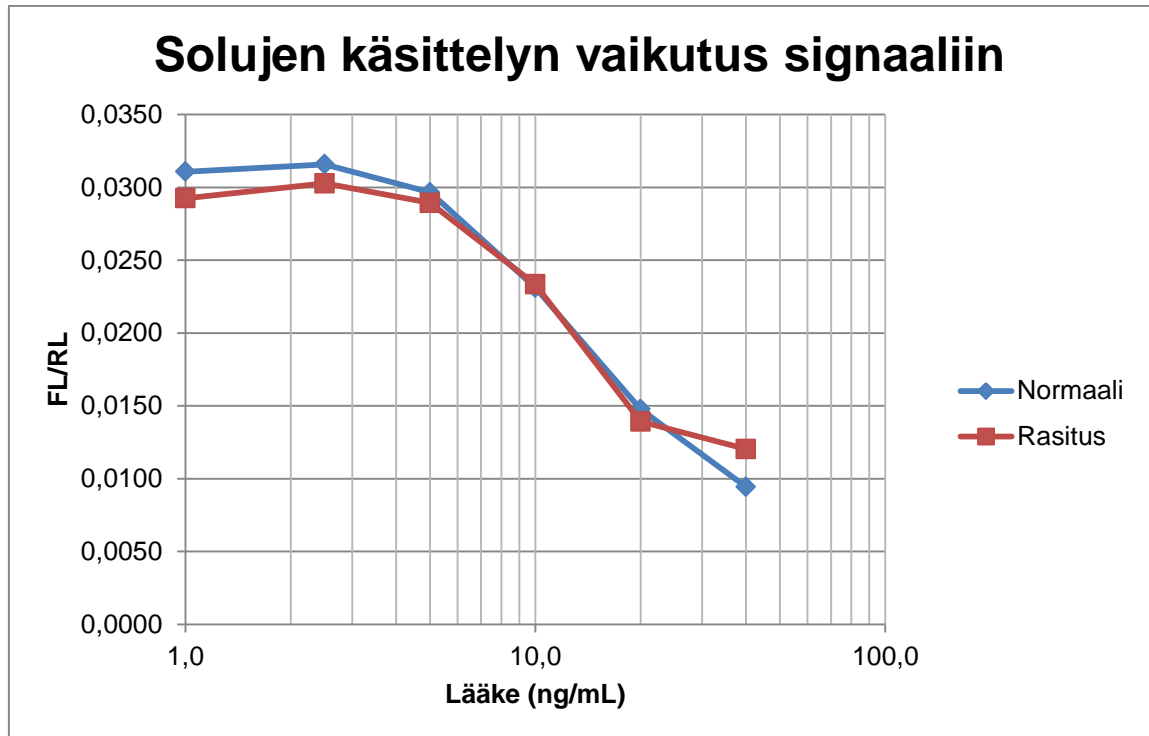
Laminaarikaapin ulkopuolella CulturPlatelle tehtynä määrittelyn FL-signaali oli jonkin verran korkeampi, mutta RL-signaalissa ei tapahtunut merkittävää muutosta. Aikaisemmin tehtyjen määrittelyjen yhteydessä on kokeiltu määrittelyn tekemistä normaalille valkoiselle OptiPlatelle. OptiPlate on PerkinElmerin valkoinen ei-steriili kuoppalevytyyppi, jossa ei ole pintakäsittelyä solutöitä varten. Tällöin FL signaali jäi aseptisesti tehdyn levyn alapuolelle, ja RL sitä vastoin vaihteli paljon alhaisemmasta paljon korkeampaan. Määrittelyn tekemisestä ei-aseptisesti tai halvemmilla OptiPlateilla ei saatu lainkaan hyviä kokemuksia, joten projektia jatkettiin aseptisesti.

6.4.2 Solujen käsittely

Biomonitorin ohjeessa määriteltiin melko tarkasti, miten soluja kuuluu käsitellä sulatuksessa, laimennuksessa ja levyllä pipetoinnissa. Sulatuksen kuuluisi tapahtua viidessä minuutissa 37 °C vesihauteessa putkea kevyesti heilutellen. Siirto laimennospuskuriin tulisi tapahtua nopeasti. Solujen arveltiin myös olevan herkkiä mekaaniselle rasitukselle, joten niiden kanssa on alusta asti pyrittävä työskentelemään varovasti. Tämän takia pyrittiin testaamaan mekaanisen rasituksen vaikutusta solujen toimintakykyyn. Solut ovat kallein yksittäinen komponentti määrittelyssä, joten esimerkiksi lattialle pudonnut putki haluttaisiin mahdollisuuksien mukaan käyttää uudestaan. Lisäksi haluttiin testata, onko erityinen varovaisuus tarpeellista solujen käsittelyssä.

Sulatus- ja laimennusvaiheiden häiriöistä ei ole varsinaista dataa, mutta projektin kuluessa saatujen kokemusten perusteella sulatus pyritään tekemään mahdollisimman tarkasti viidessä minuutissa ja välittömästi siirtämään solut laimennospuskuriin odottamaan pipetointia.

Mekaanisen rasituksen vaikutuksen tukimista varten jaettiin solut kahteen osaan, joista toinen pipetoitiin levyllä tavallisesti käytetyllä hitaalla nopeudella ja toiseen kohdistetun voimakkaan ravistelun ja vorteksoinnin lisäksi ne pipetoitiin paljon nopeammin.



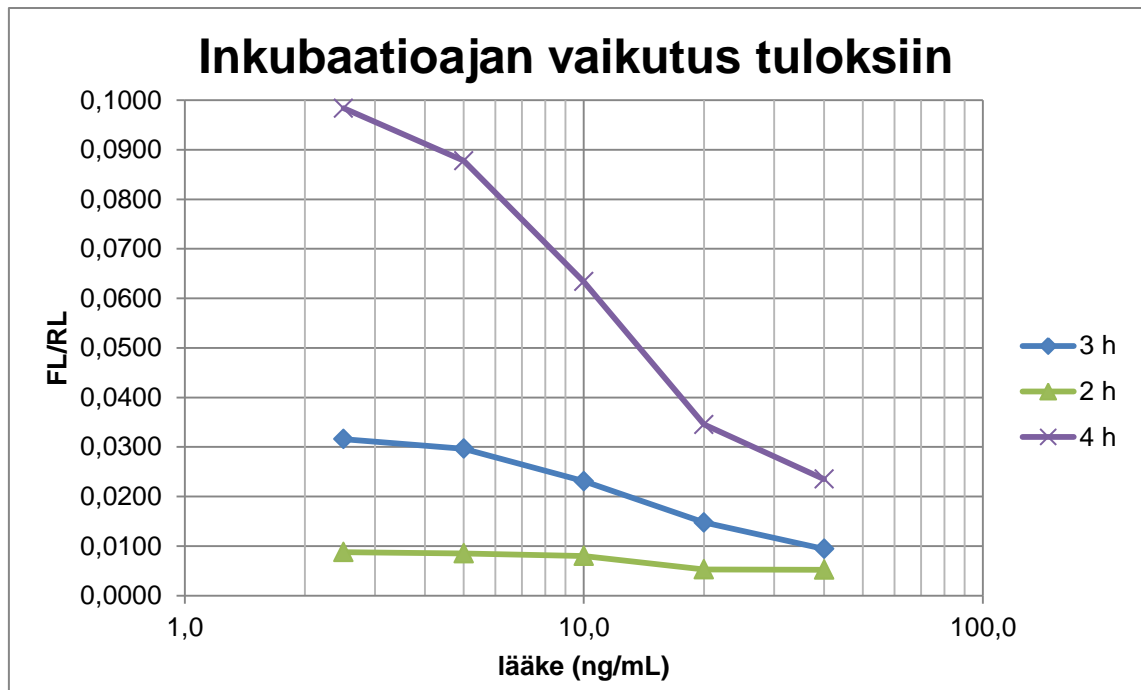
Kuvio 8. Solujen käsittelyn vaikutus signaaliin

Kuvio 8 olevien kahden mittaussarjan hajonta on samaa luokkaa kuin saman sarjan kahden rinnakkaisen mittaustuloksen. Tästä voidaan päätellä ettei solujen suorituskyky muutu rajummasta käsittelystä eikä käytännön suoritusta hankaloittavaan varovaisuuteen ole tarvetta.

6.4.3 Inkubaatioajan muutos

Inkubaatioaika voi muuttua laboratoriossa tapahtuvien häiriöiden, inhimillisen erehdyksen tai muun vastaavan syyn vuoksi. Ajan muutosta haluttiin testata, jotta nähdään onko sillä vaikutusta tuloksiin, ja pitäisikö määrittäminen tapauksessa hylätä. Esimerkiksi DELFIA-pohjaisissa määrittämissä inkubaatioajan vaihtelu ei välttämättä vaikuta tuloksiin kovin paljon, koska vasta-aineiden sitoutuminen saavuttaa siinä tasapainotilan. Solupohjaisessa määrittäksessä inkubaatioajalla oletettiin olevan kuitenkin paljon suurempi merkitys, sillä solujen reportterigeenimekanismin toiminta oletettavasti katkeaa

vasta ravinteiden loppuessa tai viimeistään solun kuollessa. Kokeiltaviksi ajoiksi valittiin ± 1 h.



Kuvio 9. Inkubaatioajan vaikutus tuloksiin.

Taulukko 5. FL- ja RL-signaalien keskiarvot eri inkubaatioajoilla.

Näyte	Lääke (ng/mL)	2 h		3 h		4 h	
		FL	RL	FL	RL	FL	RL
CAL A	40,0	250	47835	368	38994	707	30058
CAL C	20,0	252	47555	555	37556	1008	29196
CAL D	10,0	383	47975	876	37955	1937	30557
CAL E	5,00	432	50872	1142	38501	2635	30019
CAL F	2,50	429	48904	1187	37584	2906	29542

Inkubaatioajan kuvaajista (Kuvio 9) ja raakasignaalien keskiarvoista (Taulukko 5) nähdään, että aika tulisi pitää mahdollisimman tarkkaan kolmessa tunnissa. Tuloksen muutos on raju eikä se tapahdu tasaisesti. 2 h -levyllä FL-signaali laskee lähelle taustaa, ja RL-signaali kasvaa 25 - 30 %. 4 h -levyllä FL kasvaa jopa yli kaksinkertaiseksi, ja RL laskee noin 20 %. 4 h -levyn FL/RL-arvojen suhde 3 h levyyn verrattuna vaihtelee 311 %:sta 249 %:iin. RL-signaalin

käyttäytyminen tuntuu erikoiselta, sillä loogisesti ajateltuna signaalin pitäisi kasvaa pidemmällä inkubointiajalla. Signaalin laskun inkubointiajan pidentyessä arveltiin liittyvän jollain tavalla Dual-Glo-systeemin reagenssien toimintaan, mutta esimerkiksi solujen kuoleminen voisi myös olla syynä ilmiöön. Lyhyempi inkubaatioaika tekee tuloksista käyttökelvottomia, mutta pidempi ei välttämättä. Pitäisi kuitenkin suorittaa useampia kokeita, jotta voitaisiin varmistua pidemmän ajan toimivuudesta kaikissa tapauksissa.

Kokeen perusteella määrityksen suoritus tulisi optimoida niin, että aika solujen lisäämisestä levyille Dual-Glo –reagenssien lisäämiseen olisi mahdollisimman lähellä vakioarvoa, jotta eri määritykset olisivat toisiinsa nähden vertailukelpoisia.

7 POHDINTAA

7.1 Työn tavoitteiden onnistuminen

Alunperin työn tavoitteeksi asetettiin menetelmänkehitysvaiheen suorittaminen loppuun asti. Tavoite oli periaatteessa realistinen, mutta työn suorituksessa olleiden ongelmien ja aikataulurajoitteiden vuoksi se jäi toteutumatta, ja kehitys jäi hieman kesken. Menetelmällä saatujen analyysitulosten tarkkuudessa on vielä puutteita; eri individuaalisuuruuksien tulokset vaihtelivat protokollan vaihdon jälkeenkin yllättävän paljon. Myös eri ajojen ja operaattorien välillä oli runsaasti hajontaa. Olisi hyvä testata menetelmää vieläkin suuremmalla näytteen laimennoksella, jotta matriisiefektiä saataisi laskettua. Käytännön työskentelyyn voisi kiinnittää enemmän huomiota ja yrittää löytää siitä mahdollisia häiriöitä aiheuttavia kohtia. Erityisesti inkubointiaikaa ja solujen sulatusta pitäisi tarkastella paremmin. Seuraava vaihe kehityksessä mainittujen ongelmien ratkaisun jälkeen olisi cut-point –rajojen ja herkkyuden määrittäminen sekä lopuksi oikealla lääkkeellä hoidettujen potilasnäytteiden analysointi, jotta varmistuttaisiin menetelmän toimivuudesta todellisilla näytteillä.

Kun menetelmä on saatu luotettavasti toimimaan ensimmäisellä lääkkeellä, voisi sitä alkaa soveltaa myös muiden TNF α -lääkkeiden kanssa käytettäväksi. Periaatteessa kaikkien pitäisi toimia samalla tavalla, mutta ainakin standardeissa käytettävien konsentraatioiden ja cut-pointien määrittäminen pitäisi tehdä uudestaan. Myös toisen tyyppiin lääkkeisiin kohdistuvat neutralisoivat vasta-aineet voivat aiheuttaa uudenlaisia ongelmia, joita ei nyt käytetyllä lääkkeellä esiinny.

7.2 Henkilökohtainen merkitys

Opinnäytetyön tekeminen oli hyvin haastavaa mutta samalla myös erittäin hyvä tilaisuus oppia. Syrinxillä ei ollut vastaavaa määrittäystä aikaisemmin tehty, joten kaikki excel-taulukot ja määrittäminen käytännön suoritus piti kehittää itse.

Alkuvaiheessa työ lähti hitaasti eteenpäin signaalitason ongelmien ja muiden epävarmuuksien vuoksi. Sillävälän allekirjoittanut työskenteli kuitenkin muissa projekteissa, joista saatu kokemus auttoi tämänkin projektin kanssa. Aikatauluongelmien väistyttyä projekti jatkui taas hyvällä vauhdilla työsopimuksen loppuun asti.

Projektissa saatu kokemus excelin käytöstä, GLP-laboratoriossa toimimisesta ja bioanalyttisistä määrityksistä on arvokasta tulevaisuuden työllistymisen kannalta.

8 LÄHTEET

Allard, Simon T. M. 2008. "Bioluminescent Reporter Genes." Promega Corporation. Retrieved March 5, 2014 (<http://fi.promega.com/resources/pubhub/enotes/bioluminescent-reporter-genes/>).

Arican, Ozer, Murat Aral, Sezai Sasmaz, and Pinar Ciragil. 2005. "Serum Levels of TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in Patients With Active Psoriasis and Correlation With Disease Severity." *Mediators of Inflammation* 273-279.

Bendtsen, Klaus. 2012. "Anti-TNF- α biotherapies; perspectives for evidence-based personalized medicine." *Immunotherapy* 4(11):1167-1179.

Feldmann, Marc and Ravinder N. Maini. 2003. "TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases." *Nature Medicine*, October.

Gupta, Shalini, Stephen R. Indelicato, Jethwa Vijay, Thomas Kawabata, Marian Kelley, Anthony R. Mire-Sluis, Susan M. Richards, Bonita Rup, Elizabeth Shores, Steven J. Swanson, and Eric Wakshull. 2007. "Recommendations for the design, optimization, and qualification of cell-based assays used for the detection of neutralizing antibody responses elicited to biological therapeutics." *Journal of Immunological Methods* 321.

Kustannus Oy Duodecim. 2013. "Nivelreuma." Retrieved January 27, 2014 (http://www.terveyskirjasto.fi/kotisivut/tk.koti?p_artikkeli=dlk00051#s5).

Lallemand, Christophe, Nadia Kavrochorianou, Casper Steenholdt, Klaus Bendtsen, Mark A. Ainsworth, Jean-Francois Meritet, Brigitte Blanchard, Pierre Lebon, Peter Taylor, Peter Charles, Saba Alzabin, and Michael G. Tovey. 2011. "Reporter gene assay for the quantification of the activity and neutralizing antibody response to TNF α antagonists." *Journal of Immunological Methods* 229–239.

Mulleman, Denis, Emilie Ducourau, Gillers Paintaud, David Ternant, Hervé Watier, and Philippe Goupille. 2012. "Editorial: Should anti-TNF- α drug levels and/or anti-drug antibodies be assayed in patients treated for rheumatoid arthritis?" *Joint Bone Spine* 79:109-112.

Murphy, Kenneth P. 2012. *Janeway's Immunobiology*. New York: Garland Science.

Promega. 2011. "Dual Glo Luciferase Assay System Protocol." Retrieved April 20, 2013 (<https://fi.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Manuals/0/Dual%20Glo%20Luciferase%20Assay%20System%20Protocol.pdf>).

Protein Data Bank in Europe 1990. "1tnf; THE STRUCTURE OF TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA AT 2.6 ANGSTROMS RESOLUTION. IMPLICATIONS FOR RECEPTOR BINDING." Protein Data Bank in Europe.

Ristelä, Jaana 2013. "GLP-perehdytys." Syrinx Bioanalytics Oy.

Shankar, Gopi, Viswanath Devanarayan, Lakshmi Amaravadi, Yu C. Barrett, Ronald Bowsher, Deborah Finco-Kent, Michele Fiscella, Boris Gorovits, Susan Kirschner, Michael Moxness, Thomas Parish, Valerie Quarmby, Holly Smith, Wendell Smith, Linda Zuckerman, and Eugen Koren. 2008. "Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.

Syrinx Bioanalytics Oy 2013. "Biomonitor NAb assay guide."

Tracey, Daniel, Lars Klareskog, Eric H. Sasso, Jochen G. Salfeld, and Paul P. Tak. 2008. "Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review." 117.

Wajant, H, K Pfizenmaier, and P Scheurich. 2003. "Tumor necrosis factor Signaling." *Cell Death and Differentiation* 45-65.

Raakasignaalit määrittämiselle

TNF α :n annos-vaste –käyrä

TNF α (ng/mL)	FL/RL mean	CV%	FL 1	FL 2	RL 1	RL 2
0	0,00490		250	263	54707	50312
0,04	0,0088	2,19 %	474	460	53335	53391
0,11	0,0136	0,67 %	752	766	55709	56210
0,34	0,0221	3,52 %	1271	1200	56080	55651
1,03	0,0287	0,28 %	1626	1649	56705	57277
3,09	0,0367	3,29 %	1994	1991	55665	53053
9,27	0,0381	3,56 %	1954	1894	50041	51011
27,81	0,0394	3,66 %	2160	2137	53404	55641
83,42	0,0344	2,12 %	1913	1956	56428	55991
250,25	0,0332	1,40 %	1905	1896	57874	56474
750,75	0,0308	9,55 %	1632	1861	56771	56550

Lääkkeen annos-vaste –käyrä

Lääke (ng/mL)	FL/RL mean	CV%	FL 1	FL 2	RL 1	RL 2
Blank	0,01107	12,14 %	393	251	32681	24792
0,038	0,0359	23,10 %	1458	1445	48506	34575
0,114	0,0394	23,58 %	1608	1450	48981	31544
0,343	0,0327	1,44 %	1734	1847	53552	55890
1,03	0,0327	1,69 %	1862	1715	56284	53092
3,09	0,0322	1,85 %	1547	1498	48655	45898
9,26	0,0270	1,05 %	1515	1462	55782	54639
27,8	0,0122	8,60 %	664	642	51362	56094
83,3	0,0084	18,90 %	327	397	44934	41688
250	0,0061	0,16 %	293	316	48240	51907
750	0,0057	21,96 %	367	286	56186	59880

NAb annos-vaste –käyrä

Näyte	lääke/NAb (ng/mL)	FL/RL mean	CV%	FL 1	FL 2	RL 1	RL 2
Dil_0	0	0,01548	3,03 %	941	1012	62255	64141
Dil_1	2,50	0,01553	11,88 %	1048	946	62263	66516
Dil_2	5,00	0,01495	8,84 %	888	998	63343	62815
Dil_3	10,0	0,01063	7,67 %	682	616	60833	61251
Dil_4	20,0	0,00644	7,54 %	437	435	71637	64092
Dil_5	40,0	0,00518	1,98 %	328	323	62431	63228
M616p_0	0	0,01937	9,82 %	1077	963	52005	53438
M616p_1	2,50	0,01885	12,55 %	1029	878	50151	51126
M616p_2	5,00	0,01682	51,02 %	938	718	40971	66763
M616p_3	10,0	0,01177	5,68 %	631	678	55839	55365
M616p_4	20,0	0,00858	8,66 %	496	465	54494	57752
M616p_5	40,0	0,00619	4,42 %	335	356	55903	55803
Dil NAb_1	100	0,00943	5,07 %	572	608	58547	66856
Dil NAb_2	200	0,01195	4,02 %	842	797	68513	68644
Dil NAb_3	401	0,01347	1,68 %	862	897	64765	65816
Dil NAb_4	802	0,01444	0,12 %	913	877	63186	60800
Dil NAb_5	1604	0,01311	13,20 %	878	773	61233	65009
M616p NAb_1	100	0,00963	16,32 %	576	461	53645	54138
M616p NAb_2	200	0,01258	7,98 %	752	680	56587	57291
M616p NAb_3	401	0,01474	0,65 %	854	857	58215	57881
M616p NAb_4	802	0,01545	3,11 %	848	888	56138	56255
M616p NAb_5	1604	0,01546	0,47 %	861	864	55866	55690

STD-suora seerumissa (soluprotokolla)

Näyte	Lääke (ng/mL)	FL/RL mean	CV%	FL 1	FL 2	RL 1	RL 2
M617i A28_0	0	0,02380	8,94 %	1238	1127	48886	50509
M617i A28_1	2,50	0,02205	1,43 %	1139	1113	51127	50980
M617i A28_2	5,00	0,02095	7,46 %	1099	983	49819	49527
M617i A28_3	10,0	0,01853	2,91 %	951	905	50298	49874
M617i A28_4	20,0	0,01320	9,78 %	694	611	49165	49717
M617i A28_5	40,0	0,01262	28,72 %	524	490	34524	48737
M618i A28_0	0	0,01660	32,35 %	795	986	62080	48324
M618i A28_1	2,50	0,02228	4,96 %	1013	971	43917	45157
M618i A28_2	5,00	0,01737	16,04 %	815	950	52925	49121
M618i A28_3	10,0	0,01572	2,28 %	790	783	49463	50633

M618i A28_4	20,0	0,01138	1,12 %	565	567	49268	50230
M618i A28_5	40,0	0,00799	3,82 %	410	394	49940	50654
M617i A29_0	0	0,02010	0,39 %	1093	1122	54538	55675
M617i A29_1	2,50	0,02044	1,85 %	1108	1124	53512	55727
M617i A29_2	5,00	0,02070	4,33 %	1093	1164	54459	54552
M617i A29_3	10,0	0,01936	0,48 %	992	1013	51420	52150
M617i A29_4	20,0	0,01291	2,22 %	722	748	56807	57033
M617i A29_5	40,0	0,00887	12,32 %	468	552	57792	57242
M618i A29_0	0	0,01310	1,92 %	696	650	52426	50309
M618i A29_1	2,50	0,01098	6,84 %	593	560	51536	53615
M618i A29_2	5,00	0,01159	4,90 %	613	573	51133	51228
M618i A29_3	10,0	0,01128	5,22 %	591	546	50529	50261
M618i A29_4	20,0	0,00842	8,34 %	457	399	51231	50332
M618i A29_5	40,0	0,00742	5,84 %	361	360	46719	50604
M617i A30_0	0	0,01952	4,15 %	1041	1095	54937	54494
M617i A30_1	2,50	0,02044	0,91 %	1126	1139	55457	55379
M617i A30_2	5,00	0,01940	8,51 %	1009	1139	55333	55374
M617i A30_3	10,0	0,01609	8,72 %	801	909	53047	53208
M617i A30_4	20,0	0,01104	9,67 %	566	640	55020	54249
M617i A30_5	40,0	0,01043	11,95 %	488	515	51081	45510
M618i A30_0	0	0,01130	16,09 %	671	596	53311	59512
M618i A30_1	2,50	0,01641	6,43 %	842	758	49090	48401
M618i A30_2	5,00	0,01413	0,81 %	726	722	51687	50818
M618i A30_3	10,0	0,01182	4,17 %	632	578	51952	50403
M618i A30_4	20,0	0,00826	5,37 %	452	415	52729	52234
M618i A30_5	40,0	0,00787	9,77 %	386	436	52687	51824
Dil 0	0	0,01863	2,16 %	1134	1099	59945	59896
Dil 1	2,50	0,02237	21,10 %	1154	1342	60634	52206
Dil 2	5,00	0,01963	4,08 %	1251	1100	61940	57699
Dil 3	10,0	0,01460	4,47 %	906	855	60148	60465
Dil 4	20,0	0,01138	7,45 %	718	653	59944	60578
Dil 5	40,0	0,00838	12,38 %	439	512	57394	56160

STD-suora seerumissa (kittiprotokolla)

Näyte	Lääke (ng/mL)	FL/RL mean	CV%	FL 1	FL 2	RL 1	RL 2
Dil_0	0	0,03312	8,34 %	1451	1254	39871	42027
Dil_1	2,50	0,03100	2,29 %	1373	1286	43852	41896
Dil_2	5,00	0,02658	2,43 %	1141	1126	42788	42496
Dil_3	10,0	0,01992	0,31 %	868	833	42912	42470
Dil_4	20,0	0,01163	1,15 %	506	503	43112	43685

Dil_5	40,0	0,00767	10,67 %	331	330	43005	43230
M616p_0	0	0,03315	6,98 %	1452	1259	41746	39953
M616p_1	2,50	0,03277	0,62 %	1298	1298	39783	39435
M616p_2	5,00	0,03018	0,12 %	1155	1160	38305	38408
M616p_3	10,0	0,02046	0,12 %	801	840	39175	41014
M616p_4	20,0	0,01155	6,45 %	440	478	39906	39571
M616p_5	40,0	0,00924	4,24 %	358	384	39939	40347
M617i_A28_0	0	0,03117	0,08 %	1254	1251	40251	40107
M617i_A28_1	8,25	0,02348	1,78 %	936	974	40373	40968
M617i_A28_2	33,0	0,00961	2,36 %	390	375	39927	39695
M617i_A29_0	0	0,03200	0,50 %	1274	1334	39951	41538
M617i_A29_1	8,25	0,02260	1,51 %	887	926	39673	40545
M617i_A29_2	33,0	0,01005	2,43 %	413	420	41804	41075
M617i_A30_0	0	0,03101	7,28 %	1340	1218	41101	41412
M617i_A30_1	8,25	0,02191	2,40 %	918	880	41193	40853
M617i_A30_2	33,0	0,00918	6,10 %	390	358	40710	40736
M617i_A34_0	0	0,03190	4,85 %	1362	1297	41284	42104
M617i_A34_1	8,25	0,02165	6,39 %	952	842	42075	40737
M617i_A34_2	33,0	0,00946	2,42 %	376	391	40437	40638
M617i_A35_0	0	0,03214	4,33 %	1393	1343	42049	43102
M617i_A35_1	8,25	0,02301	5,95 %	1029	976	42923	44287
M617i_A35_2	33,0	0,00883	9,37 %	405	359	43023	43550
M617i_A36_0	0	0,03120	4,54 %	1369	1292	42509	42780
M617i_A36_1	8,25	0,02094	1,12 %	919	902	43534	43411
M617i_A36_2	33,0	0,00840	4,04 %	348	365	42659	42256
M618i_A25_0	0	0,02919	5,94 %	1319	1253	43363	44808
M618i_A25_1	8,25	0,02135	1,51 %	905	936	42842	43372
M618i_A25_2	33,0	0,00951	16,72 %	364	453	43408	42598
M618i_A26_0	0	0,02803	2,46 %	1220	1265	44295	44359
M618i_A26_1	8,25	0,02024	4,97 %	852	906	43625	43240
M618i_A26_2	33,0	0,00861	8,89 %	349	390	43274	42640
M618i_A27_0	0	0,02810	0,59 %	1183	1249	42279	44268
M618i_A27_1	8,25	0,01987	1,87 %	860	831	42726	42391
M618i_A27_2	33,0	0,00913	6,58 %	358	372	37467	42734
M618i_A28_0	0	0,03040	5,66 %	1177	1200	37231	41121
M618i_A28_1	8,25	0,02147	0,83 %	842	802	38989	37575
M618i_A28_2	33,0	0,00877	13,25 %	319	380	40124	39610
M618i_A29_0	0	0,02792	5,92 %	1098	1240	41047	42628
M618i_A29_1	8,25	0,01946	7,00 %	759	832	41024	40730
M618i_A29_2	33,0	0,00831	1,25 %	335	328	39978	39839
M618i_A30_0	0	0,02792	6,49 %	1255	1094	42974	41066
M618i_A30_1	8,25	0,02238	3,14 %	872	925	39851	40435
M618i_A30_2	33,0	0,00911	7,79 %	337	340	35070	39507

Menetelmän tarkkuus

								Laskettu lineaarisesta sovituksesta		
1										
Näyte	Lääke ng/mL	FL/RL mean	CV%	FL 1	FL 2	RL 1	RL 2	laskettu assay kons. (ng/mL)	laskettu seerumi kons. (µg/mL)	tarkkuus %:a todellisesta (seerumi)
CAL A	2,50	0,0309	1,97 %	1191	1139	38021	37386	2,49	0,12	100 %
CAL B	5,00	0,0255	1,89 %	927	979	36836	37876	4,53	0,23	91 %
CAL C	10,0	0,0174	4,73 %	641	699	38185	38945	11,19	0,56	112 %
CAL D	20,0	0,0113	3,25 %	422	444	38308	38493	22,01	1,10	110 %
CAL E	30,0	0,0097	8,84 %	357	409	39439	39868	26,35	1,32	88 %
CAL F	40,0	0,0080	14,74 %	294	350	40818	39422	31,53	1,58	79 %
Low / Blank	2,50	0,0286	1,52 %	1080	1104	37300	38958	3,19	0,16	128 %
Med / Blank	10,0	0,0194	0,32 %	725	773	37382	39676	8,89	0,44	89 %
High / Blank	40,0	0,0086	0,13 %	336	345	39293	40271	29,77	1,49	74 %
Low / Blank	2,50	0,0287	1,25 %	1171	1125	40380	39487	3,16	0,16	126 %
Med / Blank	10,0	0,0171	3,22 %	654	720	39102	41133	11,51	0,58	115 %
High / Blank	40,0	0,0088	3,01 %	371	358	41339	41625	29,02	1,45	73 %
Low / Blank	2,50	0,0273	3,21 %	1121	1124	42041	40285	3,72	0,19	149 %
Med / Blank	10,0	0,0166	3,52 %	674	660	39671	40830	12,21	0,61	122 %
High / Blank	40,0	0,0086	3,67 %	371	348	42291	41784	29,80	1,49	74 %
Low / Blank	2,50	0,0274	5,89 %	1170	1065	41051	40612	3,68	0,18	147 %
Med / Blank	10,0	0,0181	8,80 %	762	706	39601	41561	10,30	0,51	103 %
High / Blank	40,0	0,0081	9,16 %	314	359	41586	41762	31,42	1,57	79 %

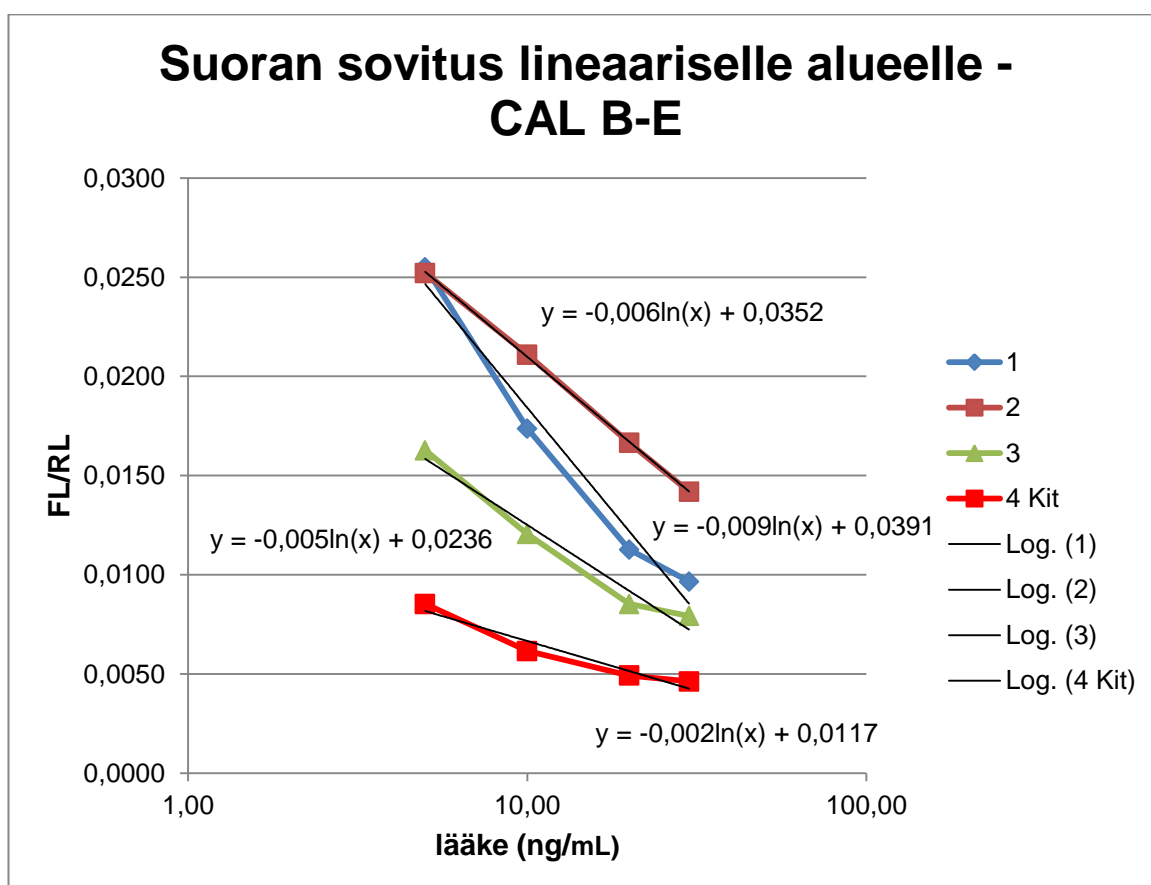
								Laskettu lineaarisesta sovituksesta		
2										
Näyte	Lääke ng/mL	FL/RL mean	CV%	FL 1	FL 2	RL 1	RL 2	laskettu assay kons. (ng/mL)	laskettu seerumi kons. (µg/mL)	tarkkuus %:a todellisesta (seerumi)
CAL A	2,50	0,0305	5,28 %	696	693	21985	23589	2,18	0,11	87 %
CAL B	5,00	0,0252	13,67 %	608	657	26695	23760	5,28	0,26	106 %
CAL C	10,0	0,0211	1,37 %	530	496	24882	23743	10,49	0,52	105 %
CAL D	20,0	0,0167	7,56 %	382	416	24230	23709	21,99	1,10	110 %
CAL E	30,0	0,0142	9,92 %	353	377	26743	24818	33,14	1,66	110 %
CAL F	40,0	0,0126	3,78 %	337	301	26114	24604	43,46	2,17	109 %
Low / Blank	2,50	0,0260	15,48 %	774	737	26872	31877	4,66	0,23	187 %
Med / Blank	10,0	0,0211	17,82 %	575	578	24168	31299	10,43	0,52	104 %
High / Blank	40,0	0,0133	10,02 %	390	397	27468	32225	38,74	1,94	97 %

Low / Blank	2,50	0,0268	1,96 %	745	689	28214	25380	4,07	0,20	163 %
Med / Blank	10,0	0,0216	4,16 %	544	555	24499	26509	9,69	0,48	97 %
High / Blank	40,0	0,0137	19,03 %	386	391	32657	25234	36,25	1,81	91 %
Low / Blank	2,50	0,0277	6,02 %	750	679	25967	25600	3,49	0,17	140 %
Med / Blank	10,0	0,0178	18,70 %	513	528	33298	26265	18,31	0,92	183 %
High / Blank	40,0	0,0110	3,46 %	361	351	33746	31245	56,77	2,84	142 %
Low / Blank	2,50	0,0262	2,98 %	730	705	28463	26354	4,48	0,22	179 %
Med / Blank	10,0	0,0185	16,45 %	544	543	33291	26304	16,19	0,81	162 %
High / Blank	40,0	0,0127	14,52 %	375	382	26696	33418	42,25	2,11	106 %

3								Laskettu lineaarisesta sovituksesta		
Näyte	Lääke ng/mL	FL/RL mean	CV%	FL 1	FL 2	RL 1	RL 2	laskettu assay kons. (ng/mL)	laskettu seerumi kons. (µg/mL)	tarkkuus %:a todellisesta (seerumi)
CAL A	2,50	0,0171	0,26 %	648	655	37810	38360	3,66	0,18	147 %
CAL B	5,00	0,0163	4,05 %	655	611	39131	38655	4,33	0,22	87 %
CAL C	10,0	0,0121	4,55 %	474	464	38085	39761	10,06	0,50	101 %
CAL D	20,0	0,0085	8,40 %	308	355	38389	39287	20,37	1,02	102 %
CAL E	30,0	0,0079	2,69 %	311	306	38536	39387	23,01	1,15	77 %
CAL F	40,0	0,0072	9,97 %	286	257	37252	38554	26,73	1,34	67 %
Low / Blank	2,50	0,0173	0,75 %	665	675	38572	38739	3,50	0,18	140 %
Med / Blank	10,0	0,0124	1,84 %	487	487	39906	38883	9,46	0,47	95 %
High / Blank	40,0	0,0071	4,42 %	285	266	39091	38839	27,28	1,36	68 %
Low / Blank	2,50	0,0168	8,49 %	626	698	39661	39213	3,90	0,20	156 %
Med / Blank	10,0	0,0111	2,60 %	434	436	39810	38552	12,17	0,61	122 %
High / Blank	40,0	0,0071	2,55 %	286	269	39802	38811	27,34	1,37	68 %
Low / Blank	2,50	0,0152	5,58 %	632	592	39902	40446	5,33	0,27	213 %
Med / Blank	10,0	0,0105	3,56 %	433	419	40040	40749	13,60	0,68	136 %
High / Blank	40,0	0,0072	0,79 %	292	289	40401	40434	26,64	1,33	67 %
Low / Blank	2,50	0,0154	0,40 %	616	649	39857	42228	5,14	0,26	206 %
Med / Blank	10,0	0,0120	3,11 %	503	481	41025	40997	10,18	0,51	102 %
High / Blank	40,0	0,0063	2,24 %	260	250	40626	40319	31,82	1,59	80 %

4 Kit								Laskettu lineaarisesta sovituksesta		
Näyte	Lääke ng/mL	FL/RL mean	CV%	FL 1	FL 2	RL 1	RL 2	laskettu assay kons. (ng/mL)	laskettu seerumi kons. (µg/mL)	tarkkuus %:a todellisesta (seerumi)
CAL A	40,0	0,0051	16,11 %	229	294	50871	51956	27,38	1,37	68 %
CAL B	30,0	0,0046	2,94 %	230	255	50765	53988	34,35	1,72	114 %
CAL C	20,0	0,0049	12,49 %	282	254	52646	56609	29,64	1,48	148 %

CAL D	10,0	0,0062	6,72 %	331	315	51306	53694	15,97	0,80	160 %
CAL E	5,00	0,0085	10,84 %	489	432	53264	54871	4,89	0,24	98 %
CAL F	2,50	0,0100	6,71 %	495	571	52105	54663	2,37	0,12	95 %
Low / Blank	2,50	0,0105	6,54 %	525	546	52262	49548	1,79	0,09	72 %
Med / Blank	10,0	0,0059	6,11 %	283	323	50171	52521	18,22	0,91	182 %
High / Blank	40,0	0,0051	1,29 %	268	264	51598	51763	26,48	1,32	66 %
Low / Blank	2,50	0,0097	15,10 %	457	549	52917	51306	2,76	0,14	110 %
Med / Blank	10,0	0,0070	0,50 %	371	364	53090	52457	10,68	0,53	107 %
High / Blank	40,0	0,0046	2,88 %	242	250	53932	53490	35,16	1,76	88 %
Low / Blank	2,50	0,0100	0,95 %	530	504	52855	50942	2,39	0,12	95 %
Med / Blank	10,0	0,0058	6,98 %	288	321	51824	52331	18,67	0,93	187 %
High / Blank	40,0	0,0050	7,95 %	280	245	53131	52028	28,65	1,43	72 %
Low / Blank	2,50	0,0091	3,30 %	441	475	49884	51279	3,76	0,19	150 %
Med / Blank	10,0	0,0064	2,11 %	347	360	53265	56936	14,02	0,70	140 %
High / Blank	40,0	0,0057	31,99 %	362	245	51366	55091	19,62	0,98	49 %



Suora on muotoa $y = \alpha * \ln(x) + C$

Lääkkeen pitoisuus lasketaan excelissä kaavasta: $x = \text{EXP}((y-C)/\alpha)$

	1			2		
Todellinen arvo (µg/mL)	Low	Med	High	Low	Med	High
	0,125	0,5	2	0,125	0,5	2
keskiarvo	0,172	0,536	1,50	0,209	0,683	2,18
keskihajonta	0,0151	0,0730	0,0505	0,0261	0,213	0,459
CV%	8,8 %	13,6 %	3,4 %	12,5 %	31,1 %	21,1 %
Tarkkuus %	138 %	107 %	75 %	167 %	137 %	109 %
	3			4 Kit		
Todellinen arvo (µg/mL)	Low	Med	High	Low	Med	High
	0,125	0,5	2	0,125	0,5	2
keskiarvo	0,223	0,568	1,41	0,134	0,770	1,37
keskihajonta	0,0451	0,0943	0,119	0,0413	0,189	0,320
CV%	20,2 %	16,6 %	8,4 %	30,9 %	24,5 %	23,3 %
Tarkkuus %	179 %	114 %	71 %	107 %	154 %	69 %

Menetelmän häiriöalttius

Plate 1 (3h, normaali & mekaaninen rasitus)

Näyte	Lääke (ng/mL)	FL/RL mean	CV%	FL 1	FL 2	RL 1	RL 2
CAL A	40,0	0,0094	8,53 %	387	349	38655	39333
CAL B	20,0	0,0148	0,97 %	566	543	38592	36519
CAL C	10,0	0,0231	9,82 %	919	833	37179	38730
CAL D	5,00	0,0297	1,22 %	1137	1147	38664	38338
CAL E	2,50	0,0316	0,42 %	1174	1200	37285	37883
CAL A_R	40,0	0,0120	36,56 %	588	353	38814	39550
CAL B_R	20,0	0,0139	0,76 %	542	531	38713	38336
CAL C_R	10,0	0,0233	2,37 %	902	895	38012	39003
CAL D_R	5,00	0,0289	1,87 %	1092	1148	38244	39158
CAL E_R	2,50	0,0303	0,68 %	1173	1144	38565	37976

Plate 2 (2 h)

Näyte	Lääke (ng/mL)	FL/RL mean	CV%	FL 1	FL 2	RL 1	RL 2
CAL A	40,0	0,0052	1,92 %	240	260	46572	49098
CAL C	20,0	0,0053	4,97 %	239	264	46860	48250
CAL D	10,0	0,0080	8,49 %	395	371	46594	49356
CAL E	5,00	0,0085	9,58 %	429	435	47075	54668
CAL F	2,50	0,0088	3,56 %	423	434	47044	50763

Plate 3 (4 h)

Näyte	Lääke (ng/mL)	FL/RL mean	CV%	FL 1	FL 2	RL 1	RL 2
CAL A	40,0	0,0235	6,61 %	730	683	29653	30463
CAL C	20,0	0,0345	5,48 %	976	1040	29400	28992
CAL D	10,0	0,0634	6,80 %	1846	2028	30591	30522
CAL E	5,00	0,0878	0,60 %	2628	2642	29811	30227
CAL F	2,50	0,0984	0,83 %	2929	2883	29950	29134

Plate 4 (3 h, ei aseptinen)

Näyte	Lääke (ng/mL)	FL/RL mean	CV%	FL 1	FL 2	RL 1	RL 2
CAL A	40,0	0,0114	10,73 %	450	398	36645	37734
CAL C	20,0	0,0152	4,51 %	577	531	36882	36178
CAL D	10,0	0,0242	1,03 %	881	950	36632	38931
CAL E	5,00	0,0303	0,14 %	1160	1188	38274	39120
CAL F	2,50	0,0347	1,16 %	1325	1321	38523	37783