RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **241608**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **432015**

(22) Data zgłoszenia: **29.11.2019**

(51) Int.Cl.
G01N 33/92 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(54) **Diagnostyczny panel biomarkerów metabolicznych do monitorowania skuteczności leczenia chemioterapeutycznego raka płuca**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
31.05.2021 BUP 11/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
07.11.2022 WUP 45/22

(73) Uprawniony z patentu:
UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU, Białystok, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
EWA PARFIENIUK, Białystok, PL
ADAM KRĘTOWSKI, Białystok, PL
MICHAŁ CIBOROWSKI, Białystok, PL
JACEK NIKLIŃSKI, Białystok, PL
EWA SIERKO, Białystok, PL
JOANNA KIŚLUK, Czarna Białostocka, PL
KAROLINA PIETROWSKA, Białystok, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Marta Kawczyńska

PL 241608 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób oceny skuteczności leczenia chemioterapeutycznego u osobnika z rakiem płuca, diagnostyczne panele biomarkerów metabolicznych, zastosowanie diagnostycznych paneli biomarkerów metabolicznych do diagnostyki in vitro raka płuca, zastosowanie diagnostycznych paneli biomarkerów metabolicznych do monitorowania in vitro skuteczności leczenia chemioterapeutycznego raka płuca u osobnika oraz zestaw do monitorowania skuteczności leczenia chemioterapeutycznego u osobnika z rakiem płuca.

Dziedzina wynalazku

Niniejszy wynalazek dotyczy ogólnie dziedziny onkologii, w szczególności kontrolowania efektów leczenia chemioterapeutycznego raka płuca, w szczególności niedrobnokomórkowego raka płuca (ang. non small cell lung carcinoma, NSCLC), poprzez ocenę statusu skuteczności leczenia chemioterapeutcznego z zastosowaniem ilościowego oznaczenia panelu biomarkerów metabolicznych.

Stan techniki

Nowotwór płuc jest najczęściej diagnozowaną chorobą onkologiczną w Polsce. Jest on również najczęstszą przyczyną zgonów będących wynikiem choroby nowotworowej (31% zgonów nowotworowych u mężczyzn i 16% u kobiet). Postępowanie operacyjne stanowi główną i najskuteczniejszą metodę leczenia raka płuca, jednak nie u wszystkich pacjentów taka terapia jest możliwa. Przeciwwskazaniem może być położenie lub wielkość guza, stadium choroby nowotworowej czy ogólny stan zdrowia pacjenta. Wśród innych metod terapeutycznych można wyróżnić radioterapię, chemioterapię, hormonoterapię czy leczenie ukierunkowane molekularnie. Niemniej, najlepsze efekty daje skojarzenie dwóch metod – leczenia miejscowego (leczenie operacyjne lub radioterapia) z systemowym (chemioterapia, hormonoterapia, leczenie biologiczne).

Leczenie chemioterapeutyczne pacjentów z nowotworami standardowo polega na podaniu pacjentom od czterech do sześciu cykli chemioterapii. Co dwa cykle przeprowadza się ocenę skuteczności leczenia, to znaczy kontrolę odpowiedzi na leczenie.

Obecnie ocenę skuteczności podjętego leczenia chemioterapeutycznego przeprowadza się poprzez obserwację zmian obrazów uzyskiwanych przy użyciu tomografii komputerowej (TK), pozytonowej tomografii emisyjnej (PET) lub rezonansu magnetycznego (MR). Niestety szeroki wachlarz przeciwwskazań do wykonania takiego rodzaju badań obrazowych uniemożliwia przeprowadzenie obrazowania u szerokiej grupy pacjentów. Pomimo, że metody te są nieinwazyjne, ograniczone są one jednak szeregiem przeciwwskazań, których wystąpienie może uniemożliwić wykonanie takich badań. Przykładowo, przeciwwskazaniem do wykonania tomografii komputerowej jest ciąża pacjentki, nadczynność tarczycy, upośledzenie funkcji nerek czy nadwrażliwość na środek kontrastujący. W przypadku badania rezonansem magnetycznym, badań nie wykonuje się u pacjentek w pierwszym trymestrze ciąży, a ponadto przeciwwskazaniem są wszczepione u pacjenta urządzenia elektryczne i elektroniczne, np. rozrusznik serca, pompa insulinowa, wszczepiony aparat słuchowy, neurostymulatory, klipsy metalowe wewnątrzczaszkowe czy metalowe endoprotezy. Ponadto badania bazujące na technikach obrazowych należą do bardzo kosztownych rozwiązań, które wciąż pozostają trudno dostępne, i które jednocześnie nie pozostają bez wpływu na stan pacjenta (przyjęcie dawki promieniowania).

Lipidy powszechnie występują we krwi człowieka, takie jak fosfatydyloetanoloamina 16:0/20:4 (PE 16:0/20:4), fosfatydyloetanoloamina 18:0/22:6 (PE 18:0/22:6) i lizofosfatydyloetanoloamina 18:0 (LPE 18:0). Pełnią one również ważną rolę w procesie rozwoju nowotworu, będąc podstawowym budulcem błon komórkowych namnażających się w procesie nowotworzenia komórek. Z kolei leczenie oparte na chemioterapii powoduje zmniejszenie guza nowotworowego, a więc i rozpad komórek nowotworowych. U pacjentów, u których leczenie chemioterapeutyczne przynosiło dobre efekty obserwowany jest wzrost poziomu lipidów, które mogą pochodzić właśnie z rozpadających się komórek nowotworowych.

Znane są rutynowe metody całościowego oznaczania lipidów. Jest to np. metoda enzymatyczno-kolorymetryczna, umożliwiająca oznaczanie całkowitego cholesterolu, trójglicerydów oraz lipoproteinę wysokiej gęstości (ang. *High Density Lipoprotein – HDL*) i lipoproteinę niskiej gęstości (ang. *Low Density Lipoprotein – LDL*). Jednak całościowy poziom lipidów, lub nawet ich frakcji, nie pozwala na uzyskanie precyzyjnej informacji, gdyż otrzymany wynik stanowi uśredniony wynik będący wypadkową stężenia wszystkich związków lipidowych należących do danej kategorii. Dlatego tak ważne jest stworzenie selektywnego sposobu, który pozwoli na ilościowe oznaczenie tylko wskazanych związków lipidowych. Nie są jednak dotąd znane żadne sposoby pozwalające na ilościowe oznaczenie tylko wskazanych lipidów.

Istnieje zatem zapotrzebowanie na opracowanie nieinwazyjnego i bezpiecznego dla pacjenta sposobu i środków oceny skuteczności podjętego leczenia chemioterapeutycznego raka płuca. Istotne jest wskazanie sposobu, który będzie dostępny również dla szerokiej grupy osób, w tym dla pacjentów, dla których wykluczone jest wykorzystanie stosowanych technik obrazowych. Jednocześnie taki sposób musi odznaczać się wysoką czułością i specyficznością, ponieważ stanowić może podstawę do podejmowania kluczowych decyzji diagnostycznych.

Istnieje zatem także zapotrzebowanie na opracowanie sposobu oznaczania poziomu wyselekcjonowanych lipidów i związków w próbce biologiczne od osobnika, takiej jak próbka osocza czy surowicy, ze szczególnym zastosowaniem w ocenie efektów leczenia chemioterapeutycznego u pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca.

Celem wynalazku jest zatem dostarczenie nowych, skutecznych, wiarygodnych, powtarzalnych, czułych i specyficznych sposobów i środków oceny skuteczności leczenia chemioterapeutycznego u pacjentów z rakiem płuca, które nadają się do zastosowania u wszystkich pacjentów tego potrzebujących, w szczególności w diagnostyce in vitro, zwłaszcza raka płuca, takiego jak niedrobnokomórkowy rak płuca.

Celem wynalazku jest także dostarczenie nowych, skutecznych, wiarygodnych, powtarzalnych, czułych i specyficznych sposobów i środków do ilościowego oznaczania wyselekcjonowanych lipidów w próbce od osobnika, które nadają się do zastosowania w diagnostyce klinicznej u wszystkich pacjentów.

Krótki opis wynalazku

Powyższe cele zostały osiągnięte dzięki rozwiązaniom zastrzeganym w załączonych zastrzeżeniach patentowych. Korzystne warianty wynalazku zostały zdefiniowane w zastrzeżeniach zależnych.

Przedmiotem wynalazku jest sposób oceny skuteczności leczenia chemioterapeutycznego u osobnika z rakiem płuca, w którym

a) w próbce od osobnika z rakiem płuca przed rozpoczęciem leczenia chemioterapeutycznego oznacza się ilościowo panel biomarkerów metabolicznych (panel metabolitów) zawierający następujące metabolity: fosfatydyloetanoloaminę 16:0/20:4 i fosfatydyloetanoloaminę 18:0/22:6,
b) w próbce od osobnika według a) po co najmniej dwóch cyklach leczenia chemioterapeutycznego oznacza się ilościowo panel biomarkerów metabolicznych (panel metabolitów) zawierający następujące metabolity: fosfatydyloetanoloaminę 16:0/20:4 i fosfatydyloetanoloaminę 18:0/22:6,
c) porównuje się wyniki uzyskane w etapie a) i w etapie b), i na podstawie uzyskanego wyniku porównania określa się status skuteczności leczenia chemioterapeutycznego u osobnika, przy czym wzrost stężenia fosfatydyloetanoloaminy 18:0/22:6 wskazuje na stabilizację leczonego raka płuca u osobnika, zaś wzrost stężenia fosfatydyloetanoloaminy 16:0/20:4 i fosfatydyloetanoloaminy 18:0/22:6 wskazuje na odpowiedź osobnika na leczenie chemioterapeutyczne.

W sposobie według wynalazku panel metabolitów korzystnie zawiera ponadto następujący metabolit: lizofosfatydyloetanoloaminę 18:0.

W sposobie według wynalazku oznaczenia ilościowe metabolitów z panelu metabolicznego korzystnie przeprowadza się z zastosowaniem chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem masowym typu potrójny kwadrupol.

W sposobie według wynalazku panel metabolitów korzystnie zawiera ponadto następujący metabolit: kwas moczowy.

Korzystniej oznaczenia ilościowe powyższego metabolitu przeprowadza się z zastosowaniem wysokowydajnego systemu ekstrakcji do fazy stałej sprzężonego ze spektrometrią mas typu potrójny kwadrupol.

W sposobie według wynalazku próbkę od osobnika stanowi korzystnie próbka krwi pełnej, korzystniej próbka osocza.

W sposobie według wynalazku osobnikiem jest korzystnie człowiek.

W sposobie według wynalazku rak płuca korzystnie stanowi niedrobnokomórkowy rak płuca.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto diagnostyczny panel biomarkerów metabolicznych składający się z następujących metabolitów: fosfatydyloetanoloaminy 16:0/20:4 i fosfatydyloetanoloaminy 18:0/22:6 oraz kwasu moczowego.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto diagnostyczny panel biomarkerów metabolicznych składający się z następujących metabolitów: fosfatydyloetanoloaminy 16:0/20:4, fosfatydyloetanoloaminy 18:0/22:6, kwasu moczowego oraz lizofosfatydyloetanoloaminy 18:0.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto zastosowanie diagnostycznego panelu biomarkerów metabolicznych zawierającego następujące metabolity: fosfatydyloetanoloaminę 16:0/20:4, fosfatydyloetanoloaminę 18:0/22:6 i kwas moczowy do diagnostyki in vitro raka płuca.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto zastosowanie diagnostycznego panelu biomarkerów metabolicznych zawierającego następujące metabolity: fosfatydyloetanoloaminę 16:0/20:4 i fosfatydyloetanoloaminę 18:0/22:6 i kwas moczowy do monitorowania in vitro skuteczności leczenia chemioterapeutycznego raka płuca u osobnika.

Zastosowanie diagnostycznego panelu biomarkerów metabolicznych według wynalazku korzystnie zawierającego ponadto następujący metabolit: lizofosfatydyloetanoloaminę 18:0.

Zastosowanie diagnostycznego panelu biomarkerów metabolicznych według wynalazku korzystnie dotyczy niedrobnokomórkowego raka płuca. Zastosowanie diagnostycznego panelu biomarkerów metabolicznych według wynalazku korzystnie dotyczy osobnika, którym jest człowiek.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto zestaw do monitorowania skuteczności leczenia chemioterapeutycznego u osobnika z rakiem płuca, charakteryzujący się tym, że zawiera środki do oznaczania ilościowego poziomu panelu biomarkerów metabolicznych składającego się z następujących metabolitów: fosfatydyloetanoloaminy 16:0/20:4, fosfatydyloetanoloaminy 18:0/22:6, metodą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas typu potrójny kwadrupol, oraz kwasu moczowego, z zastosowaniem wysokowydajnego systemu ekstrakcji do fazy stałej sprzężonego ze spektrometrią mas typu potrójny kwadrupol, oraz instrukcje do przeprowadzenia sposobu monitorowania skuteczności leczenia.

Zestaw do monitorowania skuteczności leczenia chemioterapeutycznego u osobnika z rakiem płuca według wynalazku korzystnie zawiera ponadto środki do oznaczania ilościowego poziomu następującego biomarkera metabolicznego: lizofosfatydyloetanoloaminy 18:0, metodą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas typu potrójny kwadrupol.

Szczegółowy opis wynalazku

Biomarkery metaboliczne, metabolity biomarkerowe lub bioindykatory, to wskaźniki metaboliczne, występujące u badanych osobników, które pozwalają na jakościową i/lub ilościową ocenę różnych stanów medycznych, patologicznych, chorobowych. W nowoczesnej medycynie biomarkery odgrywają nieocenioną rolę, pozwalając między innymi na szybką, precyzyjną, swoistą i czułą diagnostykę różnych chorób lub zaburzeń, jak również ocenę skuteczności podjętego leczenia, takiego jak leczenie chemioterapeutyczne. Biomarkery metaboliczne to czynniki biochemiczne, służące do precyzyjnej i łatwej diagnostyki chorób, na przykład chorób nowotworowych, jak również oceny progresji takiego rodzaju chorób lub też monitorowania ich leczenia, czy też oceny prawdopodobieństwa wystąpienia takiego rodzaju chorób u badanego osobnika. Często do uzyskania precyzyjnej, jednoznacznej i wiarygodnej oceny skuteczności takiego leczenia konieczne jest oznaczanie więcej niż jednego takiego biomarkera metabolicznego, czyli panelu biomarkerów metabolicznych lub panelu metabolitów.

Twórcy wynalazku wykazali, że kompleksowe zmiany poziomu panelu biomarkerów metabolicznych zawierającego następujące metabolity: PE 16:0/20:4, PE 18:0/22:6, oraz korzystnie LPE 18:0 a także jak i kwasu moczowego, mogą być użytecznym wskaźnikiem odpowiedzi pacjenta na zastosowane leczenie oparte na chemioterapii.

Wzrost stężenia wskazanych lipidów (PE 16:0/20:4, PE 18:0/22:6 i korzystnie LPE 18:0) oraz korzystnie kwasu moczowego co najmniej po drugim cyklu chemioterapii określony z wykorzystaniem sposobu według wynalazku polegającego na analizie ilościowej tych metabolitów we krwi pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca poddanych leczeniu świadczy o skuteczności zastosowanej terapii. Zgodnie z wynalazkiem opracowano sposób pomiaru panelu wskazanych metabolitów, który można zrealizować korzystnie przy pomocy wysokosprawnej chromatografii cieczowej – UHPLC (PE 16:0/20:4, PE 18:0/22:6 i LPE 18:0) lub wysokowydajnego systemu ekstrakcji do fazy stałej (kwas moczowy) sprzężonych ze spektrometrem mas typu potrójny kwadrupol (np. UHPLC 1290 Infinity II, Rapid Fire 365, QQQ 6495 Agilent Technologies).

Zgodnie z wynalazkiem oznacza się ilościowo wybrane lipidy (PE 16:0/20:4, PE 18:0/22:6 i korzystnie LPE 18:0) i kwas moczowy w próbce biologicznej, korzystnie próbce osocza krwi. Schematyczny przebieg korzystnego sposobu według wynalazku został przedstawiony na Fig. 1. Dokładniej, lipidy korzystnie oznacza się poprzez wykonanie następujących etapów:

1a) dostarczenie próbki biologicznej od podmiotu,
1b) ekstrakcja alkoholem połączona ze strąceniem białek,
1c) odwirowanie powstałego osadu (osad zostaje odrzucony),
1d) przefiltrowanie supernatantu,

1e) przeprowadzenie pomiaru z wykorzystaniem techniki UHPLC sprzężonej ze spektrometrem mas (QQQ).

Kwas moczowy korzystnie oznacza się natomiast następująco:

2a) dostarczenie próbki biologicznej od podmiotu,

2b) ekstrakcja alkoholem wraz z jednoczesnym przefiltrowaniem ekstraktu i usunięciem lipidów,

2c) odwirowanie próbek,

2d) przeprowadzenie pomiaru z wykorzystaniem techniki wysokowydajnej ekstrakcji do fazy stałej (Rapid Fire) sprzężonej ze spektrometrem mas (QQQ).

Zgodnie z wiedzą literaturową najbardziej wydajnym rozpuszczalnikiem wykorzystywanym do ekstrakcji lipidów jest zimny (-20°C) metanol.

Ze względu na brak rozdziału chromatograficznego poprzedzającego oznaczanie kwasu moczowego (korzystnie stosowana technika wysokowydajnej ekstrakcji do fazy stałej) wskazane jest usunięcie składników matrycy mogących zaburzać pomiar. W tym celu wykorzystany został gotowy, komercyjny zestaw umożliwiający szybką ekstrakcję połączoną z filtrowaniem i usunięciem lipidów z ekstraktu (wykorzystano zestaw Captiva ND Lipids (Agilent Technologies)).

Sposób według wynalazku dostosowany jest do wykorzystania w trakcie kontroli efektów leczenia z użyciem chemioterapii pacjentów z rakiem płuca, korzystnie niedrobnokomórkowym rakiem płuca. Zastosowanie diagnostycznego panelu biomarkerów metabolicznych według wynalazku zawierającego PE 16:0/20:4 i PE 18:0/22:6, oraz korzystnie LPE 18:0 jak i kwas moczowy, do określania skuteczności podjętego leczenia chemioterapeutycznego nie było dotychczas opisywane. Twórcy wynalazku wykazali użyteczność sposobu według wynalazku z zastosowaniem panelu biomarkerów metabolicznych w kontroli efektów leczenia chemioterapeutycznego u pacjentów z rakiem płuca, co znajduje potwierdzenie w załączonych przykładach. Sposób według wynalazku pozwala także na stwierdzenie stabilizacji statusu choroby nowotworowej.

Sposób oceny skuteczności leczenia chemioterapeutycznego u osobnika z rakiem płuca według wynalazku odznacza się dobrą czułością i specyficznością. Ponadto, jego realizacja generuje znacząco niższe koszty, niż stosowane obecnie techniki obrazowe. Jednocześnie pomiar panelu wybranych metabolitów w próbce od pacjenta powoduje dostępność takiego testu dla każdego pacjenta, co nie jest dostępne w przypadku technik obrazowych, które nie mogą być wykonane u szerokiego grona osób z powodu licznych przeciwskazań i ograniczeń takich sposobów.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto diagnostyczny panel biomarkerów metabolicznych składający się z następujących metabolitów: PE 16:0/20:4, PE 18:0/22:6 i kwasu moczowego. Przedmiotem wynalazku jest ponadto diagnostyczny panel biomarkerów metabolicznych składający się z następujących metabolitów: PE 16:0/20:4, PE 18:0/22:6, kwasu moczowego i LPE 18:0. Takie panele mogą być stosowane do diagnostyki in vitro, w szczególności do oceny skuteczności leczenia chemioterapeutycznego raka płuca, zwłaszcza u pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca, stanowiąc skuteczne narzędzie diagnostyczne.

Niniejszy wynalazek powstał w oparciu o wyniki prac naukowych. Pierwszym etapem (wstępną selekcją potencjalnych wskaźników) była niecelowana analiza metabolomiczna osocza pochodzącego pacjentów ze zdiagnozowanym niedrobnokomórkowym rakiem płuca poddanych leczeniu z wykorzystaniem chemioterapii. Materiały do badania (próbki krwi) pobierane były od pacjentów przed rozpoczęciem leczenia i po przyjęciu dwóch cykli chemioterapii. Do analizy tych próbek wykorzystano chromatograf cieczowy sprzężony ze spektrometrem mas wysokiej rozdzielczości (LC-QTOF-MS). Aparatura ta pozwala na detekcję szerokiego spektrum małocząsteczkowych składników obecnych w próbkach (metabolitów). Uzyskane dane zostały poddane analizie statystycznej, która wyłoniła grupę fosfatydyloetanoloamin i lizofosfatydyloetanoloamin oraz kwas moczowy, jako potencjalne wskaźniki odpowiedzi na leczenie chemioterapeutyczne. Kompleksowe zmiany grupy związków (panelu) sugerowały, że potencjał diagnostyczny będzie wykazywał dopiero panel metabolitów, a nie pojedynczy związek. Na potencjalną użyteczność wskazywał fakt, że wszystkie związki z wyselekcjonowanej grupy wykazywały zmiany w podobnym zakresie (30–50%) i kierunku (poziom wszystkich obserwowanych metabolitów zwiększał się po przyjęciu dwóch cykli chemioterapii u pacjentów, u których to leczenie okazywało się skuteczne). Dlatego opracowano sposób oznaczania ilości panelu wskazanych metabolitów, który można korzystnie zrealizować przy wykorzystaniu technologii spektrometrii mas (spektrometr mas typu potrójny kwadrupol – QQQ) połączonej z chromatografią cieczową (ang. *Liquid Chromatography – LC*) (panel lipidów) i wysokowydajnej ekstrakcji do fazy stałej (Rapid Fire) (kwas moczowy). Technologia wybrana do ilościowego oznaczenia wyselekcjonowanych metabolitów pozwala na bardzo dokładne

określenie stężenia badanego analitu w próbkach, co pozwala na uzyskiwanie dokładniejszych wyników badań. Metody bazujące na detekcji QQQ zostały zwalidowane według wytycznych Europejskiej Agencji Leków (ang. *European Medicine Agency – EMA*) i Agencji Żywności i Leków (ang. U.S. *Food and Drug Administation – EDA*). Analizowano materiał pochodzący od 9 pacjentów o częściowej odpowiedzi na leczenie i 14 u których zaobserwowano stabilizację choroby po przyjęciu chemioterapii. Wyniki uzyskane z wykorzystaniem innej metody analitycznej (w stosunku do sposobu według wynalazku) potwierdziły uzyskane wcześniej rezultaty.

Sposób według wynalazku obejmujący oznaczanie ilościowe panelu metabolitów zawierającego PE 16:0/20:4, PE 18:0/22:6, a także panelu metabolitów zawierającego ponadto LPE 18:0, jak i panelu metabolitów zawierającego ponadto kwas moczowy według wynalazku znajduje zastosowanie do wykrywania i oznaczania powyższych związków w próbkach biologicznych (np. osocze krwi) pochodzących od pacjentów z rakiem płuca, np. niedrobnokomórkowym rakiem płuca. Sposób ten można korzystnie zrealizować przy wykorzystaniu chromatografii cieczowej i systemu ekstrakcji do fazy stałej, takiego jak np. Rapid Fire, sprzężonych ze spektrometrem mas typu potrójny kwadrupol.

Sposób według wynalazku obejmujący oznaczanie ilościowe panelu metabolitów zawierającego PE 16:0/20:4, PE 18:0/22:6, a także panelu metabolitów zawierającego ponadto LPE 18:0, jak i panelu metabolitów zawierającego ponadto kwas moczowy według wynalazku może być wykorzystywany do oceny skuteczności podjętego leczenia chemioterapeutycznego, który korzystnie obejmuje:

- oznaczenie poziomu PE 16:0/20:4, PE 18:0/22:6, LPE 18:0, kwasu moczowego w próbce biologicznej pochodzącej od pacjenta z niedrobnokomórkowym rakiem płuc (próbka pobrana w momencie decyzji o zastosowaniu leczenia z wykorzystaniem chemioterapii);
- oznaczenie poziomu PE 16:0/20:4, PE 18:0/22:6, LPE 18:0, kwasu moczowego w próbce biologicznej pochodzącej od pacjenta po podaniu każdych dwóch cykli chemioterapii i porównanie wyniku z poziomem tych samych metabolitów zmierzonych przed rozpoczęciem terapii. Przyrost wskazuje na pozytywną odpowiedź na podane leczenie.

Fakt wykorzystania próbki do badania pobranej w sposób nieinwazyjny jako źródła informacji dotyczących postępów leczenia chemioterapeutycznego pozwala na monitorowanie skuteczności leczenia u wszystkich pacjentów z rakiem płuca. Do tej pory informacje o skuteczności podjętego leczenia określane były poprzez obserwację zmian obrazów uzyskiwanych przy użyciu tomografii komputerowego, pozytonowej tomografii emisyjnej lub rezonansu magnetycznego. Niestety szeroki wachlarz przeciwwskazań do wykonania takiego badania uniemożliwiał przeprowadzenie obrazowania u wielu pacjentów.

Realizacja sposobów według wynalazku poprzez analizę próbki od pacjenta, korzystnie próbki krwi pobranej od pacjenta, nie naraża pacjenta na przyjęcie dodatkowej dawki promieniowania, ale przede wszystkim nie wyklucza możliwości wykonania pomiaru u wszystkich tego wymagających pacjentów. Poprzez swoją prostotę, szybkość, nieinwazyjność, brak konieczności przeprowadzania zabiegu operacyjnego czy biopsji, i stosunkowo niewysoki koszt wykonania pomiaru, sposoby według wynalazku stanowią alternatywę dla obecnie stosowanych technik obrazowych stosowanych do oceny skuteczności leczenia chemioterapeutycznego, pozwalającą na kontrolowania efektów leczenia chemioterapeutycznego u wszystkich pacjentów, niezależnie od wyżej wymienionych czynników dyskwalifikujących do badań obrazowych. Ponadto, należy zauważyć, że dzięki eliminacji konieczności stosowania do tego celu kosztownych metod obrazowych, pozwala na obniżenie kosztów leczenia i objęcie badaniem szerszej populacji pacjentów.

Poniżej przedstawiono przykładowy schemat realizacji wynalazku, w tym zalecane i korzystne metody, procedury, odczynniki, warunki i urządzenia do realizacji niniejszego wynalazku. Należy zauważyć, że można zastosować równoważne środki służące do tego samego celu, zatem przedstawione poniżej i korzystne metody, procedury, odczynniki, warunki i urządzenia do realizacji niniejszego wynalazku nie mają być interpretowane ograniczająco, gdyż nie mają one na celu ograniczenia zakresu wynalazku zdefiniowanego w załączonych zastrzeżeniach patentowych, ale ilustrację przykładów wykonania niniejszego wynalazku.

Przykładowy schemat realizacji wynalazku

Wszystkie czynności związane z przygotowaniem roztworów i próbek do badań należy wykonywać w rękawiczkach. Filtrowanie należy wykonywać w okularach ochronnych. Wszystkie zużyte probówki i jednorazowe końcówki należy umieszczać w pojemnikach oznaczonych „Biohazard – zagrożenie biologiczne”.

A) Przykładowe oznaczanie fosfatydyloetanoloaminy 16:0/20:4, fosfatydyloetanoloaminy 18:0/22:6 i lizofosfatydyloetanoloaminy 18:0

1. Zasada oznaczania
Wykrywanie fosfatydyloetanoloaminy 16:0/20:4, fosfatydyloetanoloaminy 18:0/22:6 i lizofosfatydyloetanoloaminy 18:0 z krwi pacjentów wykonuje się poprzez strącenie alkoholem z uzyskanego osocza krwi białek, odwirowaniu powstałego osadu i przefiltrowaniu uzyskanego supernatantu. Roztwór uzyskany w ten sposób analizuje się z wykorzystaniem chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas typu potrójny kwadrupol.
2. Odczynniki i substancje wzorcowe do realizacji wynalazku
2.1. Odczynniki
2.1.1. Woda (I stopień czystości)
2.1.2. Acetonitryl (LC-MS Ultra Chromosolv)
2.1.3. Metanol (LC-MS Ultra Chromosolv)
2.1.4. Izopropanol (LC-MS Ultra Chomosolv)
2.1.5. Kwas mrówkowy (>98%)
2.1.6. Butylowany hydroksytoluen
2.1.7. Chloroform
2.2. Substancje wzorcowe
2.2.1 Fosfatydyloetanoloamina 16:0/20:4 rozpuszczona w chloroformie o stężeniu 10 mg/ml
2.2.2. Fosfatydyloetanoloamina 18:0/22:6 rozpuszczona w chloroformie o stężeniu 10 mg/ml
2.2.3. Lizofosfatydyloetanoloamina 18:0, proszek
2.3. Wzorzec wewnętrzny
2.3.1. Fosfatydyloetanoloamina 15:0/18:1 d7 rozpuszczona w chloroformie o stężeniu 1 mg/ml
2.3.2. Lizofosfatydyloetanoloamina 18:0 d7 rozpuszczona w chloroformie o stężeniu 1 mg/ml
2.4. Roztwory inne
2.4.1. Roztwór butylowanego hydroksytoluenu (1 mM)
Odważyć 2.204 mg butylowanego hydroksytoluenu (2.1.6.). Po czym naważkę rozpuścić w 10 ml metanolu (2.1.3.). Dokładnie wymieszać.
2.4.2 Roztwór butylowanego hydroksytoluenu (1 μM)
Sporządzić roztwór roboczy butylowanego hydroksytoluenu o stężeniu 1 μM. W tym celu należy odmierzyć 100 μl roztworu o stężeniu 1 mM (2.4.1.) i uzupełnić do 100 ml dodając 99,9 ml metanolu (2.1.3.). Całość dokładnie wymieszać.
2.4.3. Roztwory wzorców wewnętrznych o stężeniu 10 μg/ml
Sporządzić roztwór roboczy fosfatydyloetanoloaminy 15:0/18:1 d7i lizofosfatydyloetanoloaminy 18:0 d7 o stężeniu 10 μg/ml (oba). W tym celu należy odmierzyć po 10 μl roztworu fosfatydyloetanoloaminy 15:0/18:1 d7 o stężeniu 1 mg/ml (2.3.1.) i lizofosfatydyloetanoloaminy 18:0 d7 o stężeniu 1 mg/ml (2.3.2.) i uzupełnić do 1 ml dodając 980 μl metanolu (2.1.3.). Całość dokładnie wymieszać.
2.4.4. Mieszanina metanol/chloroform/woda (65/35/8 v/v/v)
Odmierzyć 1300 μl metanolu (2.3.2.), 700 μl chloroformu (2.1.7.) i 160 μl wody (2.1.1.). Całość dokładnie wymieszać.
2.4.5. Roztwór roboczy lizofosfatydyloetanoloaminy 18:0 (2.2.3.) o stężeniu 1 mg/ml
Odważyć 1 mg lizofosfatydyloetanoloaminy 18:0 (2.2.3.). Po czym naważkę rozpuścić w 1 ml mieszaniny metanol/chloroform/woda (65/35/8 v/v/v) (2.4.4.). Całość dokładnie wymieszać.
2.4.6. Roztwór fosfatydyloetanoloaminy 16:0/20:4 i lizofosfatydyloetanoloaminy 18:0 o stężeniu 10 μg/ml
Odmierzyć 1 μl roztworu fosfatydyloetanoloaminy 16:0/20:4 o stężeniu 10 mg/ml (2.2.1.) i 10 μl roztworu lizofosfatydyloetanoloaminy 18:0 o stężeniu 1 mg/ml (2.4.5.) i uzupełnić do 1 ml dodając 989 μl metanolu (2.1.3.). Całość dokładnie wymieszać.

2.4.7. Roztwór fosfatydyloetanoloaminy 16:0/20:4 i lizofosfatydyloetanoloaminy 18:0 o stężeniu 1 μg/ml
Odmierzyć 100 μl roztworu fosfatydyloetanoloaminy 16:0/20:4 i lizofosfatydyloetanoloaminy 18:0 o stężeniu 10 μg/ml (2.4.6.) i uzupełnić do 1 ml dodając 900 μl metanolu (2.1.3.). Całość dokładnie wymieszać.

2.4.8. Roztwór fosfatydyloetanoloaminy 18:0/22:6 o stężeniu 100 μg/ml
Odmierzyć 10 μl roztworu fosfatydyloetanoloaminy 18:0/22:6 o stężeniu 10 mg/ml (2.2.2.) i uzupełnić do 1 ml dodając 990 μl metanolu (2.1.3.). Całość dokładnie wymieszać.

2.4.9. Roztwór fosfatydyloetanoloaminy 18:0/22:6 o stężeniu 10 μg/ml
Odmierzyć 1 μl roztworu fosfatydyloetanoloaminy 18:0/22:6 o stężeniu 10 mg/ml (2.2.2.) i uzupełnić do 1 ml dodając 999 μl metanolu (2.1.3.). Całość dokładnie wymieszać.

2.5. Fazy ruchome

2.5.1 Faza ruchoma A
W kolbie miarowej o pojemności 1 dm3 przygotować roztwór składający się z 999 ml wody (2.1.1.) i 1 ml kwasu mrówkowego (2.1.5.). Dokładnie wymieszać.

2.5.2. Faza ruchoma B
W kolbie miarowej o pojemności 1 dm^3 przygotować roztwór składający się z 399,5 ml izopropanolu (2.1.4.), 599,5 ml acetonitrylu (2.1.2.) i 1 ml kwasu mrówkowego (2.1.5.). Dokładnie wymieszać.

3. Aparatura i wyposażenie laboratoryjne niezbędne do realizacji wynalazku
   3.1. Wysokosprawny chromatograf cieczowy sprzężony ze spektrometrem mas typu potrójny kwadrupol
   3.2. Kolumna chromatograficzna: Zorbax Eclipse C18 RRHD (2,1 x 50 mm, uziarnienie 1,8 μm).
   3.3. System oczyszczania wody Milli-Q Integral 3
   3.4. Pipety automatyczne oraz dedykowane do nich jednorazowe końcówki
   3.5. Wirówka typu Vortex
   3.6. Wirówka laboratoryjna z rotorem o stałym kącie odchyleniowym umożliwiającym odwirowanie probówek o pojemności 1,5 ml.
   3.7. Wirówka laboratoryjna z horyzontalnym rotorem odchyleniowym umożliwiająca odwirowanie probówek o pojemności 9 ml
   3.8. Szkło laboratoryjne
   3.9. Probówki typu Safe-Lock o pojemności 1,5 ml
   3.10. Naczynka chromatograficzne
   3.11. Wkłady do naczynek chromatograficznych zmniejszające objętość
   3.12. Strzykawki insulinowe
   3.13. Nylonowe filtry strzykawkowe o wielkości porów 0,22 μm
4. Przygotowanie próbek
   4.1. Próbki analizowane
      4.1.1. Krew żylną należy pobrać w warunkach sterylnych do jednej probówko-strzykawki o objętości 9 ml, zawierającej EDTA. Wymieszać krew poprzez odwracanie probówki 8–10 razy. Probówka krwi powinna być niezwłocznie przetransportowana w temperaturze pokojowej do laboratorium.
      4.1.2. Probówkę z krwią należy odwirować w wirówce z horyzontalnym rotorem odchyleniowym przez 10 min przy 1900 xg w temperaturze 4°C.
      4.1.3. Przenieść osocze krwi do probówek typu Safe-Lock o pojemności 1,5 ml.
      Przenosić po 0,5 ml osocza do poszczególnych probówek, pozostawiając około 0,3 ml osocza nad kożuszkiem leukocytalno-płytkowym. Należy ostrożnie pipetować osocze krwi, aby nie naruszyć kożuszka i nie przenieść frakcji leukocytalno-płytkowej.
      4.1.4. Odpowiednio oznakowane probówki z osoczem należy zabezpieczyć i umieścić w zamrażarce niskotemperaturowej (-80°).
   4.2. Próbki osocza od zdrowych dawców do sporządzenia krzywej kalibracyjnej.
   Próbki te należy zabezpieczyć w analogiczny sposób jak próbki analizowane.

5. Procedura
   5.1. Próbka analityczna
   Próbki (4.1.) rozmrozić trzymając na lodzie przez 60–120 min (do całkowitego rozmrożenia), wymieszać z użyciem wirówki typu vortex przez 10 sek.
   5.2. Próbka ślepa
   Próbki (4.2.) rozmrozić trzymając na lodzie przez 60–120 min (do całkowitego rozmrożenia), wymieszać z użyciem wirówki typu vortex przez 10 sek.
   5.3. Próbka wzbogacona QC 4
   Do probówki typu Safe-Lock odmierzyć 145 μl zimnego (-20°C) roztworu metanolu zawierającego butylowany hydroksytoluen (1 μM) (2.4.2.), dodać 5 μl roztworu wzorców wewnętrznych o stężeniu 10 μg/ml (2.4.3.), 5 μl roztworu fosfatydyloetanoloaminy 16:0/20:4 i lizofosfatydyloetanoloaminy 18:0 o stężeniu 10 μg/ml (2.4.6.) i 2 μl roztworu fosfatydyloetanoloaminy 18:0/22:6 o stężeniu 100 μg/ml (2.4.8.). Dokładnie wymieszać. Ostrożnie dodać 50 μl mieszaniny osocza pochodzącego od zdrowych dawców (4.2.). Zawartość analitów odpowiada następującym stężeniom: fosfatydyloetanoloamina 16:0/20:4 i lizofosfatydyloetanoloamina 18:0 po 250 ng/ml oraz fosfatydyloetanoloamina 18:0/22:6 1 μg/ml.
   5.4. Próbka kalibracyjna – CAL
   Do probówek typu Safe-Lock odmierzyć zimny (-20°C) roztworu metanolu zawierającego butylowany hydroksytoluen (1 μM) (2.4.2.) (ilości podane w tabeli 1), dodać 5 μl roztworu wzorców wewnętrznych o stężeniu 10 μg/ml (2.4.3.) a także ilości substancji wzorcowych o ilościach podanych w tabeli 1. Po tym dodać do każdej z probówek po 50 μl mieszaniny osocza pochodzącego od zdrowych dawców (4.2.).

Tabela 1.

Poziom kalibracyjny	Dodawany roztwór wzorcowy	Ilość dodanego roztworu wzorcowego [µl]	Ilość dodanego metanolu zawierającego butylowany hydroksytoluen (1mM) [µl]	Uzyskane stężenie końcowe [ng/ml]
1	Roztwór fosfatydyloetanoloaminy 16:0/20:4 i lizofosfatydyloetanoloaminy 18:0 o stężeniu 1 µg/ml (2.4.7.)	2	141	10
	Roztwór fosfatydyloetanoloaminy 18:0/22:6 o stężeniu 10 µg/ml (2.4.9.)	2		100
2	Roztwór fosfatydyloetanoloaminy 16:0/20:4 i lizofosfatydyloetanoloaminy 18:0 o stężeniu 1 µg/ml (2.4.7.)	10	130	50
	Roztwór fosfatydyloetanoloaminy 18:0/22:6 o stężeniu 10 µg/ml (2.4.9.)	5		250
3	Roztwór fosfatydyloetanoloaminy 16:0/20:4 i lizofosfatydyloetanoloaminy 18:0 o stężeniu 10 µg/ml (2.4.6.)	2	133	100
	Roztwór fosfatydyloetanoloaminy 18:0/22:6 o stężeniu 10 µg/ml (2.4.9.)	10		500
4	Roztwór fosfatydyloetanoloaminy 16:0/20:4 i lizofosfatydyloetanoloaminy 18:0 o stężeniu 10 µg/ml (2.4.6.)	5	138	250
	Roztwór fosfatydyloetanoloaminy 18:0/22:6 o stężeniu 100 µg/ml (2.4.8.)	2		1000

5	Roztwór fosfatydyloetanoloaminy 16:0/20:4 i lizofosfatydyloetanoloaminy 18:0 o stężeniu 10 µg/ml (2.4.6.)	10	131	500
	Roztwór fosfatydyloetanoloaminy 18:0/22:6 o stężeniu 100 µg/ml (2.4.8.)	4		2000
6	Roztwór fosfatydyloetanoloaminy 16:0/20:4 i lizofosfatydyloetanoloaminy 18:0 o stężeniu 10 µg/ml (2.4.6.)	15	120	750
	Roztwór fosfatydyloetanoloaminy 18:0/22:6 o stężeniu 100 µg/ml (2.4.8.)	4		5000

6. Ekstrakcja
Próbki rozmrozić trzymając je na lodzie przez 60–120 min. Uzyskawszy całkowite rozmrożenie próbek wymieszać każdą z nich z użyciem wirówki typu vortex przez 10 sek. Następnie strącić białka używając zimnego (-20°C) metanolu. W tym celu do probówki typu Safe-Lock domierzyć 145 μl metanolu zawierającego butylowany hydroxytoluen (1 mM) (2.4.2.) i 5 μl roztworu wzorców wewnętrznych o stężeniu 10 μg/ml (2.4.3.). Ostrożnie dodać 50 μl analizowanej próbki. Wymieszać z użyciem wirówki typu vortex przez 1 min. Następnie próbki trzymać na lodzie przez 10 min. Po tym czasie odwirować przez 10 min w temperaturze 4°C przy prędkości 21 000 xg. Supernatant przefiltrować przy użyciu nylonowych filtrów strzykawkowych (∅ 0,22 μm) do wkładów umieszczonych w naczynkach chromatograficznych i poddać analizie LC-MS/MS.
7. Warunki analizy
7.1. Warunki chromatografii
7.1.1. Kolumna: Zorbax Eclipse 08 RRHD (2.1 x 50 mm, uziarnienie 1,8 μm)
Prekolumna: Zorbax Eclipse C18 (2.1 x 5 mm, 1,8 μm)
Kolumna termostatowana była w 40°C
Przepływ fazy ruchomej: 0,5 ml/min
Dozowane było 2 μL próbki
7.1.2. Fazy ruchome:
A: woda + 0,1% kwas mrówkowy (2.5.1.)
B: acetonitryl/izopropanol (60/40 v/v) + 0,1% kwas mrówkowy (2.5.2.)
7.1.3. Gradient:

Tabela 2

czas [min]	% A	% B
0,0	95	5
1,0	40	60
5,0	35	65
8,0	15	85
12,0	0	100
13,0	0	100

Po każdym dozowaniu ustawiono 2 min stabilizacji układu w warunkach początkowych analizy.
7.2. Parametry spektrometru mas
7.2.1. Źródło jonów: ESI AJS
Tryb skanowania: dMRM
Rozdzielczość kwadrupolu Q1 i Q3: unit
Ładunek jonów: dodatni
Delta EMV (dodatni): +100 (0,0–7.0 min)
+400 (7.0–13.0 min)
7.2.2. Parametry pracy źródła:
Temperatura gazu (°C): 200
Szybkość przepływu gazu (l/min): 11
Ciśnienie nebulizera (psi): 40
Temperatura gazu osłonowego (°C): 250
Szybkość przepływu gazu osłonowego (l/min): 8
Napięcie kapilary (V): 4000
Parametry iFunnel:
Wysokie ciśnienie RF (V): 160
Niskie ciśnienie RF (V): 100
Fragmentor: stały (380V)
7.2.3. Monitorowane reakcje fragmentacji (dMRM)

Tabela 3

Związek	Czas retencji [min]	Jon macierzysty	Produkt	Czas obserwacji przejścia	Energia kolizji [V]
I Segment czasowy (0,0 – 7,0 min)					
Lizofosfatydyloetanoloamina 18:0 d7	3,64	487,3	346,3	150	20
Lizofosfatydyloetanoloamina 18:0	5,04	482,2	341,0	150	20
		482,2	310,0	150	35
I Segment czasowy (7,0 – 13,0 min)					
Fosfatydyloetanoloamina 16:0/20:4	9,99	740,5	599,3	125	20
		740,5	313,4	125	35
Fosfatydyloetanoloamina 15:0/18:1 d7	10,27	711,4	429,3	125	20
		711,4	354,8	125	20
Fosfatydyloetanoloamina 18:0/22:6	10,39	792,4	651,4	125	20
		792,4	34,5	125	20

8. Układ analizowania próbek
   8.1. Próbka ślepa (5.2.)
   8.2. Próbka kalibracyjna poziom 1 (5.4.)
   8.3. Próbka kalibracyjna poziom 2 (5.4.)
   8.4. Próbka kalibracyjna poziom 3 (5.4.)
   8.5. Próbka kalibracyjna poziom 4 (5.4.)
   8.6. Próbka kalibracyjna poziom 5 (5.4.)
   8.7. Próbka kalibracyjna poziom 6 (5.4.)
   8.8. Próbka wzbogacona QC 4 (5.3.)
   Próbka analityczna (w serii po 10 próbek) (5.1.)

B) Przykładowe oznaczanie kwasu moczowego

1. Zasada oznaczania
   Wykrywanie kwasu moczowego z krwi pacjentów wykonuje się poprzez strącenie alkoholem z uzyskanego osocza krwi białek, przefiltrowaniu powstałej mieszaniny przez filtr zatrzymujący powstały osad i usuwający z przesączu lipidy. Roztwór uzyskany w ten sposób analizuje się z wykorzystaniem wysokosprawnego systemu ekstrakcji do fazy stałej sprzężonego ze spektrometrem mas typu potrójny kwadrupol.
2. Odczynniki i substancje wzorcowe do realizacji wynalazku
   2.1. Odczynniki
      2.1.1 Woda (I stopień czystości)
      2.1.2. Acetonitryl (LC-MS Ultra Chromosolv)
      2.1.3. Metanol (LC-MS Ultra Chromosolv)

2.1.4. Etanol (99,8% do HPLC)
2.1.5. Kwas mrówkowy (>98%)
2.1.6. Wodorotlenek sodu
2.2. Substancja wzorcowe
2.2.1. Kwas moczowy (proszek)
2.3. Wzorzec wewnętrzny
2.3.1. Kwas moczowy ^{15}N (proszek)
2.4. Roztwory inne
2.4.1. Mieszanina metanol:etanol (1/1 v/v)
Odmierzyć 30 ml metanolu (2.1.3.) i 30 ml etanolu (2.1.4.) do butelki szklanej o pojemności 100 ml. Całość dokładnie wymieszać.
2.4.2. Roztwór 16 mg/ml wodorotlenku sodu
Odważyć 128 mg wodorotlenku sodu (2.1.6.). Po czym naważkę rozpuścić w 8 ml wody (2.1,1.). Dokładnie wymieszać.
2.4.3. Roztwór wodorotlenku sodu 0,1 M
Sporządzić roztwór roboczy wodorotlenku sodu o stężeniu 0,1 M. W tym celu należy odmierzyć 6 ml roztworu o stężeniu 16 mg/ml (2.4.2.) i uzupełnić do 24 ml dodając 18 ml wody (2.1.1.). Całość dokładnie wymieszać.
2.4.4. Roztwór wzorca wewnętrznego o stężeniu 1 mg/ml
Sporządzić roztwór roboczy kwasu moczowego ^{15}N. W tym celu należy odważyć 1 mg kwasu moczowego 15N (2.3.1.) i rozpuścić w 1 ml 0,1 M roztworu wodorotlenku sodu (2.4.3.) Całość dokładnie wymieszać.
2.4.5. Roztwór wzorca wewnętrznego w mieszaninie metanol:etanol o stężeniu 9 μg/ml
Sporządzić roztwór kwasu moczowego ^{15}N w mieszaninie metanol:etanol (1:1 v/v). W tym celu należy odmierzyć 272.7 μl roztworu wzorca wewnętrznego o stężeniu 1 mg/ml (2.4.4.) i uzupełnić do 30 ml mieszaniną metanol:etanol (1/1 v/v) (2.4.1.). Całość dokładnie wymieszać.
2.4.6. Roztwór roboczy kwasu moczowego o stężeniu 100 μg/ml
Odważyć 1 mg kwasu moczowego (2.2.1.). Po czym naważkę rozpuścić w 10 ml roztworu 0,1 M wodorotlenku sodu (2.4.2.). Całość dokładnie wymieszać.
2.5. Fazy ruchome
2.5.1. Faza ruchoma P1A i P2A
W kolbie miarowej o pojemności 1 dm^3 przygotować roztwór składający się z 999 ml wody (2.1.1.) i 1 ml kwasu mrówkowego (2.1.5.). Dokładnie wymieszać.
2.5.2. Faza ruchoma P1B i P3A
W kolbie miarowej o pojemności 1 dm^3 przygotować roztwór składający się z 999 ml acetonitrylu (2.1.2.) i 1 ml kwasu mrówkowego (2.1.5.). Dokładnie wymieszać.

3. Aparatura i wyposażenie laboratoryjne niezbędne do realizacji wynalazku
3.1. Wysokowydajny system ekstrakcji do fazy stałej sprzężony ze spektrometrem mas typu potrójny kwadrupol
3.2. Kartridż typu A (C4).
3.3. System oczyszczania wody Milli-Q Integral 3
3.4. Pipety automatyczne oraz dedykowane do nich jednorazowe końcówki
3.5. Wirówka typu Vortex
3.6. Wirówka laboratoryjna z horyzontalnym rotorem odchyleniowym umożliwiająca odwirowanie probówek o pojemności 9 ml
3.7. Szkło laboratoryjne
3.8. Probówki typu Safe-Lock o pojemności 1,5 ml
3.9. Polipropylenowa płytka 96-dołkowa, pojemność dołka 500 μl
3.10. Wspomagany próżniowo system filtrujący (Captiva ND Lipids, Agilent Technology).

4. Przygotowanie próbek
4.1. Próbki analizowane

4.1.1. Krew żylną należy pobrać w warunkach sterylnych do jednej probówko-strzykawki o objętości 9 ml, zawierającej EDTA. Wymieszać krew poprzez odwracanie probówki 8–10 razy. Probówka krwi powinna być niezwłocznie przetransportowana w temperaturze pokojowej do laboratorium.

4.1.2. Probówkę z krwią należy odwirować w wirówce z horyzontalnym rotorem odchyleniowym przez 10 min przy 1900 xg w temperaturze 4°C.

4.1.3. Przenieść osocze krwi do probówek typu Safe-Lock o pojemności 1,5 ml. Przenosić po 0,5 ml osocza do poszczególnych probówek, pozostawiając około 0,3 ml osocza nad kożuszkiem leukocytalno-płytkowym. Należy ostrożnie pipetować osocze krwi, aby nie naruszyć kożuszka i nie przenieść frakcji leukocytalno-płytkowej.

4.1.4. Odpowiednio oznakowane probówki z osoczem należy zabezpieczyć i umieścić w zamrażarce niskotemperaturowej (-80°).

4.2. Próbki osocza od zdrowych dawców do sporządzenia krzywej kalibracyjnej i ślepej próby.
Próbki te należy zabezpieczyć w analogiczny sposób jak próbki analizowane.

5. Procedura

5.1. Próbka analityczna
Próbki (4.1.) rozmrozić trzymając na lodzie przez 60–120 min (do całkowitego rozmrożenia), wymieszać z użyciem wirówki typu vortex przez 10 sek.

5.2. Próbka ślepa
Próbki (4.2.) rozmrozić trzymając na lodzie przez 60–120 min (do całkowitego rozmrożenia), wymieszać z użyciem wirówki typu vortex przez 10 sek.

5.3. Próbka wzbogacona QC 5
Do dołka odmierzyć 165 μl zimnej (-20°C) mieszaniny metanol:etanol (1/1 v/v) zawierającej wzorzec wewnętrzny (2.4.5.), dodać 15 μl roztworu wzorca o stężeniu 100 μg/ml (2.4.6.) i 70 μl wody (2.1.1.). Ostrożnie dodać 50 μl mieszaniny osocza pochodzącego od zdrowych dawców (4.2.) i wymieszać trzykrotnie w końcówce pipety. Wytwarzając próżnię przefiltrować roztwór do płytki odbieralnikowej. Całość przenieść do polipropylenowej płytki 96-dołkowej (3.9.).

5.4. Próbka kalibracyjna – CAL
Do dołka odmierzyć 165 μl zimnej (-20°C) mieszaniny metanoketanol (1/1 v/v) zawierającej wzorzec wewnętrzny (2.4.5.), dodać odpowiednią ilość roztworu wzorca o stężeniu 100 μg/ml (2.4.6.) i wody (2.1.1.) (Tabela 4.). Ostrożnie dodać 50 μl mieszaniny osocza pochodzącego od zdrowych dawców (4.2.) i wymieszać trzykrotnie w końcówce pipety. Wytwarzając próżnię przefiltrować roztwór do płytki odbieralnikowej. Całość przenieść do polipropylenowej płytki 96- dołkowej (3.9.).

Tabela 4

Poziom kalibracyjny	Ilość dodanego roztworu wzorcowego (2,4,6,) [μl]	Ilość dodanej wody (2,1,1,) [μl]	Uzyskane stężenie końcowe [μg/ml]
1	1,5	83,5	0,5
2	3	82,0	1,0
3	4,5	80,5	1,5
4	6	79,0	2,0
5	15	70,0	5,0
6	30	55,0	10,0

6. Ekstrakcja
Próbki rozmrozić trzymając je na lodzie przez 60–120 min. Uzyskawszy całkowite rozmrożenie próbek wymieszać każdą z nich z użyciem wirówki typu vortex przez 10 sek. Następnie na płytkę filtracyjną (3.10.) nanieść 165 μl zimnej (-20°C) mieszaniny metanol:etanol (1/1 v/v) zawierającej 9 μg/ml wzorca wewnętrznego (2.4.5.) i po 80 μl wody (2.1.1.). Do poszczególnych dołków filtracyjnych ostrożnie przenieść 50 μl analizowanych próbek i wymieszać trzykrotnie w końcówce pipety. Wytwarzając próżnię ostrożnie przefiltrować mieszaniny do płytki odbieralnikowej. Z niej przenieść materiał na polipropylenową płytkę 96-dołkowej (3.9.) i poddać analizie Rapid Fire- MS/MS.
7. Warunki analizy
   7.1. Warunki analizy Rapid Fire
      7.1.1. Kartridż: A (C4)
      Czas trwania cykli Rapid Fire zawiera tabela 5.

Tabela 5

	czas [ms]
Pobieranie	600
Ładowanie/Przemywanie	2000
Dodatkowe przemywanie	0
Elucja	5000
Kondycjonowanie	12000

      7.1.2. Pompy:
         7.1.2.1 Pompa 1:
         Przepływ: 1,5 ml/min
         Skład: 80%P1A, 20% P1B
         7.1.2.2. Pompa 2:
         Przepływ: 1,25 ml/min
         Skład: 100% P2A
         7.1.2.3. Pompa 3:
         Przepływ: 1,25 ml/min
         Skład: 100% P3A
   7.2. Parametry spektrometru mas
      7.2.1. Źródło jonów: ESI AJS
      Tryb skanowania: MRM
      Rozdzielczość kwadrupolu Q1 i Q3: unit
      Ładunek jonów: ujemny
      Delta EMV (dodatni): -400
      7.2.2. Parametry pracy źródła:
      Temperatura gazu (°C): 300
      Szybkość przepływu gazu (l/min): 11
      Ciśnienie nebulizera (psi): 40
      Temperatura gazu osłonowego (°C): 250
      Szybkość przepływu gazu osłonowego (l/min): 8
      Napięcie kapilary (V): 4000
      Parametry iFunnel:
      Wysokie ciśnienie RF (V): 140
      Niskie ciśnienie RF (V): 90
      Fragmentor: stały (380V)
      7.2.3. Monitorowane reakcje fragmentacji (dMRM)

Tabela 6

Związek	Jon macierzysty	Produkt	Czas obserwacji przejścia	Energia kolizji [V]
Kwas moczowy	167,1	124,2	150	20
	167,1	96,0	125	20
kwasu moczowego ^{15}N	169,0	125,2	125	20
	169,0	97,2	125	20

8. Układ analizowania próbek
   8.1. Próbka ślepa (5.2.)
   8.2. Próbka kalibracyjna poziom 1 (5.4.)
   8.3. Próbka kalibracyjna poziom 2 (5.4.)
   8.4. Próbka kalibracyjna poziom 3 (5.4.)
   8.5. Próbka kalibracyjna poziom 4 (5.4.)
   8.6. Próbka kalibracyjna poziom 5 (5.4.)
   8.7. Próbka kalibracyjna poziom 6 (5.4.)
   8.8. Próbka wzbogacona QC 4 (5.3.)
   8.9. Próbka analityczna (w serii po 10 próbek) (5.1.)
9. Obliczanie wyników (wspólne dla części A i B)
   9.1. Kalibracja
   Stosując metodę dodatku wzorca wewnętrznego należy wyznaczyć liniową krzywą kalibracyjną. Dla poziomów kalibracyjnych 2–6 odchylenie standardowe stężenia wyznaczone na podstawie krzywej kalibracyjnej nie powinno przekraczać ±20% wartości przewidywanego stężenia metabolitu w próbce. Należy oszacować stosunek sygnału do szumu dla poziomu kalibracyjnego 1, który powinien być równy lub większy od 10 dla jonu wykorzystywanego do kwantyfikacji.
   9.2. Obliczanie ilości metabolitów
   Zawartość wybranych metabolitów w analizowanych próbkach należy obliczyć z równania krzywej kalibracyjnej. Odchylenie stężenia w próbce wzbogaconej – QC (5.3.) nie powinno przekroczyć ±20% wartości stężenia nominalnego w próbce. Jeżeli wspomniane odchylenie stężenia jest większe niż ±20% wartości stężenia nominalnego metabolitu w próbce, należy ponownie wykonać kalibrację.

Krótki opis figur

Fig. 1 przedstawia schemat poglądowy realizacji korzystnego sposobu według wynalazku.
Fig. 2 przedstawia przykładowy chromatogram uzyskany dla badanej próbki.
Fig. 3 przedstawia porównanie próbki uzyskanej od zdrowych pacjentów (czerwony (1)) z próbką wzbogacaną wzorcami (niebieski (2)).
Fig. 4 przedstawia wyniki pomiaru uzyskanego dla rozpuszczalników używanych do preparatyki próbek.
Fig. 5 przedstawia porównanie próbki uzyskanej od zdrowych pacjentów (zielony (1)) z próbką wzbogacaną wzorcem (czerwony (2)).
Fig. 6 przedstawia wyniki pomiaru uzyskanego dla faz ruchomych używanych do analizy próbek.
Fig. 7 przedstawia analizę krzywej ROC przeprowadzoną na danych eksperymentalnych dla panelu biomarkerów metabolicznych zawierającego wszystkie cztery metabolity.

Niniejszy wynalazek zostanie poniżej zilustrowany za pomocą przykładów wykonania i figur, które nie mają jednak w jakikolwiek sposób ograniczać zakresu ochrony wynalazku jak zdefiniowano w za-

strzeżeniach patentowych. O ile nie wskazano inaczej wszelkie metody i parametry są takie, jakie powszechnie stosuje się w dziedzinie, do której należy niniejszy wynalazek, a stosowane urządzenia oraz odczynniki stosowane są w sposób zalecany przez ich wytwórców.

Przykład – Oznaczenie ilościowe dwuskładnikowego, trzyskładnikowego i czteroskładnikowego panelu biomarkerów metabolicznych oraz ocena skuteczności leczenia chemioterapeutycznego raka płuca z zastosowaniem takich paneli.

Poniżej zaprezentowano przykład przeprowadzonych badań obejmujących analizę celowaną i jej wyniki prowadzące do uznania paneli metabolitów, na które składają się fosfatydyloetanoloamina 16:0/20:4 i fosfatydyloetanoloamina 18:0/22:6, a ewentualnie ponadto lizofosfatydyloetanoloamina 18:0 i ewentualnie dodatkowo kwas moczowy.

1. Gromadzenie materiału biologicznego

Próbki krwi pobierane były w Uniwersyteckim Szpitalu Klinicznym w Białymstoku. Grupę badaną stanowili pacjenci ze zdiagnozowanym niedrobnokomórkowym rakiem płuca, którzy zostali poddani leczeniu chemioterapią. Próbki krwi pobierano przed rozpoczęciem terapii oraz po przyjęciu dwóch cykli chemioterapii. Do badań pobierano 9 ml krwi obwodowej do probówki zawierającej EDTA. Następnie krew poddawano wirowaniu (10 min., 1900 xg, 4°C). Otrzymane osocze krwi przenoszono do odpowiednio oznaczonych krioprobówek. Próbki osocza pobranego od pacjentów były przechowywane w temperaturze -80°C do dnia analiz.

2. Charakterystyka grupy badanej

Eksperyment obejmował dwie grupy pacjentów. Pierwszą z nich (n=9) stanowiły osoby, u których konsylium lekarskie po podaniu dwóch cykli chemioterapii stwierdziło częściową odpowiedź na podane leczenie. Zaś drugą grupę (n=14) tworzyli pacjenci, u których stwierdzono jedynie stabilizację choroby po przyjętym leczeniu.

3. Walidacja metod analitycznych

Każda instrumentalna metoda analityczna umożliwiająca oznaczenia ilościowe wymaga zwalidowania, również w przedstawianym eksperymencie przeprowadzono tego typu testy. W tym celu przygotowano serię próbek kalibracyjnych w trzech powtórzeniach. Ze względu na duże znaczenie obecności matrycy (tzw. efekt matrycowy) w przypadku oznaczeń ilościowych bazujących na spektrometrii mas wykorzystującej źródło typu ESI do testów posłużono się zmieszanym (uśrednionym) osoczem pochodzącym od 40 zdrowych dawców. Materiał ten stanowił podstawę testów składających się na walidację metody. Walidacja została przeprowadzona zarówno dla metody umożliwiającej oznaczanie lipidów (wykorzystującej chromatografię cieczową), jak i dla metody określającej stężenie kwasu moczowego (bazującej na pomiarze technologią Rapid Fire).

W obu przypadkach osocze było rozmrożone na lodzie przez 60–120 min. Po rozmrożeniu zostało wymieszane przy użyciu wytrząsarki laboratoryjnej (10 sek).

3.1. Walidacja metody oznaczania lipidów

Do probówek typu Safe-Lock odmierzono porcje zimnego (-20°C) metanolu z 0,1 μM butylowanym hydroksytoluenem (jako środek przeciwutleniający), porcję wzorców wewnętrznych i serię substancji wzorcowych. Do każdej porcji dodano również rozmrożone (jak opisano powyżej) osocze. Serię próbek przygotowano w zakresie stężeń 10–750 ng/ml (dla fosfatydyloetanoloaminy 16:0/20:4 i lizofosfatydyloetanoloaminy 18:0) oraz 0,1–5 μg/ml dla fosfatydyloetanoloaminy 18:0/22:6). Stężenie wzorców wewnętrznych było stałe we wszystkich próbkach i wynosiło 250 ng/ml (zarówno dla fosfatydyloetanoloaminy 15:0/18:1 d7 i lizofosfatydyloetanoloaminy 18:1 d7). Serię przygotowano w trzech powtórzeniach. Przygotowano również ślepą próbę bez dodatku substancji wzorcowych. Wszystkie próbki po dodaniu osocza mieszano przez 1 min, a następnie trzymano na lodzie przez 10 min. Po tym czasie odwirowywano je przez 10 min w temperaturze 4°C przy prędkości wirowania 21 000 xg. Następnie supernatant przesączano przy użyciu nylonowych filtrów strzykawkowych (0,22 μm) bezpośrednio do wkładów do naczynek chromatograficznych. Przygotowano również próbkę, w której przed procedurą ekstrakcji nie dodawano wzorców (ani substancji oznaczanych ani wzorców wewnętrznych). Próbkę taką przygotowano według powyżej opisanej procedury i wszystkie substancje wzorcowe dodane zostały już na końcowym etapie do przefiltrowanego supernatantu. Całość dokładnie wymieszano i poddano analizie LC-MS/MS.

3.2. Walidacja metody oznaczania kwasu moczowego

W dołku na płytce filtracyjnej umieszczono porcję mieszaniny metanoketanol (1/1 v/v), dodano porcje: wzorca wewnętrznego, substancji wzorcowej i wody. Do każdej porcji dodano również rozmrożone osocze. Serię próbek przygotowano w zakresie stężeń 0,5–10 μg/ml. Serię przygotowano w trzech

powtórzeniach. Przygotowano również ślepą próbę bez dodatku substancji wzorcowych. Wszystkie próbki zostały przefiltrowane przez zestaw dedykowany do jednoczesnego strącania białek wraz z usuwaniem frakcji lipidowej z przesączu. Przygotowano również próbkę, w której przed procedurą ekstrakcji nie dodawano ani wzorca wewnętrznego ani wzorca substancji oznaczanej. Próbkę taką również przefiltrowano według powyższej procedury (z wyłączeniem dodatku wzorców). Po przefiltrowaniu dodano do niej oba wzorce (wzorzec badanej substancji i wzorzec wewnętrzny) w ściśle określonym stężeniu. Wszystkie próbki były analizowane przy pomocy systemu Rapid Fire sprzężonego ze spektrometrem mas typu potrójny kwadrupol.

4. Próbki analityczne

4.1. Analiza lipidów

Próbki zostały rozmrożone na lodzie przez 60–120 min (do uzyskania całkowitego rozmrożenia). Następnie każdą z próbek wymieszano przez 10 sek przy użyciu wytrząsarki typu vortex. Po czym przystąpiono do strącania białek i ekstrakcji. Do tego celu użyto zimnego (-20°C) metanolu z 0,1 μM butylowanym hydroksytoluenem (jako środek przeciwutleniający). Dodano również roztwór wzorca wewnętrznego. Strącanie białek i ekstrakcję prowadzono poprzez dodanie 3 porcji metanolu do 1 porcji osocza (próbki). Tak przygotowaną próbkę mieszano przy pomocy wytrząsarki (vortex) przez 1 min. Po tym czasie umieszczono ją na lodzie (10 min). Następnie odwirowano w temperaturze 4°C przy prędkości 21 000 xg przez 10 min. Supernatant przesączono przy użyciu nylonowych filtrów strzykawkowych do wkładów do naczynek chromatograficznych.

Krzywą kalibracyjną i próbkę wzbogacaną (QC) utworzono przez sporządzenie serii próbek o różnym stężeniu wzorców z uwzględnieniem matrycy. Zostały one przygotowane w identyczny sposób jak próbki z serii walidacyjnej.

4.2. Analiza kwasu moczowego

Próbki zostały rozmrożone na lodzie przez 60 min (do uzyskania całkowitego rozmrożenia). Następnie każdą z próbek wymieszano przez 10 sek przy użyciu wytrząsarki typu vortex. Płytkę filtracyjną przygotowano poprzez umieszczenie w każdym dołku porcji zimnej (-20°C) mieszaniny metanolu:etanolu z dodatkiem wzorca wewnętrznego, a także porcji wody. Do kolejnych tak przygotowanych dołków filtracyjnych dodawano 50 μl próbki (osiągano stosunek 5 porcji rozpuszczalnika do 1 porcji próbki). Używając pompy próżniowej próbki były filtrowane przez płytkę, po czym przenoszone z płytki odbieralnikowej na klasyczną płytkę 96-dołkową.

Krzywą kalibracyjną i próbkę wzbogaconą (QC) utworzono przez sporządzenie serii próbek o różnym stężeniu wzorców z uwzględnieniem matrycy. Zostały one przygotowane w identyczny sposób jak próbki z serii walidacyjnej.

5. Analiza próbek

5.1. Analiza lipidów przy pomocy chromatografu cieczowego sprzężonego ze spektrometrem mas

Próbki analizowano za pomocą chromatografii cieczowej (ang. *Liquid Chromatography – LC*) sprzężonej ze spektrometrem mas typu potrójny kwadrupol (6495 iFunnel Triple Quad Agilent Technologies) (QQQ). Użyte zostało źródło jonów ESI z opcją JetStream. Rozdzielanie chromatograficzne prowadzone było na termostatowanej (40°C) kolumnie Zorbax Eclipse C18 RRHD (2.1 x 50 mm, uziarnienie 1,8 μm) wyposażonej w prekolumnę (Zorbax Eclipse C18 2.1 x 5 mm, 1,8 μm). Fazy ruchome o przepływie 0,5 ml/min stanowiły woda z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego (faza A) i mieszanina acetonitryl/izopropanol (60/40) z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego (faza B). Ich wzajemny stosunek zmieniał się w czasie według następującego gradientu: 0,0 min 95% A, 1,0 min 40% A, 5,0 min 35% A, 8,0 min 15% A, 12,0 min do 13,0 min 0% A. Po tym pozostawiono 2 min na ustabilizowanie warunków początkowych układu przed kolejną analizą.

Spektrometr pracował w trybie dMRM rejestrując dodatni ładunek jonów.

Obserwowane przejścia wymienione zostały w tabeli 3.

Pomiędzy próbkami stosowano dozowanie rozpuszczalnika (metanol). Analizę próbek rozpoczęto od pomiaru próby odczynnikowej i próbki ślepej. Następnie analizowano serię próbek kalibracyjnych, którą powtarzano po każdych 20 próbkach. Pomiędzy analizą próbek kalibracyjnych, co 7 próbek analitycznych analizowane były próbki wzbogacane (QC).

5.2. Analiza kwasu moczowego przy pomocy systemu Rapid Fire sprzężonego ze spektrometrem mas

Próbki analizowano za pomocą wysokoprzepustowej ekstrakcji do fazy stałej (Rapid Fire 365) wraz ze spektrometrem mas typu potrójny kwadrupol (6495 iFunnel Triple Quad Agilent Technologies). Również wykorzystano źródło ESI wyposażone w JetStream. Do analiz użyto kartridża A (C4 Agilent

Technolgies). Jako faz ruchomych używano: na pompie nr 1 (o przepływie 1,5 ml/min) wody (90%) i acetonitrylu (10%) oba z dodatkiem 0,1 % kwasu mrówkowego, na pompie nr 2 (przepływ 1,25 ml/min) woda z 0,1% kwasem mrówkowym, na pompie nr 3 (przepływ 1,25 ml/min) acetonitryl z 0,1% kwasem mrówkowym.

Spektrometr pracował w trybie jonów ujemnych. Obserwowane przejścia wymienione zostały w tabeli 6.

Analizę rozpoczęto od pomiaru próby odczynnikowej i próbki ślepej. Następnie analizowano serię próbek kalibracyjnych, którą powtarzano co 27 próbek. Pomiędzy analizą próbek kalibracyjnych co 8 próbek analitycznych analizowane były próbki wzbogacane (QC).

6. Otrzymane wyniki

6.1. Walidacja metody oznaczania lipidów

W celu przeprowadzenia walidacji proponowanej metody analitycznej zmierzono sygnał badanych metabolitów w serii roztworów kalibracyjnych w trzech powtórzeniach. Na podstawie tak uzyskanych wyników wyznaczono metodą dodatku wzorca wewnętrznego liniową krzywą kalibracyjną. Odchylenie stężenia dla badanego metabolitu w próbce wyznaczone na podstawie równania krzywej kalibracyjnej nie przekraczało ±20% wartości stężenia nominalnego. Zmierzono również powtarzalność wyników na każdym z poziomów kalibracyjnych. Względne odchylenie standardowe (RSD) zawierało się w zakresach: 2,58–14,15% dla lizofosfatydyloetanoloaminy 18:0, 2,68–1,35% dla fosfatydyloetanoloaminy 18:0/22:6 i 10,34–17,94% dla fosfatydyloetanoloaminy 16:0/20:4. Na tej podstawie określono następujące limity oznaczalności: 50 ng/ml dla lizofosfatydyloetanoloaminy 18:0, 100 ng/ml dla fosfatydyloetanoloaminy 18:0/22:6 i 50 ng/ml dla fosfatydyloetanoloaminy 16:0/20:4.

Sprawdzono również jak efektywna jest proponowana metoda ekstrakcji panelu badanych metabolitów z osocza. Wykonano to porównując wynik uzyskany dla próbki wzbogaconej przed ekstrakcją z wynikiem pochodzącym z próbki wzbogaconej wzorcami już po procesie ekstrakcji. Odzyski wynosiły: 111% dla lizofosfatydyloetanoloaminy 18:0, 120% dla fosfatydyloetanoloaminy 18:0/22:6 i 165% dla fosfatydyloetanoloaminy 16:0/20:4.

Zbadano również selektywność metody. W tym celu wykonano pomiar dla faz ruchomych, rozpuszczalników użytych do strącania białek i samego osocza (pochodzącego od zdrowych dawców). Wyniki uzyskane w ten sposób porównano z sygnałem pochodzącym z próbki wzbogaconej wzorcem. Rezultaty oceny selektywności metody prezentowane są na Figurach 2–4. Na ich podstawie metodę uznano za selektywną względem wybranych metabolitów ekstrahowanych z osocza. Na Fig. 2 widać przykładowy chromatogram uzyskany dla badanej próbki, na Fig. 3 widoczne jest porównanie próbki uzyskanej od zdrowych pacjentów (czerwony (1)) z próbką wzbogacaną wzorcami (niebieski (2)). Różnice pomiędzy próbkami są wyraźnie widoczne. Na Fig. 4 przedstawiono wyniki pomiaru uzyskanego dla rozpuszczalników używanych do preparatyki próbek.

6.2. Walidacja metody oznaczania kwasu moczowego

Walidacja metody umożliwiającej pomiar kwasu moczowego została przeprowadzona w analogiczny sposób jak ten opisany w punkcie 6.1. Odchylenie stężenia dla badanego metabolitu w próbce wyznaczone na podstawie równania krzywej kalibracyjnej nie przekraczało ±20% wartości stężenia nominalnego. Także zmierzono powtarzalność wyników na każdym z poziomów kalibracyjnych. Względne odchylenie standardowe (RSD) zawierało się w zakresie: 1,99–6,06%. Na tej podstawie określono limit oznaczalności na poziomie 1,5 μg/ml.

Również w tym przypadku sprawdzono efektywność ekstrakcji kwasu moczowego z osocza. Wykonano to w ten sam sposób, który opisany jest w punkcie 6.1. Odzysk, dla kwasu moczowego wyniósł 151%. Ważnym parametrem, który należy wyszczególnić w kontekście analiz bazujących na technologii Rapid Fire jest wpływ matrycy. Pomimo braku rozdzielania chromatograficznego poprzedzającego jonizację wpływ matrycy w przypadku proponowanej analizy nie jest aż tak duży, jak można by się spodziewać i wynosi 72%.

W identyczny sposób, jak ten opisany powyżej, zbadano selektywność metody. Uzyskane wyniki pozwalają określić metodę jako selektywną (Figury 5–6). Na Fig. 5 przedstawiono porównanie próbki uzyskanej od zdrowych pacjentów (zielony (1)) z próbką wzbogacaną wzorcem (czerwony (2)). Różnice pomiędzy próbkami są wyraźnie widoczne. Na Fig. 6 przedstawiono wyniki pomiaru uzyskanego dla faz ruchomych używanych do analizy próbek.

7. Wyniki próbek analitycznych

Wyniki, niezależnie od użytej techniki pomiaru, chromatografia czy wysokowydajna ekstrakcja do fazy stałej, były analizowane w identyczny sposób. Użyto do tego oprogramowania Mass Hunter Quantitative Analysis (version B.07.01 for QQQ). Wyznaczono metodą dodatku wzorca wewnętrznego krzywą kalibracyjną. Na jej podstawie określano stężenia każdego z analitów. Następnie uzyskane wyniki zostały poddane analizie statystycznej. Metabolity, które istotnie zmieniają się u pacjentów po przyjęciu dwóch cykli chemioterapii (grupa pacjentów, u których stwierdzono częściową odpowiedź na leczenie) należy wskazać fosfatydyloetanoloaminę 18:0/22:6 (przyrost o 44% wartość *p* 0,009) i fosfatydyloetanoloaminę 16:0/20:4 (przyrost o 24,6%, wartość *p* 0,045). Co więcej, fosfatydyloetanoloamina 18:0/22:6 również przyrasta (o 25,3%) istotnie (wartość *p* 0,048) również u pacjentów, u których stwierdzono jedynie stabilizację choroby.

8. Analiza krzywych ROC

Aby ocenić przydatność diagnostyczną paneli metabolitów według wynalazku przeprowadzono analizę krzywych ROC (ang. Receiver Operating Characteristics) wykorzystując w tym celu oprogramowanie MedCalc. Zaobserwowano, że używając oprócz dwóch wskazanych metabolitów istotnie zmieniających się w efekcie leczenia, także kolejnych, czyli lizofosfatydyloetanoloaminy 18:0, ale także kwasu moczowego znacząco poprawiają się parametry czułości i selektywności takiego panelu (Fig. 7). W wyniku analizy dla panelu wszystkich czterech metabolitów uzyskano pole pod krzywą ROC, AUC = 0,762 (o wartości *p* 0,0189) przy czułości 66,67% i specyficzności 92,86%. Wyniki te wskazują na uzyskanie precyzyjnego narzędzia diagnostycznego, które pozwoli na ułatwienie oceny skuteczności leczenia chemioterapeutycznego u wszystkich pacjentów, tego potrzebujących, przy jednoczesnym obniżeniu kosztów takiego badania.

Przeprowadzone badania wykazały, że panel biomarkerów metabolicznych, zawierający fosfatydyloetanoloaminę 16:0/20:4 i fosfatydyloetanoloaminę 18:0/22:6: ulega istotnej zmianie po rozpoczęciu, leczenia chemioterapeutycznego raka płuca i wskazuje na uzyskanie odpowiedzi na leczenie chemioterapeutyczne (istotny wzrost poziomu tych biomarkerów metabolicznych).

Wskazany powyżej panel metaboliczny zawierający dwa biomarkery metaboliczne, tj. fosfatydyloetanoloaminę 16:0/20:4 i fosfatydyloetanoloaminę 18:0/22:6, okazał się szczególnie, istotny, gdyż to właśnie te dwa biomarkery zmieniają się istotnie (przyrost o 24,6% (wartość *p* = 0,045) i przyrost o 44% (wartość *p* = 0,009) odpowiednio) po przyjęciu dwóch cykli chemioterapii u pacjentów, którzy po takim leczeniu wykazali częściową odpowiedź na leczenie.

Co więcej, fosfatydyloetanoloamina 18:0/22:6 zmienia się również istotnie (przyrost o 25,3% (wartość *p* = 0,048)) u pacjentów, u których obserwuje-się jedynie stabilizację choroby. Panel metabolitów zawierający dwa biomarkery metaboliczne, tj. fosfatydyloetanoloaminę 16:0/20:4 i fosfatydyloetanoloaminę 18:0/22:6, pozwala na efektywną ocenę skuteczności leczenia chemioterapeutycznego w raku płuca. Panel zawierający fosfatydyloetanoloaminę 18:0/22:6 pozwala na stwierdzenie stabilizacji choroby.

Przeprowadzone badania wykazały ponadto, że panel biomarkerów metabolicznych zawierający fosfatydyloetanoloaminę 16:0/20:4 i fosfatydyloetanoloaminę 18:0/22:6 oraz lizofosfatydyloetanoloaminę 18:0 jak i kwas moczowy znacząco podnosi parametry uzyskanych krzywych ROC, a zatem dodatkowo zwiększa czułość i selektywność, a przez co precyzyjność, sposobu oceny skuteczności leczenia chemioterapeutycznego u badanych pacjentów z rakiem płuca w stosunku do opisanego powyżej dwuskładnikowego i trzyskładnikowego panelu biomarkerów metabolicznych.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób oceny skuteczności leczenia chemioterapeutycznego u osobnika z rakiem płuca, w którym
   a) w próbce od osobnika z rakiem płuca przed rozpoczęciem leczenia chemioterapeutycznego oznacza się ilościowo panel biomarkerów metabolicznych zawierający następujące metabolity: fosfatydyloetanoloaminę 16:0/20:4 i fosfatydyloetanoloaminę 18:0/22:6,
   b) w próbce od osobnika według a) po co najmniej dwóch cyklach leczenia chemioterapeutycznego oznacza się ilościowo panel biomarkerów metabolicznych zawierający następujące metabolity: fosfatydyloetanoloaminę16:0/20:4 i fosfatydyloetanoloaminę 18:0/22:6,

c) porównuje się wyniki uzyskane w etapie a) i w etapie b), i na podstawie uzyskanego wyniku porównania określa się status skuteczności leczenia chemioterapeutycznego u osobnika, przy czym wzrost stężenia fosfatydyloetanoloaminy 18:0/22:6 wskazuje na stabilizację leczonego raka płuca u osobnika, zaś wzrost stężenia fosfatydyloetanoloaminy 16:0/20:4 i fosfatydyloetanoloaminy 18:0/22:6 wskazuje na odpowiedź osobnika na leczenie chemioterapeutyczne.

2. Sposób oceny skuteczności leczenia według zastrz. 1, **znamienny tym**, że panel metabolitów zawiera ponadto następujący metabolit: lizofosfatydyloetanoloaminę 18:0.
3. Sposób według zastrz. 1 albo 2, **znamienny tym**, że oznaczenia ilościowe metabolitów z panelu metabolicznego przeprowadza się z zastosowaniem chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas typu potrójny kwadrupol.
4. Sposób oceny skuteczności leczenia według jednego z zastrz. 1 do 3, **znamienny tym**, że panel metabolitów zawiera ponadto następujący metabolit: kwas moczowy.
5. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że oznaczenia ilościowe metabolitu przeprowadza się z zastosowaniem wysokowydajnego systemu ekstrakcji do fazy stałej sprzężonego ze spektrometrią mas typu potrójny kwadrupol.
6. Sposób według jednego z zastrz. 1 do 5, **znamienny tym**, że próbkę od osobnika stanowi próbka krwi pełnej, korzystnie próbka osocza.
7. Sposób według jednego z zastrz. 1 do 6, **znamienny tym**, że osobnikiem jest człowiek.
8. Sposób według jednego z zastrz. 1 do 7, **znamienny tym**, że rak płuca stanowi niedrobnokomórkowy rak płuca.
9. Diagnostyczny panel biomarkerów metabolicznych składający się z następujących metabolitów: fosfatydyloetanoloaminy 16:0/20:4 i fosfatydyloetanoloaminy 18:0/22:6 oraz kwasu moczowego.
10. Diagnostyczny panel biomarkerów metabolicznych składający się z następujących metabolitów: fosfatydyloetanoloaminy 16:0/20:4, fosfatydyloetanoloaminy 18:0/22:6, kwasu moczowego oraz lizofosfatydyloetanoloaminy 18:0.
11. Zastosowanie diagnostycznego panelu biomarkerów metabolicznych zawierającego następujące metabolity: fosfatydyloetanoloaminę 16:0/20:4, fosfatydyloetanoloaminę 18:0/22:6 i kwas moczowy do diagnostyki in vitro raka płuca.
12. Zastosowanie diagnostycznego panelu biomarkerów metabolicznych zawierającego następujące metabolity: fosfatydyloetanoloaminę 16:0/20:4 i fosfatydyloetanoloaminę 18:0/22:6 i kwas moczowy do monitorowania in vitro skuteczności leczenia chemioterapeutycznego raka płuca u osobnika.
13. Zastosowanie diagnostycznego panelu biomarkerów metabolicznych według zastrz. 11 albo 12, **znamienne tym**, że panel ten zawiera ponadto następujący metabolit: lizofosfatydyloetanoloaminę 18:0.
14. Zastosowanie diagnostycznego panelu biomarkerów metabolicznych według jednego z zastrz. 12 do 13, **znamienne tym**, że raka płuca stanowi niedrobnokomórkowy rak płuca.
15. Zastosowanie diagnostycznego panelu biomarkerów metabolicznych według jednego z zastrz. 12 do 14, **znamienne tym**, że osobnikiem jest człowiek.
16. Zestaw do monitorowania skuteczności leczenia chemioterapeutycznego u osobnika z rakiem płuca, **znamienny tym**, że zawiera środki do oznaczania ilościowego poziomu panelu biomarkerów metabolicznych składającego się z następujących metabolitów: fosfatydyloetanoloaminy 16:0/20:4, fosfatydyloetanoloaminy 18:0/22:6, metodą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas typu potrójny kwadrupol, oraz kwasu moczowego, z zastosowaniem wysokowydajnego systemu ekstrakcji do fazy stałej sprzężonego ze spektrometrią mas typu potrójny kwadrupol, oraz instrukcje do przeprowadzenia sposobu monitorowania skuteczności leczenia.
17. Zestaw do monitorowania skuteczności leczenia chemioterapeutycznego u osobnika z rakiem płuca według zastrz. 16, **znamienny tym**, że zawiera ponadto środki do oznaczania ilościowego poziomu następującego biomarkera metabolicznego: lizofosfalydyloetanoloaminy 18:0, metodą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas typu potrójny kwadrupol.

Rysunki

Fig. 1

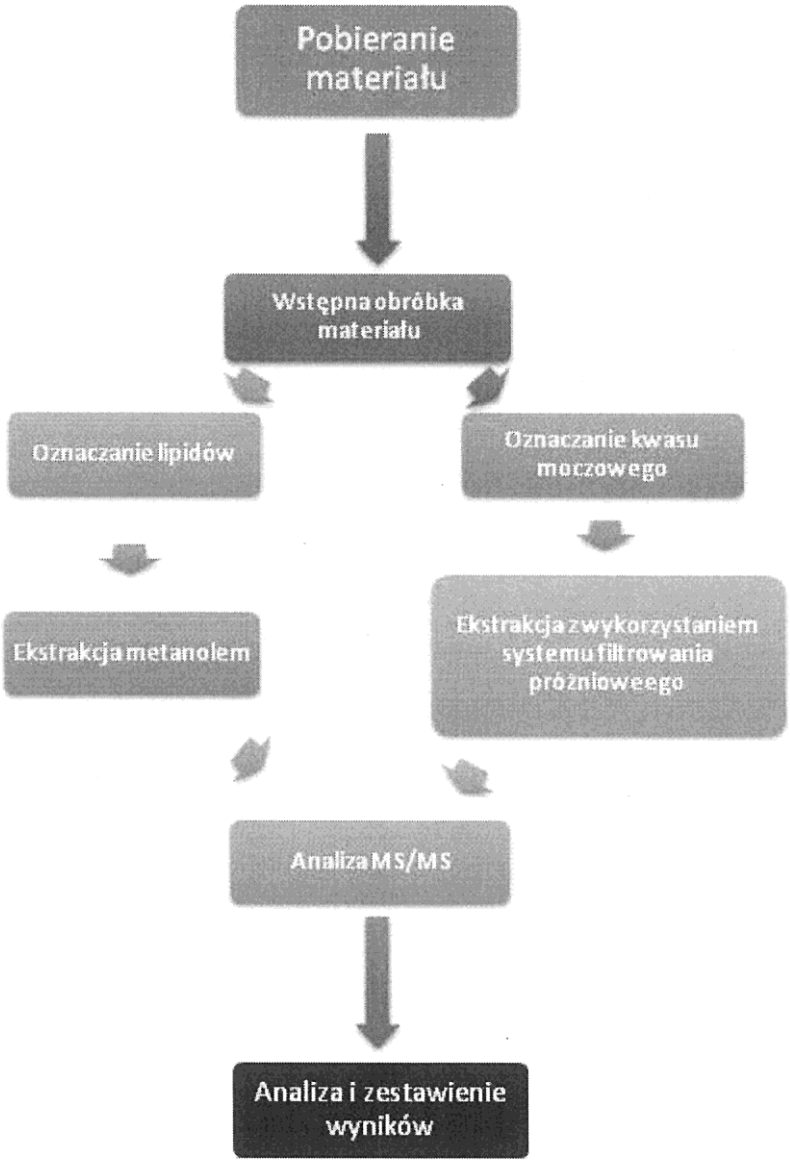


Fig. 2

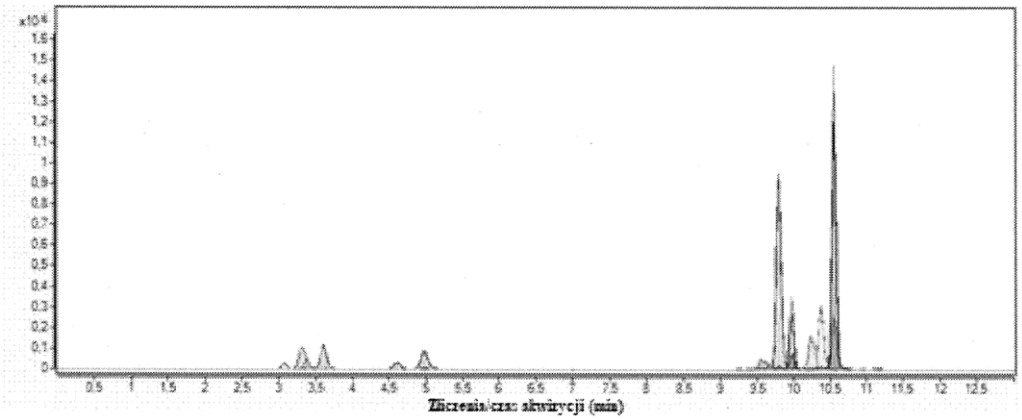


Fig. 3

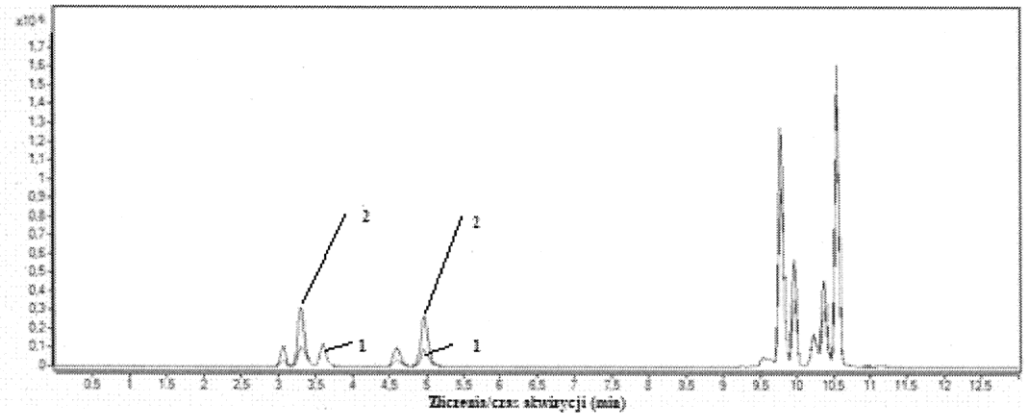


Fig. 4

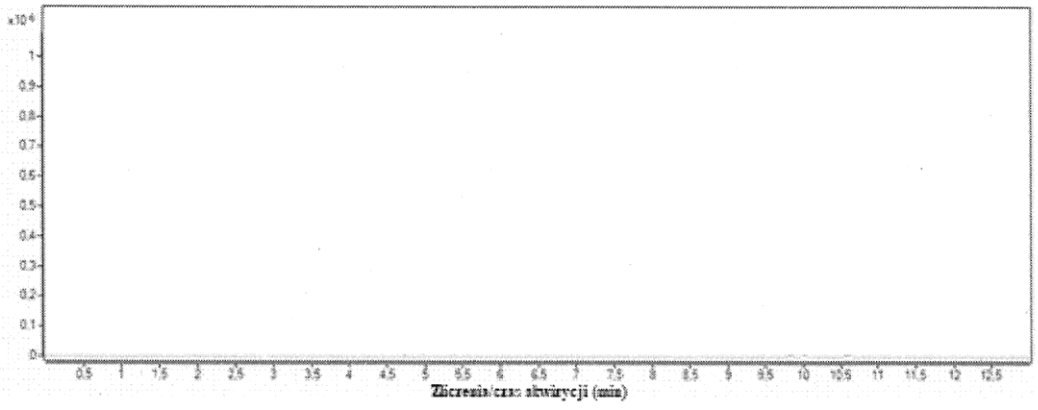


Fig. 5

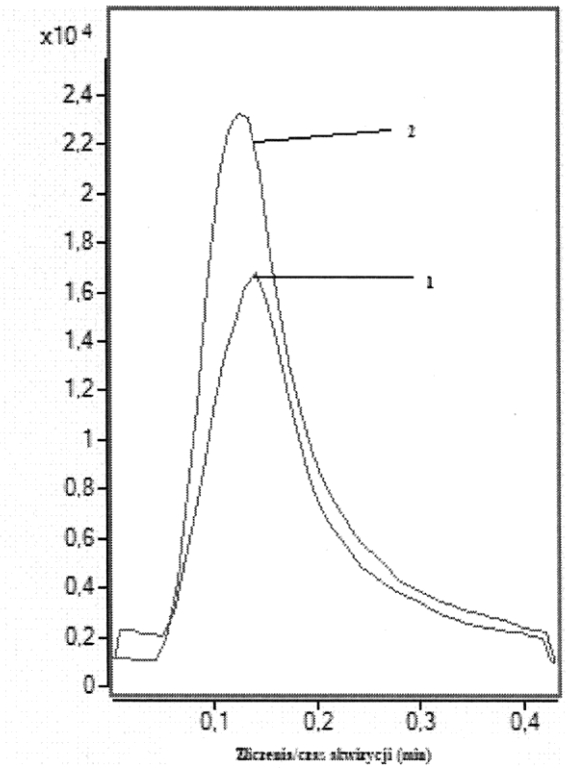

x10 4
2,4
2,2
2
1,8
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,1
0,2
0,3
0,4
2
1
Zliczenia/czas akwizycji (min)

Fig. 6

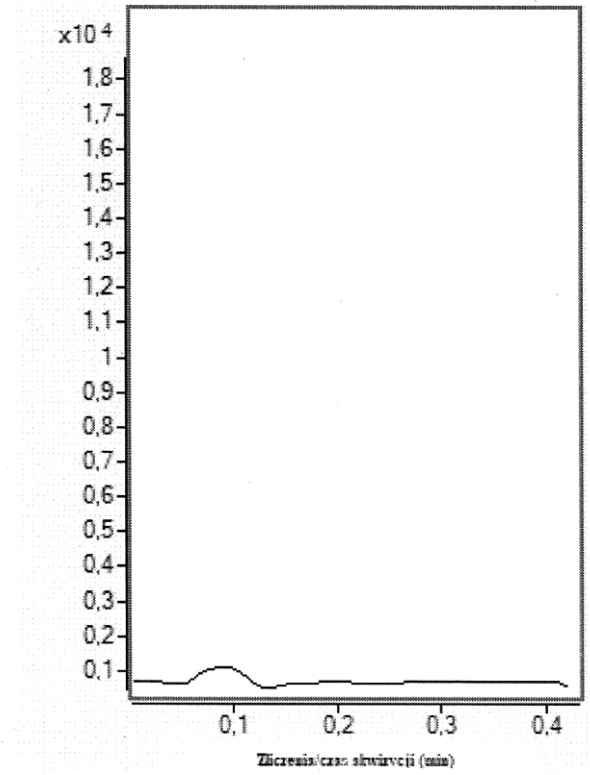
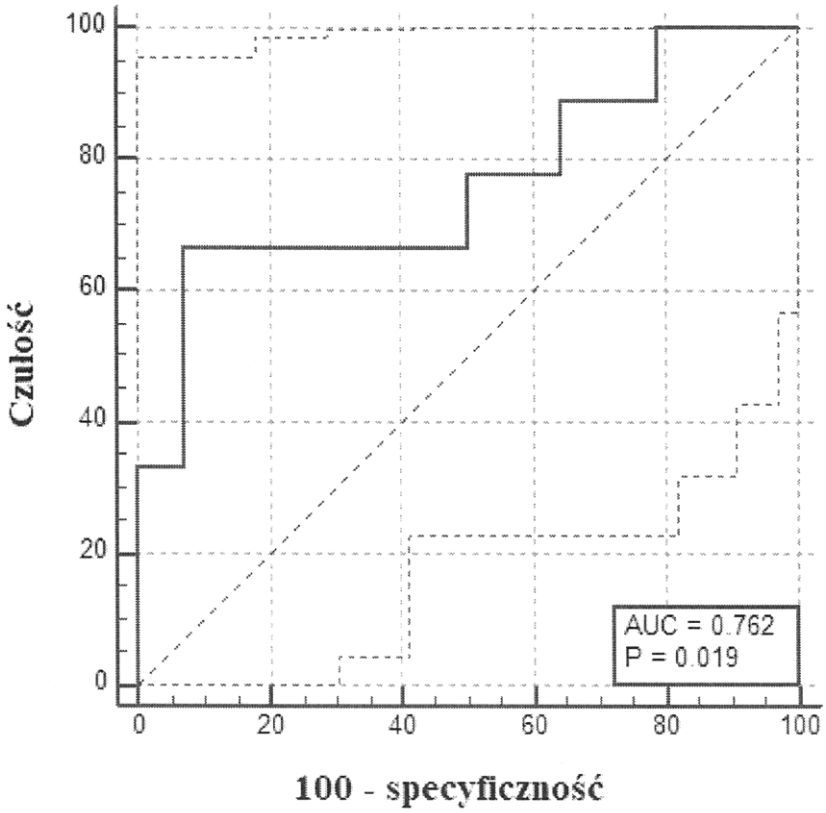

x10 4
1,8
1,7
1,6
1,5
1,4
1,3
1,2
1,1
1
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,1
0,2
0,3
0,4
Zliczenia/czas skwirvcji (min)

Fig. 7


Czułość
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
AUC = 0.762
P = 0.019
100 - specyficzność