

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201650035 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2017.05.31

(51) Int. Cl. G01N 33/86 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2015.05.21

(54) ПРОБИРНЫЙ АНАЛИЗ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИКОАГУЛЯНТОВ В КРОВИ ИЛИ В ПЛАЗМЕ КРОВИ

(31) 1450612-5

(32) 2014.05.22

(33) SE

(86) PCT/EP2015/061292

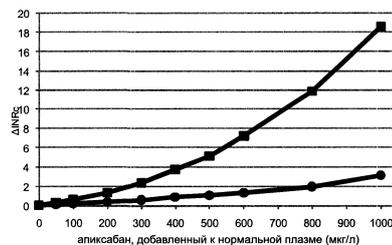
(87) WO 2015/177293 2015.11.26

(71) Заявитель:
ЗАФЕНА АБ (SE)

(72) Изобретатель:
Ронбю Матт (SE)

(74) Представитель:
Вашина Г.М. (RU)

(57) Предложен пробирный анализ для определения антикоагулянтов в образце крови или плазме крови. Предлагаемый пробирный анализ содержит стадии анализа, включающие по меньшей мере две процедуры мокрой химии для определения протромбинового времени. Предлагаемый пробирный анализ включает определение протромбинового времени в первой реакционной смеси с помощью первой процедуры и во второй реакционной смеси с помощью второй процедуры. Содержание крови или плазмы крови во второй реакционной смеси отличается от содержания крови или плазмы крови в первой реакционной смеси. Упомянутые процедуры определения протромбинового времени калибруют для обеспечения идентичных или близких к идентичным результатов определения протромбинового времени для эталонных образцов, не содержащих антикоагулянтов, представляющих интерес с точки зрения пробирного анализа. Кроме того, вычисляют значения разницы в значениях протромбинового времени, при этом если разница в значениях протромбинового времени (1) значительна, то это считают указанием на присутствие в образце крови или плазмы крови антикоагулянтов, а если (2) незначительна, то это считают указанием на отсутствие в образце крови или плазмы крови антикоагулянтов в концентрациях выше порога чувствительности.



A1

201650035

201650035

A1

ПРОБИРНЫЙ АНАЛИЗ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИКОАГУЛЯНТОВ В КРОВИ ИЛИ В ПЛАЗМЕ КРОВИ

5 ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ПРЕДЛАГАЕМОЕ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Предлагаемое изобретение относится к пробирному анализу для определения антикоагулянтов в образцах крови или плазмы крови.

10

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ПРЕДЛАГАЕМОГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

Антикоагулянты – это вещества, замедляющие, уменьшающие или не допускающие свертывания крови или плазмы крови, антикоагулянты уменьшают скорость превращения фибриногена в фибрин.

15

Некоторые антикоагулянты, порождаемые естественным образом, являются эндогенными и играют важную роль в ограничительном воздействии на возникновение, скорость распространения и пространственную протяженность процесса свертывания крови в живом организме (*in vivo*). Но существуют и такие антикоагулянты, которые порождаются в патологических состояниях. Обнаружены антикоагулянты в змеиных ядах, а также в продуктах жизнедеятельности кровососущих насекомых, пиявок, рукокрылых и клещей. Растущей группой антикоагулянтов являются искусственно синтезируемые вещества, создаваемые для целей терапевтического лечения и профилактики тромбозных заболеваний.

20

25

Свертывание крови – это сложное явление, в котором участвует большое количество взаимодействующих молекул, присутствующих в плазме крови или на поверхности участвующих в этом процессе клеток. Существует много клеточных и молекулярных взаимодействий, в том числе катализируемых ферментами реакций, которые могут быть ослаблены или нарушены под действием антикоагулянтов.

30

35

Антикоагулянты прямого действия подавляют, затрудняют, или делают невозможным либо действие ферментов, имеющих решающее значение в процессе свертывания крови, тромбина (фактор IIa), либо ферментативное действие активированного фактора X свертывания крови (фактор Xa), либо и то, и другое действия. Непрямое действие антикоагулянтов работает несколько иначе, в частности, путем повышения действенности антикоагулян-

тов прямого действия. Из антикоагулянтов, нашедших широкое терапевтическое применение, к антикоагулянтам непрямого действия относится гепарин, а антагонисты витамина К (варфарин) нашли широкое применение в качестве агентов, понижающих уровни факторов свертывания крови. В качестве антикоагулянта прямого действия известен гирудин (белок, вырабатываемый пиявками), а также недавно созданные ингибиторы фактора IIa или фактора Ха. Именно эти новые антикоагулянты прямого действия DOAC (аббревиатура от **direct oral anticoagulant** – пероральный антикоагулянт прямого действия), в частности, те из них, которые могут приниматься перорально, называемые также пероральными антикоагулянтами – не антагонистами витамина К – NOAC (аббревиатура от **non-vitamin K oral anticoagulant** – пероральный антикоагулянт – не антагонист витамина К), произвели глубокие изменения как в клинической, так и в лабораторной медицине.

Тот факт, что антикоагулянты различаются способом своего действия, представляет проблему для лабораторной медицины с точки зрения разработки способов определения антикоагулянтов. Эта проблема до некоторой степени обостряется из-за последних успехов в области фармакологии в части создания новых веществ для терапевтического лечения тромбоземблических заболеваний (см., например, публикацию J. Harenburg, S. Marx and R. Krämer. Determination of anticoagulation effects of the new oral anticoagulants: an unmet need (Определение антикоагуляционного действия новых пероральных антикоагулянтов: неудовлетворенная потребность), *Expert Review of Haematology*, февраль 2012 г., том 5, №1, страницы 107-113).

В лабораториях центральных больниц, где обеспечена возможность проведения различных испытаний и работает квалифицированный персонал, способный интерпретировать результаты этих испытаний, обнаружение и определение антикоагулянтов прямого действия представляется относительно простой задачей: ингибиторы фактора IIa и фактора Ха могут быть подвергнуты пробирному анализу путем испытаний по определению тромбинового времени ТТ (аббревиатура от **thrombin time** – тромбиновое время) или путем испытаний по определению фактора Ха, соответственно. Если стандартные варианты этих испытаний не удовлетворяют требованиям, то их подвергают модификации («разбавлению»). В медицинских центрах по оказанию первичной помощи и в больницах, удаленных от центральной лабора-

тории, ситуация иная. Для лабораторной медицины в местах оказания медицинской помощи РОС (аббревиатура от point of care – место оказания медицинской помощи) характерно ограниченное количество возможных лабораторных испытаний, потому что ограничено физическое пространство таких лабораторий, а также недостаточно квалифицированного лабораторного персонала. В процессе свертывания крови наиболее доступным испытанием, проводимым в местах оказания медицинской помощи, является определение протромбинового времени PT (prothrombin time), результаты которого проявляются в величине международного нормализованного отношения

5
10 INR (International normalized ratio), определяемой как отношение протромбинового времени испытуемого образца к нормальному протромбиновому времени, нормализованному путем возведения в некоторую нормализующую степень, индекс чувствительности. К другим обычным или распространенным испытаниям на свертывание крови относятся определение активированного

15 частичного тромбопластинового времени АРТТ (activated partial thromboplastin time), активированного времени свертывания крови АСТ (activated coagulation time) и упоминавшегося выше тромбинового времени. Эксперты-мечтатели надеются, что в области свертывания крови эти обычные и распространенные испытания могут быть приспособлены и модифицированы,

20 чтобы в местах оказания медицинской помощи удовлетворять потребности в пробирном анализе «новых» антикоагулянтов, в частности, пероральных антикоагулянтов – не антагонистов витамина К. Такие мысли и надежды выражены, например, в публикации E.J. Favaloro and G. Lippi. The new oral anticoagulants and the future of haemostasis laboratory testing (Новые пероральные

25 антикоагулянты и будущее лабораторных испытаний гемостаза), *Biochemia Medica* 2012; 22(3):329-41.

Наиболее широкодоступным является испытание на протромбиновое время – международное нормализованное отношение для измерения свертывания крови, поэтому разработка модифицированного испытания на протромбиновое время (или «разбавленное протромбиновое время»), при котором

30 обеспечена возможность определения пероральных антикоагулянтов – не антагонистов витамина К, представляется в высшей степени желательной. Имеются сообщения о работах, ведущихся в этом направлении. Известно, что чувствительность большинства испытаний на протромбиновое время

в отношении ингибиторов прямого действия фактор Ха, такого как, например, ривароксабан, низка. В патентной публикации EP 2 405 274 A1 на имя С. Kluff раскрыты испытания на протромбиновое время при использовании определенного змеиного яда, фактора испытание на протромбиновое время свертывания крови из яда гадюки Рассела, а также показана чувствительность к ривароксабану и раскрыто использование испытания на протромбовиновое время, в котором используют такие тромбопластины.

В последние годы стало меньше надежд на создание способа определения пероральных антикоагулянтов – не антагонистов витамина К с помощью некоторых испытаний на протромбиновое время, модифицированных или нет. В январе 2014 года Т. Линдал (Т. Lindhal), член экспертной группы по свертыванию крови организации внешнего качества Швеции, EQUALIS, сделал сообщение об исследованиях, выполненных этой экспертной группой для априксабана, одного из веществ – ингибиторов фактора Ха. Было сделано заключение, что ни одно из многих коммерчески доступных испытаний на протромбиновое время или активированное частичное тромбопластиновое время не может быть использовано при определении априксабана в плазме крови в клинически значимых концентрациях. В то же время испытания на фактор Ха для этой цели были хорошо применимыми.

Заслуживают упоминания попытки корректировать результаты испытаний на протромбиновое время для переменного антикоагуляционного действия неработающих факторов свертывания крови, белка, обусловленного отсутствием витамина К (PIVKA – аббревиатура от protein induced by vitamin K absence), обнаруженного в крови пациентов после терапевтического лечения антагонистами витамина К. В патентной публикации US 7 767 459 B2 на имя J. Horsti раскрыто измерение протромбинового времени плазмы крови с помощью стандартного протокола любой данной методики измерения протромбинового времени, а также измерение его после предварительного разбавления плазмы физиологическим буферным раствором, таким как раствор хлорида натрия (NaCl) в концентрации 9 г/л. Результаты измерения протромбинового времени, выраженные в секундах или в значениях международного нормализованного отношения, нанесены на график в зависимости от степени конечного разбавления плазмы и экстраполированы до нуля. Протромбиновое время плазмы при конечном разбавлении ноль, уменьшенное на про-

тромбиновое время для нормальной плазмы, было принято за меру влияния белка, обусловленного отсутствием витамина К, и было использовано для корректировки первоначальных результатов измерения протромбинового времени.

- 5 Для определения антикоагулянтов нескольких разных типов, в частности, гепаринов и пероральных антикоагулянтов – не антагонистов витамина К были разработаны новые испытания на свертываемость крови.

Эти попытки демонстрируют клиническую важность определения этих антикоагулянтов.

- 10 См. публикацию Calatzis A, Peletz D, Haas S, Spannagl M, Rudin K, Wilmer M. Protrombinase-induced Clotting Time Assay for Determination of the Anti-coagulant Effect of UFH and LMWH, Fondaparinux, and Thrombin Inhibitors (Пробирный анализ на определение времени свертывания крови, обусловленного протромбиназой, для определения антикоагуляционного действия
- 15 нефракционированного UFH (unfractionated heparin) и низкомолекулярного гепарина LMWH (low molecular weight heparin), фондапаринукса и ингибиторов тромбина), American Journal of Clinical Pathology 2008; 130: 446-454, и публикацию Samama MM, Martinol JL, LeFlem L, Guinet C, Plu-Bureau G, Depasse F. Assessment of laboratory assays to measure rivaroxaban – an oral, direct factor
- 20 Xa inhibitor (Оценка лабораторных анализов для измерения содержания ривароксабана – перорального ингибитора фактора Xa прямого действия), Journal of Thrombosis and Haemostasis 2000; 103/4: 815-825.

- Соответствующие предлагаемому изобретению предпосылки его создания – это различие между методиками мокрой химии и методиками сухой
- 25 химии. Методики мокрой химии характеризуются тем, что при проведении пробирного анализа на свертываемость крови или плазмы крови определенный объем испытуемого образца смешивают с определенным объемом реагента. Образец, таким образом, до некоторой степени разбавляют с получением реакционной смеси. В методиках сухой химии такое разбавление не
- 30 имеет места. Испытуемый образец перемешивают или приводят в контакт с веществом-реагентом в сухом виде, и никакого разбавления образца не делают. Большинство испытаний, проводимых в местах оказания медицинской помощи, относятся к методикам сухой химии, потому что они часто могут осуществляться в формате, обеспечивающим легкость в использовании,

например, с использованием полосок или микросхем. Обычно от оператора требуется только внести некоторый малый объем образца. Методикам сухой химии присущ тот недостаток, что такие испытания труднее модифицировать. Одна из степеней свободы, обеспечиваемая процедурами мокрой химии, а именно, варьирование степени разбавления образца, не обеспечена процедурами сухой химии. Каждое упоминание «разбавительной» модификации обычного испытания подразумевает использование процедур мокрой химии.

10

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПРЕДЛАГАЕМОГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

15

Целью предлагаемого изобретения является создание способа проведения пробирного анализа для определения антикоагулянтов в образцах крови или плазмы крови, включающего стадии анализа, включающие по меньшей мере две процедуры мокрой химии для определения протромбинового времени, при этом разрабатываемый пробирный анализ должен быть применимым для определения в образцах крови и плазмы крови как антикоагулянтов прямого действия, так и антикоагулянтов непрямого действия.

20

Сущность предлагаемого изобретения раскрыта в независимом пункте прилагаемой к настоящему описанию формулы изобретения. Варианты осуществления предлагаемого изобретения раскрыты в зависимых пунктах формулы изобретения, в прилагаемых графических материалах и в последующем тексте описания.

25

Согласно первому аспекту осуществления предлагаемого изобретения предусмотрено создание пробирного анализа для определения антикоагулянтов в образце крови или плазме крови, при этом предлагаемый пробирный анализ содержит стадии анализа, включающие по меньшей мере две процедуры мокрой химии для определения протромбинового времени. Пробирный анализ включает следующие стадии: (а) на первой стадии определения протромбинового времени выполняют измерение протромбинового времени с помощью первой процедуры, проводимой с использованием первой реакционной смеси, полученной разбавлением первого объема крови или плазмы крови первым объемом жидкого реагента, содержащего тромбопластин, фибриноген и фактор V свертывания крови, (б) на второй стадии вы-

30

35

полняют измерение протромбинового времени с помощью второй процедуры, проводимой с использованием второй реакционной смеси, полученной разбавлением второго объема крови или плазмы крови вторым объемом жидкого реагента, при этом содержание крови или плазмы крови во второй реакционной смеси отличается от содержания крови или плазмы крови в первой реакционной смеси. Упомянутые по меньшей мере две процедуры определения протромбинового времени калибруют для обеспечения идентичных или приблизительно идентичных результатов определения протромбинового времени путем использования для анализа эталонной крови или плазмы крови, не содержащей антикоагулянтов, представляющих интерес с точки зрения пробирного анализа. Кроме того, предлагаемый способ проведения пробирного анализа дополнительно содержит стадию (в), состоящую в вычислении разницы в значениях протромбинового времени, полученных на стадиях (а) и (б), при этом если разница в значениях протромбинового времени (1) значительна, то это считают указанием на присутствие в образце крови или плазмы крови антикоагулянтов, а если (2) незначительна, то это считают указанием на отсутствие в образце крови или плазмы крови антикоагулянтов в концентрациях выше порога чувствительности.

Под стадиями анализа, включающими по меньшей мере две процедуры определения протромбинового времени, здесь подразумевается, что данный пробирный анализ может содержать стадии анализа, включающие две, три, четыре, пять и даже до шести процедур определения протромбинового времени.

Под разницей в значениях протромбинового времени здесь понимается абсолютная разница (разность) или относительная разница (отношение, частное).

Упомянутые по меньшей мере две процедуры определения протромбинового времени, используемые при пробирном анализе, могут быть в своей основе идентичны, но иметь некоторые различия, которые могут показаться незначительными. Такие различия, кроме различия, предусмотряемого предлагаемым изобретением, то есть, различия в отношении между объемом образца и объемом реагента, могут представлять собой различия в температуре, при которой выполняют измерения, и различия в ионной силе или рН реакционной смеси.

Под процедурой мокрой химии по определению противотромбинового времени здесь имеются в виду процедуры определения противотромбинового времени по Оврену.

5 Отношение между объемом крови или плазмы крови и объемом жидкого реагента в реакционной смеси может варьировать в широких пределах в зависимости от характеристик реагента для определения протромбинового времени и концентрации в образце антикоагулянта, подлежащего определению.

10 При практическом осуществлении предлагаемого пробирного анализа не налагается строгих ограничений в отношении того, насколько малым может быть образец и до какой степени этот образец может быть разбавлен в реагенте для определения протромбинового времени, могут возникать только ограничения естественного характера. Нижний уровень разбавления крови или плазмы крови в жидком реагенте составляет приблизительно 1 : 2. При 15 более низких степенях разбавления могут быть утрачены некоторые полезные характеристики пробирного анализа, например, цитрированные образцы становятся неподдающимися анализу. Наивысшее возможное разбавление значительно выше, оно составляет приблизительно 1 : 200. Столь высокие степени разбавления возможны потому, что нет необходимости в том, чтобы 20 необходимые концентрации фибриногена и фактора V в реакционной смеси происходили из образца. Это обусловлено тем, что жидкий реагент для определения протромбинового времени овренова типа (то есть, по Оврену) помимо тромбопластина содержит также эффективные уровни фибриногена и фактора V. Все же и при использовании жидких реагентов овренова типа 25 возникают практические ограничения в отношении степени разбавления окончательного образца. При очень низких концентрациях образца крови или плазмы крови в реакционной смеси уровни фактора VII, фактора X и фактора II настолько низки, что время свертывания крови (протромбиновое время) удлинняется настолько, что его определение становится трудным или невозможным. Следовательно, при практическом осуществлении предлагаемого 30 изобретения отношение объема крови или плазмы крови к объему жидкого реагента в реакционной смеси может варьировать от 1 : 2 до 1 : 200. Предпочтительный диапазон этого отношения может быть от 1 : 5 до 1 : 100 или от 1 : 10 до 1 : 50.

При проведении предлагаемого пробирного анализа определение протромбинового времени выполняют по меньшей мере в двух реакционных смесях, в которых кровь или плазма крови присутствуют в разных концентрациях. Содержание крови или плазмы крови в первой реакционной смеси может быть в количестве раз приблизительно от 1,5 до 100, от 1,5 до 50, от 1,5 до 25, от 1,5 до 10, или от 1,5 до 5 выше, чем содержание крови или плазмы крови во второй реакционной смеси. Разница в уровнях содержания от 1,5 до 5 раз может быть легко достигнута на практике, и при осуществлении предлагаемого пробирного анализа обеспечивает возможность определения антикоагулянтов в клинически значимых диапазонах уровней содержания.

Содержание крови или плазмы крови во второй реакционной смеси может быть в количестве раз приблизительно от 1,5 до 100, от 1,5 до 50, от 1,5 до 25, от 1,5 до 10, или от 1,5 до 5 выше, чем содержание крови или плазмы крови в возможной третьей реакционной смеси.

Несмотря на разницу в уровне содержания крови или плазмы крови в реакционной смеси все две или больше процедур определения протромбинового времени откалиброваны, чтобы с помощью соответствующих эталонных образцов крови или плазмы крови, в которых отсутствуют антикоагулянты, представляющие интерес с точки зрения данного пробирного анализа, обеспечить идентичный или приблизительно идентичный результат определения протромбинового времени. Это протромбиновое время выражается в той форме, которая возможна. Выражение в обычных единицах времени непригодно, так как оно будет варьировать от процедуры к процедуре, и не поддается калибровке (абсолютные единицы времени остаются такими, какие они есть). Реакционная смесь с низкой концентрацией крови или плазмы крови показывает большие значения протромбинового времени и соответственно, реакционная смесь с высокой концентрацией крови или плазмы крови показывает малые значения протромбинового времени. Естественный способ выражения протромбинового времени – это международное нормализованное отношение, но возможны и другие способы его выражения: в различных условных (расчетно-аналитических) единицах времени или в их отношениях. Важно, чтобы данный соответствующий образец, в котором отсутствуют коагулянты, анализируемые с помощью упомянутых двух или больше процедур определения протромбинового времени, давал несколько

возможно один и тот же результат. Естественный путь для сравнения результатов, полученных при проведении одной процедуры определения протромбинового времени, с результатами другой такой процедуры – это получение среднего результата определения протромбинового времени и использование коэффициента вариации CV (coefficient of variation) сравнения. Калибровка состоит в том, что средний результат протромбинового времени для нескольких образцов, в которых отсутствуют указанные коагулянты, должен быть как можно более близким для всех двух или больше процедур определения протромбинового времени, а коэффициент вариации сравнения должен быть как можно более низким.

Упомянутые по меньшей мере две процедуры определения протромбинового времени могут быть откалиброваны таким образом, чтобы они давали идентичный или практически идентичный результат при их осуществлении для анализа эталонной крови или плазмы крови, взятой от здоровых индивидуумов, и для разбавленных образцов такой эталонной крови или плазмы крови. Под эталонной кровью или плазмой крови, взятой от здоровых индивидуумов, здесь понимается кровь или плазма крови, или же фонд(ы) таких образцов, взятых от одного или нескольких явно здоровых индивидуумов, не проходящих лечения антикоагулянтами.

Упомянутые по меньшей мере две процедуры определения протромбинового времени могут быть откалиброваны таким образом, чтобы они давали идентичный или практически идентичный результат при их осуществлении для анализа эталонной крови или плазмы крови (взятой от одного или многих индивидуумов или из фонда образцов, взятых от разных индивидуумов), в которой отсутствуют антикоагулянты, представляющие интерес с точки зрения данного пробирного анализа и в которых протромбиновое время, определенное с помощью одной или нескольких установленных процедур определения протромбинового времени, больше нормального.

На стадии (в) пробирного анализа высчитывают абсолютную или относительную разницу протромбинового времени между измеренными значениями протромбинового времени. Признаки разницы «значительная» и «незначительная» здесь следует понимать как конвенционально статистически определенные. Разница считается значительной при значении относительной разницы, превышающей коэффициент вариации в два или более раз, и

считается незначительной, если она меньше удвоенного коэффициента корреляции. В другом выражении наблюдаемая разница считается значительной, если вероятность того, что она произошла в популяции образцов, не содержащих антикоагулянтов, определяемых данным пробирным анализом, мала. Пороговое значение этой вероятности может быть принято различным образом. Типичные пороговые значения – это 5% ($p < 0,05$) или 1% ($p < 0,01$).

Если разница значений протромбинового времени, рассчитанная на стадии (в), признана значительной и вид антикоагулянта известен, то может быть вычислена концентрация антикоагулянта в образце крови или плазмы крови.

Если разница значений протромбинового времени, рассчитанная на стадии (в), признана незначительной, а вид антикоагулянта известен, то можно установить уровень, выше которого этот антикоагулянт не присутствует в этом образце крови или плазмы крови.

Если разница протромбинового времени, рассчитанная на стадии (в), признана значительной, то может быть вычислено оценочное протромбиновое время этого образца крови или плазмы крови в отсутствие антикоагулянта.

Вычисление концентрации антикоагулянта в образце крови или плазмы крови может быть выполнено только тогда, когда вид антикоагулянта известен или предполагается.

Если выполнены анализы с двумя процедурами определения протромбинового времени, то для этого вычисления может быть целесообразно использовать разницу полученных значений протромбинового времени и значения протромбинового времени, полученного в результате анализа образца с самой высокой степенью разведения. Упомянутый результат, полученный при определении протромбинового времени для образца с самой высокой степенью разведения, будет наиболее близок к результату определения протромбинового времени, который был бы получен в отсутствие каких-либо антикоагулянтов. При выражении через международное нормализованное отношение этот воображаемый результат определения протромбинового времени здесь обозначен как INRo. INRo можно получить путем вычитания дроби разницы или путем вычитания некоторой функции этой разницы в зависимости от того, является ли дозозависимый эффект уровня этого коагу-

лянта линейным, или нелинейным. Так как дозозависимый эффект может зависеть от величины упомянутого INRo, а также от температуры, при которой проводили процедуры определения, преобразование величины разницы в значение концентрации антикоагулянта может потребовать большого количества так называемых стандартных кривых. В альтернативном варианте для вычисления величины INRo и концентрации антикоагулянта можно использовать многомерную функцию.

Если при проведении пробирного анализа согласно предлагаемому изобретению выполняют больше двух процедур определения протромбинового времени, то можно рассчитать больше одной разницы, и эти несколько значений разницы и значение протромбинового времени, полученное для образца с самой высокой степенью разведения, могут быть использованы для вычисления величины INRo и возможных уровней антикоагулянта в зависимости от вида антикоагулянта. Можно также предпочесть какое-то одно из значений разницы как наиболее пригодное к употреблению, так как оно дает предпочтительный диапазон для определений.

Измерения протромбинового времени могут выполняться при температуре окружающей среды (помещения) в диапазоне от 17°C до 45°C, предпочтительно – в диапазоне от 18°C до 30°C, более предпочтительно – в диапазоне от 21°C до 30°C, и наиболее предпочтительно – в диапазоне от 25°C до 30°C.

Такие температурные интервалы, от 30°C и ниже, но не намного, представляются предпочтительными, так как тогда температура практически не влияет на протромбиновое время, благодаря чему обеспечено повышение точности анализа на определение протромбинового времени. Кроме того, при более низкой температуре повышается чувствительность предлагаемого пробирного анализа к антикоагулянтам, что подтверждается примерами, которые будут рассмотрены ниже.

Антикоагулянты, которые могут быть определены с помощью предлагаемого пробирного анализа, принадлежат к группе, включающей ингибиторы прямого действия активированных факторов IIa и Xa свертывания крови, а именно, они могут быть выбраны из следующей группы: дабигатран, апиксабан, ривароксабан, гирудин, или же они принадлежат к группе, включающей ингибиторы непрямого действия активированных факторов IIa и Xa свертывания.

вания крови, а именно, они могут быть выбраны из следующей группы: фракционированные гепарины, нефракционированные гепарины.

Первый объем жидкого реагента в первой реакционной смеси может быть равным второму объему жидкого реагента во второй реакционной смеси.

Объем крови или плазмы крови, разбавленной жидким реагентом, может составлять от 1 мкл до 20 мкл.

Кровь или плазма крови в необходимом объеме может быть введена в жидкий реагент с помощью капиллярной трубки типа «конец-в-конец».

Отношение объема крови или плазмы крови к объему жидкого реагента в составе реакционной смеси может составлять от 1:2 до 1:200, от 1:5 до 1:100, или от 1:10 до 1:50.

Содержание крови или плазмы крови в первой реакционной смеси может быть в количестве раз приблизительно от 1,5 до 100, от 1,5 до 50, от 1,5 до 25, от 1,5 до 10, или от 1,5 до 5 выше, чем содержание крови или плазмы крови во второй реакционной смеси.

Конечная концентрация ионов кальция в реакционной смеси может составлять величину в диапазоне от 10 мМ до 50 мМ, в диапазоне от 10 мМ до 30 мМ, или в диапазоне от 10 мМ до 24 мМ.

Под конечной концентрацией кальция в реакционной смеси здесь следует понимать общее содержание кальция в реакционной смеси, в основном это свободные ионы Ca^{2+} , но должны учитываться также связанные ионы кальция.

При использовании реакционной смеси, содержащей кальций в указанных концентрациях, чувствительность предлагаемого пробирного анализа, с которой могут быть определены ингибиторы коагуляции, может быть увеличена.

Следует избегать избыточно высокой концентрации кальция, потому что при повышении концентрации ионов Ca^{2+} увеличивается время свертывания крови, что в общем случае является недостатком.

Осмоляльность реакционной смеси может составлять приблизительно от 0,3 осмоль/кг до 0,5 осмоль/кг, или приблизительно от 0,3 осмоль/кг до 0,4 осмоль/кг.

Такие уровни осмоляльности могут быть получены путем увеличения концентрации хлорида натрия (NaCl) в реагенте для определения протромбинового времени до уровней, которые делают этот реагент для определения протромбинового времени гипертоническим (когда его осмотическое давление выше, чем осмотическое давление плазмы крови и других физиологических жидкостей), следовательно, гипертонической должна стать и реакционная смесь.

Такие уровни осмоляльности могут повысить чувствительность предлагаемого пробирного анализа к антикоагулянтам. Значения времени свертывания крови, однако, при слишком высоких концентрациях хлорида натрия (NaCl) могут стать слишком большими.

Сочетание повышенной осмоляльности и повышенных концентраций кальция в реакционной смеси может повысить чувствительность предлагаемого пробирного анализа к антикоагулянтам с обеспечением наиболее выигрышной высокой чувствительностью.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПРИЛАГАЕМЫХ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1 изображен график, отображающий концентрацию апиксабана в нормальной плазме крови, измеренную с помощью предлагаемого пробирного анализа.

На фиг. 2 изображена часть графика, изображенного на фиг. 1, в увеличенном масштабе.

На фиг. 3 изображен график, отображающий концентрацию апиксабана в нормальной плазме крови, измеренную с помощью предлагаемого пробирного анализа (первичные данные: протромбиновое время в секундах).

На фиг. 4 изображена часть графика, изображенного на фиг. 3, в увеличенном масштабе.

На фиг. 5 изображен график, отображающий концентрацию апиксабана в нормальной крови, измеренную с помощью предлагаемого пробирного анализа.

На фиг. 6 изображена часть графика, изображенного на фиг. 5, в увеличенном масштабе.

На фиг. 7 изображен график, отображающий концентрацию дабигатрана в нормальной крови, измеренную с помощью предлагаемого пробирного анализа.

5 На фиг. 8 изображена часть графика, изображенного на фиг. 7, в увеличенном масштабе.

На фиг. 9 изображен график, отображающий концентрацию гепарина в нормальной крови, измеренную с помощью предлагаемого пробирного анализа.

10 На фиг. 10 изображена часть графика, изображенного на фиг. 9, в увеличенном масштабе.

На фиг. 11 изображен график, отображающий относительную разницу (то есть, частное от деления PT_{20c} на PT_{5c}) в зависимости от среднего калиброванного значения протромбинового времени для процедур с 5 мкм и 20 мкм при количественном анализе эталонных образцов, взятых от здоровых индивидуумов и от пациентов, проходящих лечение варфарином.

20 На фиг. 12 изображен график, отображающий абсолютную разницу (то есть, разность $PT_{20c} - PT_{5c}$) в зависимости от среднего калиброванного значения протромбинового времени для процедур с 5 мкм и 20 мкм при количественном анализе эталонных образцов, взятых от здоровых индивидуумов и от пациентов, проходящих лечение варфарином.

25 На фиг. 13 изображен график, отображающий относительную разницу (то есть, частное от деления PT_{20c} на PT_{5c}) в зависимости от среднего калиброванного значения протромбинового времени для процедур с 5 мкм и 20 мкм при количественном анализе эталонных образцов, взятых от здоровых индивидуумов и от пациентов, проходящих лечение варфарином, а также образцов, взятых от пациентов, проходящих лечение дабигатраном.

30 На фиг. 14 изображен график, отображающий абсолютную разницу (то есть, разность $PT_{20c} - PT_{5c}$) в зависимости от среднего калиброванного значения протромбинового времени для процедур с 5 мкм и 20 мкм при количественном анализе эталонных образцов, взятых от здоровых индивидуумов и от пациентов, проходящих лечение варфарином, а также образцов, взятых от пациентов, проходящих лечение дабигатраном.

На фиг. 15 изображен график, отображающий относительные разницы некалиброванного протромбинового времени (то есть, частное от деления

PT20 на PT5) для процедур с 5 мкм и 20 мкм при количественном анализе эталонных образцов, взятых от здоровых индивидуумов и от пациентов, проходящих лечение варфарином, а также образцов, взятых от пациентов, проходящих лечение дабигатраном.

5 На фиг. 16 изображен график, отображающий относительные разницы калиброванного протромбинового времени (то есть, частное от деления PT20 на PT5) для процедур с 5 мкм и 20 мкм при количественном анализе эталонных образцов, взятых от здоровых индивидуумов и от пациентов, проходящих лечение варфарином, а также образцов, взятых от пациентов, проходящих лечение дабигатраном.
10

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ПРЕДЛАГАЕМОГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

15 Ниже будут рассмотрены примеры, которые не ограничивают объем предлагаемого изобретения, а служат для более полного объяснения и описания предлагаемого изобретения, а также для стимулирования развития в этой важной области медицинской диагностики.

20 Экспериментальная часть выполнялась с использованием коммерчески доступного способного работать при температуре окружающей среды коагуляционного прибора производства компании «Симпл Саймон ПТ Сафена АБ» (Simple Simon PT Zafena AB), Линчёпинг, Швеция, работа которого описана в патентной публикации EP 1 636 595 B2. Для каждой процедуры определения протромбинового времени использовали отдельный прибор – считывающее устройство. В альтернативном варианте возможно использование
25 одного и того же прибора для всех процедур определения протромбинового времени.

30 В примерах 1-6 один специальный прибор – считывающее устройство был использован для каждой из трех процедур определения протромбинового времени: для процедуры-20 мкл, процедуры-10 мкл и процедуры-5 мкл. Эти три прибора использовали совместно поставленными один около другого на лабораторной полке в термическом равновесии с температурой помещения лаборатории. Для данной процедуры определения протромбинового времени каждый из этих приборов показывал протромбиновое время в секундах, как отображено в Таблице 2. Кроме того, благодаря способности
35

прибора – считывающего устройства обрабатывать данные для каждой процедуры определения протромбинового времени обеспечено отображение грубого оценочного значения образцового международного нормализованного отношения. Эти грубые оценочные значения международного нормализованного отношения приведены в Таблицах 1, 3 и 4. В каждой серии экспериментов подвергали анализу также соответствующие эталонные образцы, при этом результаты, полученные от каждой процедуры определения протромбинового времени, могли быть откалиброваны на отдельном совещании по завершении серий экспериментов. Неважно, как выражены первичные данные протромбинового времени при двух или большем количестве определений протромбинового времени путем разных процедур, после калибровки с помощью эталонных образцов разные процедуры определения протромбинового времени показывают идентичное или максимально близкое к идентичному протромбиновое время.

Температура лабораторного помещения, в котором выполнялись эксперименты, менялась от 21°C до 26°C. Температурные интервалы от 30°C и ниже, но не намного, представляются предпочтительными, потому что такая температура оказывает сильное влияние на протромбиновое время, благодаря чему обеспечено повышение точности определения протромбинового времени. Кроме того, при более низких температурах повышается чувствительность предлагаемого пробирного анализа к антикоагулянтам в описываемых ниже примерах. Тем не менее, предлагаемый пробирный анализ может быть выполнен в температурном диапазоне от 17°C до 45°C.

В качестве реагента для определения протромбинового времени использовали один из поставляемых с партией N223M продукта «Симпл Саймон ПТ» (Simple Simon PT), это реагент овренова типа, содержащий эффективные количества тромбопластина, фибриногена и фактора V (тромбопластин из мозга кролика, фибриноген и фактор V из плазмы крови коровы). Могут быть использованы и другие реагенты овренова типа.

Реагент был использован в виде порций по 200 мкл для каждого образца, к которому добавляли и с которым смешивали цитрированную кровь или цитрированную плазму крови. Это добавление выполняли с помощью пластиковой капиллярной трубки типа «конец-в-конец», установленной у одного конца трубчатого корпуса с механизмом смещения у другого его конца,

благодаря чему удобным образом обеспечена возможность смешения испытуемого образца с реагентом. Такие капиллярные трубки под товарным знаком Mixxocaps® с капиллярами 10 мкл поставляются с продуктом «Симпл Саймон ПТ». Для выполнения описываемых экспериментов некоторые трубки Mixxocaps® вместо капилляров 10 мкл, поставляемых производителем, были снабжены капиллярами 20 мкл или 5 мкл. В альтернативном варианте для смешения крови или плазмы крови с жидким реагентом могут быть использованы стандартные пипетки или подобные орудия.

Отношения между объемом крови или плазмой крови и объемом жидкого реагента, использованного в экспериментах, составляли 1 : 11, 1 : 21 и 1 : 41. Могли бы быть использованы и другие отношения, лежащие в диапазоне от 1 : 5 до 1 : 100 или в диапазоне от 1 : 2 до 1 : 200.

Разница в концентрации крови или плазмы крови между разными реакционными смесями, использованными в экспериментах по проведению пробирного анализа, составляла от 1,5 до 5 раз. Однако эта разница в концентрации может быть от приблизительно 1,5 до 100 раз.

В качестве антикоагулированной нормальной плазмы использовали продукт NKP GHI-163, партия 10188, производства компании «Медирокс АБ» (MediRox AB). Маточные растворы дабигатрана («Прадакса», производства компании «Бёрингер-Ингельхайм» (Boehringer-Ingelheim)) и аликсабана («Эликвис», производства компании «Бристол-Майерс Сквибб» (Bristol-Meyers Squibb)) в концентрации 100 мг/л были любезным подарком от профессора Томаса Линдала с факультета экспериментальной медицины университета города Линчёпинг. В качестве нефракционированного гепарина использовали препарат «Heparin Leo», партия A6888B, производства компании «Лео Фарма А/С» (Leo Pharms A/S), город Баллеруп, Дания.

Пример 1

Аликсабан – это антикоагулянт прямого действия – ингибитор активированного фактора X (фактора Xa) свертывания крови. Он является действующим веществом антитромботического препарата «Эликвис», производимого компанией «Бристол-Майерс Сквибб». Клинический интерес представляет измерение содержания аликсабана в плазме крови в диапазоне от 50 мкг/л до 1000 мкг/л. Для приготовления подходящих образцов малые объ-

емы маточного раствора апиксабана добавляли к нормальной плазме, контрольной плазме НКР, чтобы получать нормальную плазму с концентрацией апиксабана в диапазоне от 0 до 1000 мкг/л. Эти образцы нормальной плазмы с апиксабаном, в том числе неразбавленную нормальную плазму (НКР) и ее же, разбавленной раствором хлорида натрия (NaCl) 9 г/л в отношении 1 : 2 (НКР 1:2) подвергали анализу с помощью приборов «Симпл Саймон ПТ» при добавленных образцах 20 мкл, 10 мкл и 5 мкл в 200 мкл реагентов, то есть, с тремя процедурами определения протромбинового времени с разными содержаниями образцов в реакционных смесях, как предусмотрено предлагаемым изобретением. Имеет отношение к делу также то, что все три процедуры определения протромбинового времени были откалиброваны, как предусмотрено предлагаемым изобретением, чтобы для неразбавленной плазмы НКР было обеспечено значение международного нормализованного отношения, равное 1,000, а для разбавленной плазмы НКР 1:2 было обеспечено значение международного нормализованного отношения, равное 1,357. Все первичные значения международного нормализованного отношения, результаты, отображаемые на экранах приборов (для каждой процедуры определения протромбинового времени использовался один прибор), преобразовывали в скорректированные / откалиброванные значения (обозначено как INR_c) по формуле $A \cdot INR_{exp}(B)$, где A и B были выбраны таким образом, чтобы придать неразбавленной плазме НКР и разбавленной плазме НКР 1:2 желаемые значения международного нормализованного отношения, а именно, 1,000 и 1,357, соответственно. Значение международного нормализованного отношения разбавленной плазмы НКР 1:2 рассчитывали по формуле Линдла и соавторов для международного нормализованного отношения, соответствующего 50%-ному воздействию на протромбиновое время (половине от 100%, что соответствует международному нормализованному отношению, равному 1,000). Результаты обработки данных сведены в помещаемую ниже Таблицу 1. Над колонками калиброванного международного нормализованного отношения (INR_c) помещены значения упоминавшихся выше A (верхнее) и B (нижнее).

Таблица 1

				0,94	0,93	0,95			
				1,31	1,21	0,97			
АПИ-ксабан	INR	INR	INR	INR _c	INR _c	INR _c	ΔINR	ΔINR	0,54
мкг/л	Образец 20 мкг/л	Образец 10 мкг/л	Образец 5 мкг/л	Образец 20 мкг/л	Образец 10 мкг/л	Образец 5 мкг/л	20 мкл – 5 мкл	10 мкл – 5 мкл	INR _o
1000	10,70	4,41	2,67	21,03	5,58	2,47	18,56	3,12	0,78
800	7,81	3,35	2,22	13,91	4,00	2,06	11,85	1,94	1,01
600	5,56	2,70	1,90	8,91	3,08	1,77	7,14	1,31	1,06
500	4,47	2,37	1,73	6,69	2,63	1,62	5,07	1,02	1,07
400	3,68	2,16	1,58	5,18	2,35	1,48	3,70	0,87	1,01
300	2,82	1,82	1,44	3,66	1,91	1,35	2,30	0,56	1,05
200	2,12	1,53	1,29	2,51	1,55	1,22	1,30	0,34	1,03
100	1,55	1,27	1,15	1,67	1,24	1,09	0,58	0,15	1,01
50	1,28	1,18	1,12	1,30	1,13	1,06	0,24	0,07	1,02
0	1,05	1,065	1,055	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
NKP	1,050	1,065	1,055	1,000	1,000	1,000			
NKP 1:2	1,325	1,37	1,445	1,357	1,357	1,357			

Приведены два измеренных значения содержания апиксабана в нормальной плазме, более чувствительное измерение разницы значений калиброванного международного нормализованного отношения с использованием процедур определения протромбинового времени с образцом 20 мкл и образцом 5 мкл и менее чувствительное измерение разницы значений калиброванного международного нормализованного отношения с образцом 10 мкл и образцом 5 мкл. Эти разницы значений калиброванного международного нормализованного отношения здесь выражены в виде разностей, но равным образом они могут быть выражены в виде отношений. На фиг. 1 эти разницы значений калиброванного международного нормализованного отношения показаны графически как функция от концентрации апиксабана. Кривая с квадратами отражает разницу значений калиброванного международного нормализованного отношения, полученных в процедурах с образцами 20 мкл и 5 мкл, а кривая с кружками отражает разницу значений калиброванного международного нормализованного отношения, полученных в процедурах с образцами 10 мкл и 5 мкл.

Следует заметить, что есть возможность оценить международное нормализованное отношение нормальной плазмы в отсутствие антикоагулянта (обозначено как INR_o). Выше это сделано менее изощренным путем. Часть (56%) меньшей разницы значений калиброванного международного нормализованного отношения вычтена из результатов определения калиброванного международного нормализованного отношения в процедуре определения

протромбинового времени с образцом 5 мкл, при этом полученный результат очевидно наиболее близок к INRo. Эти просто полученные оценочные значения INRo удивительным образом точны, только одно из верхних значений концентрации аписабана (1000 мкл/л) отклоняется более, чем на десятую часть единицы международного нормализованного отношения.

На фиг. 1 и фиг. 2 изображены графики роста разницы значений калиброванного международного нормализованного отношения в зависимости от концентрации аписабана. Однако для тех многих, кто ценит / предпочитает линейный дозозависимый эффект, этот эффект здесь отображен для концентраций аписабана ниже одной единицы международного нормализованного отношения, как можно видеть на фиг. 2, на этом чертеже изображена часть графика, изображенного на фиг. 1, в увеличенном масштабе.

Обработка данных, отображенная на фиг. 1 и фиг. 2, может привести в замешательство тех, кто не знаком с определением международного нормализованного отношения при температуре помещения. Вместо первичного результата определения международного нормализованного отношения, которое было скорректировано с учетом влияния температуры путем вычислений с помощью прибора – считывающего устройства, мы могли бы рассматривать протромбиновое время в секундах. Это сделано для большей ясности в описании предлагаемого изобретения несмотря на погрешность, обусловленную тем, что температура не является строго постоянной в течение времени проведения предлагаемого пробирного анализа (температура варьировалась от 22,3°C до 24,2°C). Несмотря на эту погрешность результаты все же достаточно точны и убедительны и освещают картину с большей ясностью, потому что при этом обеспечена возможность обработки данных, с которой знакомы все специалисты в данной отрасли и которая состоит в вычислении международного нормализованного отношения путем деления протромбинового времени (в секундах) на нормальное протромбиновое время и возведение полученного отношения в степень, равную нормализующей константе, эквивалентной международному индексу чувствительности тромбопластина ISI (аббревиатура от International sensitivity index – международный индекс чувствительности [тромбопластина]).

В приводимой ниже Таблице 2 сведены результаты пробирного анализа, проведенного в отношении нормальной плазмы (NKP) с добавленным к

ней аликсабаном, но первичные данные здесь – протромбиновое время, в секундах, и эти данные преобразованы в калиброванное международное нормализованное отношение (INRc) путем деления на протромбиновое время нормальной плазмы и возведения этого отношения в степень, равную 5 международному индексу чувствительности [тромбопластина] (ISI) – эти значения показаны в колонках над калиброванным международным нормализованным отношением (INRc) – верхнее число и нижнее число, соответственно. Как признано релевантным, верхнее числовое значение выбрано таким образом, чтобы для разбавленной плазмы НКР 1:2 значение калиброванного международного нормализованного отношения было равно 1,357.

В Таблице 2 данные имеют погрешность, обусловленную температурным градиентом от 22,3°C сверху до 24,2°C внизу. Это, однако не слишком искажает общую картину. Используемые процедуры определения протромбинового времени, выполняемые по Оврену при температуре помещения, более чувствительны к ингибиторам, чем другие процедуры, но все же очевидно, что только одна из выбранных процедур определения протромбинового времени не дала бы много полезной информации при низких концентрациях аликсабана.

20 Таблица 2

				32,8	37,3	45,8			
				2,63	1,66	1,07			
АПИ-ксабан	Протромбиновое время (с)	Протромбиновое время (с)	Протромбиновое время (с)	INRc	INRc	INRc	ΔINR	ΔINR	0,54
мкг/л	Образец 20 мкг/л	Образец 10 мкг/л	Образец 5 мкг/л	Образец 20 мкг/л	Образец 10 мкг/л	Образец 5 мкг/л	20 мкл – 5 мкл	10 мкл – 5 мкл	INRo
1000	117,4	109,3	111,2	228,43	5,94	2,57	25,85	3,37	0,75
800	96,9	87,2	91,7	17,18	4,08	2,09	15,08	1,99	1,02
600	79,9	73,9	78,8	10,35	3,10	1,78	8,57	1,32	1,07
500	70,8	67,0	72,0	7,54	2,64	1,62	5,92	1,02	1,07
400	63,5	62,3	66,3	5,66	2,34	1,48	4,18	0,86	1,02
300	54,8	54,6	60,6	3,85	1,88	1,35	2,50	0,53	1,06
200	46,7	47,9	54,4	2,53	1,51	1,20	1,33	0,31	1,03
100	39,3	41,5	49,1	1,61	1,19	1,08	0,53	0,12	1,01
50	35,5	39,1	47,7	1,23	1,08	1,04	0,19	0,04	1,02
0	32,8	37,3	45,8	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
НКР	32,8	37,3	45,8	1,00	1,00	1,00			
НКР 1:2	36,9	44,9	61,0	1,357	1,357	1,357			

Представьте, что из трех процедур вы используете наиболее чувствительную к аликсабану, в которой использован образец 20 мкл, и вы получаете

те протромбиновое время 35,2 с. Это больше, чем протромбиновое время нормальной плазмы (NKP), 32,8 с, но это увеличение протромбинового времени может быть обусловлено как антикоагулянтами, так и низкой концентрацией факторов свертывания крови (протромбиновое время разбавленной нормальной плазмы NKP 1:2 составляет 36,9 с). Как это узнать? Пробирный анализ с использованием двух или большего количества процедур определения протромбинового времени с разными концентрациями образцов в реакционной смеси дает более ясную картину. Процедуры, которые были откалиброваны на одно и то же протромбиновое время (здесь соответствующее этому одному и тому же протромбиновому времени международное нормализованное отношение обозначено как INR_c, где буква «с» значит *calibrated* – калиброванное), различия для образцов, в которых нет антикоагулянтов, подлежащих определению, будут незначительны, или различий не будет вообще, то есть, не будет существенной разницы между полученными значениями калиброванного международного нормализованного отношения для образца с низким содержанием фактора свертывания крови. Известно, что в рассматриваемом примере образцы содержат аликсабан, потому что он был добавлен, и проявляется разница в значениях калиброванного международного нормализованного отношения. В рассматриваемом примере в соответствии с предлагаемым изобретением использовано три процедуры определения протромбинового времени и получено три разницы в значениях калиброванного международного нормализованного отношения (две из этих трех приведены в Таблице 2), и для образца нормальной плазмы с концентрацией аликсабана 50 мкг/л все три разницы указывают на присутствие антикоагулянта. Если вид антикоагулянта известен, то его концентрации может быть дана количественная оценка. Эти разницы в значениях калиброванного международного нормализованного отношения здесь показаны в виде разности, но с равным успехом могут быть использованы и их отношения (то есть, в виде частного). Кроме того, может быть дана количественная оценка ожидаемого значения калиброванного международного нормализованного отношения для образца, не содержащего ингибитора (INR_o). В Таблице 2 значения протромбинового времени показаны в секундах, что делает ясной пользу от осуществления предлагаемого изобретения. Можно было ожидать, что результаты, приведенные в Таблице 2, близки аналогичным результатам, при-

веденным в Таблице 1, и они на самом деле хорошо согласуются. Различия, отмеченные для образцов с самой высокой концентрацией аликсабана, объясняются влиянием температуры. За время выполнения серии экспериментов температура помещения повысилась на 2°C. Приборы компенсировали влияние этого температурного сдвига до того, как значения международного нормализованного отношения были внесены в Таблицу 1. Значения протромбинового времени (время свертывания крови в секундах), приведенные в Таблице 2, конечно, не скорректированы в отношении этого температурного эффекта (значения протромбинового времени в секундах это истинные значения). Отсюда небольшие различия в значениях калиброванного международного нормализованного отношения, приведенных в Таблице 1 и Таблице 2.

Графики, изображенные на фиг. 3 и фиг. 4, построены по данным из Таблицы 2. Различия в значениях калиброванного международного нормализованного отношения показаны в зависимости от концентрации аликсабана в нормальных плазмах (различия в значениях калиброванного международного нормализованного отношения, полученных с помощью процедур определения протромбинового времени для образца 20 мкл и образца 5 мкл (кривая с квадратами), и различия в значениях калиброванного международного нормализованного отношения, полученных с помощью процедур определения протромбинового времени для образца 10 мкл и образца 5 мкл (кривая с точками). График, изображенный на фиг. 4, представляет собой часть графика, изображенного на фиг. 3, в увеличенном масштабе.

25

Пример 2

Аликсабан в концентрациях от 0 до 1000 мкг/л добавляли к нормальной цитрированной крови. Эти образцы крови и образец крови с международным нормализованным отношением 2,3 подвергали анализу с помощью прибора «Симпл Саймон ПТ» с использованием образцов с объемами 20 мкл, 10 мкл и 5 мкл, смешанных с реагентами, взятыми в объеме 200 мкл. В приводимой ниже Таблице 3 сведены первичные результаты для международного нормализованного отношения (INR), а также соответствующие значения этого отношения после калибровки (INRc).

Таблица 3

				0,87	0,93	1,01			
				0,96	1,10	1,15			1,5
АПИ- ксабан	INR	INR	INR	INR _c	INR _c	INR _c	ΔINR	ΔINR	
мкг/л	Образец 20 мкг/л	Образец 10 мкг/л	Образец 5 мкг/л	Образец 20 мкг/л	Образец 10 мкг/л	Образец 5 мкг/л	20 мкл – 5 мкл	10 мкл – 5 мкл	INR ₀
1000	8,76	3,50	2,21	6,94	3,69	2,51	4,43	1,18	0,74
714	6,06	2,78	1,87	4,88	2,86	2,08	2,80	0,78	0,91
500	4,58	2,27	1,65	3,73	2,29	1,81	1,92	0,48	1,09
250	2,61	1,64	1,32	2,18	1,60	1,39	0,79	0,21	1,07
125	1,75	1,32	1,13	1,49	1,26	1,16	0,32	0,10	1,02
63	1,41	1,19	1,04	1,21	1,12	1,06	0,15	0,06	0,96
0	1,16	1,06	0,00	1,00	1,00	1,00	0,00	-0,01	
Нормаль- ная кровь 0,37	1,16	1,06	0,99	1,00	1,00	1,00	0,00	-0,01	
Цитриро- ванная кровь 2,3	2,76	2,27	2,05	2,30	2,30	2,30	0,00	0,00	

Здесь для всех процедур определения протромбинового времени было решено, что нормальная кровь без добавления апиксабана должна показывать значение калиброванного международного нормализованного отношения, равное 1,00, а цитрированная кровь, которая согласно информации от лаборатории центральной больницы имела международное нормализованное отношение 2,3, должна показывать значение калиброванного международного нормализованного отношения, равное 2,30. Как и в предыдущем примере, разность (в альтернативном варианте может быть использовано частное) полученных значений калиброванного международного нормализованного отношения рассматривалась как мера концентрации антикоагулянта, в данном случае концентрации апиксабана, и по двум из трех возможных разностей значений калиброванного международного нормализованного отношения показаны графически как функция от концентрации апиксабана на фиг. 5 и фиг. 6. Кривая с квадратами отражает разницу значений калиброванного международного нормализованного отношения, полученных в процедурах с образцами 20 мкл и 5 мкл, а кривая с точками отражает разницу значений калиброванного международного нормализованного отношения, полученных в процедурах с образцами 10 мкл и 5 мкл. На фиг. 6 часть графика, изображенного на фиг. 5, изображена в увеличенном масштабе.

Дозозависимые эффекты определения антикоагулянта согласно предлагаемому изобретению показывают хорошие положительные характеристики, имеющие клинический интерес, в диапазоне концентраций апиксабана в

крови. Если значение калиброванного международного нормализованного отношения меньше единицы, то дозозависимый эффект и в этом случае имеет линейный характер, как можно видеть на фиг. 6.

5

Пример 3

Дабигатран – это активное соединение, образующееся в живом организме после перорального приема препарата «Прадакса» (производство компании «Бёрингер-Ингельхайм»), содержащего дабигатран-этексилат.

10 Представляющие клинический интерес концентрации в плазме крови находятся в диапазоне от 50 мкг/л до 1000 мкг/л. Такие образцы получали добавлением малых объемов маточного раствора дабигатрана к нормальной плазме крови (NKP). Результаты, полученные путем измерений и путем обработки данных, сведены в помещаемую ниже Таблицу 4.

15

Таблица 4

				0,95	0,94	0,96			
				1,32	1,12	0,98			
дабигатран	INR	INR	INR	INR _c	INR _c	INR _c	ΔINR	ΔINR	1
мкг/л	Образец 20 мкг/л	Образец 10 мкг/л	Образец 5 мкг/л	Образец 20 мкг/л	Образец 10 мкг/л	Образец 5 мкг/л	20 мкл – 5 мкл	10 мкл – 5 мкл	INR _o
1000	7,03	3,55	2,53	12,47	3,89	2,39	10,08	1,51	0,88
800	4,22	2,50	1,81	6,36	2,62	1,72	4,64	0,91	0,81
533	2,38	1,70	1,44	2,98	1,70	1,37	1,61	0,33	1,04
355	1,82	1,44	1,28	2,09	1,41	1,22	0,87	0,19	1,03
236	1,53	1,30	1,17	1,67	1,26	1,12	0,55	0,14	0,98
157	1,31	1,19	1,13	1,36	1,14	1,08	0,28	0,06	1,02
105	1,22	1,13	1,10	1,24	1,07	1,05	0,18	0,02	1,03
52	1,16	1,09	1,05	1,16	1,03	1,01	0,15	0,03	0,98
0	1,04	1,06	1,05	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	
NKP	1,04	1,06	1,05	1,000	1,000	1,000	0,00	0,00	
NKP 1:2	1,31	1,39	1,43	1,357	1,357	1,357	0,00	0,00	

20 При сравнении данных, приведенных в Таблице 4, с соответствующими данными, приведенными в Таблице 1 Примера 1, создается впечатление, что в этом варианте осуществления предлагаемого изобретения имеет место более низкая чувствительность к дабигатрану, чем к аписабану в плазме. Это впечатление усиливается при сравнении графиков, изображенных на фиг. 7 и фиг. 8, с соответствующими графиками, относящимися к Примеру 1.

25 Показывающая бóльшую чувствительность разность значений калиброванного международного нормализованного отношения (результат для образца 20 мкл минус результат для образца 5 мкл) в линейной части графика

(см. график на фиг. 8, который является частью графика на фиг. 7 в увеличенном масштабе) достигает величины 0,5 при концентрации дабигатрана приблизительно 200 мкг/л, в то время как в случае аписабана то же самое достигается при концентрации аписабана приблизительно 80 мкг/л (см.

5 фиг. 2), то есть, имеет место разница в чувствительности более, чем в два раза. Тем не менее, оказываются определяемыми концентрации дабигатрана 50 мкг/л. Не удивительно, что предлагаемый пробирный анализ для определения антикоагулянтов проявляет разную чувствительность к разным антикоагулянтам. Кроме того, ожидается, что разная чувствительность будет
10 иметь место при разных реагентах, а также при разных температурах, при которых выполняются процедуры по определению протромбинового времени.

15 **Пример 4**

Гепарин относится к антикоагулянтам, с трудом поддающимся надежному определению в местах оказания медицинской помощи, например, в хирургических палатах. Есть потребность в более удобных способах определения этого антикоагулянта. Применимость предлагаемого пробирного анализа
20 по определению антикоагулянтов на примере гепарина будет проиллюстрирована ниже. В рассматриваемом примере использовали нефракционированный гепарин, который часто используют в экстенсивной хирургии в качестве антитромботического агента.

Образцы готовили путем добавления малых объемов маточного
25 раствора гепарина к нормальной плазме (НKP). Выбранные значения калиброванного международного нормализованного отношения 1,000 и 1,357 были назначены, соответственно, нормальной плазме НKP и разбавленной плазме НKP 1:2, как и рассмотренных выше Примере 1 и Примере 3. Детали эксперимента те же, что и в Примере 1 и Примере 3, а результаты, полученные как
30 измерениями, так и обработкой данных, сведены в помещаемую ниже Таблицу 5.

Таблица 5

				0,95	0,94	0,96			
				1,32	1,12	0,98			
Гепарин	INR	INR	INR	INRc	INRc	INRc	ΔINR	ΔINR	0,43
ЕД/мл	Образец 20 мкг/л	Образец 10 мкг/л	Образец 5 мкг/л	Образец 20 мкг/л	Образец 10 мкг/л	Образец 5 мкг/л	20 мкл – 5 мкл	10 мкл – 5 мкл	INRo
5	6,47	2,10	1,35	11,17	2,16	1,29	9,88	0,87	0,91
2,5	2,46	1,40	1,13	3,12	1,37	1,08	2,04	0,29	0,96
1,2	1,47	1,19	1,11	1,58	1,14	1,06	0,52	0,08	1,03
0,6	1,26	1,12	1,08	1,29	1,06	1,03	0,26	0,03	1,02
0	1,04	1,06	1,05	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
НКР	1,04	1,06	1,05	1,00	1,00	1,00			
НКР 1:2	1,31	1,39	1,43	1,36	1,36	1,36			

Графическое представление измерений концентрации антикоагулянта в нормальной плазме по разности (в альтернативном варианте может быть использовано частное) полученных значений калиброванного международного нормализованного отношения для двух разностей из трех возможных в зависимости от концентрации гепарина нашло выражение в графиках, изображенных на фиг. 9 и фиг. 10. Как можно видеть из Таблицы 5 и графиков на фиг. 9 и фиг. 10, гепарин может быть определен при концентрации приблизительно 0,2 ЕД/мл и был определен в диапазоне концентраций от 0,2 ЕД/мл до 5 ЕД/мл, что имеет клиническую значимость.

Пример 5

Согласно предлагаемому пробирному анализу, калибровке подвергают две или больше процедур определения протромбинового времени, из которых в одной используют более высокое содержание образца, чем в других, чтобы добиться насколько возможно одного и того же протромбинового времени для эталонных образцов, в которых отсутствуют антикоагулянты, представляющие интерес, то есть, которые не содержат антикоагулянтов, которые не могут быть определены этим пробирным анализом. По определению значения протромбинового времени для эталонных образцов – это либо средние значения для группы эталонных образцов, либо индивидуальные значения для этих образцов.

В рассматриваемом примере использовали эталонные образцы двух типов: образцы плазмы от здоровых индивидуумов (в количестве 34) и образцы плазмы от пациентов, получающих лечение варфарином (в количестве 30). Значения протромбинового времени определяли путем эталонных

анализов, выполненных в центральной лаборатории университетского госпиталя города Линчёпинг, Швеция. У здоровых индивидуумов среднее эталонное протромбиновое время составляло 23,1 с, а у пациентов, получающих лечение варфарином, среднее эталонное протромбиновое время составляло
5 51,5 с.

При выполнении осуществляемых согласно предлагаемому пробирному анализу процедур определения протромбинового времени в одном случае к 200 мкл реагента добавляли 20 мкл образца (более высокое содержание образца в реакционной смеси), а в другом к 200 мкл того же реагента добавляли 5 мкл образца (более низкое содержание образца в реакционной смеси). В результате этих двух процедур были получены, соответственно, средние значения протромбинового времени 32,8 с и 65,3 с в случае эталонных образцов, взятых у здоровых индивидуумов, и 41,8 с и 104,3 с в случае эталонных образцов, взятых у пациентов, проходящих лечение варфарином.
10
15 Затем обе процедуры, процедура с 20 мкл и процедура с 5 мкл, были калиброваны таким образом, чтобы они показывали одно и то же среднее протромбиновое время (в условных, расчетно-аналитических, секундах) как эталонная процедура для обоих наборов эталонных образцов. Преобразование значений протромбинового времени (PT) упомянутых процедуры с 20 мкл и
20 процедуры с 5 мкл в значения калиброванного протромбинового времени (PTс) осуществлялось с применением констант A20 и B20 и констант A5 и B5, соответственно, по формуле $PTс = A \cdot PT \cdot \exp B$. Разницу в значениях калиброванного протромбинового времени для каждого образца при обеих процедурах, выраженную как в виде отношения ($PT_{20с} / PT_{5с}$), так и в виде разности ($PT_{20с} - PT_{5с}$) рассчитывали и строили графики ее зависимости от средних значений протромбинового времени для обеих процедур (см. фиг. 11 и
25 фиг. 12).

Два из эталонных образцов, взятых от пациентов, получающих лечение антикоагулянтом (на графиках обозначены косыми крестиками (x)), дали значения разницы, выходящие за пределы нормального статистического
30 распределения значений, образуемого другими эталонными образцами (на графиках обозначены квадратами). Упомянутые отклоняющиеся образцы могут содержать антикоагулянт гепарин, который может быть определен предлагаемым пробирным анализом (см. Пример 4), и который используют для

лечения некоторых госпитализированных пациентов, получающих варфарин, когда лечение варфарином неэффективно.

5 Можно по выбору использовать или отношение (фиг. 11), или разность (фиг. 12) полученных с помощью двух процедур предлагаемого пробирного анализа калиброванных значений протромбинового времени. Здесь прояв-
ляется преимущество формы представления разницы в виде отношения, и это преимущество состоит в том, что среднее квадратическое отклонение в диапазоне нормальных значений протромбинового времени приблизительно то же самое, что и в диапазоне повышенных значений протромбинового вре-
10 мени, а именно, 0,054 и 0,044, соответственно. Отношения значений протромбинового времени для взятых у пациентов образцов, подозрительных на наличие гепарина, показали отклонения в 3,0 и 4,5 раза от среднее квадратического отклонения для других 28 взятых у пациентов образцов. Два отклонения – это статистически маловероятно ($p < 0,05$), чтобы быть частью рас-
15 пределения отношения калиброванных значений протромбинового времени, задаваемого другими пациентскими образцами.

Та же самая экспериментальная установка, которую использовали для анализа 34 эталонных образцов плазмы, взятых у здоровых индивидуумов, и 30 эталонных образцов плазмы, взятых у пациентов, получающих лечение
20 варфарином, была использована для анализа образцов плазмы (в количестве 13), взятых у пациентов, проходящих лечение дабигатраном (пероральный антикоагулянт – не антагонист витамина К, являющийся ингибитором тромбина) или находящихся на стадии начала такого лечения. Упомянутые 13 пациентских образцов плазмы были взяты из отделения терапии острых
25 заболеваний университетского госпиталя города Линчёпинг, Швеция.

На фиг. 13 и фиг. 14 можно видеть для каждого образца пациентской плазмы разницу в значениях калиброванного протромбинового времени PT_{20c} и PT_{5c} (косые крестики (x)), выраженную как в виде отношения (на
фиг. 13), так и в виде разности (на фиг. 14), наносили на графики для эта-
30 лонных образцов (квадратики).

Три пациента, получающих лечение пероральным антикоагулянтом – не антагонистом витамина К, показали разницу калиброванных значений протромбинового времени, которая вышла в сторону повышения за пределы нормального распределения, заданного эталонными образцами. Согласно

установленной процедуре определения дабигатрана, а именно, процедуре «разбавленного» тромбинового времени dTT (аббревиатура от diluted thrombin time – «разбавленное» тромбиновое время), упомянутые три образца, которые показали повышенную разницу калиброванных значений протромбинового времени, содержали дабигатран в концентрациях 172 мкг/л, 224 мкг/л и 350 мкг/л. Остальные десять образцов плазмы, взятой у пациентов, получающих лечение пероральным антикоагулянтом – не антагонистом витамина К, ни один из которых не показал повышенной разницы калиброванных значений протромбинового времени, содержали дабигатран, определенный по процедуре «разбавленного» тромбинового времени, в концентрации ниже 30 мкг/л.

Интересно, что из 13 образцов, взятых у дабигатрановых пациентов, было несколько образцов, показавших повышенные калиброванные значения протромбинового времени как при процедуре с 20 мкл, так и при процедуре 5 мкл, но при этом не было существенной разницы между процедурами. Результаты согласуются с влиянием лечения варфарином, но не дабигатраном. Таким образом, предлагаемый пробирный анализ по определению антикоагулянтов обеспечивает возможность сделать различие. Таким образом, предлагаемый пробирный анализ обеспечивает возможность дать количественную оценку как протромбинового времени, так и концентрации перорального антикоагулянта – не антагониста витамина К в образце. Признаком отсутствия дабигатрана (меньше 30 мкг/л) в образцах явилась незначительная разница в калиброванных значениях протромбинового времени. Результат был подтвержден с помощью установленной процедуры (процедура «разбавленного» тромбинового времени) для определения дабигатрана. Все десять из 13 образцов с незначительной разницей протромбинового времени, полученной с помощью предлагаемого пробирного анализа, содержали дабигатран в концентрации ниже 30 мкг/л согласно процедуре «разбавленного» тромбинового времени.

При выполнении предлагаемого пробирного анализа обе процедуры определения протромбинового времени, одну с высоким и одну с низким содержанием образца в реакционной смеси, калибруют для численного выражения эталонных уровней протромбинового времени. В рассматриваемом примере значения протромбинового времени, полученные в результате двух

процедур данного пробирного анализа, калибровали, чтобы получить расчетно-аналитические значения протромбинового времени, не в секундах, а в виде численных значений, соответствующих протромбиновому времени в секундах, полученному с помощью эталонной процедуры. Если протромбиновое время эталонных образцов выражено в виде международного нормализованного отношения, то процедуры согласно предлагаемому изобретению калибруют, чтобы получить значение, насколько возможно близкое к значению международного нормализованного отношения для эталонных образцов. Если для эталонных образцов их эталонное протромбиновое время выражено в процентах от нормального протромбинового времени, то эти значения используют при калибровке.

Пример 6

Как и в рассмотренном выше Примере 5, в данном примере при осуществлении предлагаемого пробирного анализа выполняли две или больше процедур определения протромбинового времени, в одной из которых содержание образца в реакционной смеси было выше, чем в другой (других), для получения эталонного протромбинового времени обе процедуры калибровали с помощью двух наборов эталонных образцов, из которых 34 образца плазмы были взяты у здоровых индивидуумов, а 30 образцов плазмы были взяты от пациентов, получавших лечение варфарином.

Все эталонные значения протромбинового времени были определены в центральной лаборатории университетского госпиталя города Линчёпинг, Швеция. Как и в Примере 5А, из двух процедур определения протромбинового времени в одной реакционную смесь получали введением 20 мкл образца в 200 мкл реагента, а в другой введением 5 мкл образца в 200 мкл реагента. Полученные некалиброванные значения протромбинового времени обозначены соответственно как РТ20 и РТ5, а калиброванные значения протромбинового времени – соответственно как РТ20с и РТ5с.

Кроме того, с помощью таких процедур определения протромбинового времени исследовали образцы плазмы (в количестве 20), взятые у пациентов, получающих лечение дабигатраном в отделении острой терапии университетского госпиталя города Линчёпинг, Швеция. Во всех этих 20 образцах

плазмы концентрация дабигатрана, определенная по установленной процедуре «разбавленного» тромбинового времени, о которой говорилось в Примере 5, была выше 34 мкг/л.

5 На фиг. 15 и фиг. 16 выраженные в виде отношения и полученные до и после калибровки, соответственно, значения разницы между результатами выполненных при осуществлении предлагаемого пробирного анализа процедур определения протромбинового времени нанесены на графики в зависимости от средних значений результатов определения протромбинового времени. На фиг. 15 и фиг. 16 квадратиками показаны результаты для эталонных образцов, а косыми крестиками (x) – результаты для образцов с пероральными антикоагулянтами – не антагонистами витамина К (в данном случае с дабигатраном).

Нормальные эталонные образцы до калибровки (см. фиг. 15) показывают среднее протромбиновое время приблизительно 35 с, а среднее время образцов, взятых от пациентов, получающих лечение варфарином, варьирует от приблизительно 65 с до 110 с. После калибровки (см. фиг. 16) среднее протромбиновое время (среднее РТс) нормальных эталонных образцов составляет 23,1, но не реальных секунд, а условных, расчетно-аналитических, а среднее калиброванное протромбиновое время эталонных образцов, взятых у пациентов, получающих лечение варфарином, варьирует от приблизительно 40 до 70. После калибровки эти средние значения и диапазоны, конечно, почти идентичны тем, которые получены с помощью эталонной процедуры, то есть, они отражают эталонные значения. Из сравнения графиков на фиг. 15 и фиг. 16 очевидно, что результатом калибровки является существенное усовершенствование предлагаемого пробирного анализа для определения антикоагулянтов в крови или в плазме крови. Простой статистический анализ показывает, что приблизительно 80% клинических образцов, содержащих дабигатран (см. фиг. 16), имеют поддающиеся определению концентрации антикоагулянта (отношения калиброванных значений протромбинового времени выше, чем среднее значение плюс удвоенное среднеквадратическое отклонение для нормальных эталонных образцов). До калибровки таких образцов было только 70% (см. фиг. 15). Если бы не было калибровки, то потребовался бы более сложный и менее интуитивно понятный анализ. После калибровки образцы, содержащие дабигатран, показывают разницу

протромбинового времени (разница РТс) в более широком диапазоне и становятся более подходящими для количественного определения концентрации пероральных антикоагулянтов – не антагонистов витамина К. Не менее важной является логика, закладываемая оператором в пробирный анализ.

- 5 После калибровки процедура определения протромбинового времени с более высоким содержанием образца в реакционной смеси показывает более высокие значения протромбинового времени для образцов с антикоагулянтами, чем процедура определения протромбинового времени с более низкой концентрацией образца в реакционной смеси, – если образцы не содержат
- 10 антикоагулянтов в поддающихся определению концентрациях, то две процедуры определения протромбинового времени, конечно, покажут приблизительно идентичные результаты. Без калибровки такой простой логики нет.

Две процедуры определения протромбинового времени, выполняемые в ходе предлагаемого процедурного анализа, могут быть откалиброваны,

15 чтобы показать эталонные значения протромбинового времени эталонных образцов независимо от того, в каком виде выражены эти эталонные значения. Эти эталонные значения протромбинового времени могут быть выражены, как в рассматриваемом примере, в секундах, или же они могут быть выражены в единицах международного нормализованного отношения, то есть,

20 как отношение протромбинового времени испытуемого образца к нормализованному протромбиновому времени. Во всех случаях калибровка возможна и представляется обеспечивающей преимущество.

25 **Пример 7**

Примеры 5 и 6 продемонстрировали потребность в повышении чувствительности используемого пробирного анализа по определению антикоагулянтов, так как только 80% клинических образцов с концентрацией дабигатрана выше 30 мкг/л (определенной согласно установленной процедуре «разбавленного» тромбинового времени) показали концентрации антикоагулянта выше порога чувствительности пробирного анализа (см. фиг. 16)

30 (следует заметить, что этот порог чувствительности находится практически на горизонтальной линии на уровне 1,1).

В рассматриваемом примере описываются эксперименты, выполняемые с целью повышения чувствительности пробирного анализа. В помещаемой ниже Таблице 6 сведены данные, полученные в результате экспериментов, в которых жидкий реагент для определения протромбинового времени (партия Р161) содержал хлорид кальция (CaCl) в различных концентрациях, а именно, 4 мМ, 8 мМ, 16 мМ или 32 мМ. С каждым реагентом с помощью предусмотренных предлагаемым пробирным анализом процедур определения протромбинового времени (процедура-20 мкл и процедура-5 мкл) анализировали три образца. Два из этих образцов были эталонными, в них были использованы контрольные плазмы NKP и ZAP, и для них были установлены значения международного нормализованного отношения 1,00 и 2,50, соответственно. Третий образец состоял из нормальной плазмы NKP, к которой был добавлен малый объем маточного раствора апиксабана, так что концентрация апиксабана составила 500 мкг/л. Затем результаты, полученные с каждым реагентом, калибровали, чтобы получить калиброванное значение международного нормализованного отношения 1,00 для NKP и 2,50 для ZAP. Образцы NKP с апиксабаном 500 мкг/л (условное обозначение «образцы NKP+500») в результате показывали различные значения INR20с и INR5с. Для каждого реагента вычисляли разницу, выраженную в виде отношения INR20с/INR5с, которая отображена в Таблице 6 в предпоследнем столбце.

Чтобы получить меру чувствительности, порог чувствительности оценивали из отношения INR20с/INR5с, которое наблюдалось для образца NKP+500. Эта оценка делалась, исходя из следующих предположений: (i) среднеквадратичное отклонение для отношений нормальных эталонных плазм составляло 0,052 для всех реагентов (это значение получали из данных, приведенных в Таблице 6) и (ii) значение отношения, уменьшенное на единицу, возрастает от нуля пропорционально концентрации дабигатрана. При этих предположениях порог чувствительности для каждого реагента вычисляли как концентрацию дабигатрана, при которой отношение достигает значения единица плюс $0,104(2*SD)$. Вычисленные значения порога чувствительности приведены в последнем столбце Таблицы 6.

Самый высокий порог чувствительности (сама низкая чувствительность), приблизительно 94 мкг/л, был получен с реагентом, содержащим хлорид кальция (CaCl) в концентрации 4 мМ. Для реагента, содержащего хлорид

кальция (CaCl) в концентрации 8 мМ, чувствительность была выше, а порог чувствительности составлял 70 мкг/л, а для реагента, содержащего хлорид кальция (CaCl) в концентрации 16 мМ, чувствительность была еще выше, а порог чувствительности составлял 38 мкг/л. У реагентов, содержащих хлорид кальция (CaCl) в более высоких концентрациях (24 мМ и 32 мМ) не происходит дальнейшего повышения чувствительности и порог чувствительности остается практически на том же уровне, что и у реагента, содержащего хлорид кальция (CaCl) в концентрации 16 мМ.

10

Таблица 6

Реагент	Добавлено Ca ²⁺ (мМ)	Процедура 20 мкг/л	Процедура 5 мкг/л	Процедура 20 мкг/л	Процедура 5 мкг/л	Процедура 20 мкг/л	Процедура 5 мкг/л	Отношение INR20с / INR5с	апикасан, предел чувствительности (мкг/л)
		НКР	НКР	ЗАР	ЗАР	НКР+500	НКР+500		
		INR20с	INR5с	INR20с	INR5с	INR20с	INR5с		
P161 без Ca ²⁺	4	1,00	1,00	2,50	2,50	1,83	1,18	1,55	94
P161 без Ca ²⁺	8	1,00	1,00	2,50	2,50	2,15	1,23	1,75	70
P161 без Ca ²⁺	16	1,00	1,00	2,50	2,50	3,15	1,33	2,37	38
P161 без Ca ²⁺	24	1,00	1,00	2,50	2,50	3,30	1,41	2,34	39
P161 без Ca ²⁺	32	1,00	1,00	2,50	2,50	3,38	1,49	2,27	41

Из Таблицы 6 можно видеть, что повышение концентрации ионов кальция в реагенте для определения протромбинового времени в диапазоне от приблизительно 10 мМ до 50 мМ приводит к повышению чувствительности предлагаемого пробирного анализа для определения антикоагулянтов. Это проявляется в виде понижения порога чувствительности. По причине того, что реагент оказывается разбавленным добавленным образцом лишь в малой степени (при процедуре-20 мкл разбавлен приблизительно на 10%, а при процедуре-5 мкл – приблизительно на 3%), содержание ионов кальция в реакционной смеси приблизительно то же самое, что и в реагенте для определения протромбинового времени. Эти результаты удивительны и неожиданны, так как при выполнении стандартных процедур определения протромбинового времени концентрация ионов кальция в реакционной степени обычно составляет приблизительно 8 мМ. Такая концентрация обычно достигается при добавлении к реагенту для определения протромбинового времени рас-

25

творимой соли кальция (в данном случае хлорида кальция, CaCl_2), но возможны и другие источники ионов кальция, в частности, гидроксид кальция, лактат кальция и другие растворимые соли кальция, не содержащие агрессивных анионов. Возможно использование даже металлического кальция, хотя это и не является практичным решением.

Повышение концентрации ионов кальция в реакционной смеси для определения протромбинового времени приводило к последовательному увеличению времени, требующегося для достижения точки коагуляции, то есть, времени свертывания крови. Для процедуры-5 мкл и образца НКР (международное нормализованное отношение 1,00) время свертывания крови для концентраций ионов кальция в реакционной смеси 4 мМ, 8 мМ, 16 мМ, 24 мМ и 32 мМ составляло, соответственно, 42,1 с, 47,4 с, 52,5 с, 70,1 с и 82,1 с. Повышение концентрации ионов кальция выше уровня, который необходим для обеспечивающего преимущество повышения чувствительности пробирного анализа по причине увеличения времени свертывания крови представляется обеспечивающим преимущество. По этой причине предпочтительное значение концентрации ионов кальция находится в диапазоне от 10 мМ и 30 мМ или даже в диапазоне от 10 мМ и 24 мМ.

При реакциях свертывания крови функцию ионов кальция часто могут вместо них выполнять ионы магния. Это верно и в данном случае. Поэтому установленные пределы концентрации ионов кальция можно рассматривать как пределы суммы концентраций ионов кальция и ионов магния.

В дополнительных экспериментах, направленных на повышение чувствительности предлагаемого пробирного анализа для определения антикоагулянтов в крови и в плазме крови, концентрацию хлорида натрия (NaCl) в реагенте для определения протромбинового времени повышали до величин, при которых упомянутый реагент для определения протромбинового времени становился гипертоническим (когда его осмотическое давление выше, чем осмотическое давление плазмы крови и других физиологических жидкостей), вследствие чего гипертонической становилась и реакционная смесь. Это повышало чувствительность предлагаемого пробирного анализа для определения антикоагулянтов в крови и в плазме крови. Это повышение чувствительности пробирного анализа за счет повышения осмоляльности тоже имеет пределы, так как при слишком высоких концентрациях хлорида натрия

(NaCl) время свертывания крови может стать слишком долгим. На практике для повышения чувствительности пробирного анализа осмоляльность реакционной смеси может быть повышена настолько, чтобы она попала в диапазон от 0,3 осмоль/кг до 0,5 осмоль/кг, или приблизительно от 0,3 осмоль/кг до 5 0,4 осмоль/кг. Обычно осмоляльность реакционных смесей, используемых в процедурах для определения протромбинового времени, весьма близки к физиологической осмоляльности 0,308 осмоль/кг, так же как и раствор хлористого натрия (NaCl) в концентрации 0,154 мМ.

Возможны также такие решения, при которых для достижения как мож- 10 но более высокой чувствительности пробирного анализа описанные выше приемы скомбинированы. Реакционная смесь может быть сделана гипертонической путем добавления хлорида натрия (NaCl) до достижения осмоляль-ности в диапазоне от 0,3 осмоль/кг до 0,4 осмоль/кг, а концентрация ионов кальция при этом может быть в диапазоне от 12 мМ до 30 мМ.

15

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пробирный анализ для определения антикоагулянтов в образцах
крови или плазме крови, содержащий стадии анализа, включающие по
5 меньшей мере две процедуры мокрой химии для определения протромбино-
вого времени, при этом

(а) на первой стадии определения протромбинового времени выпол-
няют измерение протромбинового времени с помощью первой процедуры,
проводимой с использованием первой реакционной смеси, полученной раз-
10 бавлением первого объема крови или плазмы крови первым объемом жидко-
го реагента, содержащего тромбопластин, фибриноген и фактор V свертыва-
ния крови,

(б) на второй стадии определения протромбинового времени выпол-
няют измерение протромбинового времени с помощью второй процедуры,
15 проводимой с использованием второй реакционной смеси, полученной раз-
бавлением второго объема крови или плазмы крови вторым объемом жидко-
го реагента, при этом содержание крови или плазмы крови во второй реакци-
онной смеси отличается от содержания крови или плазмы крови в первой ре-
акционной смеси,

20 характеризующийся тем, что

упомянутые по меньшей мере две процедуры определения протром-
бинового времени калибруют для

обеспечения идентичных или приблизительно идентичных результатов
определения протромбинового времени путем использования для анализа
25 эталонной крови или плазмы крови, не содержащей антикоагулянтов, пред-
ставляющих интерес с точки зрения пробирного анализа,

при этом дополнительно осуществляют

стадию (в), на которой вычисляют значения разницы в значениях про-
тромбинового времени, полученных на стадиях (а) и (б), при этом если раз-
30 ница в значениях протромбинового времени

(1) значительна, то это считают указанием на присутствие в образце
крови или плазмы крови антикоагулянтов, а если она

(2) незначительна, то это считают указанием на отсутствие в образце крови или плазмы крови антикоагулянтов в концентрациях выше порога чувствительности.

5 2. Пробирный анализ по п.1, в котором, если полученная на стадии (в) разница в значениях протромбинового времени значительна и вид антикоагулянта известен, то концентрацию антикоагулянта в данном образце крови или плазмы крови вычисляют.

10 3. Пробирный анализ по п.1, в котором, если полученная на стадии (в) разница в значениях протромбинового времени незначительна и вид антикоагулянта известен, то концентрацию антикоагулянта в данном образце крови или плазмы крови назначают.

15 4. Пробирный анализ по любому из пп.1 или 2, в котором, если полученная на стадии (в) разница в значениях протромбинового времени значительна, то вычисляют оценочное значение протромбинового времени для образца крови или плазмы крови, в котором отсутствуют антикоагулянты.

20 5. Пробирный анализ по любому из пп.1-4, в котором процедуры для определения протромбинового времени выполняют при температуре помещения в диапазоне от 17°C до 45°C, предпочтительно – в диапазоне от 18°C до 30°C, более предпочтительно – в диапазоне от 21°C до 30°C, наиболее предпочтительно – в диапазоне от 25°C до 30°C.

25 6. Пробирный анализ по любому из пп.1-5, в котором антикоагулянты, определяемые с его помощью, принадлежат к группе, включающей ингибиторы прямого действия активированных факторов IIa и Xa свертывания крови, выбранные из следующей подгруппы: дабигатран, апиксабан, ривароксабан, гирудин, или к группе, включающей ингибиторы непрямого действия активированных факторов IIa и Xa свертывания крови, выбранные из следующей подгруппы: фракционированные гепарины, нефракционированные гепарины.

30

7. Пробирный анализ по любому из пп.1-6, в котором первый объем жидкого реагента в первой реакционной смеси равен второму объему жидкого реагента во второй реакционной смеси.

5 8. Пробирный анализ по любому из пп.1-7, в котором объем крови или плазмы крови, разбавленной жидким реагентом, составляет от 1 мкл до 20 мкл.

10 9. Пробирный анализ по любому из пп.1-8, в котором кровь или плазма крови в необходимом объеме вводят в жидкий реагент с помощью капиллярной трубки типа «конец-в-конец».

15 10. Пробирный анализ по любому из пп.1-9, в котором отношение объема крови или плазмы крови к объему жидкого реагента в составе реакционной смеси составляет от 1:2 до 1:200, от 1:5 до 1:100, или от 1:10 до 1:50.

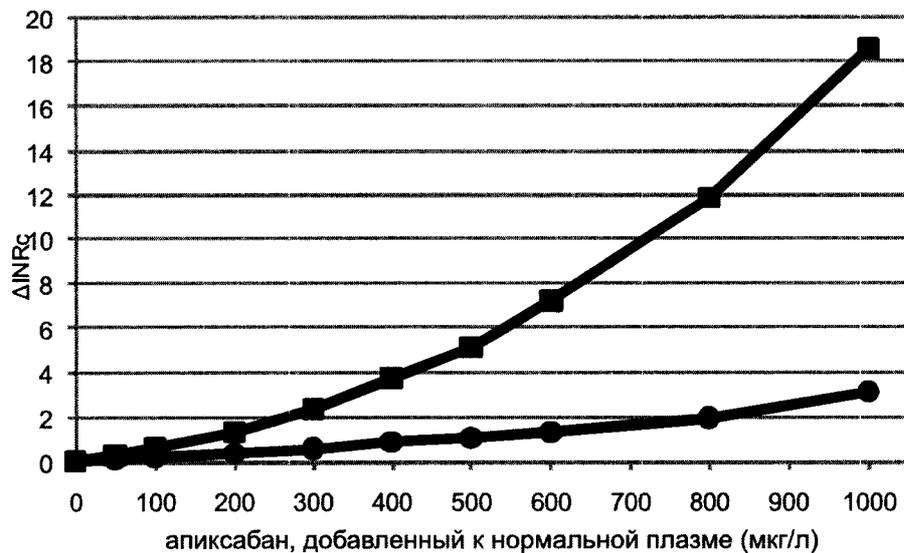
20 11. Пробирный анализ по любому из пп.1-10, в котором содержание крови или плазмы крови в первой реакционной смеси в количестве раз приблизительно от 1,5 до 100, от 1,5 до 50, от 1,5 до 25, от 1,5 до 10, или от 1,5 до 5 выше, чем содержание крови или плазмы крови во второй реакционной смеси.

25 12. Пробирный анализ по любому из пп.1-11, в котором конечная концентрация ионов кальция в реакционной смеси составляет величину в диапазоне от 10 мМ до 50 мМ, в диапазоне от 10 мМ до 30 мМ, или в диапазоне от 10 мМ до 24 мМ.

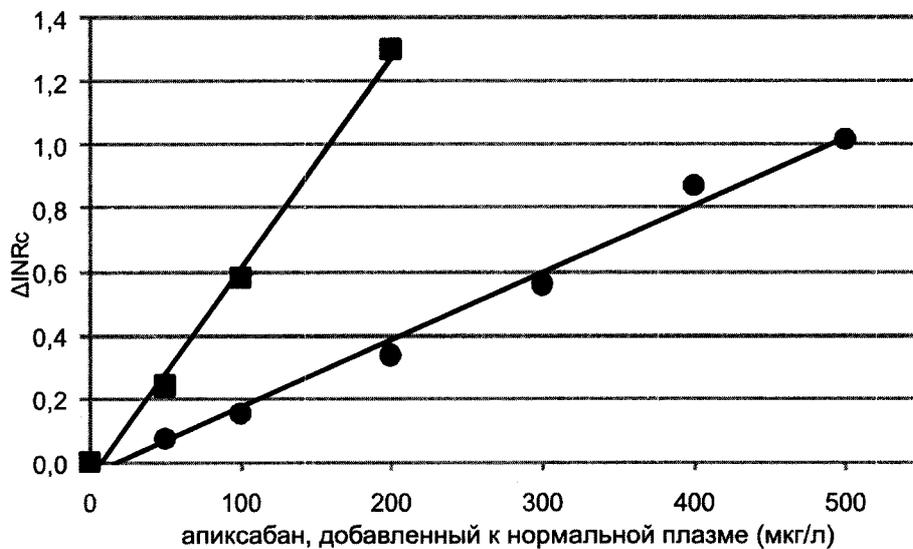
30 13. Пробирный анализ по любому из пп.1-12, в котором осмоляльность реакционной смеси составляет приблизительно от 0,3 осмоль/кг до 0,5 осмоль/кг, или приблизительно от 0,3 осмоль/кг до 0,4 осмоль/кг.

Пробирный анализ для определения антикоагулянтов в крови или в плазме крови

1 / 8



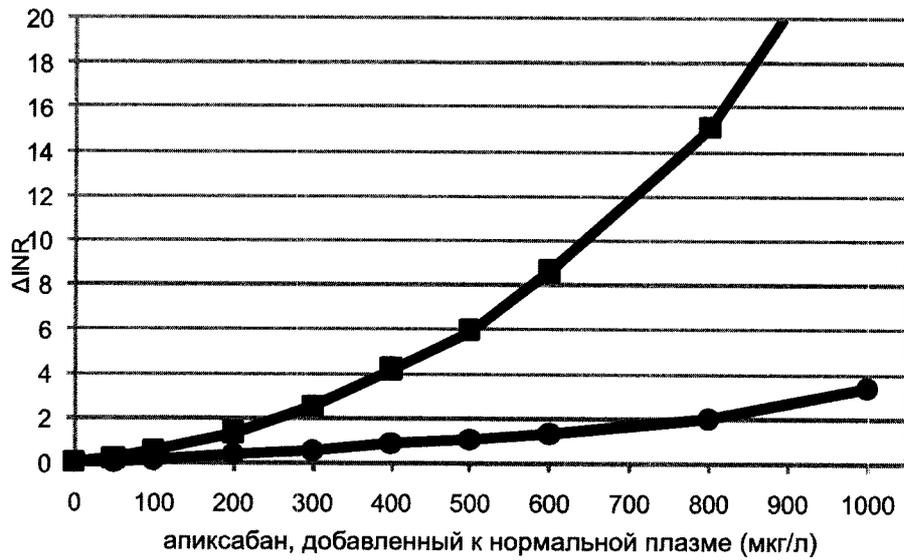
Фиг. 1



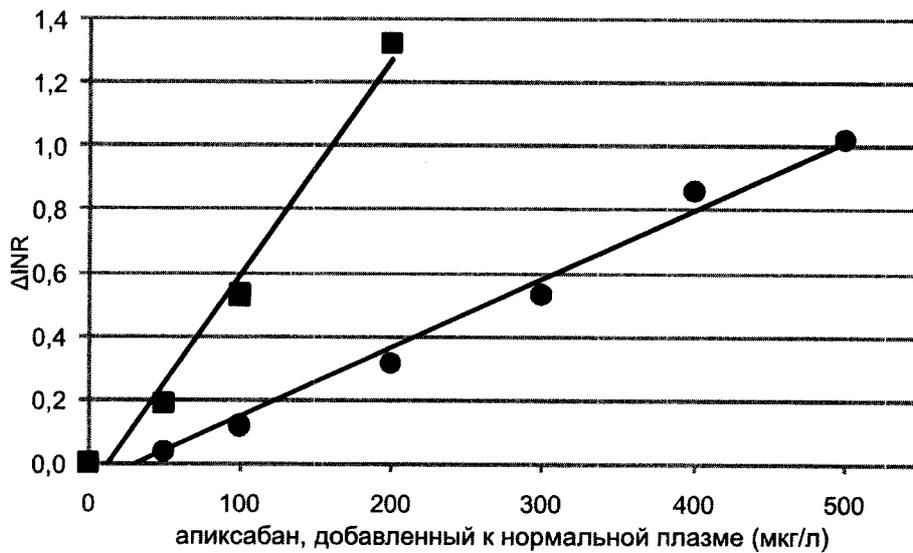
Фиг. 2

Пробирный анализ для определения антикоагулянтов в крови или в плазме крови

2 / 8



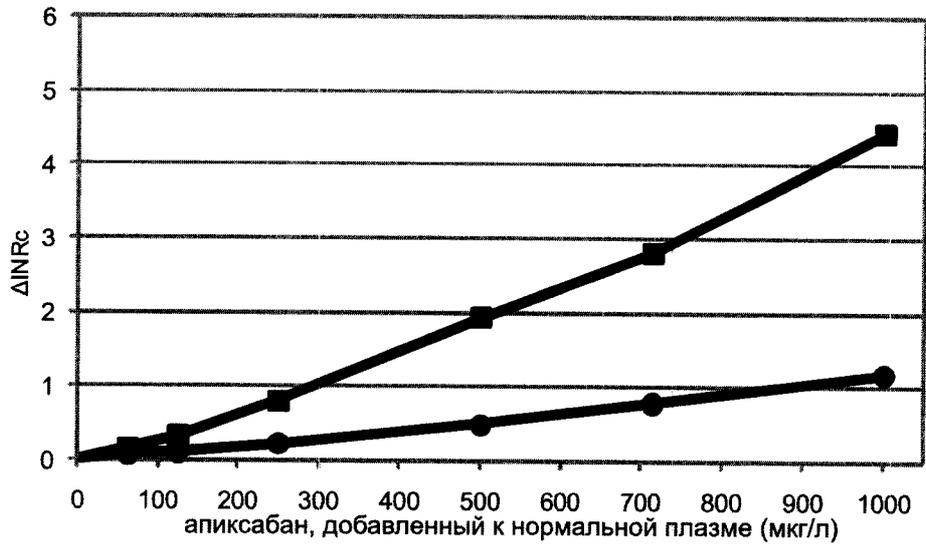
Фиг. 3



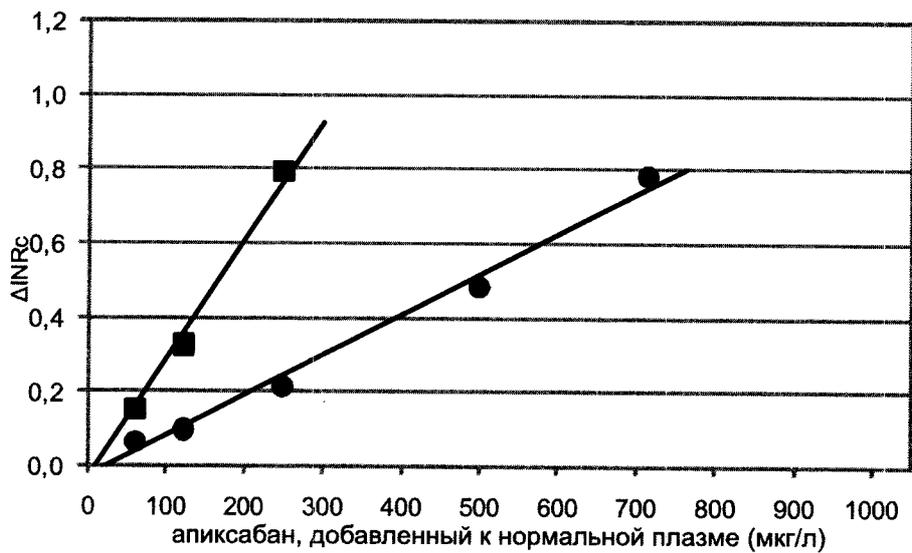
Фиг. 4

Пробирный анализ для определения
антикоагулянтов в крови или в плазме крови

3 / 8



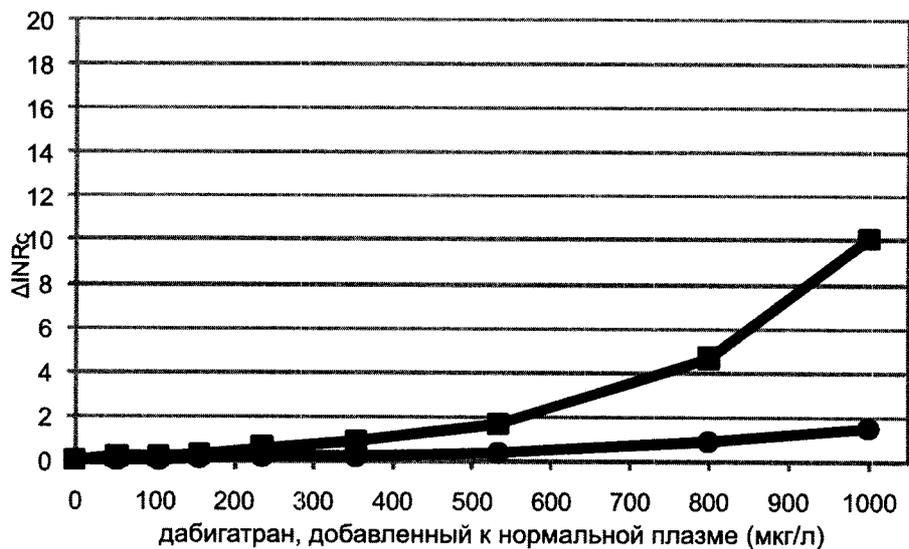
Фиг. 5



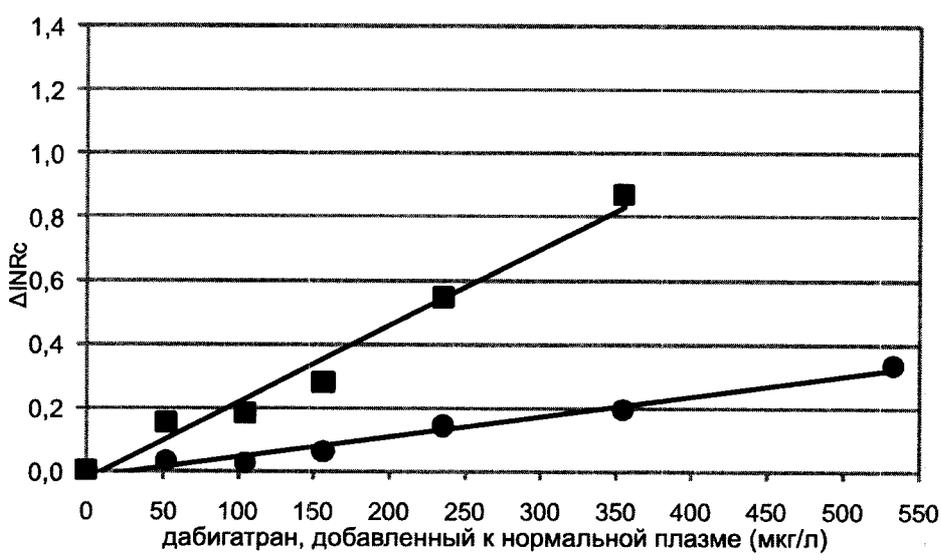
Фиг. 6

Пробирный анализ для определения антикоагулянтов в крови или в плазме крови

4 / 8



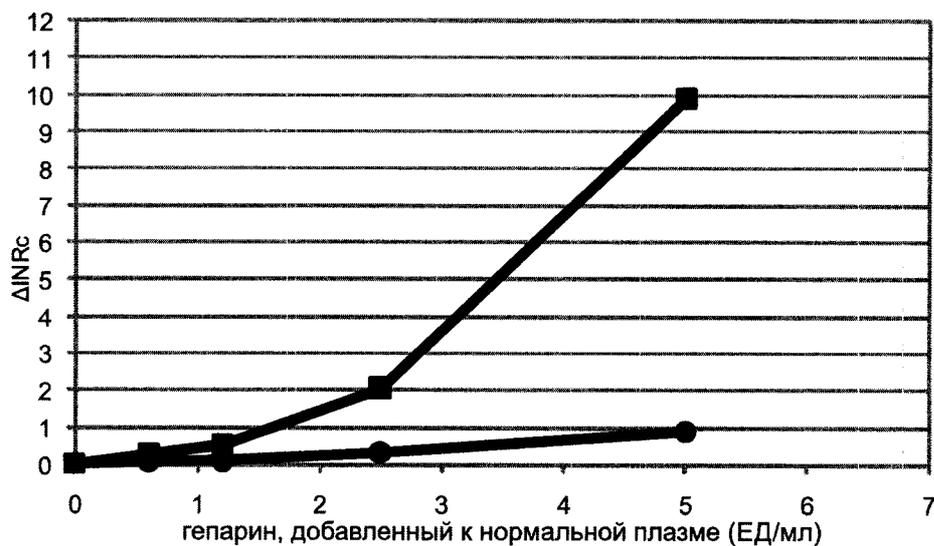
Фиг. 7



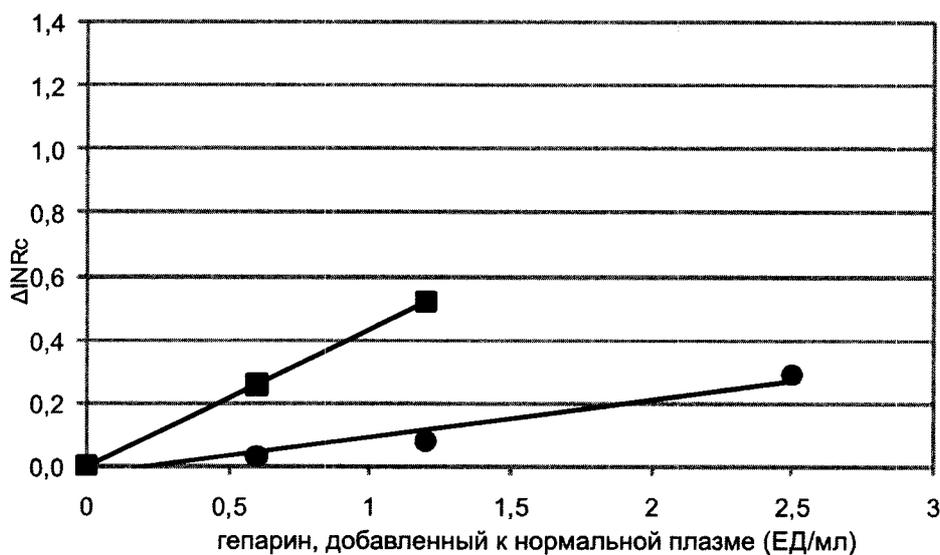
Фиг. 8

Пробирный анализ для определения антикоагулянтов в крови или в плазме крови

5 / 8



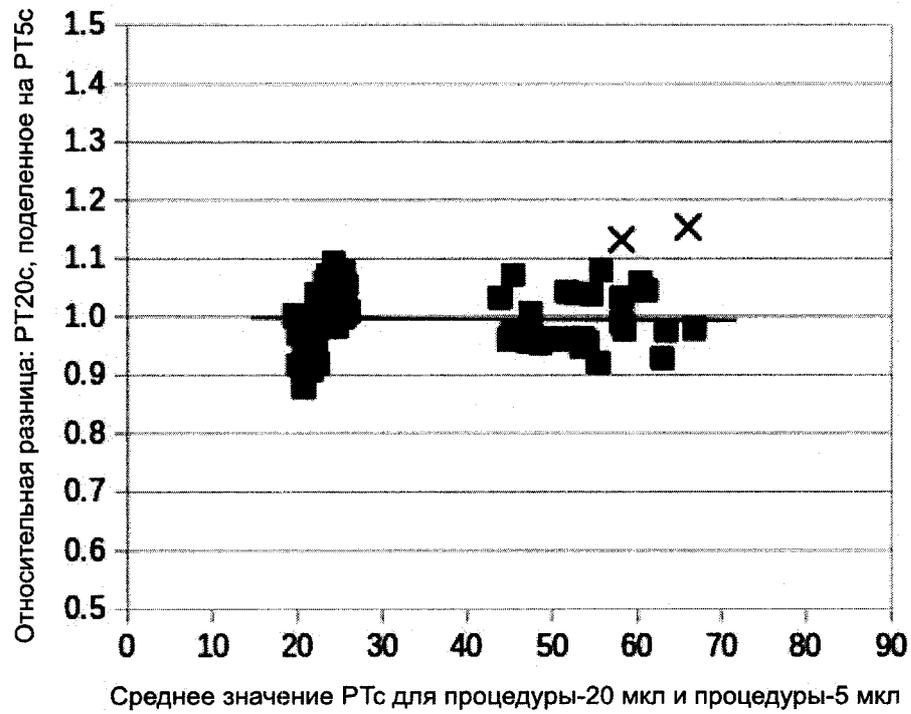
Фиг. 9



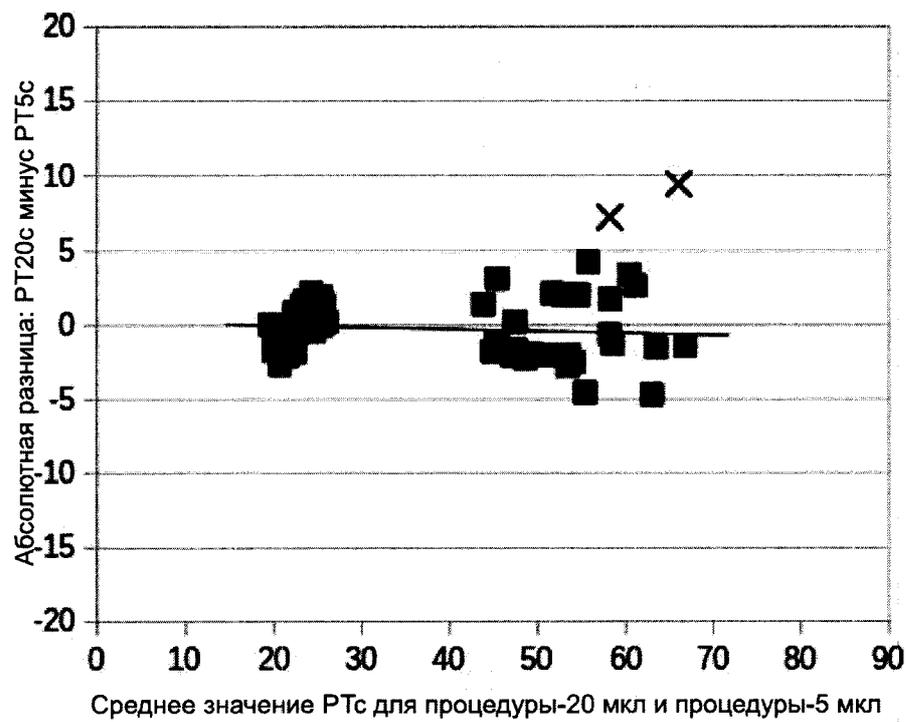
Фиг. 10

Пробирный анализ для определения
антикоагулянтов в крови или в плазме крови

6 / 8



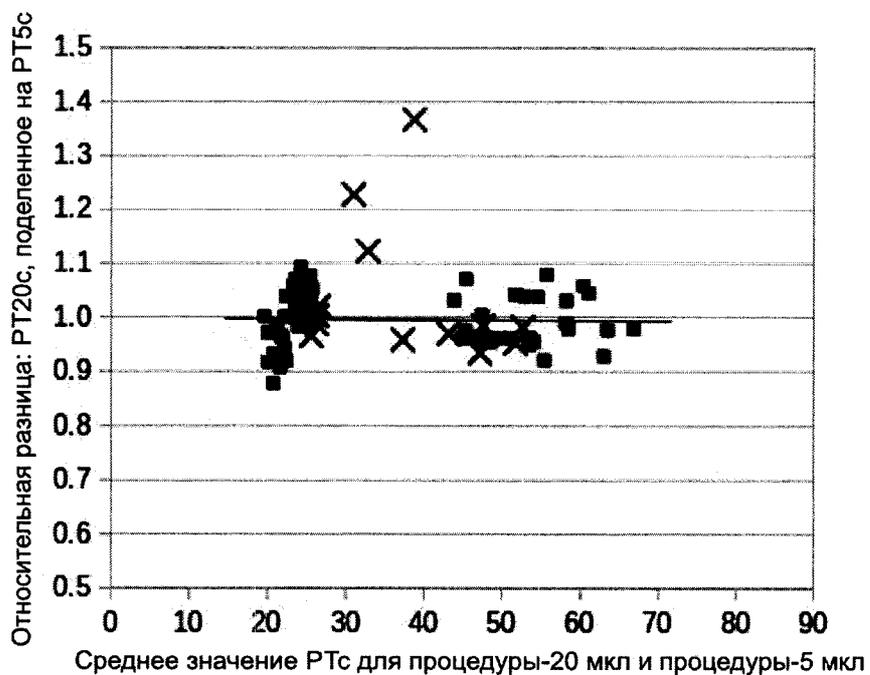
Фиг. 11



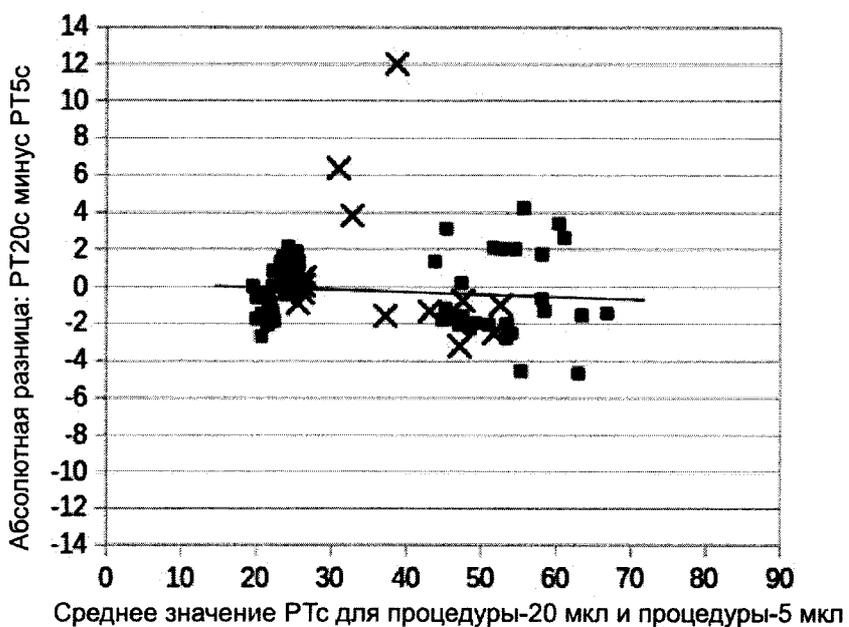
Фиг. 12

Пробирный анализ для определения антикоагулянтов в крови или в плазме крови

7 / 8



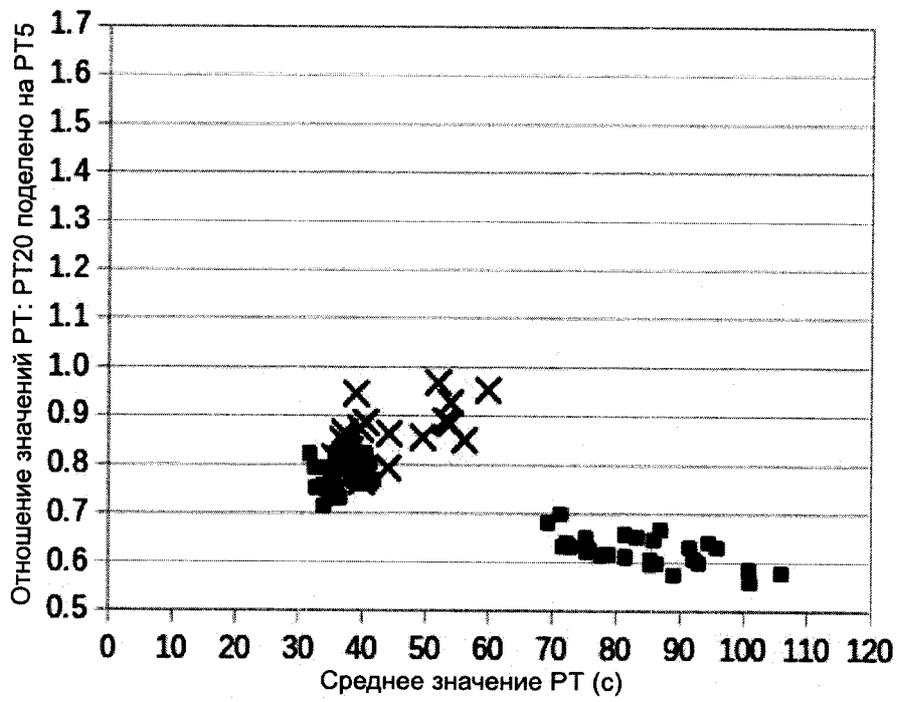
Фиг. 13



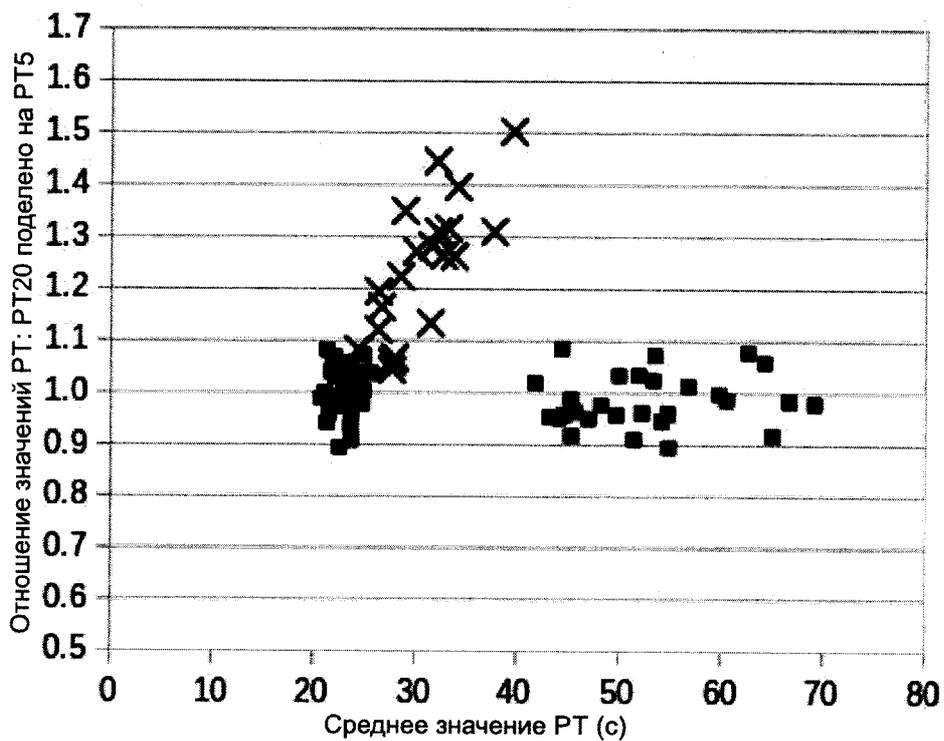
Фиг. 14

Пробирный анализ для определения
антикоагулянтов в крови или в плазме крови

8 / 8



Фиг. 15



Фиг. 16