



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012140371/15, 22.02.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.02.2011

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
23.02.2010 EP 10001817.5

(43) Дата публикации заявки: 27.03.2014 Бюл. № 9

(45) Опубликовано: 20.02.2016 Бюл. № 5

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 2007231922 A1, 04.10.2007. US 5889585 A, 30.03.1999. US 2005244986 A1, 03.11.2005.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 24.09.2012

(86) Заявка РСТ:
EP 2011/052613 (22.02.2011)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2011/104238 (01.09.2011)

Адрес для переписки:

105082, Москва, Спартаковский пер., д. 2, стр. 1,
секция 1, этаж 3, "ЕВРОМАРКПАТ"

(72) Автор(ы):

Флориан ЭКХАРДТ (DE)

(73) Патентообладатель(и):

Б.Р.А.Х.М.С ГМБХ (DE)

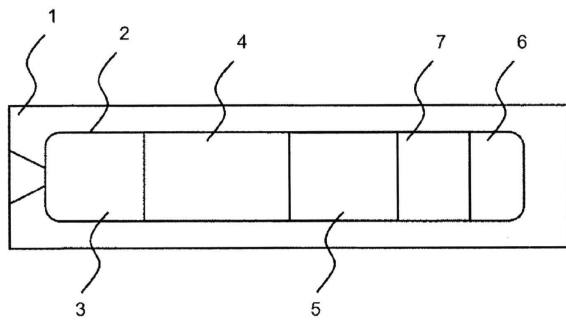
(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАРКЕРА В МАЛОМ ОБЪЕМЕ ОБРАЗЦА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ

(57) Реферат:

Изобретение касается способа определения правильности проведения теста в отношении образца биологической жидкости и/или составляющей биологической жидкости, внесенного для проведения теста в проточном тестовом элементе. Элемент имеет несколько функциональных зон (3, 4, 5, 6), по меньшей мере частично сообщающихся между собой и включающих в себя зону (3) внесения, предназначенную для внесения образца жидкости, и зону (5) тестирования, сообщающуюся с зоной (3) внесения и выполненную с возможностью определения маркера в образце. Проточный тестовый элемент имеет по меньшей мере одну

соединительную зону (4), расположенную между зоной (5) тестирования и зоной (3) внесения, сообщающуюся с этими зонами (3, 5) и задерживающую по меньшей мере 95% эритроцитов, и зону (6) контроля, расположенную ниже по потоку от зоны (5) тестирования, сообщающуюся с ней и содержащую контрольный реагент. Для одной или нескольких функциональных зон (3, 4, 5, 6) измеряют по меньшей мере один оптический параметр и сравнивают его измеренное значение с его заданным значением, поставленным в соответствие одной или нескольким функциональным зонам (3, 4, 5, 6). Таким

образом, оптически определяют содержание эритроцитов. 9 з.п. ф-лы, 2 ил.



ФИГ. 1

RU 2575559 C2

RU 2575559 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2012140371/15, 22.02.2011**(24) Effective date for property rights:
22.02.2011

Priority:

(30) Convention priority:
23.02.2010 EP 10001817.5(43) Application published: **27.03.2014 Bull. № 9**(45) Date of publication: **20.02.2016 Bull. № 5**(85) Commencement of national phase: **24.09.2012**(86) PCT application:
EP 2011/052613 (22.02.2011)(87) PCT publication:
WO 2011/104238 (01.09.2011)

Mail address:

**105082, Moskva, Spartakovskij per., d. 2, str. 1,
seksija 1, ehtazh 3, "EVROMARKPAT"**

(72) Inventor(s):

Florian EhKKhARDT (DE)

(73) Proprietor(s):

B.R.A.H.M.S GMBH (DE)(54) **METHOD FOR MARKER DETECTION IN SMALL AMOUNT OF BIOLOGICAL FLUID SAMPLE**

(57) Abstract:

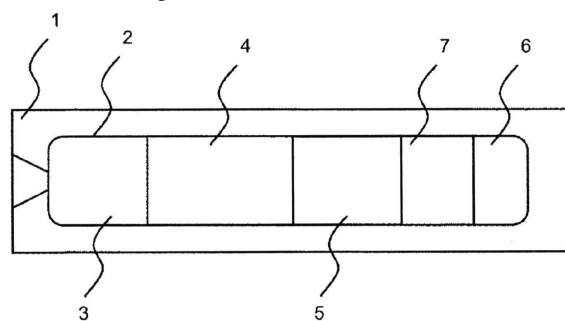
FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention concerns a method for detecting if a test with a biological fluid sample and/or a biological fluid component introduced into a flow test element has been conducted correctly. Th element has several functional areas (3, 4, 5, 6) connected to each other at least partially and comprising an area of introduction designed for fluid sample introduction, and a test area (5) connected to the area of introduction (3) and configured to detect a marker in the sample. The flow test element has at least one connective area (4) arranged between the test area (5) and the area of introduction (3), connected to the above areas (3, 5) and entrapping at least 95% of erythrocytes, and a control area (6) arranged downstream of the test area (5), connected thereto and comprising a control chemical agent. For one or more functional areas (3, 4,

5, 6), at least one optical parameter is measured and compared to its pre-set value associated with one or more functional areas (3, 4, 5, 6).

EFFECT: enabling optical determination of an erythrocyte count.

10 cl, 2 dwg



ФИГ. 1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способу определения маркера (метки) в малом объеме образца (пробы) биологической жидкости.

Уровень техники

5 Такие способы используются для экспресс-определения присутствия одного или большего числа маркеров в малом объеме образца биологической жидкости. Известные способы и устройства описаны, например, в документах WO 2004/033101 A1, WO 2007/000048 A1 и WO 2009/14360 A1.

10 В документе WO 2007/000048 A1 описано устройство для проведения исследований по месту лечения, содержащее три или более пористых мембран, используемых для детекции одного или нескольких маркеров из имеющего малый объем образца текучей среды, пригодное для идентификации маркеров из цельной крови. Описаны состоящие из мембран матрицы, содержащие мембрану первой ступени, задерживающую красные кровяные тельца и вмещающую детектирующий реагент, пористую мембрану второй 15 ступени с такой пористостью, которая обеспечивает еще более глубокую, по сравнению с указанной первой ступенью, задержку красных кровяных телец с минимальным гемолизом образца, и мембрану третьей ступени, пористость которой ниже, чем у указанной мембраны второй ступени. На третьей мембране помещен зонд захвата.

20 В документе US 2005/0244986 A1 раскрыто аналитическое тестовое устройство, применимое, например, при проведении тестов на беременность. В процессе эксплуатации образец жидкости вносят на нижний конец тестового устройства. На тестовом устройстве предусмотрены функциональные зоны. Кольцевая зона может действовать как контрольное средство, порождающее, например, цветовой сигнал вне зависимости от того, содержит или нет внесенный образец жидкости подлежащий 25 определению аналит, а определение аналита происходит в другой кольцевой зоне. Пользователь может определить, присутствует ли аналит во внесенном образце жидкости, сравнивая полученные в двух зонах сигналы.

30 В документе WO 2007/149043 A1 раскрыт анализатор для осуществления анализа на образце жидкости с использованием детектирующего конъюгата, способного к связыванию с антигеном и содержащего метку.

Документ US 2009/0253119 A1 относится к методике горизонтального проточного (с растеканием капли в сторону) анализа и системе для его осуществления, содержащей индикаторную тест-полоску для детекции и количественной оценки аналитов в образцах, таких как образцы, содержащие клетки и текучую среду.

35 В документе EP 1975619 A1 предложено хроматографическое тестовое устройство, содержащее первый элемент отделения клеток крови, второй элемент отделения клеток крови и хроматографическую подложку, расположенные именно в таком порядке от верхней по потоку стороны направления прохождения образца.

Раскрытие изобретения

40 Задача настоящего изобретения состоит в том, чтобы разработать усовершенствованный способ определения маркера в малом объеме образца биологической жидкости, в котором исключается неправильное использование проточного тестового элемента, используемого для определения маркера.

45 Указанная задача решается в способе определения маркера в малом объеме образца биологической жидкости, охарактеризованном в пункте 1 формулы изобретения. Кроме того, разработан способ определения правильности проведения теста для проточного тестового элемента, охарактеризованный в пункте 1 формулы изобретения. В зависимых пунктах формулы изобретения приведены предпочтительные варианты осуществления

изобретения.

В ходе оптического определения можно измерять один или более спектроскопических параметров, выбранных из следующей группы: поглощение, флуоресценция, отражение, переизлучение и пропускание.

5 Одна или более из функциональных зон на проточном тестовом элементе может подразделяться на две или более функциональных подзон. К примеру, на проточном тестовом элементе может быть расположено несколько подзон тестирования.

10 За счет определения правильности проведения теста, например, удастся избежать того, что в проточный тестовый элемент вносится образец жидкости, на который он не рассчитан. Проточный тестовый элемент может быть предназначен для биологической жидкости и/или составляющей биологической жидкости. Именуемое здесь термином "составляющее" вещество следует отличать от вещества, которое могло бы быть впоследствии добавлено к биологической жидкости. Добавленное вещество также можно назвать примесью или подмешанным веществом. В случае биологической жидкости такое вещество, например, могло бы быть добавлено к биологической жидкости после забора ее у пациента, например, могло бы быть добавлено антитело. В отличие от этого, в соответствии с данным здесь определением составляющая является частью самой биологической жидкости. Примерами таких составляющих образца цельной крови являются сыворотка крови и плазма крови.

20 К примеру, если в проточный тестовый элемент вносят образец жидкости, для которого этот проточный тестовый элемент не предназначен, то это приведет к ошибочным результатам. Предлагаемый в изобретении способ обеспечивает правильность определения маркера в образце жидкости. Это достигается благодаря стадии определения правильности проведения теста, которая дает пользователю 25 информацию о том, обеспечена ли правильность проведения теста, например, верная ли жидкость была внесена в проточный тестовый элемент.

Предпочтительно, чтобы определение маркера в образце жидкости осуществлялось путем считывания интересующей информации из зоны тестирования оптическим тестированием с использованием одной или более длин волн тестирования. В 30 предпочтительном варианте осуществления изобретения определение правильности проведения теста проводят путем оптического определения с использованием одной или более длин волн тестирования, отличных от использованной(-ых) для тестирования длины волны (длин волн). К примеру, может быть выбрана длина волны флуоресценции и/или длина волны поглощения, отличающаяся от применяемой(-ых) для тестирования 35 длины волны (длин волн).

Использованный здесь термин "сообщающиеся" означает, что текучая среда, такая, например, как образец, может проходить из одного отсека или части предлагаемого в изобретении устройства по существу беспрепятственно. Такой признак предпочтительно независим от реального наличия образца жидкости.

40 Определение правильности проведения теста, прежде всего на правильность использования образца, после первого определения может повторяться однократно или несколько раз в течение времени между внесением образца жидкости в проточный тестовый элемент и определением маркера. Тестирование на правильность проведения теста можно провести даже после определения маркера, предпочтительно в виде 45 дополнительного шага определения. Этот шаг можно осуществить с целью определения правильности проведения теста, прежде всего правильности использования образца, для одной или нескольких функциональных зон или в них.

Определение правильности проведения теста может быть осуществлено в одной из

функциональных зон после того, как часть внесенной жидкости достигает этой одной функциональной зоны. В этом случае сравнивают измеренное значение по меньшей мере одного оптического параметра для одной функциональной зоны с заданным значением одного или нескольких оптических параметров, поставленным в соответствие одной функциональной зоне.

В целом в контексте изобретения выражение "измеренный для одной функциональной зоны" означает, что параметр был измерен для того, чтобы охарактеризовать одну функциональную зону. Оптическое измерение может быть выполнено в области в пределах одной функциональной зоны и/или в области, расположенной снаружи одной функциональной зоны.

Одна зона тестирования или несколько подзон тестирования могут быть выполнены с возможностью определения одного или большего числа маркеров. Ниже приведены примеры маркеров, которые можно определять заявляемым способом.

Прокальцитонин (ПКТ, международное название PCT) успешно прижился в качестве биомаркера для диагностирования сепсиса: Прокальцитонин отражает тяжесть бактериальной инфекции и используется, в частности, для отслеживания развития инфекции в сепсис, тяжелый сепсис или септический шок. Прокальцитонин можно использовать для измерения активности системной воспалительной реакции, для контроля успеха терапии и для выдачи прогноза (Assicot M et al.: Lancet 1993, 341: 515-8; Clec'h C et al: Diagnostic and prognostic value of procalcitonin in patients with septic shock. Crit Care Med 2004; 32: 1166-9; Lee YJ et al, Yonsei Med J 2004, 45, 29-37; Meisner M Curr Opin Crit Care 2005, 11, 473-480; Wunder C et al. Inflamm Res 2004, 53, 158-163). Выявлена корреляция между увеличением уровней прокальцитонина у пациентов с диагнозом "сепсис" и смертностью (Oberhoffer M et al. Clin Chem Lab Med 1999; 37: 363-368).

Пептид адреномедуллин (ADM) впервые был описан в 1993 году (Kitamura et al. (1993), Biochem. Biophys. Res. Commun. 192: 553-560) и представлен при этом как новый гипотензивный пептид, содержащий 52 аминокислоты, выделенный из феохромоцитомы человека. В том же самом году также были описаны кодирование комплементарной ДНК (кДНК) для пептида-предшественника, содержащего 185 аминокислот, и полная аминокислотная последовательность этого пептида-предшественника (Kitamura et al. (1993), Biochem. Biophys. Res. Commun. 194: 720-725). Пептид-предшественник, содержащий, среди прочего, сигнальную последовательность из 21 аминокислоты на N-конце, называется "препроадреномедуллин" (pre-pro-ADM). Пептид адреномедуллин содержит аминокислоты 95-146 препроадреномедуллина, из которого он образуется протеолитическим расщеплением. Были подробно охарактеризованы некоторые пептидные фрагменты из числа образующихся в процессе расщепления препроадреномедуллина, в частности физиологически активные пептиды адреномедуллин (ADM) и PAMP (proadrenomedullin N-20 terminal peptide) - пептид, содержащий 20 аминокислот (22-41), следующие за 21 аминокислотой сигнального пептида в препроадреномедуллине. Другой фрагмент, функция которого неизвестна, обладающий высокой стабильностью *ex vivo*, представляет собой среднерегионарный проадреномедуллин (MR-proADM) (Struck et al. (2004), Peptides 25(8): 1369-72), для которого разработана надежная методика количественной оценки (Morgenthaler et al. (2005), Clin. Chem. 51(10): 1823-9). Адреномедуллин является эффективным сосудорасширяющим веществом. Гипотензивное действие связали, прежде всего с пептидными сегментами в C-концевой части адреномедуллина. С другой стороны, пептидные последовательности N-конца адреномедуллина проявляют гипертензивные эффекты (Kitamura et al. (2001), Peptides 22, 1713-1718).

Эндотелин (ЭТ)-1 является сильнодействующим синтезируемым эндотелием эндогенным сосудосуживающим агентом [Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto, Masaki T, *J Hypertens Suppl* 1988; 6:S 188-91]. ЭТ-1 оказывает свои сосудисто-регулирующие действия за счет активации располагающихся на клетках гладкой мускулатуры ЭТ(А)- и ЭТ(В)-рецепторов, что вызывает повышение внутриклеточного кальция [Yanagisawa et al, *J Hypertens Suppl* 1988; 6: S188-91]. Зрелый эндотелин-1 образуется из более крупного предшественника, названного проэндотелин-1. Проэндотелин-1 может быть переработан в процессе протеолиза в различные фрагменты, как это описано [Struck J, Morgenthaler NG, Bergmann Peptides. 2005 Dec; 26 (12): 2482-6]. Эти фрагменты подвергаются протеолитическому расщеплению в сосудистом русле, что может происходить быстро или медленно, в зависимости от типа фрагмента и типа и концентрации/активности присутствующих в циркулирующей крови протеаз. Одним примером этих фрагментов является С-концевой проэндотелин-1 (СТ-proET-1), который можно измерить путем иммунологического анализа типа "сэндвич" [Papassotiriou J, Morgenthaler NO, Struck J, Alonso C, Bergmann A. *Clin Chem*. 2006 Jun; 52 (6): 1144-51].

Мозговые натрийуретические пептиды (они же натрийуретические пептиды типа В, международное название BNP) являются служащими для количественной оценки маркерами сердечной недостаточности. Использование его и его аминоконцевого фрагмента - N-концевого мозгового натрийуретического пропептида (NT-proBNP) значительно увеличивает диагностическую точность в отделениях неотложной помощи (Januzzi, J.L., Jr., et al., *Am. J. Cardiol.*, 2005. 95(8): p.948-54; Maisel, A.S., et al., *N Engl. J. Med.*, 2002. 347(3): p.161-7) и тем самым улучшает оценку состояния и лечение пациента (Moe, G.W., et al., *Circulation*, 2007. 115(24): p.3103-10; 8.Mueller, C, et al., *N Engl J Med*, 2004. 350(7): p.647-54). Концентрация предсердного натрийуретического пептида (ПНП) в циркулирующей крови примерно 50-100-кратно превышает концентрацию мозгового натрийуретического пептида (Pandey, K.N., *Peptides*, 2005. 26(6): p.901-32). Следовательно, биологический сигнал, отраженный повышенным предсердным натрийуретическим пептидом, может иметь даже большую патофизиологическую и, следовательно, диагностическую важность, чем даваемый мозговым натрийуретическим пептидом сигнал. Несмотря на это немного известно о диагностической эффективности предсердного натрийуретического пептида и его предшественников (Cowie, M.R., et al., *Lancet*, 1997. 350(9088): p.1349-53). Зрелый предсердный натрийуретический пептид образуется из предшественника - N-концевого предсердного натрийуретического пептида (NT-proANP), который значительно более стабилен в контуре кровообращения, чем зрелый пептид, и, следовательно, есть мнение о том, что он был бы более надежным анализом (Vesely, D.L., *IUBMB Life*, 2002. 53(3): p.153 - Pandey, K.N., *Peptides*, 2005. 26(6): p.901-32).

Предсердный натрийуретический пептид (ПНП), член семейства натрийуретических пептидов, регулирует несколько физиологических параметров, в числе которых диурез и натрийурез, и вызывает снижение артериального кровяного давления. Он вырабатывается главным образом в предсердии и на его долю приходится 98% натрийуретических пептидов в системе кровообращения (Vesely DL.*Life* 2002; 53: 153-159). Предсердный натрийуретический пептид образуется из расщепления являющегося его предшественником прогормона, который значительно более стабилен в циркулирующей крови, чем зрелый пептид. Среднерегионарный фрагмент гормона-предшественника (аминокислоты с 53 по 90 NT-proANP), названный среднерегионарным предсердным натрийуретическим пропептидом (MR-proANP), может быть относительно

стойким к разложению экзопротеазами, а не как эпитопы в N-концах или C-концах предсердного натрийуретического пропептида, использовавшегося в более ранних иммунологических анализах (Morgenthaler NG et al. Clin Chem 2004; 50: 234-236; Gerszten RE et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2008).

5 Миоглобин представляет собой одноцепочечный глобулярный белок из 153 аминокислот, содержащий находящуюся в центре простетическую группу, в качестве которой выступает гем (железосодержащий порфирин), вокруг которой укладывается остальная (белковая) часть - апопротеин. Миоглобин является чувствительным маркером для диагностирования мышечного повреждения, что делает его
10 потенциальным маркером для выявления сердечного приступа у пациентов с болью в грудной клетке (M. Weber, M. Rau, K. Madlener, A. Elsaesser, D. Bankovic, V. Mitrovic and C. Hamm (2005) Clinical Biochemistry 38: 1027). Изофермент креатинкиназу MB (международное название СК-MB) и сердечный тропонин T (сTnT) используют в комбинации с ЭКГ в качестве клинических признаков для диагностирования острого
15 инфаркта миокарда. Сердечный тропонин представляет собой белковый комплекс, состоящий из трех субъединиц, а именно тропонин T (сTnT), тропонин I (сTnI) и тропонин C, из которых только тропонины T и I расположены в ткани сердечной мышцы и используются в качестве маркеров для диагностических целей (Rottbauer W et al., Eur Heart J 1996; 17: 3-8).

20 Аргинин-вазопрессин (АВП), он же вазопрессин, аргипрессин или антидиуретический гормон (АДГ), представляет собой гормон, найденный у большинства млекопитающих, в том числе у человека (Caldwell HK, Young WS III (2006). in Lajtha A, Lim R. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Neuroactive Proteins and Peptides (3rd edition ed.). Berlin: Springer, pp.573-607. ISBN 0-387-30348-0). Вазопрессин представляет собой
25 пептидный гормон. Он образуется из предшественника-препрогормона, который синтезируется в гипоталамусе и накапливается в везикулах в задней доле гипофиза. Уменьшенная секреция вазопрессина или пониженная почечная чувствительность к вазопрессину приводит к несахарному диабету - состоянию, характеризующемуся
30 следующими симптомами: гипернатриемией (повышенной концентрацией натрия в крови), полиурией (избыточным производством мочи) и полидипсией (патологически усиленной жаждой).

Используемые в данном документе термины, такие как "определение маркера (маркеров)" и подобные им, охватывают детекцию присутствия или отсутствия и/или
35 количественную оценку суммарного содержания и/или концентрации маркера (маркеров) в образце. Здесь присутствие или отсутствие следует понимать с принятием во внимание минимально поддающегося детекции присутствия маркера, т.е. предела детекции при анализе.

"Маркеры" - это вещества, указывающие на физиологические или патологические состояния. Они включают, например, связанные с сердечной деятельностью аналиты,
40 представляющие собой белки, секретируемые из клеток миокарда в контур кровообращения вследствие повреждения тканей сердца, гормоны, указывающие на беременность, глюкозу, используемую для отслеживания диабетического состояния, и различные белки или токсины, являющиеся результатом инфекций.

В некоторых вариантах осуществления изобретения маркер представляет собой
45 белок или пептид, который подлежит детекции и/или количественной оценке с использованием предлагаемых в изобретении матриц, устройств, способов и применений. Этот маркер включает фрагменты длиной по меньшей мере 12 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 15 аминокислот указанных белков или пептидов.

Конкретные примеры таких белков или пептидов в соответствии с настоящим изобретением представляют собой маркеры, связанные с диагнозом и/или прогнозом случаев сердечно-сосудистых заболеваний, такие как миоглобин, тропонины Т и I, изофермент креатинкиназа МВ (СК-МВ), белок, связывающий жирные кислоты, фактор роста/дифференцировки GDF-15 (от англ. "growth differentiation factor"), сердечный биомаркер ST2, прокальцитонин (ПКТ), С-реактивный белок (CRP), проадреномедуллин и его фрагменты, включая среднерегионарный проадреномедуллин (MR-proADM), адреномедуллин, PAMP, С-концевой проадреномедуллин (СТ-proADM), проэндотелин-1 и его фрагменты, включая С-концевой проэндотелин-1 (СТ-proET-1), большой эндотелин-1, эндотелин-1, N-концевой проэндотелин-1, предсердный натрийуретический пропептид и его фрагменты, включая среднерегионарный предсердный натрийуретический пропептид (MR-proANP), N-концевой предсердный натрийуретический пропептид (NT-proANP), предсердный натрийуретический пептид, провазопрессин и его фрагменты, включая С-концевой аргинин-вазопрессинозный пропептид (СТ-proAVP, "Копептин"), вазопрессин, нейрофизин II, мозговой натрийуретический пропептид (proBNP) и его фрагменты, включая мозговой натрийуретический пропептид и N-концевой мозговой натрийуретический пропептид (NT-proBNP).

Следует понимать, что описанные в настоящем документе выступающие в роли маркеров белки и/или пептиды охватывают фрагменты указанных служащих маркерами белков и/или пептидов длиной по меньшей мере 12 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 15 аминокислот.

Кроме того, с использованием настоящего изобретения или его различных вариантов осуществления изобретения также можно детектировать гормоны, связанные с беременностью или овуляцией, такие, соответственно, как хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) и лютеинизирующий гормон (ЛГ). В объем настоящего изобретения также попадает то, что с использованием настоящего изобретения также можно детектировать другие антигены для заболеваний, таких как рак, прежде всего антигены рака простаты (простатоспецифические антигены (ПСА)). В число дополнительных применений настоящего изобретения входит распознавание маркеров, связанных с вирусными инфекциями, такими как гепатит, бактериальная и грибковая инфекция, в том числе *Helicobacter pylori* для язв желудочно-кишечного тракта, другими инфекциями, вызванными *Bacillus anthracis*, *Pediculus humanis*, *Siphonaptera* и грамположительными бактериями, как *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus faecalis*. Все перечисленные являются не ограничивающими примерами. Настоящее изобретение также может быть полезно для детекции лекарственных препаратов, включая злоупотребление ими. Ферментные анализы, такие как проводимые для определения уровней глюкозы в крови, также следует считать входящими в объем настоящего изобретения. Несложно догадаться, что использование предлагаемых в изобретении устройств не ограничивается этими конкретными маркерами или же цельной кровью, а равным образом они применимы к другим аналитическим процедурам, таким как упомянутые выше.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения определение правильности проведения теста включает определение правильности использования образца, при котором оптически определяют то, является ли биологической жидкостью или ее составляющей внесенный образец жидкости, при этом проточный тестовый элемент выполнен с возможностью определения маркера в биологической жидкости и/или составляющей биологической жидкости.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения способ дополнительно включает внесение малого объема образца цельной крови и оптическое определение того, является ли этот образец цельной крови негемолизированной или гемолизированной кровью. В предпочтительном варианте осуществления изобретения оптическое определение включает измерение сигнала переизлучения для света, излученного в интересующую область на проточном тестовом элементе. Измеренный сигнал переизлучения можно сравнивать с опорным сигналом для определения того, какая кровь в наличии - гемолизированная или негемолизированная. Использованный здесь термин "образец цельной крови" служит для описания образца необработанной или по существу необработанной крови.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения измерение включает оптическое измерение в области, сообщающейся с зоной тестирования и зоной контроля и расположенной между ними. Поскольку в этом случае обследуемая область расположена ниже по потоку от зоны тестирования, оптическое измерение дает информацию о части образца жидкости, ранее побывавшей в зоне тестирования.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения подготавливают проточный тестовый элемент, имеющий соединительную зону, расположенную между зоной тестирования и зоной внесения и сообщающуюся с ними, и зону контроля, расположенную ниже по потоку от зоны тестирования и сообщающуюся с ней. Соединительная зона может быть обеспечена соединительной мембраной, сообщающейся с зоной внесения и зоной тестирования. Соединительная мембрана может иметь средний размер пор $8,0 \pm 2$ мкм и обеспечивает течение сыворотки или плазмы под действием капиллярных сил, при котором на расстояние 2 см она утекает менее чем 30 с и/или на расстояние 4 см менее чем 180 с, при этом характеристики капиллярного течения сыворотки или плазмы в соединительной мембране ниже, чем в первом пористом материале и выше, чем в зоне тестирования. К тому же зона тестирования и зона контроля могут быть реализованы одной или большим числом мембран. Предпочтительно, чтобы мембраны были выполнены из пористого материала.

Согласно еще одному варианту осуществления изобретения при определении правильности проведения теста выполняют оптическое измерение по меньшей мере в одной из функциональных зон, выбранной из следующей группы: зона внесения, соединительная зона, зона тестирования и зона контроля.

В еще одном варианте осуществления изобретения при определении правильности проведения теста выполняют оптическое измерение в области проточного тестового элемента, расположенной снаружи нескольких функциональных зон. Такое измерение можно проводить в качестве альтернативного подхода или в дополнение к измерению в пределах одной из нескольких функциональных зон. Например, оптическое измерение можно проводить для областей проточного тестового элемента, расположенных между двумя из функциональных зон. Оптическое измерение на предмет того, правильная ли жидкость находится в одной из функциональных зон, можно проводить для области, расположенной выше по потоку и/или ниже по потоку от интересующей функциональной зоны.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения предлагаемый в изобретении способ дополнительно включает внесение малого объема образца цельной крови и оптическое определение просачивания эритроцитов в интересующую область на проточном тестовом элементе. Если, например, стоит задача по определению маркера в образце цельной крови, обычно необходимо избежать того, чтобы эритроциты просачивались в саму зону тестирования. За счет вышеописанного варианта

осуществления изобретения можно проверить, имеет ли место или нет такое просачивание. Если определение правильности проведения теста указывает на то, что такое просачивание случилось, то это дает пользователю информацию о том, что полученные при таких обстоятельствах результаты измерений могут быть

5 недостоверными.

Согласно еще одному варианту осуществления изобретения при определении правильности проведения теста выполняют несколько оптических измерений в разные моменты времени. Несколько оптических измерений можно провести для одной и той же интересующей области или для различных интересующих областей на проточном

10 тестовом элементе.

В другом варианте осуществления изобретения определение маркера включает по меньшей мере одну из следующих операций: определение присутствия маркера в образце жидкости и определение концентрации маркера в образце жидкости.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения при

15 определении правильности использования образца оптически определяют то, является ли внесенный образец жидкости биологической жидкостью или составляющей биологической жидкости, выбранной из следующей группы: образец цельной крови, образец сыворотки крови, образец плазмы крови, образец мочи, образец спинномозговой жидкости, образец кала, образец слюны и образец лимфы.

20 В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения разработан способ определения правильности проведения теста, включающий:

- подготовку проточного тестового элемента с несколькими функциональными зонами, по меньшей мере частично сообщающимися между собой и включающими в себя зону внесения и зону тестирования, сообщающуюся с зоной внесения и

25 выполненную с возможностью определения маркера в биологической жидкости и/или составляющей биологической жидкости,

- внесение малого объема образца жидкости в зону внесения образца проточного тестового элемента,

- определение правильности проведения теста, для чего измеряют по меньшей мере

30 один оптический параметр для функциональной зоны и сравнивают измеренное значение по меньшей мере одного оптического параметра с заданным значением по меньшей мере одного оптического параметра, поставленным в соответствие одной или нескольким функциональным зонам.

Если при определении правильности проведения теста детектируется некорректное

35 проведение теста, то может быть предусмотрено, что аналитическая система прерывает дальнейший анализ. Например, аналитическая система может быть заблокирована в отношении дальнейшего использования проточного тестового элемента, в который внесен образец жидкости. В предпочтительном варианте осуществления изобретения пользователю аналитической системы представляется сигнал оповещения. Сигнал

40 оповещения может включать в себя акустический сигнал и/или видеосигнал.

Краткое описание чертежей

Ниже приведено более подробное описание изобретения на примере различных вариантов его осуществления, со ссылками на поясняющие чертежи, на которых

показано:

45 на фиг.1 - схематический вид сверху на проточный тестовый элемент, и

на фиг.2 - сигналы спектроскопического переизлучения (шкала в относительных единицах) в зависимости от положения (в относительных единицах) вдоль проточного тестового элемента, в который внесли образец цельной крови, в различные моменты

времени инкубации.

Осуществление изобретения

Приведенные ниже примеры описаны только для целей иллюстрации и не предназначены для ограничения объема изобретения. Изменения формы и замена эквивалентами не выходят за объем изобретения, а рассматриваются лишь как обстоятельства, которые могут считаться не более чем целесообразными предложениями или делающими изобретение более рациональным. Хотя в настоящем описании использованы конкретные термины, они предназначены для целей описания, а не носят ограничительный характер.

На фиг.1 схематически на виде сверху показан проточный тестовый элемент. Проточный тестовый элемент, который также можно назвать устройством для проведения исследований по месту лечения, содержит корпус 1, в котором размещен служащий держателем мембран коробок 2, на котором имеется несколько функциональных зон. Функциональные зоны сообщаются и среди находятся следующие зоны: зона 3 внесения, мостиковая, или соединительная, зона 4, зона 5 тестирования и зона 6 контроля.

Согласно своему определению "исследования по месту лечения" - это любой диагностический тест, выполняемый на месте лечения пациента или вблизи этого места (Kost, Goals, guidelines and principles for point-of-care testing. In: Kost GJ, ed. Principles and practice of point-of-care testing. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 2002, Chapter 1, стр.3-12). За счет переброски проведения анализа ближе к пациенту устраняются некоторые технологические операции, что способствует сокращению времени ожидания до получения результата и более быстрому принятию ответных мер с улучшенным конечным исходом. К преимуществам исследований по месту лечения относятся: меньшие временные затраты на двусторонний обмен результатами и мнениями между членами медицинской команды, более скорое принятие решений медицинского характера, исключение долгой транспортировки образца и необходимость только малых объемов исследуемой пробы (Heinschink et al., Point-of-care testing. Laboratoriums Medizin 2002. 26 (1-2): 61-67).

Зона 3 внесения предназначена для приема малого объема биологической жидкости, которая затем по меньшей мере частично движется в служащем держателем мембран коробке 2 в зону 5 тестирования и зону 6 контроля. Применяемый здесь термин "зона внесения образца" использован для описания части устройства, в которую вносят образец, что может достигаться, например, путем погружения зоны внесения образца в образец или путем внесения образца с помощью средств переноса образца, таких как шприц или пипетка. Таким образом, зона внесения образца представляет собой отверстие в устройстве, которое может быть реализовано, например, в виде кармана или углубления, через которое образец может быть внесен на первый пористый материал.

Течение происходит вдоль канала течения образца, образованного между зоной 3 внесения и зоной 6 контроля. Служащий держателем мембран коробок 2 может быть снабжен одним или более мембранных элементов, которые в одном варианте осуществления изобретения выполнены в пакете мембран. Обеспеченные пористым материалом мембран проточные каналы имеют размеры, делающие возможным капиллярное течение.

В одном варианте осуществления изобретения зона 5 тестирования выполнена с возможностью определения присутствия маркера в образце цельной крови. Эксплуатация проточного тестового элемента может происходить следующим образом.

Как легко понять, при контакте с первым пористым материалом, предусмотренным

внутри зоны 3 внесения и/или по соседству с ней, красные кровяные тельца внесенного образца начинают отделяться от плазмы и в ходе своего течения маркер встретится с детектирующим реагентом, обычно, но не исключительно, меченым антителом, направленным к эпитопу маркера для образования комплекса "маркер - детектирующий реагент". В описанном варианте осуществления изобретения комплекс "маркер - детектирующий реагент" затем перемещается в соединительную зону 4, обеспеченную соединительной мембраной, где предотвращается или замедляется дальнейшая миграция красных кровяных телец. После этого комплекс "маркер - детектирующий реагент" перемещается к зоне 5 тестирования, обеспеченной тестировочной мембраной, и встречается с иммобилизованным зондом захвата, обычно, но не исключительно, антителом, направленным к отдельному эпитопу маркера или к эпитопу детектирующего реагента. В результате реакции комплекса "маркер - детектирующий реагент" с иммобилизованными зондами захвата формируется пятючок захвата с высокой концентрацией, видимый невооруженным глазом или с помощью подходящего оборудования. Находящаяся ниже по потоку от располагающегося в зоне 5 тестирования пятючка захвата необязательная зона 6 контроля вмещает контрольный реагент. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения контрольный реагент может представлять собой полученный от иммунизированного животного антииммуноглобулин G. В альтернативном варианте вместо зоны 6 контроля изменения длины прозрачной покрывающей ленты, располагающейся поверх мембран тестового устройства, могут привести к управляемому или контролируемому испарению образца по достижении им конца тестировочной мембраны, что сопровождается формированием легко регистрируемого сигнала.

В объем настоящего изобретения попадает детекция маркера или даже нескольких маркеров в образце исследуемой среды в одно время. Соответственно, специалистам понятно, что на предлагаемом в изобретении устройстве для проведения исследований по месту лечения могут быть заложены один или более детектирующих реагентов и/или один или более зондов захвата.

В принципе, анализ, т.е. комбинация детектирующего реагента и зонда захвата, используемый для детекции маркера, может быть основан на любом типе, применяемом в области диагностики. Анализы могут быть неконкурентными, т.е. "сэндвич"-анализами, или конкурентными (The Immunoassay Handbook, Ed. David Wild, Elsevier LTD, Oxford; 3rd ed. (May 2005), ISBN-13: 978-0080445267; Hultschig C et al., Curr Opin Chem Biol. 2006 Feb; 10(1): 4-10. PMID: 16376134).

В контексте использования здесь зонд захвата может быть выбран из группы, в состав которой входят молекула нуклеиновой кислоты, молекула углевода, молекула пептидо-нуклеиновой кислоты (ПНК, международное название PNA, сокр. от англ. "peptide nucleic acid"), аптамер, белок, антитело, пептид или гликопротеин, предпочтительно антитело.

В тестовом устройстве можно использовать любые из широкого разнообразия методов мечения зондов захвата и соответствующих систем детекции, доступных специалистам. Известные метки включают, но не исключительно: металлические метки, флуоресцентные метки, метки с помощью электрохемилюминесценции и ферментные метки. Особенно предпочтительны металлические метки благодаря их замечательной чувствительности. Среди металлов в принципе наиболее предпочтительным является золото, так как его широко задействуют для этого типа реакции и его характеристики хорошо понятны.

В некоторых вариантах осуществления изобретения первый пористый материал

содержит конъюгаты "антитело-частица золота", связывающиеся с подлежащим определению маркером в образце цельной крови. Тем самым понятно, что конъюгаты "антитело-частица золота" расположены как таковые в первом пористом материале и конъюгаты "антитело-частица золота" при контакте с образцом образуют суспензию в образце и транспортируются вместе с ним. Таким образом, очевидно, что конъюгаты "антитело-частица золота" могут быть необратимо иммобилизованы в первом пористом материале. Тем не менее в некоторых вариантах осуществления изобретения может быть реализована иммобилизация конъюгатов "антитело-частица золота" на первом пористом материале, которая обратима при контакте с образцом, например, таким, который имеет склонность к гидролизу.

Предпочтительный размер частиц для примененных здесь помеченных золотом антител составляет примерно от 20 до 65 нм, хотя допустимы существенные вариации в зависимости от хорошо понятных факторов, таких как применяемое для клинических исследований пороговое значение концентрации маркера и сродство реагентов. Кроме того, сигнал золотом может быть улучшен с целью того, чтобы он стал легко видимым за счет использования содержащей восстанавливаемое серебро соли, которая осаждается в виде видимого продукта. Типичной химически активной солью является лактат серебра, служащий в качестве источника ионов восстанавливаемого серебра, при этом в качестве восстановителя задействуется гидрохинон. Металлическое серебро образует легко различимый черный осадок вокруг каждой частицы золота. В качестве альтернативы, при использовании ферментной метки, такой как пероксидаза хрена, реакция может быть детектирована путем добавления перекиси водорода и красителя, такого как цис ортофенилендиамин, в соответствии со стандартными процедурами. Дополнительные метки, которые вполне успешно можно использовать в объеме настоящего изобретения - это парамагнитные метки, описанные в патенте США 6046585, содержание которого целиком включено в настоящий документ путем ссылки, которые дают возможность даже большей чувствительности для детекции маркера.

В контексте настоящего документа "детектирующий реагент" представляет собой материал, часто антитело к подлежащему детекции в образце жидкости маркеру. В некоторых вариантах осуществления изобретения он с возможностью отсоединения связан с подложкой первого пористого материала в точке внесения образца жидкости или ниже по потоку от нее. Для большинства иммунохимических анализов его метят детектируемой меткой, такой как коллоидное золото, и он образует комплекс с подлежащим определению маркером.

В контексте капиллярного течения сыворотки по соединительной мембране термин "горизонтальное изменение" употреблен для описания изменения расхода в направлении течения сыворотки.

Использованное в настоящем документе выражение "отделение сыворотки от клеток крови" означает, что задерживаются клетки крови, в частности эритроциты, в то время как сыворотка проходит в соседний отсек или часть устройства, например, к следующей мембране. В результате этого задерживается предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно - по меньшей мере 99,5%, а наиболее предпочтительно - около 100% эритроцитов.

Способ определения присутствия маркера в биологической жидкости, описанный со ссылками на приведенные выше неограничивающие варианты осуществления изобретения, включает определение правильности использования образца. Выполняют это определение путем спектроскопического измерения (спектроскопических измерений). При этом детектируют и анализируют один или более спектроскопических параметров,

выбранных из группы, включающей поглощение, флуоресценцию, пропускание, отражение и переизлучение (диффузное отражение света от материала с отсылкой обратно), для определения того, является ли часть образца жидкости, внесенная в зону 3 внесения и достигающая одной из функциональных зон на проточном тестовом элементе, одной из биологических жидкостей или составляющей биологической жидкости, в расчете на которые разработан проточный тестовый элемент.

Предпочтительно, чтобы для определения правильности использования образца оптически обследовалась область 6. К примеру, может быть оптически обследована область 7, расположенная между зоной 5 тестирования и зоной 6 контроля, что делается для определения того, к какому типу принадлежит образец жидкости, достигший зоны 5 тестирования и/или зоны 6 контроля. Например, для области 7 можно анализировать такой оптический параметр, как переизлучение света.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения описанный выше способ включает внесение малого объема образца цельной крови и оптическое определение просачивания эритроцитов в интересующую область на проточном тестовом элементе. Например, если в образце цельной крови должен быть определен маркер, обычно необходимо исключить просачивание эритроцитов в саму зону 5 тестирования. За счет вышеописанного варианта осуществления изобретения можно проверить, случилось или нет такое просачивание. Если определение правильности использования образца указывает на то, что имеет место такое просачивание, то это дает пользователю информацию о том, что полученные при таких обстоятельствах результаты измерений нельзя считать достоверными.

На фиг.2 показаны записи сигналов спектроскопического переизлучения (в относительных единицах) в зависимости от относительного положения (в относительных единицах) на проточном тестовом элементе 1, к которому доставили образец цельной крови, в различные моменты времени инкубации. Проточный тестовый элемент 1 (см. фиг.1) сосканирован слева направо с покрытием при этом по меньшей мере зоны 6 контроля, области 7 и зоны 5 тестирования. С левой стороны так называемая контрольная полоса, поставленная в соответствие сигналу переизлучения в зоне 6 контроля, не претерпевает изменений с течением времени. Увеличение сигнала переизлучения с правой стороны указывает на просачивание эритроцитов в зону 5 тестирования на проточном тестовом элементе 1.

Признаки, раскрытые и показанные по меньшей мере в одном из подробного описания, формулы изобретения и чертежей, взятые по отдельности или в различных их сочетаниях, могут быть существенными для осуществления изобретения в различных вариантах.

Формула изобретения

1. Способ определения правильности проведения теста в отношении образца биологической жидкости и/или составляющей биологической жидкости, внесенного для проведения теста в проточном тестовом элементе, имеющем несколько функциональных зон (3, 4, 5, 6), по меньшей мере частично сообщающихся между собой и включающих в себя зону (3) внесения, предназначенную для внесения образца жидкости, и зону (5) тестирования, сообщающуюся с зоной (3) внесения и выполненную с возможностью определения маркера в биологической жидкости и/или составляющей биологической жидкости, характеризующийся тем, что для одной или нескольких функциональных зон (3, 4, 5, 6) измеряют по меньшей мере один оптический параметр и сравнивают его измеренное значение с его заданным значением, поставленным в

соответствие одной или нескольким функциональным зонам (3, 4, 5, 6), таким образом, оптически определяя содержание эритроцитов, причем используют проточный тестовый элемент, имеющий по меньшей мере одну соединительную зону (4), расположенную между зоной (5) тестирования и зоной (3) внесения, сообщающуюся с этими зонами (3, 5) и задерживающую по меньшей мере 95% эритроцитов, и зону (6) контроля, расположенную ниже по потоку от зоны (5) тестирования, сообщающуюся с ней и содержащую контрольный реагент.

2. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что в качестве образца жидкости вносят малый объем образца цельной крови и оптически определяют то, является ли часть образца цельной крови, достигающая зоны (5) тестирования, негемолизированной или гемолизированной кровью.

3. Способ по п. 1 или 2, характеризующийся тем, что оптическое измерение проводят в области, сообщающейся с зоной (5) тестирования и зоной (6) контроля и расположенной между ними.

4. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что оптическое измерение выполняют по меньшей мере в одной из функциональных зон (3, 4, 5, 6), выбранной из следующей группы: зона (3) внесения, соединительная зона (4), зона (5) тестирования и зона (6) контроля.

5. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что при определении правильности проведения теста выполняют оптическое измерение в области проточного тестового элемента, расположенной снаружи нескольких функциональных зон (3, 4, 5, 6).

6. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что в качестве образца жидкости вносят малый объем образца цельной крови и оптически определяют просачивание эритроцитов в интересующую область на проточном тестовом элементе.

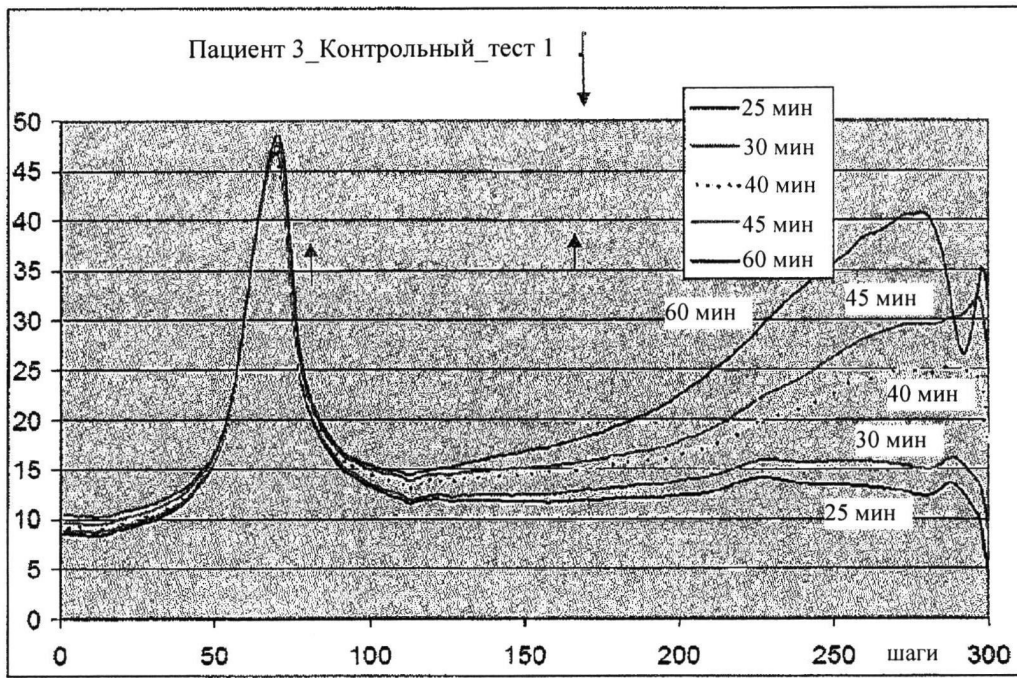
7. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что проводят несколько оптических измерений, выполняемых в разные моменты времени.

8. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что в зоне (5) тестирования определяют присутствие маркера и/или концентрацию маркера в образце жидкости.

9. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что часть внесенного образца жидкости, достигающую одной из функциональных зон (3, 4, 5, 6), проверяют на соответствие биологической жидкости и/или составляющей биологической жидкости, выбранной из следующей группы: образец цельной крови, образец сыворотки крови, образец плазмы крови, образец мочи, образец спинномозговой жидкости, образец кала, образец слюны и образец лимфы.

10. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что определение маркера в образце жидкости выполняют путем считывания интересующей информации из зоны (5) тестирования.

11. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что между зоной (5) тестирования и зоной (6) контроля дополнительно расположена область (7), используемая для определения диффузного отражения или других оптических свойств образца.



ФИГ. 2