

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

32 566

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/32 (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2018-35596**
(22) Přihlášeno: **10.11.2018**
(47) Zapsáno: **07.02.2019**

- (73) Majitel:
Masarykova univerzita, Brno, Brno-město, CZ
Masarykův onkologický ústav, Brno, Staré Brno,
CZ
- (72) Původce:
RNDr. Alena Mikušková, Šlapanice, CZ
doc. MUDr. Dalibor Valík, Ph.D., Brno, Černá
Pole, CZ
Kristína Greplová, Brno, CZ
Michal Řiháček, Brno, CZ
- (74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Na bělidle 64/3, 150 00 Praha 5,
Smíchov

- (54) Název užitého vzoru:
**Sada pro stanovení katalytické aktivity
terapeuticky podané asparaginázy**

CZ 32566 U1

Sada pro stanovení katalytické aktivity terapeuticky podané asparaginázy

Oblast techniky

5

Předkládaný vynález se týká sady pro stanovení katalytické aktivity terapeuticky podané asparaginázy ve vzorku odebraném z těla pacienta, zejména ve vzorku krve nebo krevní plasmy.

10 Dosavadní stav techniky

Enzym asparagináza (například léčivé přípravky Elspar[®], Kidrolase[®], Erwinase[®], Oncaspar[®]) je specifický lék pro ALL (akutní lymfoblastickou leukémií) a NHL (non-Hodgkinův lymfom) u dětí, užívaný v intenzivních fázích terapie. Asparagináza v krevní plazmě pacienta hydrolyzuje aminokyselinu asparagin na kyselinu asparagovou a amoniak. Asparagin je pro lymfoblasty esenciální aminokyselinou, protože lymfoblasty nemají dostatečnou aktivitu asparagin-syntetázy, po podání asparaginázy tedy dochází k depleci asparaginu v plazmě. V důsledku jeho snížené nabídky leukemickým buňkám se snižuje syntéza proteinů a nukleových kyselin, po zablokování

15
20

progrese buněčného cyklu nedochází k proliferaci buněk. Vzhledem k tomu, že asparagináza je pro tělo pacienta cizí látkou, tvoří se protilátky. V důsledku tvorby protilátek dochází k poklesu účinnosti asparaginázy snížením její aktivity a zkracuje se doba deplece asparaginu.

Metody a sady, které jsou v současné době k dispozici na trhu, dovolují pouze hmotnostní stanovení množství asparaginázy ve vzorku odebraném z těla pacienta, například metodami typu ELISA, ale žádná aktuálně dostupná metoda či sada nedovoluje stanovit přímo množství katalyticky aktivní asparaginázy, resp. rozlišit katalyticky aktivní a neaktivní asparaginázu.

25

Předkládané technické řešení si klade za cíl poskytnout analytickou sadu pro přímé stanovení katalytické aktivity terapeuticky podané asparaginázy ve vzorku odebraném z těla pacienta.

30

Podstata technického řešení

Předmětem technického řešení je sada pro stanovení aktivity terapeuticky podané asparaginázy ve vzorku odebraném z těla pacienta, která obsahuje asparagin, 2-oxoglutarát, nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADPH) a enzym glutamátdehydrogenázu (GLDH).

35

Stanovení katalytické aktivity asparaginázy ve vzorku, například v krevní plazmě, pacienta s použitím sady podle technického řešení spočívá ve sledování *in vitro* nárůstu koncentrace amoniaku jako produktu enzymatického rozkladu asparaginu katalyzované katalyticky aktivní asparaginázou.

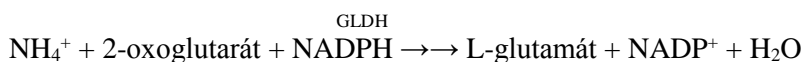
40

S výhodou je asparagin ve formě vodného roztoku o koncentraci 0,08 až 0,12 mol/l, výhodněji 0,1 mol/l.

45

2-oxoglutarát, NADPH a enzym glutamátdehydrogenáza slouží ke kvantitativnímu stanovení vzniklého amoniaku. Při stanovení amoniaku těmito činidly se využívá detekční enzymatická reakce s glutamátdehydrogenázou v kombinaci s Warburgovým optickým testem, například za pomoci automatického biochemického analyzátoru:

50



S výhodou sada dále obsahuje směsnou lidskou krevní plasmu s nulovou hodnotou aktivity asparaginázy, např. směsné K₃EDTA plazmy osob neléčených asparaginázou.

55

Dále může sada s výhodou obsahovat alespoň jednu zkumavku s antikoagulačním činidlem, která je vhodná pro použití při odběru vzorku krve od pacienta. S výhodou je antikoagulačním činidlem K_3EDTA .

5

Sada umožňuje kvantitativní stanovení katalytické aktivity terapeuticky podané asparaginázy, například u onkologicky nemocných dětí s diagnózou ALL. Umožňuje stanovit frakci účinného léčiva v organismu i v přítomnosti inhibitorů / protilátek, na rozdíl od ELISA metod, které stanovují pouze hmotnostní koncentraci asparaginázy. Stanovení lze provést i v režimu STATIM (= akutní režim); stanovená aktivita může pomoci lékaři optimalizovat podávané dávky léčiva pro konkrétního pacienta.

10

Objasnění výkresů

15

Obr. 1 znázorňuje příklad ověření lineární závislosti koncentrace amoniaku v reakční směsi na čase, podle příkladu provedení.

Příklad uskutečnění technického řešení

20

Byla připravena sada podle předkládaného technického řešení, obsahující:

25

- Asparagin o koncentraci 0,1 mol/l, připravený rozpuštěním 1,3212 g asparaginu ve 100 ml vody;

30

- Činidla pro kvantitativní stanovení amoniaku: 2-oxoglutarát, NADPH a enzym glutamátdehydrogenáza (byla použita činidla pro stanovení amoniaku, která jsou součástí soupravy NH3L Ammonia firmy Roche);

30

- Zkumavku s antikoagulačním činidlem K_3EDTA .

35

Stanovení aktivity asparaginázy v krevní plazmě pacienta bylo provedeno s využitím automatického biochemického analyzátoru Cobas Integra 400 Plus firmy Roche. Stanovení spočívá ve sledování *in vitro* nárůstu koncentrace amoniaku jako produktu enzymatické reakce substrátu asparaginu katalyzované asparaginázou. Analyzovaná reakční směs tedy obsahuje zředěnou plazmu pacienta s ALL (s asparaginázou aplikovanou v rámci léčby) a dodaný substrát asparagin ze sady podle předkládaného technického řešení. Reakce katalyzovaná asparaginázou pak probíhá přímo v nádobce na vzorky ve vzorkovém kompartmentu automatického analyzátoru a nárůst koncentrací amoniaku *in vitro* je sledován opakovanými analýzami na tomto analyzátoru s využitím činidel ze sady podle předkládaného technického řešení.

40

Primárním zpracovávaným materiálem je krev odebraná do zkumavky s antikoagulačním činidlem K_3EDTA a v krátkém čase doručená do laboratoře při teplotě tajícího ledu. Krevní plazma je získána centrifugací 10 minut při 2500 g za teploty 4 °C.

45

Krevní plazma pacienta s asparaginázou byla před analýzou naředěna v poměru 1 díl plazmy pacienta léčeného asparaginázou a 9 dílů irelevantní plazmy s nulovou hodnotou aktivity asparaginázy (tj. směsné K_3EDTA plazmy pacientů neléčených asparaginázou). Irelevantní plazma může být připravena přímo v analytické laboratoři nebo může být dodávána jako součást sady podle technického řešení. Ředění je prováděno za účelem zajištění linearit enzymatické reakce rozkladu asparaginu (tj. zajištění rovnoměrného nárůstu koncentrace amoniaku v reakční směsi) po dostatečně dlouhou dobu, a také z důvodů dosažení takových hodnot koncentrací amoniaku v reakční směsi, které odpovídají pracovnímu rozsahu metody stanovení amoniaku na automatickém analyzátoru a jsou tedy spolehlivě měřitelné (aktivita asparaginázy v neředěné

55

krevní plazmě dosahuje poměrně vysokých hodnot až kolem 20 $\mu\text{kat.l}^{-1}$, což odpovídá nárůstu koncentrace NH_3 až o 12000 μmol za 10 minut). Směsná plazma (místo pouhého ředícího pufru s vhodným pH) je k ředění použita z důvodu zachování matrice vzorku.

- 5 Reakční směs dále obsahuje přídavek asparaginu v co nejvyšší koncentraci pro zajištění linearity enzymatické reakce rozkladu asparaginu (tedy kinetiky reakce nultého řádu díky dostatečnému nadbytku substrátu). 900 μl zředěné plazmy pacienta je přidáno ke 100 μl roztoku asparaginu o koncentraci 0,1 mol/l. Objemový poměr je opět zvolen tak, aby nebyla výrazně ovlivněna matrice vzorku. Asparagin je ve vodě poměrně málo rozpustný, proto není možné použít
- 10 o mnoho vyšší koncentrace. Vzhledem k výsledné koncentraci asparaginu v reakční směsi (0,01 mol/l) tedy není dosaženo optimálního stavu nasycení substrátem, koncentrace však postačuje k tomu, aby bylo ve sledovaném časovém intervalu dosaženo linearity reakce i pro vzorky s vysokou hodnotou aktivity asparaginázy.
- 15 Výsledná reakční směs obsahuje 90 μl plazmy pacienta s ALL, 810 μl ředící plazmy a 100 μl vodného roztoku asparaginu o koncentraci 0,1 mol/l (finální ředící faktor je 11,11).

Přípravená reakční směs je ihned přenesena do vzorkové nádoby, umístěna do vzorkového kompartmentu biochemického automatického analyzátoru, na kterém je poté opakovaně měřena

20 *in vitro* koncentrace amoniaku – vždy 5 až 6 měření s odstupem 10 minut mezi startem jednotlivých analýz (analyzátor Cobas Integra 400 Plus a metoda NH_3L Ammonia firmy Roche). Desetiminutový interval je při vhodně zvolené sekvenci jednotlivých úkonů (start analýzy, umístění nosiče vzorku, využití softwarových možností analyzátoru) možné dodržet

25 i v nepřetržitém statimovém provozu laboratoře bez narušení běžného režimu práce na automatickém analyzátoru.

Automatický analyzátor využívá při stanovení koncentrace amoniaku detekční enzymatickou reakci s glutamátdehydrogenázou v kombinaci s Warburgovým optickým testem:



Koncentrace amoniaku je přímo úměrná koncentraci vznikajícího oxidovaného koenzymu NADP^+ , která je sledována poklesem absorbance při 340 nm. U detekční enzymové reakce je

35 zajištěna pracovní teplota 37 °C.

Pro vzorky, u nichž se předpokládá, že koncentrace amoniaku během opakovaných analýz přesáhne horní hranici měřícího rozsahu metody (v případě Roche NH_3L Ammonia hodnotu 700 $\mu\text{mol/l}$), je nutné na základě posouzení prvního naměřeného výsledku nastavit automatické

40 ředění vzorku 10x.

Linearita průběhu primární reakce rozkladu asparaginu za daných podmínek musí být vždy ověřena vnesením naměřených hodnot koncentrace amoniaku na čase analýzy do grafu, příklad výsledků měření je uveden na Obr. 1.

45

Z lineární závislosti je pomocí regresní rovnice zjištěna směrnice přímky, která za daných podmínek odpovídá rychlostní konstantě. Se znalostí rychlostní konstanty je poté možné vypočítat aktivitu enzymu podle vzorce:

50

$$\text{Aktivita} = \frac{k \cdot 10}{60 \cdot 0,9} \quad (\mu\text{kat/l})$$

kde **k** je rychlostní konstanta, která se násobí **10** (ředění plazmy) a dělí **60** (přepočet jednotek z UI na μkat) a **0,9** (objemová korekce na přídavek asparaginu do reakční směsi).

NÁROKY NA OCHRANU

5

1. Sada pro stanovení aktivity terapeuticky podané asparaginázy ve vzorku odebraném z těla pacienta, **vyznačená tím**, že obsahuje asparagin, 2-oxoglutarát, nikotinamidadeninukleotid-fosfát a enzym glutamátdehydrogenázu.

10

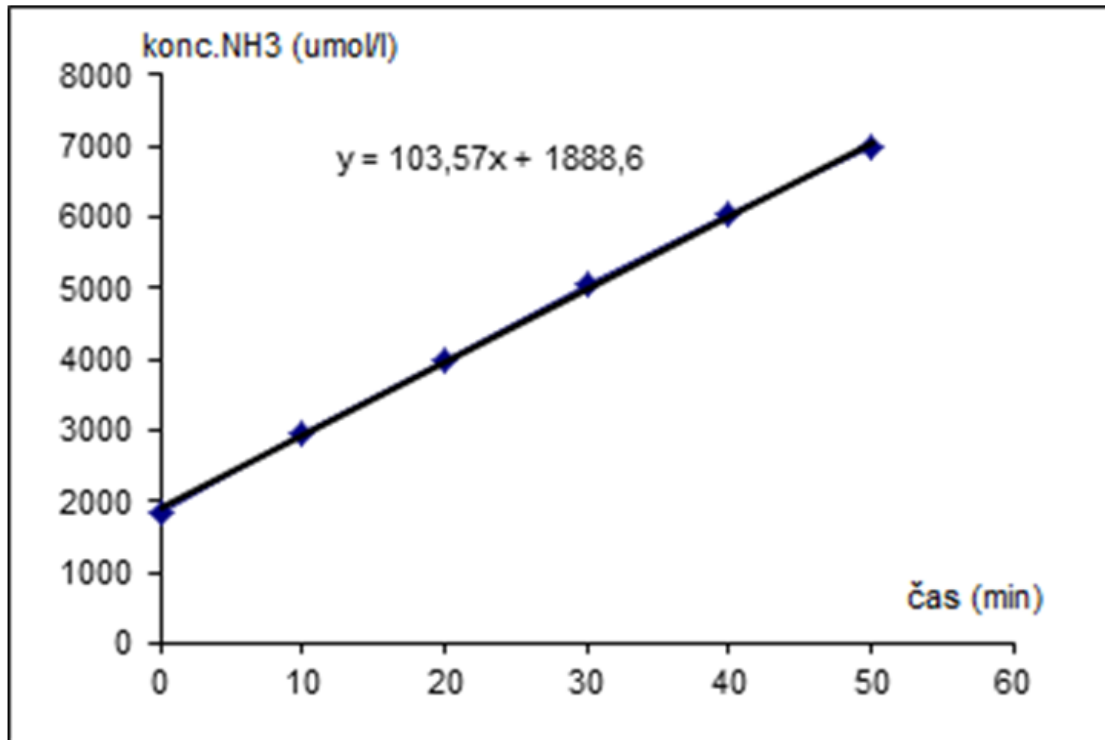
2. Sada podle nároku 1, **vyznačená tím**, že asparagin je ve formě vodného roztoku o koncentraci 0,08 až 0,12 mol/l, výhodněji 0,1 mol/l.

3. Sada podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačená tím**, že dále obsahuje směšnou lidskou krevní plasmu s nulovou hodnotou aktivity asparaginázy.

15

4. Sada podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačená tím**, že dále obsahuje alespoň jednu zkumavku s antikoagulačním činidlem, s výhodou je antikoagulačním činidlem K₃EDTA.

1 výkres



Obr. 1