

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044190**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.07.28

(21) Номер заявки
201991506

(22) Дата подачи заявки
2017.12.22

(51) Int. Cl. **G01N 33/50** (2006.01)
G01N 33/555 (2006.01)

**(54) СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ И СКРИНИНГА С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СВЯЗАННЫХ С СОЕДИНЕНИЯМИ СУБСТРАТОВ**

(31) **62/438,909**

(32) **2016.12.23**

(33) **US**

(43) **2020.01.23**

(86) **PCT/US2017/068352**

(87) **WO 2018/119462 2018.06.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СИРУС КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:
Норт Энн, Муфти Нахид (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) REINHARD HENSCHLER ET AL. "Development of the S-303 Pathogen Inactivation Technology for Red Blood Cell Concentrates", TRANSFUSION MEDICINE AND HEMOTHERAPY, vol. 38, no. 1, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 33-42, XP055455301, CH ISSN: 1660-3796, DOI: 10.1159/000324458, Abstract; p.38-39 "Immune response to S-303-treated red blood cells"

GEISEN ET AL. "P-262: Screening of patients for preexisting antibodies to pathogen inactivated red blood cells", VOX SANGUINIS; ABSTRACTS OF THE 23RD REGIONAL CONGRESS OF BLOOD TRANSFUSION, vol. 105, no. Suppl. 1, 1 June 2013 (2013-06-01), page 156, XP002778725, S. KARGER AG, BASEL, CH; AMSTERDAM, THE NETHERLANDS, the whole document

NORTH ET AL. "P-309: Demonstration of an S-303-induced immune response in a nave rabbit model of chronic transfusion using a sensitive flow cytometry assay", VOX SANGUINIS, vol. 93, no. Suppl. 1, 1 January 2007 (2007-01-01), page 168, XP002778726, the whole document

NORTH ET AL. "SP245: A Modified Process for Preparation of S-303 RBCs for Pathogen Inactivation Substantially Reduces Potential for Reactivity", TRANSFUSION, vol. 46, no. 9S, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 116A-117A, XP002778727, the whole document

Anonymous: "ISBT 2015 PRESENTED AT 25th Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion", 1 January 2015 (2015-01-01), XP055455557, Retrieved from the Internet: URL:<http://interceptbloodsystem.com/sites/default/files/content/events/abstractbook-isbt-2015.pdf>, [retrieved on 2018-03-01] p. 5, 21-23.

(57) Изобретение относится к композициям, способам, наборам и системам для детекции антител в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления способы/системы особенно подходят для детекции антител против эритроцитов, обработанных патоген-инактивирующим соединением, у пациентов.

B1

044190

044190 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной патентной заявке США № 62/438909, поданной 23 декабря 2016 года, содержание которой включено таким образом в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

Область техники

Изобретение относится к системам и способам для тестирования и/или скрининга биологических образцов с использованием связанных с соединениями субстратов, таких как реагентные эритроциты.

Уровень техники

Переливание крови или компонентов крови является всеобщепотребительным в медицинской практике. Как правило, препараты крови тестируют на совместимость между донором и реципиентом перед переливанием или использованием препарата крови для реципиента.

Антигены групп крови являются полиморфными белковыми или углеводными остатками на эритроцитах. Эти антигены могут стимулировать гуморальный ответ у индивидуумов, у которых они отсутствуют, и некоторые антитела (например, клинически значимые антитела) могут приводить к трансфузионной гемолитической реакции или гемолитической болезни. Существует более 300 антигенов групп крови (BGA) на эритроцитах, таким образом, реципиенты при переливании зачастую подвергаются воздействию таких антигенов, и в случае общепринятых переливаний эритроцитов наблюдают иммунные ответы на них. Иммунные ответы чаще возникают у пациентов с многократным воздействием аллогенных эритроцитов и/или некоторыми состояниями (например, SCD, талассемией).

Детекция клинически значимых аллоантител групп крови (тест на совместимость крови донора и реципиента) является основным тестом в рамках тестирования перед переливанием.

Доноров и пациентов, как правило, типировать по ABO и Rh(D), т.к. их считают наиболее важными антигенами для безопасного переливания. Как правило, типирование не осуществляют для минорных антигенов, таких как антигены систем Rh (C/c и E/e), Келл (K/k), Даффи (Fya, Fyb), Кидд (Jka/Jkb) и MNS (M/N и S/s), а плазму подвергают скринингу на антитела против этих антигенов. Если результаты скрининга антител пациента являются отрицательными, единицы для переливания эритроцитов также должны быть ABO- и Rh(D)-совместимыми. Если присутствует антитело против клинически значимого минорного антигена, в единицах дополнительно должен отсутствовать соответствующий антиген. Общепринято скрининговый тест на антитела осуществляют в виде твердофазного анализа адгезии эритроцитов (например, Galileo System, Immucor) или реакции агглютинации в пробирке, такой как, например, антиглобулиновый тест (например, прямой антиглобулиновый тест (DAT), непрямой антиглобулиновый тест (IAT)). Они включают использование эритроцитов человека с известной специфичностью, тестируемых против образцов плазмы или сыворотки. После периода инкубации и, чаще всего, добавления растворов вторичных антител, смесь осматривают на гемагглютинацию. В последнее время этот тест также осуществляют с использованием систем с технологией агглютинации на микропланшетах и колонках, известных в этой области, которые также можно использовать с некоторой степенью автоматизации. Однако существующий тест ограничен диапазоном клинически значимых антител, которые можно определять с помощью него.

Передача заболеваний с препаратами крови и другими биологическими материалами остается серьезной проблемой здравоохранения. Для инактивации патогенов перед переливанием и снижения риска трансфузионных инфекций в препараты крови, такие как тромбоциты и плазма, включают соединения, воздействующие на нуклеиновые кислоты, такие как псоралены и производные псораленов для фотохимической обработки УФ-излучением. Для обработки эритроцитов с целью инактивации патогенов разработаны другие соединения, воздействующие на нуклеиновые кислоты, такие как, например, S-303 (например, амусталин). Соединение S-303 образует ковалентные поперечные связи с нуклеиновыми кислотами контаминирующего патогена и лейкоцитов для блокирования репликации и снижения риска трансфузионных инфекций. Однако некоторое количество этих соединений или их производных потенциально может реагировать с другими нуклеофилами в компонентах эритроцитов, включая нуклеофилы на их поверхности, что в конкретных случаях может приводить к связыванию соединения или его производных (например, остатков) с эритроцитами, например, посредством образования связанных с поверхностью аддуктов. Даже если такие эритроциты с инактивированными патогенами, как правило, считают безопасными и неиммуногенными, соединения или их производные, связанные с эритроцитами, в некоторых случаях могут распознаваться уже существующими антителами или вызывать нежелательные иммунные ответы у некоторых пациентов.

Таким образом, существует потребность в способах/системах для детекции у пациентов антител против эритроцитов, обработанных патоген-инактивирующими соединениями.

Сущность изобретения

Композиции, способы, наборы и системы по настоящему изобретению, помимо другого применения, представляют собой средства для детекции антител в биологическом образце, например, для скрининга потенциальных реципиентов эритроцитов с инактивированными патогенами на уже существующие перекрестные антитела перед инфузией обработанных эритроцитов. В некоторых вариантах осуществления композиции, способы, наборы и системы особенно подходят для детекции у пациентов антител

против эритроцитов, обработанных соединением S-303.

В одном из аспектов изобретение относится к набору, содержащему: (а) первый контейнер, содержащий первый субстрат, где функциональный фрагмент связан с поверхностью первого субстрата, и где функциональный фрагмент выбран из группы, состоящей из соединений любой из формул I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII и IX и их производных или соли или стереоизомера любого из указанных выше соединений; и (b) второй контейнер, содержащий второй субстрат, где на поверхности второго субстрата отсутствует связанный функциональный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент выбран из группы, состоящей из соединений любой из формул I, II, III, VII, VIII и IX и их производных или соли или стереоизомера любого из указанных выше соединений. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент выбран из группы, состоящей из соединений любой из формул IV, V и VI и их производных или соли или стереоизомера любого из указанных выше соединений. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент выбран из группы, состоящей из соединений любой из формул IV(a)-IV(h) и их производных или соли или стереоизомера любого из указанных выше соединений. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент является S-303, производным S-303 или солью любого из указанных выше соединений. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент является труднорасщепляемым аналогом S-303 или его солью. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент, связанный с поверхностью субстрата, присутствует при уровне загрузки по меньшей мере приблизительно 10000 функциональных фрагментов на единицу субстрата. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент, связанный с поверхностью субстрата, присутствует при уровне загрузки по меньшей мере приблизительно 50 функциональных фрагментов/мкм². В некоторых вариантах осуществления соединение и связанный с поверхностью функциональный фрагмент являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления соединение и функциональный фрагмент, связанный с поверхностью, отличаются. В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и второго субстрата содержит полимерную частицу, матрицу или часть аналитического планшета. В некоторых вариантах осуществления первый субстрат содержит эритроциты, где второй субстрат содержит эритроциты, и где эритроциты из первого и второго субстратов получают от одного или более общих доноров. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит третий контейнер, содержащий третий субстрат, где первый уровень функционального фрагмента связан с поверхностью первого субстрата, где второй уровень функционального фрагмента связан с поверхностью третьего субстрата, и где второй уровень меньше первого уровня. В некоторых вариантах осуществления первый уровень функционального фрагмента, связанного с поверхностью первого субстрата, по меньшей мере в 3 раза превышает второй уровень функционального фрагмента, связанного с поверхностью третьего субстрата. В некоторых вариантах осуществления третий субстрат содержит полимерную частицу, матрицу или часть аналитического планшета. В некоторых вариантах осуществления третий субстрат содержит эритроциты, и эритроциты из первого, второго и третьего субстратов получают от одного или более общих доноров. В некоторых вариантах осуществления первый субстрат содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 образцов, где каждый из образцов первого субстрата содержит эритроциты, полученные от другого донора крови, и где второй субстрат содержит соответствующий образец, содержащий эритроциты от каждого из разных доноров крови. В некоторых вариантах осуществления 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 образцов соответствуют множеству групп крови. В некоторых вариантах осуществления первый субстрат и второй субстрат содержат эритроциты, полученные от донора с группой крови O. В некоторых вариантах осуществления первый субстрат, второй субстрат и третий субстрат содержат эритроциты, полученные от донора с группой крови O. В некоторых вариантах осуществления первый субстрат и второй субстрат содержат эритроциты в забуференной суспензионной среде при количестве от приблизительно 0,5% до приблизительно 5% эритроцитов. В некоторых вариантах осуществления первый субстрат, второй и третий субстрат содержат эритроциты в забуференной суспензионной среде при количестве от приблизительно 0,5% до приблизительно 5% эритроцитов. В некоторых вариантах осуществления первый контейнер, содержащий первый субстрат, второй контейнер, содержащий второй субстрат, и/или набор, содержащий первый контейнер и второй контейнер, подходят для хранения при 2-8°C. В некоторых вариантах осуществления первый контейнер, содержащий первый субстрат, второй контейнер, содержащий второй субстрат, и/или набор, содержащий первый контейнер и второй контейнер, подходят для хранения при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления первый контейнер, содержащий первый субстрат, второй контейнер, содержащий второй субстрат, и/или набор, содержащий первый контейнер и второй контейнер, подходят для хранения при температуре менее -20°C.

В другом аспекте изобретение относится к способу получения панели субстратов, включающему: а) получение первого и второго образца, каждый из которых содержит субстрат; и б) обработку субстрата из первого образца соединением, где обработка соединением приводит к связыванию функционального фрагмента с поверхностью субстрата из первого образца; где второй образец не обрабатывают соединением, таким образом, получая панель, содержащую первый образец субстрата со связанным с поверхностью функциональным фрагментом и второй образец субстрата, в котором отсутствует связанный с поверхностью функциональный фрагмент, и где соединение выбрано из группы, состоящей из соединений

любой из формул I, II, III, IV(a)-IV(h), VII, VIII и IX и их производных или соли или стереоизомера любого из указанных выше соединений. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу получения панели полимерных частиц, включающему: а) получение первого и второго образца, содержащих полимерные частицы; и б) обработку полимерных частиц из первого образца соединением, где обработка соединением приводит к связыванию функционального фрагмента с поверхностью частиц из первого образца; где второй образец не обрабатывают соединением, таким образом, получая панель, содержащую первый образец полимерных частиц со связанным с поверхностью функциональным фрагментом и второй образец полимерных частиц, в котором отсутствует связанный с поверхностью функциональный фрагмент, и где соединение выбрано из группы, состоящей из соединений любой из формул I, II, III, IV(a)-IV(h), VII, VIII и IX и их производных или соли или стереоизомера любого из указанных выше соединений. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу получения панели эритроцитов, включающему: а) получение первого и второго образцов, содержащих эритроциты; и б) обработку эритроцитов из первого образца соединением, где обработка соединением приводит к связыванию функционального фрагмента с поверхностью эритроцитов из первого образца; где второй образец не обрабатывают соединением, таким образом, получая панель, содержащую первый образец эритроцитов со связанным с поверхностью функциональным фрагментом и второй образец эритроцитов, в котором отсутствует связанный с поверхностью функциональный фрагмент, и где соединение выбрано из группы, состоящей из соединений любой из формул I, II, III, IV(a)-IV(h), VII, VIII и IX и их производных или соли или стереоизомера любого из указанных выше соединений. В некоторых вариантах осуществления соединения выбрано из группы, состоящей из соединений любой из формул I, II, III, VII, VIII и IX и их производных или соли или стереоизомера любого из указанных выше соединений. В некоторых вариантах осуществления соединения выбрано из группы, состоящей из соединений любой из формул IV(a)-IV(h) и их производных или соли или стереоизомера любого из указанных выше соединений. В некоторых вариантах осуществления соединения является производным S-303 или его солью. В некоторых вариантах осуществления соединения является труднорасщепляемым аналогом S-303 или его солью. В некоторых вариантах осуществления связанный с поверхностью функциональный фрагмент является производным S-303 или его солью. В некоторых вариантах осуществления связанный с поверхностью функциональный фрагмент является труднорасщепляемым аналогом S-303 или его солью. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент, связанный с поверхностью эритроцитов, присутствует при уровне загрузки по меньшей мере приблизительно 10000 функциональных фрагментов на эритроцит. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент, связанный с поверхностью эритроцитов, присутствует при уровне загрузки по меньшей мере приблизительно 50 функциональных фрагментов/мкм². В некоторых вариантах осуществления соединения и связанный с поверхностью функциональный фрагмент являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления соединения и связанный с поверхностью функциональный фрагмент отличаются. В некоторых вариантах осуществления эритроциты из первого и второго образцов получают от одного донора крови. В некоторых вариантах осуществления эритроциты из первого и второго образцов получают от донора с группой крови O. В некоторых вариантах осуществления обработки субстрата из первого образца соединением, где обработка соединением приводит к связыванию функционального фрагмента с поверхностью субстрата из первого образца, осуществляют при 2-8°C. В некоторых вариантах осуществления обработку субстрата из первого образца соединением, где обработка соединением приводит к связыванию функционального фрагмента с поверхностью субстрата из первого образца, осуществляют при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления способ после стадии (b) дополнительно включает промывку первого и второго образцов. В некоторых вариантах осуществления способ после стадии (b) дополнительно включает ресуспендирование первого и второго образцов в забуференной суспензионной среде при количестве от приблизительно 0,5% до приблизительно 5% эритроцитов. В некоторых вариантах осуществления способ после стадии (b) дополнительно включает добавление криоконсерванта в первый и второй образцы и замораживание первого и второго образцов. В некоторых вариантах осуществления способ после стадии (b) дополнительно включает хранение первого и второго образцов при температуре охлаждения (например, 2-8°C). В некоторых вариантах осуществления способ после стадии (b) включает хранение первого и второго образцов при температуре менее приблизительно -20°C. В некоторых вариантах осуществления способ после стадии (b) включает хранение первого и второго образцов при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает обработку третьего образца, содержащего эритроциты, соединением, где обработка эритроцитов из третьего образца соединением приводит к получению второго уровня функционального фрагмента, связанного с поверхностью эритроцитов из третьего образца, где первый уровень функционального фрагмента связан с поверхностью эритроцитов из первого образца, и где второй уровень меньше первого уровня. В некоторых вариантах осуществления после обработки третьего образца соединением способ дополнительно включает промывку третьего образца. В некоторых вариантах осуществления после обработки третьего образца соединением способ дополнительно включает добавление криоконсерванта в третий образец и замораживание третьего образца. В некоторых вариантах осуществления после обработки третьего образца соединением способ дополнительно включает ресуспендирование третьего образца в забуференной суспен-

зионной среде при количестве от приблизительно 0,5% до приблизительно 5% эритроцитов. В некоторых вариантах осуществления после обработки третьего образца соединением способ дополнительно включает хранение третьего образца при температуре охлаждения или при комнатной температуре.

В другом аспекте изобретение относится к способу тестирования образца на наличие антитела, связывающегося с соединением, включающему: а) получение образца, содержащего сыворотку или плазму; б) приведение образца в контакт с субстратом, где функциональный фрагмент связан с поверхностью субстрата; и где функциональный фрагмент выбран из группы, состоящей из соединений любой из формул I, II, III, IV, IV(a)-IV(h), V, VI, VII, VIII и IX и их производных или соли или стереоизомера любого из указанных выше соединений; и с) анализа степени связывания между антителом из образца и связанным с поверхностью функциональным фрагментом из субстрата, где связывание между антителом и связанным с поверхностью функциональным фрагментом свидетельствует о том, что антитело связывается с соединением. В некоторых вариантах осуществления способ тестирования образца на наличие антитела, связывающегося с соединением, включает: а) получение образца, содержащего сыворотку или плазму; б) приведение образца в контакт с полимерной частицей (например, бусиной, микросферой), матрицей или частью аналитического планшета, где функциональный фрагмент связан с поверхностью полимерной частицы (например, бус, микросфер), матрицы или части аналитического планшета; и где функциональный фрагмент выбран из группы, состоящей из соединений любой из формул I, II, III, IV, IV(a)-IV(h), V, VI, VII, VIII и IX и их производных или соли или стереоизомера любого из указанных выше соединений; с) анализ степени связывания между антителом из образца и связанным с поверхностью функциональным фрагментом на полимерной частице (например, бусах, микросферах), матрице или части аналитического планшета, где связывание между антителом и связанным с поверхностью функциональным фрагментом свидетельствует о том, что антитело связывается с соединением. В некоторых вариантах осуществления способ тестирования образца на наличие антитела, связывающегося с соединением, включает: а) получение образца, содержащего сыворотку или плазму; б) приведение образца в контакт с эритроцитами, где функциональный фрагмент связан с поверхностью эритроцитов; и где функциональный фрагмент выбран из группы, состоящей из соединений любой из формул I, II, III, IV(a)-IV(h), VII, VIII и IX и их производных или соли или стереоизомера любого из указанных выше соединений; и с) анализ степени связывания между антителом из образца и связанным с поверхностью функциональным фрагментом на эритроцитах, где связывание между антителом и связанным с поверхностью функциональным фрагментом свидетельствует о том, что антитело связывается с соединением. В некоторых вариантах осуществления соединение выбрано из группы, состоящей из соединений любой из формул I, II, III, VII, VIII и IX и их производных или соли или стереоизомера любого из указанных выше соединений. В некоторых вариантах осуществления соединение выбрано из группы, состоящей из соединений любой из формул IV(a)-IV(h) и их производных или соли или стереоизомера любого из указанных выше соединений. В некоторых вариантах осуществления соединение является производным S-303 или его солью. В некоторых вариантах осуществления соединение является труднорасщепляемым аналогом S-303 или его солью. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент является труднорасщепляемым аналогом S-303 или его солью. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент, связанный с поверхностью эритроцитов, присутствует при уровне загрузки по меньшей мере приблизительно 10000 функциональных фрагментов на эритроцит. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент, связанный с поверхностью эритроцитов, присутствует при уровне загрузки по меньшей мере приблизительно 50 функциональных фрагментов/мкм². В некоторых вариантах осуществления соединение и связанный с поверхностью функциональный фрагмент являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления соединение и связанный с поверхностью функциональный фрагмент отличаются. В некоторых вариантах осуществления стадия (с) включает сравнение степени связывания между антителом из образца и связанным с поверхностью функциональным фрагментом с эталоном, и где повышенная степень связывания по сравнению с эталоном свидетельствует о наличии антитела в образце. В некоторых вариантах осуществления стадия (с) включает анализ степени связывания между антителом из образца и эритроцитами, в которых отсутствует связанный с поверхностью функциональный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления стадия (с) дополнительно включает анализ степени связывания между антителом из образца и эритроцитами, содержащими сниженное количество связанного с поверхностью функционального фрагмента. В некоторых вариантах осуществления стадия (б) включает приведение образца и эритроцитов в контакт с антиглобулиновой сывороткой, и где стадия (с) включает анализ степени агглютинации.

В другом аспекте изобретение относится к способу осуществления переливания эритроцитов пациенту, где переливание эритроцитов включает эритроциты, обработанные патоген-инактивирующим соединением, включающему: а) получение образца, содержащего сыворотку или плазму пациента; б) приведение образца в контакт с первым субстратом, где функциональный фрагмент связан с поверхностью субстрата; с) анализ степени связывания между антителом из образца и связанным с поверхностью функциональным фрагментом из первого субстрата по сравнению с эталоном, где связывание между антителом и связанным с поверхностью функциональным фрагментом свидетельствует о том, что антитело

связывается с эритроцитами, обработанными патоген-инактивирующим соединением; d) определение того, превышает ли степень связывания эталон; и f) если определено, что степень связывания не превышает эталон, осуществление переливания крови пациенту. В некоторых вариантах осуществления связанный с поверхностью функциональный фрагмент выбран из группы, состоящей из соединений любой из формул I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII и IX и их производных или соли или стереоизомера любого из указанных выше соединений. В некоторых вариантах осуществления связанный с поверхностью функциональный фрагмент выбран из группы, состоящей из соединений любой из формул I, II, III, VII, VIII и IX и их производных или соли или стереоизомера любого из указанных выше соединений. В некоторых вариантах осуществления связанный с поверхностью функциональный фрагмент выбран из группы, состоящей из соединений любой из формул IV, V и VI, и их производных или соли или стереоизомера любого из указанных выше соединений. В некоторых вариантах осуществления связанный с поверхностью функциональный фрагмент выбран из группы, состоящей из соединений любой из формул IV(a)-IV(h) и их производных или соли или стереоизомера любого из указанных выше соединений. В некоторых вариантах осуществления связанный с поверхностью функциональный фрагмент является S-303, производным S-303 или солью любого из указанных выше соединений. В некоторых вариантах осуществления связанный с поверхностью функциональный фрагмент является труднорасщепляемым аналогом S-303 или его солью. В некоторых вариантах осуществления соединение и связанный с поверхностью функциональный фрагмент являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления соединение и связанный с поверхностью функциональный фрагмент отличаются. В некоторых вариантах осуществления первый субстрат содержит полимерную частицу, матрицу или часть аналитического планшета. В некоторых вариантах осуществления первый субстрат содержит эритроциты. В некоторых вариантах осуществления стадия (с) включает анализ степени связывания между антителом из образца и вторым субстратом, в котором отсутствует связанный с поверхностью функциональный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления второй субстрат является тем же, что и первый субстрат. В некоторых вариантах осуществления стадия (с) дополнительно включает анализ степени связывания между антителом из образца и третьим субстратом, содержащим меньшее количество связанного с поверхностью функционального фрагмента по сравнению с первым субстратом. В некоторых вариантах осуществления третий субстрат является тем же, что и первый субстрат. В некоторых вариантах осуществления стадия (b) включает приведение образца и субстратов в контакт с антиглобулиновой сывороткой, и где стадия (с) включает анализ степени агглютинации. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент, связанный с поверхностью субстратов, отличается от патоген-инактивирующего соединения.

В другом аспекте изобретение относится к композиции, содержащей эритроциты человека, где функциональный фрагмент, выбранный из группы, состоящей из соединений любой из формул I, II, III, IV(a)-IV(h), VI, VII, VIII и IX и их производных или соли или стереоизомера любого из указанных выше соединений, связан с поверхностью эритроцитов человека. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент выбран из группы, состоящей из соединений любой из формул I, II, III, VII, VIII и IX и их производных или соли или стереоизомера любого из указанных выше соединений. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент является труднорасщепляемым аналогом S-303 или его солью.

Краткое описание фигур

- Фиг. 1 представляет собой график уровней окрашивания антителами обработанных эритроцитов.
- Фиг. 2 представляет собой график уровней окрашивания антителами обработанных эритроцитов.
- Фиг. 3 представляет собой график уровней окрашивания антителами обработанных эритроцитов.
- Фиг. 4 представляет собой график уровней окрашивания антителами обработанных эритроцитов.
- Фиг. 5 представляет собой график уровней окрашивания антителами обработанных эритроцитов.
- Фиг. 6 представляет собой график уровней окрашивания антителами обработанных эритроцитов.

Подробное описание

Настоящее изобретение относится к способам и системам для тестирования и/или скрининга биологических образцов с использованием субстрата, содержащего связанное с ним соединение. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что, хотя соединение (например, патоген-инактивирующее соединение), используемое по различным вариантам осуществления настоящего изобретения, может быть безопасным и эффективным для обработки эритроцитов (например, инактивации патогенов), такая обработка потенциально может приводить к тому, что соединение будет реагировать с другими нуклеофилами в эритроцитах, что в конкретных случаях может приводить к связыванию соединения с эритроцитами, например, с поверхностью эритроцитов (например, образованию связанных с поверхностью аддуктов). Такое связывание также может приводить к образованию антител, специфических для соединения или его части, также связывающихся с обработанными эритроцитами, если такие антитела есть у пациента, которому переливают обработанные эритроциты. Таким образом, важно тестировать биологический образец (например, образец от пациента) для оценки наличия или отсутствия антител (например, клинически значимых антител) против соединения или его части. Настоящая заявка включает способы/системы, представленные в настоящем описании, и применение этих способов/систем в тестировании биологического образца на наличие антитела против соединения с использованием композиций и/или наборов, со-

державших соединения по настоящему изобретению, связанные с субстратами. В некоторых вариантах осуществления способы/системы особенно пригодны для детекции уже существующих антител, реагирующих с эритроцитами, обработанными патоген-инактивирующим соединением, у пациентов перед переливанием.

Настоящее изобретение относится к композициям связанных с соединением субстратов (например, эритроцитов, связанных с патоген-инактивирующим соединением), наборам/системам, способам получения композиций и их применению.

В настоящем описании термины в единственном числе используют для обозначения одного или более (т.е. по меньшей мере одного) грамматических объектов. В качестве примера, "субстрат" означает один субстрат или несколько субстратов.

В рамках изобретения термин "биологический образец" или просто "образец" означает образец, такой как образец, необязательно, полученный из животного (например, человека), при этом образец или его компонент можно использовать для оценки наличия, отсутствия и/или уровня антитела способами по изобретению. Такой образец включает, в качестве неограничивающих примеров, любые биологические образцы, такие как, например, биологическая жидкость (например, кровь, сыворотка, плазма, лимфа, сперма, мокрота, слюна, слезы, и т.п.) и любой образец, полученный из животного (например, человека), который можно анализировать на наличие или отсутствие антитела.

В рамках изобретения термин "алкил" относится к циклической, разветвленной или неразветвленной химической группе, содержащей углерод и водород, такой как метил, пентил и адамантил. Алкильные группы могут быть незамещенными или замещенными одним или более заместителями, например, галогеном, алкоксигруппой, ацилоксигруппой, аминогруппой, гидроксилом, тиолом, карбоксигруппой, бензилоксигруппой, фенилом, бензилом или другой функциональной группой. Алкильные группы могут быть насыщенными или ненасыщенными (например, содержащими субъединицы $-C=C-$ или $-C-C-$) в одном или более положениях. Как правило, если не указано иначе, алкильные группы будут содержать от 1 до 12 атомов углерода, например, от 1 до 10 атомов углерода или от 1 до 8 атомов углерода.

В рамках изобретения термин "гетероалкил" относится к алкильной цепи с одним или более гетероатомами N, O, S или P, встроенными в цепь. Гетероатомы могут нести один или более заместителей, описанных выше, или не нести их. "Гетероатомы" также включают окисленные формы гетероатомов N, S и P. Неограничивающие примеры гетероалкильных групп включают метокси-, этокси- и другие алкоксигруппы; группы, содержащие простой эфир, амидсодержащие группы, такие как полипептидные цепи; кольцевые системы, такие как пиперидинил, лактам и лактон; и другие группы, включающие гетероатомы в углеродной цепи. Как правило, если не указано иначе, гетероалкильные группы будут содержать, в дополнение к гетероатомам, от 1 до 12 атомов углерода, например, от 1 до 10 атомов углерода или от 1 до 8 атомов углерода.

Термин "арил" или "Ar" относится к ненасыщенной ароматической карбоциклической группе, содержащей одно кольцо (например, фенил) или множество конденсированных колец (например, нафтил или антрил), необязательно, ненасыщенной или замещенной аминогруппой, гидроксилом, C_{1-8} -алкилом, алкоксигруппой, галогеном, тиолом и другими заместителями.

"Гетероарильные" группы являются ненасыщенными ароматическими карбоциклическими группами, содержащими одно кольцо (например, пиридил или фурил) или множество конденсированных колец (например, акридинил, индолил или бензотиенил) и по меньшей мере один гетероатом, такой как N, O или S, в по меньшей мере одном из колец. Кольца являются необязательно незамещенными или замещенными аминогруппой, гидроксилом, алкилом, алкоксигруппой, галогеном, тиолом, ацилоксигруппой, карбоксигруппой, бензилоксигруппой, фенилом, бензилом и другими заместителями.

Композиции.

Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим субстрат, содержащий связанный с поверхностью функциональный фрагмент, где связанный с поверхностью функциональный фрагмент подходит для связывания антител против соединения, такого как, например, соединение, используемое в получении эритроцитов с инактивированными патогенами, которые могут присутствовать в биологическом образце.

Субстрат.

Как будет понятно специалисту в этой области, субстрат может являться любой твердой подложкой, известной в этой области. Твердая подложка может состоять из любого материала (например, биологического, синтетического) или матрицы, подходящей для связывания связанного с поверхностью функционального фрагмента. Примеры твердых подложек включают полимеры или сополимеры (например, сложные полиэфиры, простые полиэфиры, полиолефины, полиамиды, полисахариды, полиуретаны, стиролы и производные стиролов, полистиролы, целлюлозы), пластик, стекло, золото и другие металлы и т.д. Дополнительные примеры твердых подложек включают клетки (например, эритроциты), мембраны клеток и другой материал клеточного происхождения. Твердая подложка может экспонировать связанный с поверхностью функциональный фрагмент в двухмерном формате (например, планшет) или трехмерном формате (например, клетка, частица, бусина или другой сферический или квазисферический объект). Дополнительные примеры твердых подложек включают частицы (например, полимерные частицы),

такие как, например, бусы и микросферы (например, синтетические бусы и микросферы, бусы и микросферы из полимеров или сополимеров). Для придания твердым подложкам целостности и структуры также можно использовать связывающие средства. Субстрат может являться частью аналитического планшета. Конкретные твердые подложки состоят из одного или более материалов, с которыми биологический образец не будет связываться или, по существу, не будет связываться. Например, твердая подложка может состоять из материала, с которыми антитела не связываются или, по существу, не связываются (например, материала, не содержащего антигены, с которыми связываются конкретные антитела). В частности, твердая подложка состоит из материала, с которым не связываются или, по существу, не связываются антитела против эритроцитов с инактивированными патогенами.

Любая твердая подложка для использования в композициях и способах по изобретению может подходить для ковалентного или нековалентного присоединения связанного с поверхностью функционального фрагмента. В некоторых вариантах осуществления твердая подложка является инертной. В некоторых вариантах осуществления связанный с поверхностью функциональный фрагмент можно ковалентно или нековалентно связывать с самим материалом твердой подложки. В других вариантах осуществления материал твердой подложки функционализируют с использованием реакционноспособной группы (например, функциональной группы амина (-NH₂) или аммония (-NH₃⁺ или -NR₃⁺), спиртовой функциональной группы (-OH), карбоксильной функциональной группы (-COOH) изоцианатной функциональной группы (-NCO)), которая может взаимодействовать или иным образом ковалентно или нековалентно связываться со связанным с поверхностью функциональным фрагментом.

Предпочтительной может являться стабильность субстрата при различных температурах, таких как комнатная температура, температура охлаждения или температуры замораживания. В некоторых вариантах осуществления субстрат стабилен при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления субстрат стабилен при температуре охлаждения (например, 1-6°C, 2-8°C, 2-4°C). В некоторых вариантах осуществления субстрат стабилен при температуре 0°C или менее (например, -20°C). В некоторых вариантах осуществления субстрат стабилен при -80°C.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения субстрат содержит эритроциты. Например, эритроциты, часто используемые в иммуногематологических тестах, могут являться субстратом, как представлено в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления эритроциты получают из крови человека. Субстрат может включать эритроциты из крови любой группы, например, от доноров с группой O, группой A, группой B или группой АВ. Эритроциты могут быть специально предназначены для поддержки разрешения одной или более смесей антител. В некоторых вариантах осуществления эритроциты экспрессируют антигены, выбранные из группы, состоящей из антигенов C, c, E, e, K, k, Fya, Fyb, Jka, Jkb, M, N, S, s, P1, Lea и Leb. В некоторых вариантах осуществления эритроциты экспрессируют Rh(D). В некоторых вариантах осуществления эритроциты имеют тип Rh, выбранный из группы, состоящей из R₁R₁, R₂R₂, R₁^wR₁, R₀г и гг. Эритроциты можно хранить при комнатной температуре (например, в забуференной суспензионной среде при количестве 0,5-5% эритроцитов), температуре охлаждения (например, в забуференной суспензионной среде при количестве 0,5-5% эритроцитов) или их можно замораживать (например, в криоконсерванте, таком как, например, глицеролит) и хранить при -80°C.

Эритроциты, используемые в качестве субстратов в композициях по изобретению, можно получать от одного донора или от двух или более доноров (например, смесь эритроцитов, полученных от двух или более доноров). В некоторых вариантах осуществления эритроцитарный субстрат содержит эритроциты, полученные от 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или более отдельных доноров. В некоторых случаях эритроциты от двух или более доноров обладают одним или более общими свойствами, такими как группа крови ABO или наличие или отсутствие других антигенов эритроцитов (например, общих антигенов эритроцитов, клинически значимых антигенов эритроцитов). В других случаях эритроциты от двух или более доноров являются гетерогенными в отношении конкретных свойств, таких как группа крови ABO или наличие или отсутствие других антигенов эритроцитов (например, общих антигенов эритроцитов, клинически значимых антигенов эритроцитов). В некоторых вариантах осуществления эритроцитарный субстрат включает эритроциты, имеющие смесь групп крови ABO. В некоторых вариантах осуществления эритроцитарный субстрат является гомогенным в отношении Rh-фактора. В других вариантах осуществления эритроцитарный субстрат является гетерогенным в отношении Rh-фактора. В некоторых вариантах осуществления эритроцитарный субстрат является гомогенным в отношении любого одного или более из следующих антигенов: Cs^a, Cs^b, Er^a, Er^b, Vel, ABTI, Lan, At^a, Jr^a, AnWj, Sd^a, Batty (By), Biles (Bi), Box (Bx^a) Christiansen (Chr^a), HJK, HOFM, JFV, JONES, Jensen (Je^a), Katagiri (Kg), Livesay (Li^a), Milne, Oldeide (OI^a), Peters (Pt^a), Rasmussen (RASM), Reid (Re^a), REIT, SARA, Torkildsen (To^a) и Bennett-Goodspeed (Bg). В некоторых вариантах осуществления эритроцитарный субстрат является гетерогенным в отношении любого одного или более из следующих антигенов: Cs^a, Cs^b, Er^a, Er^b, Vel, ABTI, Lan, At^a, Jr^a, AnWj, Sd^a, Batty (By), Biles (Bi), Box (Bx^a) Christiansen (Chr^a), HJK, HOFM, JFV, JONES, Jensen (Je^a), Katagiri (Kg), Livesay (Li^a), Milne, Oldeide (OI^a), Peters (Pt^a), Rasmussen (RASM), Reid (Re^a), REIT, SARA, Torkildsen (To^a) и Bennett-Goodspeed (Bg).

Эритроциты для использования в качестве субстрата в композициях и способах, представленных в

настоящем описании, можно получать любым известным в этой области способом. Например, эритроциты можно получать стандартными способами сдачи эритроцитов (например, посредством афереза, сдачи двойной дозы эритроцитов). Альтернативно, эритроциты можно получать при сдаче цельной крови посредством разделения эритроцитов и других компонентов цельной крови, например, посредством центрифугирования или другого стандартного способа фракционирования. В некоторых вариантах осуществления эритроциты стерилизуют любым известным в этой области способом до или после функционализации с использованием связанного с поверхностью функционального фрагмента.

Специалисту в этой области будет понятно, что в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соединение можно связывать с субстратом в виде массива. В рамках изобретения термин "массив" относится к, как правило, упорядоченному расположению связанных соединений на субстрате, таком как стекло или пластике. Как правило, массив может находиться в форме серии равномерно расположенных и разграниченных областей, с которыми связаны соединения. Такие массивы можно описать как чип. Например, массивы в многолуночных микропланшетах можно сканировать с помощью автоматизированного оборудования.

Связанный с поверхностью функциональный фрагмент.

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения функциональный фрагмент связан с поверхностью субстрата. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент является патоген-инактивирующим соединением. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент является производным (например, частью) патоген-инактивирующего соединения. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент является соединением с частью, аналогичной или общей с патоген-инактивирующим соединением. Субстрат можно обрабатывать патоген-инактивирующим соединением таким образом, что соединение или его производное связывается с поверхностью субстрата. Альтернативно, субстрат можно обрабатывать функциональным фрагментом, который сам по себе является производным патоген-инактивирующего соединения, таким образом, что сам реакционноспособный функциональный фрагмент связывается с субстратом или его дополнительное производное связывается с субстратом. Альтернативно, субстрат можно обрабатывать соединением с частью, аналогичной или общей с патоген-инактивирующим соединением, таким образом, что аналогичная или общая часть связывается с субстратом. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент является производным соединения, содержащего акридин, такой как например, акридиновый мутаген, моноалкилятор, бис-алкилятор, иприт акридина (например, 6-хлор-9-[3-[(2-хлорэтил)этиламино]пропиламино]-2-метоксиакридин, Sigma #12888) или полуиприт акридина (например, 6-хлор-9-[3-(2-хлорэтиламино)пропиламино]-2-метоксиакридина дигидрохлорид, Sigma #13636), и субстрат можно обрабатывать соединением или производным соединения, содержащим акридин.

Патоген-инактивирующие соединения являются соединениями, инактивирующими один или более возбудителей, содержащих нуклеиновые кислоты, в эритроцитах или других композициях на основе крови, где возбудители, содержащие нуклеиновые кислоты, способны вызывать заболевание у человека, других млекопитающих или позвоночных. Возбудитель может являться одноклеточным или многоклеточным. Примерами патогенов являются бактерии, вирусы, простейшие, грибы, дрожжи, плесени и микоплазмы, вызывающие заболевание у людей, других млекопитающих или позвоночных. Генетическим материалом патогена может являться ДНК или РНК, и генетический материал может присутствовать в виде одноцепочечной или двухцепочечной нуклеиновой кислоты.

Разработаны патоген-инактивирующие соединения, как правило, содержащие электрофильные группы, реагирующие с патогенами, более конкретно - с нуклеиновыми кислотами патогенов. Например, в патентах США №№ 5691132, 6177441, 6410219, 6143490 и 6093725, описания которых включены, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылки, описывают применение соединений, содержащих компонент, воздействующий на нуклеиновые кислоты, а также электрофильный компонент, реагирующий с нуклеиновой кислотой, для инактивации патогена. В патентах США №№ 6093725 и 6514987, описания которых включены, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылки, описывают соединения, где компонент, воздействующий на нуклеиновые кислоты, соединен с реакционноспособным электрофильным компонентом посредством гидролизуемого линкера. Соединения, содержащие такие гидролизуемые линкеры, можно обозначать как легкорасщепляемые соединения. В конкретных условиях линкер из легкорасщепляемого соединения будет подвергаться гидролизу, таким образом, отщепляя компонент, воздействующий на нуклеиновые кислоты, от электрофильного компонента соединения. Соединения, содержащие компонент, воздействующий на нуклеиновые кислоты, связанный с электрофильным компонентом посредством негидролизуемого линкера можно обозначать как труднорасщепляемые соединения.

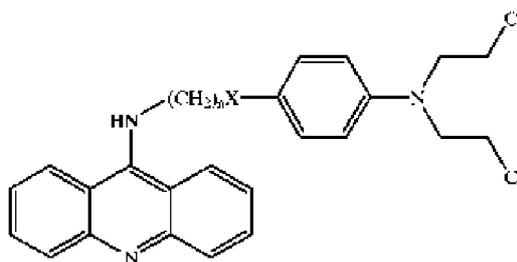
В некоторых вариантах осуществления патоген-инактивирующие соединения включают соединения, содержащие функциональную группу, образующую или способную образовывать и образовавшую, например *in situ*, реакционноспособную группу, такую как электрофильная группа. В некоторых случаях для патоген-инактивирующего соединения необходима фотоактивация, чтобы оно стало реакционноспособным. В некоторых случаях для патоген-инактивирующего соединения не требуется фотоактивация, чтобы оно было реакционноспособным. Например, функциональная группа может являться ипритной

группой, промежуточным продуктом ипритной группы, эквивалентом ипритной группы, оксидом, формальдегидом или формальдегидным синтоном. Такие функциональные группы могут образовывать *in situ* реакционноспособную группу, такую как электрофильный азиридин, азиридиный, тиран или ион тириания. Ипритная группа может являться моно- или бис-(галоэтил)аминогруппой или моно(галоэтил)сульфидной группой. Эквивалентом иприта является группа, реагирующая посредством механизма, схожего с ипритами, например, образуя реакционноспособные промежуточные продукты, такие как азиридиный и азиридиновые группы или тиран и группы тириания. Примеры включают производные азиридина, моно или бис-(мезилэтил)аминогруппы, моно-(мезилэтил)сульфидные группы, моно-или бис-(тозилэтил)аминогруппы и моно-(тозилэтил)сульфидные группы. Формальдегидный синтон является любым соединением, распадающимся до формальдегида, включая гидроксиламин, такой как гидрокси-метилглицин. Реакционноспособная группа патоген-инактивирующего соединения может реагировать с нуклеиновыми кислотами патогенов, например, с нуклеофильными группами на нуклеиновой кислоте. Реакционноспособная группа также может реагировать с нуклеофильной группой гасителя.

В некоторых вариантах осуществления патоген-инактивирующие соединения включают компонент, направляющий соединение к нуклеиновым кислотам, такой как якорная часть. Якорная часть содержит функциональный фрагмент, способный нековалентно связываться с биополимером нуклеиновой кислоты, такой как ДНК или РНК, и ее также обозначают как связывающий нуклеиновую кислоту лиганд, связывающая нуклеиновую кислоту группа или связывающий нуклеиновую кислоту функциональный фрагмент. В определенных вариантах осуществления якорную часть соединяют с реакционноспособным электрофильным компонентом посредством гидролизуемого линкера.

В некоторых вариантах осуществления соединение, которым обрабатывают субстрат, представленный в настоящем описании, или получаемый функциональный фрагмент, связанный с поверхностью субстрата, представленного в настоящем описании, является труднорасщепляемым соединением или его производным. Труднорасщепляемые соединения могут являться соединением любой из следующих формул I, II или III.

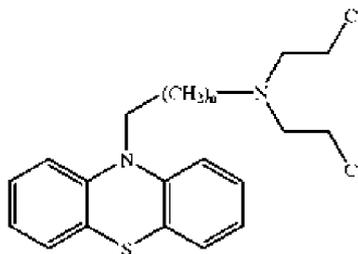
Формула I представляет собой:



Формула (I)

где n является целым числом 1-12, включительно, и X представляет собой CH_2 , NH , O или S , или его соль или стереоизомер (включая энантимеры и диастереомеры).

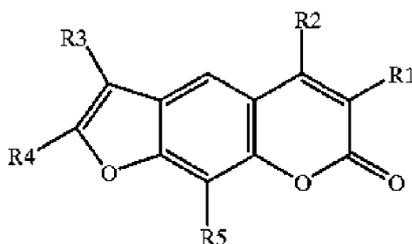
Формула II представляет собой:



Формула (II)

где n является целым числом 1-12, включительно, или его соль или стереоизомер (включая энантимеры и диастереомеры).

Формула III представляет собой:

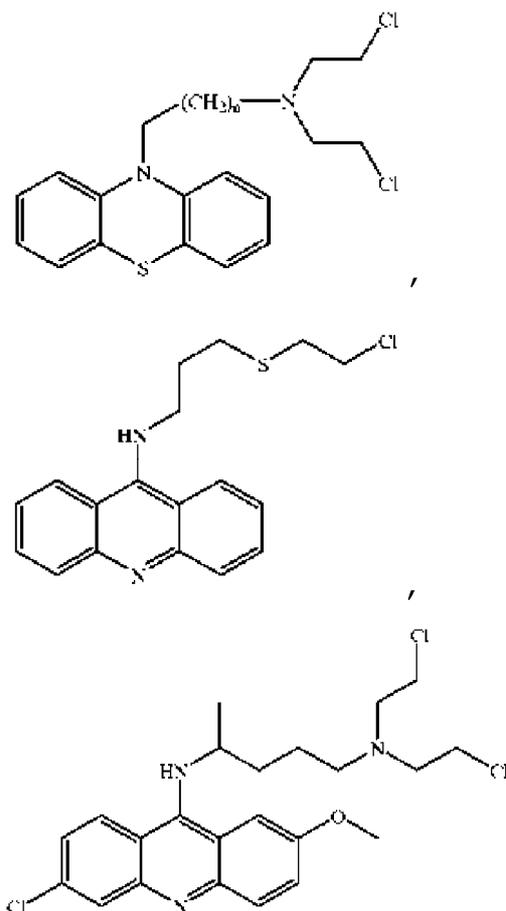


Формула (III)

где один или два из R1, R2, R3, R4, и R5 независимо представляют собой (2-хлорэтил)аминогруппу или (2-бромэтил)аминогруппу, необязательно, со второй 2-этилгалогеновой группой на амине, присоединенной к трициклическому кольцу с помощью цепи из от одного до девяти атомов углерода, где цепь необязательно содержит один или более гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из атомов кислорода, азота и серы, где цепь необязательно содержит одну или более ненасыщенных связей или карбонильных групп, и где цепь является необязательно замещенной одной или более группами низших алкилов; и

остальные из R1, R2, R3, R4 и R5 независимо представляют собой водород, низший алкил, низшую алкоксигруппу, галоген, CH₂OR₆ или -CH₂NR₇R₈, где каждый из R₆, R₇ и R₈ независимо представляет собой водород или низший алкил.

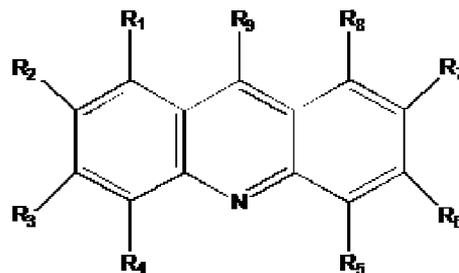
Конкретные трудноращепляемые соединения включают следующие:



и их соли или стереоизомеры (включая энантиомеры и диастереомеры).

В некоторых вариантах осуществления соединение, которым обрабатывают субстрат, представленный в настоящем описании, или получаемый функциональный фрагмент, связанный с поверхностью субстрата, представленного в настоящем описании, является легкорасщепляемым соединением или его производным. Легкорасщепляемое соединение может являться соединением любой из формул IV, V или VI или производным соединения любой из следующих формул IV, V или VI, как указано далее.

Формула IV представляет собой:



(IV)

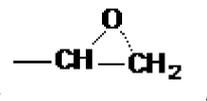
где по меньшей мере один из R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈ и R₉ представляет собой -V-W-X-E, как определено ниже, и остальные из R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈ и R₉ независимо выбраны из группы, состоящей из -H, -R₁₀, -O-R₁₀, -NO₂, -NH₂, -NH-R₁₀, N(R₁₀)₂, -F, -Cl, -Br, -I, -C(=O)-R₁₀, -C(=O)-O-R₁₀ и -O-C(=O)-R₁₀,

где -R₁₀ независимо представляет собой H, -C₁₋₈-алкил-, -C₁₋₈-гетероалкил-, -арил-, -гетероарил-, -C₁₋₃-алкил-арил-, -C₁₋₃-гетероалкил-арил-, -C₁₋₃-алкил-гетероарил-, -C₁₋₃-гетероалкил-гетероарил-, -арил-C₁₋₃-алкил-, -арил-C₁₋₃-гетероалкил-, -гетероарил-C₁₋₃-алкил-, -гетероарил-C₁₋₃-гетероалкил-, -C₁₋₃-алкил-арил-C₁₋₃-алкил-, -C₁₋₃-гетероалкил-арил-C₁₋₃-алкил-, -C₁₋₃-алкил-гетероарил-C₁₋₃-алкил-, -C₁₋₃-алкил-арил-C₁₋₃-гетероалкил-, -C₁₋₃-гетероалкил-гетероарил-C₁₋₃-алкил-, -C₁₋₃-гетероалкил-арил-C₁₋₃-гетероалкил-, -C₁₋₃-алкил-гетероарил-C₁₋₃-гетероалкил- или -C₁₋₃-гетероалкил-гетероарил-C₁₋₃-гетероалкил;

V независимо представляет собой -R₁₁-, -NH-R₁₁- или -N(CH₃)-R₁₁-, где -R₁₁- независимо представляет собой -C₁₋₈-алкил-, -C₁₋₈-гетероалкил-, -арил-, -гетероарил-, -C₁₋₃-алкил-арил-, -C₁₋₃-гетероалкил-арил-, -C₁₋₃-алкил-гетероарил-, -C₁₋₃-гетероалкил-гетероарил-, -арил-C₁₋₃-алкил-, -арил-C₁₋₃-гетероалкил-, гетероарил-C₁₋₃-алкил-, -гетероарил-C₁₋₃-гетероалкил-, -C₁₋₃-алкил-арил-C₁₋₃-алкил-, -C₁₋₃-гетероалкил-арил-C₁₋₃-алкил-, -C₁₋₃-алкил-гетероарил-C₁₋₃-алкил-, -C₁₋₃-алкил-арил-C₁₋₃-гетероалкил-, -C₁₋₃-гетероалкил-гетероарил-C₁₋₃-алкил-, -C₁₋₃-гетероалкил-арил-C₁₋₃-гетероалкил-, -C₁₋₃-алкил-гетероарил-C₁₋₃-гетероалкил- или -C₁₋₃-гетероалкил-гетероарил-C₁₋₃-гетероалкил-;

W независимо представляет собой -C(=O)-O-, -O-C(=O)-, C(=S)-O-, -O-C(=S)-, -C(=S)-S-, -S-C(=S)-, -C(=O)-S-, -S-C(=O)-, -O-S(=O)₂-O-, -S(=O)₂-O-, -O-S(=O)₂-, -C(=O)-NR₁₀-, -NR₁₀-C(=O)-, -O-P(=O)(-OR₁₀)-O-, -P(=O)(-OR₁₀)-O-, -O-P(=O)(-OR₁₀)-;

X независимо представляет собой -R₁₁-, и



E независимо выбран из группы, состоящей из -N(R₁₂)₂, -N(R₁₂)(R₁₃), -S-R₁₂ и

где -R₁₂ представляет собой -CH₂CH₂-G, где каждый G независимо представляет собой -Cl, -Br, -I, -O-S(=O)₂-CH₃, -O-S(=O)₂-CH₂-C₆H₅, или -O-S(=O)₂-C₆H₄-CH₃; и

где R₁₃ независимо представляет собой -C₁₋₈-алкил-, -C₁₋₈-гетероалкил-, -арил-, -гетероарил-, -C₁₋₃-алкил-арил-, -C₁₋₃-гетероалкил-арил-, -C₁₋₃-алкил-гетероарил-, -C₁₋₃-гетероалкил-гетероарил-, -арил-C₁₋₃-алкил-, -арил-C₁₋₃-гетероалкил-, -гетероарил-C₁₋₃-алкил-, -гетероарил-C₁₋₃-гетероалкил-, -C₁₋₃-алкил-арил-C₁₋₃-алкил-, -C₁₋₃-гетероалкил-арил-C₁₋₃-алкил-, -C₁₋₃-алкил-гетероарил-C₁₋₃-алкил-, -C₁₋₃-алкил-арил-C₁₋₃-гетероалкил-, -C₁₋₃-гетероалкил-гетероарил-C₁₋₃-алкил-, -C₁₋₃-гетероалкил-арил-C₁₋₃-гетероалкил-, -C₁₋₃-алкил-гетероарил-C₁₋₃-гетероалкил- или -C₁₋₃-гетероалкил-гетероарил-C₁₋₃-гетероалкил;

или его соль или стереоизомер (включая энантиомеры и диастереомеры).

В некоторых вариантах осуществления формулы IV каждый из R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ и R₈ представляет собой водород. В других вариантах осуществления по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6 или по меньшей мере 7 из R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈ представляют собой водород.

В некоторых вариантах осуществления формулы IV R₉ представляет собой -V-W-X-E. В некоторых вариантах осуществления V представляет собой -NH-R₁₁-. В некоторых таких вариантах осуществления R₁₁ представляет собой -C₁₋₈-алкил-, например, метил или этил. В конкретных вариантах осуществления V представляет собой -NH-R₁₁-, где R₁₁ представляет собой линейный -C₁₋₈-алкил-. В некоторых вариантах осуществления V представляет собой -N(CH₃)-R₁₁-. В некоторых таких вариантах осуществления R₁₁ представляет собой -C₁₋₈-алкил-, например, метил или этил. В конкретных вариантах осуществления V представляет собой -N(CH₃)-R₁₁-, где R₁₁ представляет собой линейный -C₁₋₈-алкил-.

В некоторых вариантах осуществления формулы IV W представляет собой -C(=O)-O-. В некоторых вариантах осуществления W представляет собой -C(=O)-NR₁₀-. В некоторых вариантах осуществления W представляет собой -C(=O)-NH-.

В некоторых вариантах осуществления формулы IV X представляет собой -R₁₁-, где -R₁₁- представ-

3-алкил, -C₁₋₃-гетероалкил-арил-C₁₋₃-алкил, -C₁₋₃-алкил-гетероарил-C₁₋₃-алкил, -C₁₋₃-алкил-арил-C₁₋₃-гетероалкил, -C₁₋₃-гетероалкил-гетероарил-C₁₋₃-алкил, -C₁₋₃-гетероалкил-арил-C₁₋₃-гетероалкил, -C₁₋₃-алкил-гетероарил-C₁₋₃-гетероалкил или -C₁₋₃-гетероалкил-гетероарил-C₁₋₃-гетероалкил;

или его соль или стереоизомер (включая энантиомеры и диастереомеры).

В некоторых вариантах осуществления формулы V каждый из R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ и R₈ представляет собой водород. В других вариантах осуществления по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6 или по меньшей мере 7 из R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈ представляют собой водород. В некоторых вариантах осуществления формулы V R₂₀ представляет собой H. В некоторых вариантах осуществления R₂₀ представляет собой -CH₃.

В некоторых вариантах осуществления формулы V R₂₁ представляет собой -R₁₁-W-X-E. В некоторых вариантах осуществления R₁₁ представляет собой -C₁₋₈-алкил-, например, метил или этил. В некоторых вариантах осуществления R₁₁ представляет собой линейный -C₁₋₈-алкил-. В некоторых вариантах осуществления R₁₁ представляет собой -(CH₂)-, -(CH₂)₂-, -(CH₂)₃-, -(CH₂)₄-, (CH₂)₅-, -(CH₂)₆-, -(CH₂)₇- или -(CH₂)₈-.

В некоторых вариантах осуществления формулы V W представляет собой -C(=O)-O-. В некоторых вариантах осуществления W представляет собой -C(=O)-NR₁₀-. В некоторых вариантах осуществления W представляет собой -C(=O)-NH-.

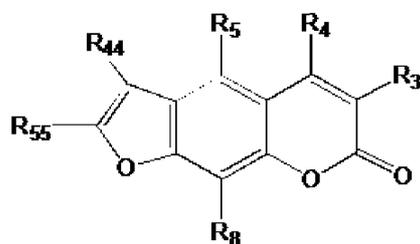
В некоторых вариантах осуществления формулы V X представляет собой -R₁₁-, где -R₁₁- представляет собой -C₁₋₈-алкил-. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой метил или этил. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой линейный -C₁₋₈-алкил-. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой -(CH₂)-, -(CH₂)₂-, -(CH₂)₃-, -(CH₂)₄-, (CH₂)₅-, -(CH₂)₆-, -(CH₂)₇- или -(CH₂)₈-. В некоторых таких вариантах осуществления R₂₀ представляет собой H. В некоторых таких вариантах осуществления R₂₀ представляет собой -CH₃.

В некоторых вариантах осуществления формулы V E представляет собой -N(R₁₂)₂, где R₁₂ представляет собой -CH₂CH₂-G. В некоторых таких вариантах осуществления каждый G независимо представляет собой -Cl, -Br или -I. В некоторых таких вариантах осуществления оба функциональных фрагмента G представляют собой -Cl.

В некоторых вариантах осуществления формулы V R₂₁ представляет собой -C₁₋₈алкил-C(=O)-O-C₁₋₈-алкил-N(CH₂CH₂Cl)₂. В некоторых вариантах осуществления R₂₁ представляет собой -(CH₂)₂-C(=O)O-(CH₂)₂-N(CH₂CH₂Cl)₂, -(CH₂)₂-C(=O)O-(CH₂)₂-N(CH₂CH₂Cl)₂, -(CH₂)₂-C(=O)-O-(CH₂)₂-N(CH₂CH₂Cl)₂, -(CH₂)₃-C(=O)-O-(CH₂)₂-N(CH₂CH₂Cl)₂ или -(CH₂)₂-C(=O)-O-(CH₂)₃-N(CH₂CH₂Cl)₂. В некоторых таких вариантах осуществления R₂₀ представляет собой H. В некоторых таких вариантах осуществления R₂₀ представляет собой -CH₃. В любом из приведенных выше вариантов осуществления каждый из R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ и R₈ может представлять собой водород.

В некоторых вариантах осуществления формулы V R₂₁ представляет собой -C₁₋₈алкил-C(=O)-NH-C₁₋₈-алкил-N(CH₂CH₂Cl)₂. В некоторых вариантах осуществления R₂₁ представляет собой -(CH₂)₂-C(=O)-NH-(CH₂)₂-N(CH₂CH₂Cl)₂, -(CH₂)₂-C(=O)-NH-(CH₂)₂-N(CH₂CH₂Cl)₂, -(CH₂)₂-C(=O)-NH-(CH₂)₂-N(CH₂CH₂Cl)₂, -(CH₂)₃-C(=O)-NH-(CH₂)₂-N(CH₂CH₂Cl)₂ или -(CH₂)₂-C(=O)-NH-(CH₂)₃-N(CH₂CH₂Cl)₂. В некоторых таких вариантах осуществления R₂₀ представляет собой H. В некоторых таких вариантах осуществления R₂₀ представляет собой -CH₃. В любом из приведенных выше вариантов осуществления каждый из R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ и R₈ может представлять собой водород.

Формула VI представляет собой:



(VI)

где по меньшей мере один из R₄₄, R₅₅, R₃, R₄, R₅ и R₈ представляет собой -V-W-X-E, и остальные из R₄₄, R₅₅, R₃, R₄, R₅ и R₈ независимо выбраны из группы, состоящей из -H, -R₁₀, -O-R₁₀, -NO₂, -NH₂, -NH-R₁₀, -N(R₁₀)₂, -F, -Cl, -Br, -I, -C(=O)-R₁₀, -C(=O)-O-R₁₀ и -O-C(=O)-R₁₀,

где -R₁₀ независимо представляет собой H, -C₁₋₈-алкил, -C₁₋₈-гетероалкил, -арил, -гетероарил, -C₁₋₃-алкил-арил, -C₁₋₃-гетероалкил-арил, -C₁₋₃-алкил-гетероарил, -C₁₋₃-гетероалкил-гетероарил, -арил-C₁₋₃-алкил, -арил-C₁₋₃-гетероалкил, -гетероарил-C₁₋₃-алкил, -гетероарил-C₁₋₃-гетероалкил, -C₁₋₃-алкил-арил-C₁₋₃-алкил, -C₁₋₃-гетероалкил-арил-C₁₋₃-алкил, -C₁₋₃-алкил-гетероарил-C₁₋₃-алкил, -C₁₋₃-алкил-арил-C₁₋₃-

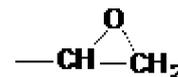
гетероалкил, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-гетероарил- C_{1-3} -алкил, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-арил- C_{1-3} -гетероалкил, $-C_{1-3}$ -алкил-гетероарил- C_{1-3} -гетероалкил или $-C_{1-3}$ -гетероалкил-гетероарил- C_{1-3} -гетероалкил;

V независимо представляет собой $-R_{11}$ -, $-NH-R_{11}$ - или $-N(CH_3)-R_{11}$ -,

где $-R_{11}$ - независимо представляет собой $-C_{1-8}$ -алкил-, $-C_{1-8}$ -гетероалкил-, -арил-, -гетероарил-, $-C_{1-3}$ -алкил-арил-, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-арил-, $-C_{1-3}$ -алкил-гетероарил-, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-гетероарил-, -арил- C_{1-3} -алкил-, -арил- C_{1-3} -гетероалкил-, гетероарил- C_{1-3} -алкил-, -гетероарил- C_{1-3} -гетероалкил-, $-C_{1-3}$ -алкил-арил- C_{1-3} -алкил-, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-арил- C_{1-3} -алкил-, $-C_{1-3}$ -алкил-гетероарил- C_{1-3} -алкил-, $-C_{1-3}$ -алкил-арил- C_{1-3} -гетероалкил-, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-гетероарил- C_{1-3} -алкил-, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-арил- C_{1-3} -гетероалкил-, $-C_{1-3}$ -алкил-гетероарил- C_{1-3} -гетероалкил- или $-C_{1-3}$ -гетероалкил-гетероарил- C_{1-3} -гетероалкил-;

W независимо представляет собой $-C(=O)-O-$, $-O-C(=O)-$, $C(=S)-O-$, $-O-C(=S)-$, $-C(=S)-S-$, $-S-C(=S)-$, $-C(=O)-S-$, $-S-C(=O)-$, $-O-S(=O)_2-O-$, $-S(=O)_2-O-$, $-O-S(=O)_2-$, $-C(=O)-NR_{10}$ -, $-NR_{10}-C(=O)-$, $-O-P(=O)(-OR_{10})-$, $O-$, $-P(=O)(-OR_{10})-O-$, $-O-P(=O)(-OR_{10})-$;

X независимо представляет собой $-R_{11}$ -, и



E независимо выбран из группы, состоящей из $-N(R_{12})_2$, $N(R_{12})(R_{13})$, $-S-R_{12}$ и

где $-R_{12}$ представляет собой $-CH_2CH_2-G$, где каждый G независимо представляет собой $-Cl$, $-Br$, $-I$, $-O-S(=O)_2-CH_3$, $-O-S(=O)_2-CH_2-C_6H_5$ или $-O-S(=O)_2-C_6H_4-CH_3$;

и где R_{13} независимо представляет собой $-C_{1-8}$ -алкил-, $-C_{1-8}$ -гетероалкил-, -арил-, -гетероарил-, $-C_{1-3}$ -алкил-арил-, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-арил-, $-C_{1-3}$ -алкил-гетероарил-, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-гетероарил-, -арил- C_{1-3} -алкил-, -арил- C_{1-3} -гетероалкил-, -гетероарил- C_{1-3} -алкил-, -гетероарил- C_{1-3} -гетероалкил-, $-C_{1-3}$ -алкил-арил- C_{1-3} -алкил-, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-арил- C_{1-3} -алкил-, $-C_{1-3}$ -алкил-гетероарил- C_{1-3} -алкил-, $-C_{1-3}$ -алкил-арил- C_{1-3} -гетероалкил-, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-гетероарил- C_{1-3} -алкил-, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-арил- C_{1-3} -гетероалкил-, $-C_{1-3}$ -алкил-гетероарил- C_{1-3} -гетероалкил- или $-C_{1-3}$ -гетероалкил-гетероарил- C_{1-3} -гетероалкил-;

или его соль или стереоизомер (включая энантимеры и диастереомеры).

Следует понимать, что в приведенной выше формуле IV акридиновое ядро является якорным функциональным фрагментом, группы $-V-W-X-$ содержат легкорасщепляемый линкер, и группы E являются эффекторными группами. Аналогично, в приведенной выше формуле VI псораленовое ядро является якорным функциональным фрагментом, группы $-V-W-X-$ содержат легкорасщепляемый линкер, и группы E являются эффекторными группами. Формула V является подтипом формулы IV.

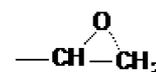
В некоторых вариантах осуществления легкорасщепляемое соединение формулы IV является соединением формулы IV(a)-IV(h) или его солью или стереоизомером (включая энантимеры и диастереомеры), где все переменные группы, не указанные конкретно, являются теми же, что и в приведенной выше формуле IV:

Формула IV(a): W независимо представляет собой $-O-C(=O)-$, $-C(=S)-O-$, $-O-C(=S)-$, $-C(=S)-S-$, $-S-C(=S)-$, $-C(=O)-S-$, $-S-C(=O)-$, $-O-S(=O)_2-O-$, $-S(=O)_2-O-$, $-O-S(=O)_2-$, $-C(=O)-NR_{10}$ -, $-NR_{10}-C(=O)-$, $-O-P(=O)(-OR_{10})-O-$, $-P(=O)(-OR_{10})-O-$, $-O-P(=O)(-OR_{10})-$

Формула IV(b): V независимо представляет собой $-R_{11}$ -, или $-N(CH_3)-R_{11}$ -, где $-R_{11}$ - независимо представляет собой $-C_{1-8}$ -алкил-, -арил-, -гетероарил-, $-C_{1-3}$ -алкил-арил-, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-арил-, $-C_{1-3}$ -алкил-гетероарил-, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-гетероарил-, -арил- C_{1-3} -алкил-, -арил- C_{1-3} -гетероалкил-, гетероарил- C_{1-3} -алкил-, -гетероарил- C_{1-3} -гетероалкил-, $-C_{1-3}$ -алкил-арил- C_{1-3} -алкил-, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-арил- C_{1-3} -алкил-, $-C_{1-3}$ -алкил-гетероарил- C_{1-3} -алкил-, $-C_{1-3}$ -алкил-арил- C_{1-3} -гетероалкил-, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-гетероарил- C_{1-3} -алкил-, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-арил- C_{1-3} -гетероалкил-, $-C_{1-3}$ -алкил-гетероарил- C_{1-3} -гетероалкил- или $-C_{1-3}$ -гетероалкил-гетероарил- C_{1-3} -гетероалкил-;

Формула IV(c): $-R_{11}$ - независимо представляет собой -арил-, -гетероарил-, $-C_{1-3}$ -алкил-арил-, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-арил-, $-C_{1-3}$ -алкил-гетероарил-, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-гетероарил-, -арил- C_{1-3} -алкил-, -арил- C_{1-3} -гетероалкил-, -гетероарил- C_{1-3} -алкил-, гетероарил- C_{1-3} -гетероалкил-, $-C_{1-3}$ -алкил-арил- C_{1-3} -алкил-, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-арил- C_{1-3} -алкил-, $-C_{1-3}$ -алкил-гетероарил- C_{1-3} -алкил-, $-C_{1-3}$ -алкил-арил- C_{1-3} -гетероалкил-, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-гетероарил- C_{1-3} -алкил-, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-арил- C_{1-3} -гетероалкил-, $-C_{1-3}$ -алкил-гетероарил- C_{1-3} -гетероалкил-, $-C_{1-3}$ -алкил-гетероарил- C_{1-3} -гетероалкил- или $-C_{1-3}$ -гетероалкил-гетероарил- C_{1-3} -гетероалкил-;

Формула IV (d): $-R_{12}$ представляет собой $-CH_2CH_2-G$, где каждый G независимо представляет собой $-Br$, $-I$, $-O-S(=O)_2-CH_3$, $O-S(=O)_2-CH_2-C_6H_5$ или $-O-S(=O)_2-C_6H_4-CH_3$;



Формула IV(e): E независимо выбран из группы, состоящей из $-N(R_{12})(R_{13})$, $-S-R_{12}$ и

где $-R_{12}$ представляет собой $-CH_2CH_2-G$, где каждый G независимо представляет собой $-Cl$, $-Br$, $-I$, $-O-S(=O)_2-CH_3$, $-O-S(=O)_2-CH_2-C_6H_5$ или $-O-S(=O)_2-C_6H_4-CH_3$; и где R_{13} независимо представляет собой $-C_{1-8}$ -гетероалкил-, -арил-, -гетероарил-, $-C_{1-3}$ -алкил-арил-, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-арил-, $-C_{1-3}$ -алкил-гетероарил-, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-гетероарил-, -арил- C_{1-3} -алкил-, -арил- C_{1-3} -гетероалкил-, -гетероарил- C_{1-3} -алкил-, -гетероарил- C_{1-3} -гетероалкил-, $-C_{1-3}$ -алкил-арил- C_{1-3} -алкил-, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-арил- C_{1-3} -алкил-, $-C_{1-3}$ -алкил-гетероарил- C_{1-3} -алкил-, $-C_{1-3}$ -алкил-арил- C_{1-3} -гетероалкил-, $-C_{1-3}$ -алкил-гетероарил- C_{1-3} -гетероалкил- или $-C_{1-3}$ -гетероалкил-гетероарил- C_{1-3} -гетероалкил-;

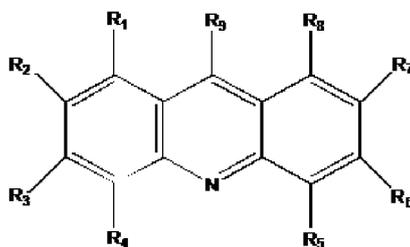
гетероарил- C_{1-3} -алкил, $-C_{1-3}$ -алкил-арил- C_{1-3} -гетероалкил, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-гетероарил- C_{1-3} -алкил, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-арил- C_{1-3} -гетероалкил, $-C_{1-3}$ -алкил-гетероарил- C_{1-3} -гетероалкил или $-C_{1-3}$ -гетероалкил-гетероарил- C_{1-3} -гетероалкил;

Формула IV(f): W независимо представляет собой $-C(=S)-O-$, $-O-C(=S)-$, $-C(=S)-S-$, $-S-C(=S)-$, $-C(=O)-S-$, $-S-C(=O)-$, $-O-S(=O)_2-O-$, $-S(=O)_2-O-$, $-O-S(=O)_2-$, $-C(=O)-NR_{10}-$, $-NR_{10}-C(=O)-$, $-O-P(=O)(-OR_{10})-$, $-P(=O)(-OR_{10})-O-$, $-O-P(=O)(-OR_{10})-$;

Формула IV(g): $-R_{12}$ представляет собой $-CH_2CH_2-G$, где каждый G независимо представляет собой $-O-S(=O)_2-CH_3$, $-O-S(=O)_2-CH_2-C_6H_5$ или $-O-S(=O)_2-C_6H_4-CH_3$;

Формула IV(h): по меньшей мере один из R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 и R_9 представляет собой -V-W-X-E, как определено для формулы IV, по меньшей мере один из R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 и R_9 выбран из группы, состоящей из $-R_{10}$, $-O-R_{10}$, $-NO_2$, $-NH_2$, $-NH-R_{10}$, $-N(R_{10})_2$, $-F$, $-Cl$, $-Br$, $-I$, $-C(=O)-R_{10}$, $-C(=O)-O-R_{10}$ и $-O-C(=O)-R_{10}$, и остальные из R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 и R_9 независимо выбраны из группы, состоящей из $-H$, $-R_{10}$, $-O-R_{10}$, $-NO_2$, $-NH_2$, $-NH-R_{10}$, $-N(R_{10})_2$, $-F$, $-Cl$, $-Br$, $-I$, $-C(=O)-R_{10}$, $-C(=O)-OR_{10}$ и $-O-C(=O)-R_{10}$, где R_{10} является таким, как определено для формулы IV.

В некоторых вариантах осуществления соединения, которым обрабатывают субстрат, представленный в настоящем описании, или получаемый функциональный фрагмент, связанный с поверхностью субстрата, представленного в настоящем описании, является труднорасщепляемым соединением, таким как труднорасщепляемый аналог соединения любой из формул IV, V или VI. Такое труднорасщепляемое соединение может являться соединением любой из следующих формул VII, VIII или IX. Формула VII представляет собой:



(VII)

где по меньшей мере один из R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 и R_9 представляет собой -V-X-E, где V, X и E являются такими, как определено для формулы IV, и остальные из R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 и R_9 независимо выбраны из группы, состоящей из $-H$, $-R_{10}$, $-O-R_{10}$, $-NO_2$, $-NH_2$, $-NH-R_{10}$, $-N(R_{10})_2$, $-F$, $-Cl$, $-Br$, $-I$, $-C(=O)-R_{10}$, $-C(=O)-O-R_{10}$ и $-O-C(=O)-R_{10}$,

где $-R_{10}$ независимо представляет собой H, $-C_{1-8}$ -алкил, $-C_{1-8}$ -гетероалкил, -арил, -гетероарил, $-C_{1-3}$ -алкил-арил, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-арил, $-C_{1-3}$ -алкил-гетероарил, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-гетероарил, -арил- C_{1-3} -алкил, -арил- C_{1-3} -гетероалкил, -гетероарил- C_{1-3} -алкил, -гетероарил- C_{1-3} -гетероалкил, $-C_{1-3}$ -алкил-арил- C_{1-3} -алкил, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-арил- C_{1-3} -алкил, $-C_{1-3}$ -алкил-гетероарил- C_{1-3} -алкил, $-C_{1-3}$ -алкил-арил- C_{1-3} -гетероалкил, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-гетероарил- C_{1-3} -алкил, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-арил- C_{1-3} -гетероалкил, $-C_{1-3}$ -алкил-гетероарил- C_{1-3} -гетероалкил или $-C_{1-3}$ -гетероалкил-гетероарил- C_{1-3} -гетероалкил, или его соль или стереоизомер (включая энантиомеры и диастереомеры).

В некоторых вариантах осуществления формулы VII каждый из R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 и R_8 представляет собой водород. В других вариантах осуществления по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6 или по меньшей мере 7 из R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 представляют собой водород.

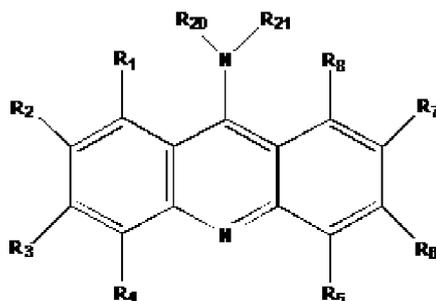
В некоторых вариантах осуществления формулы VII R_9 представляет собой -V-X-E, где V, X и E являются такими, как определено для формулы IV. В некоторых вариантах осуществления V представляет собой $-NH-R_{11}-$. В некоторых таких вариантах осуществления R_{11} представляет собой $-C_{1-8}$ -алкил-, например, метил или этил. В конкретных вариантах осуществления V представляет собой $-NH-R_{11}-$, где R_{11} представляет собой линейный $-C_{1-8}$ -алкил-. В некоторых вариантах осуществления V представляет собой $-N(CH_3)-R_{11}-$. В некоторых таких вариантах осуществления R_{11} представляет собой $-C_{1-8}$ -алкил-, например, метил или этил. В конкретных вариантах осуществления V представляет собой $-N(CH_3)-R_{11}-$, где R_{11} представляет собой линейный $-C_{1-8}$ -алкил-.

В некоторых вариантах осуществления формулы VII X представляет собой $-R_{11}-$, где $-R_{11}-$ представляет собой $-C_{1-8}$ -алкил-. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент -V-X- представляет собой $-NH-C_{1-8}$ -алкил-. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент -V-X- представляет собой $-NH-(CH_2)_1-$, $-NH-(CH_2)_2-$, $-NH-(CH_2)_3-$, $-NH-(CH_2)_4-$, $-NH-(CH_2)_5-$, $-NH-(CH_2)_6-$, $-NH-(CH_2)_7-$ или $-NH-(CH_2)_8-$. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент -V-X- представляет собой $-N(CH_3)-C_{1-8}$ -алкил-. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент -V-X- представляет собой $-N(CH_3)-(CH_2)_1-$, $-N(CH_3)-(CH_2)_2-$, $-N(CH_3)-(CH_2)_3-$, $-N(CH_3)-(CH_2)_4-$, $-N(CH_3)-(CH_2)_5-$, $-N(CH_3)-(CH_2)_6-$, $-N(CH_3)-(CH_2)_7-$ или $-N(CH_3)-(CH_2)_8-$.

В некоторых вариантах осуществления формулы VII E представляет собой $N(R_{12})_2$, где R_{12} представляет собой $-CH_2CH_2-G$. В некоторых таких вариантах осуществления каждый G независимо представляет собой $-Cl$, $-Br$ или $-I$. В некоторых таких вариантах осуществления оба функциональных фрагмента G представляют собой $-Cl$.

В некоторых вариантах осуществления формулы VII R_9 представляет собой $-NH-C_{1-8}$ -алкил- $N(CH_2CH_2Cl)_2$. В некоторых вариантах осуществления R_9 представляет собой $-NH-(CH_2)-N(CH_2CH_2Cl)_2$, $-NH-(CH_2)_2-N(CH_2CH_2Cl)_2$, $-NH-(CH_2)_3-N(CH_2CH_2Cl)_2$, $-NH-(CH_2)_4-N(CH_2CH_2Cl)_2$, $-NH-(CH_2)_5-N(CH_2CH_2Cl)_2$, $-NH-(CH_2)_6-N(CH_2CH_2Cl)_2$, $-NH-(CH_2)_7-N(CH_2CH_2Cl)_2$ или $-NH-(CH_2)_8-N(CH_2CH_2Cl)_2$. В некоторых таких вариантах осуществления каждый из R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 и R_8 представляет собой водород.

Формула VIII представляет собой:



(VIII)

где R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 и R_8 независимо выбраны из группы, состоящей из $-H$, $-R_{10}$, $-O-R_{10}$, $-NO_2$, $-NH_2$, $-NH-R_{10}$, $N(R_{10})_2$, $-F$, $-Cl$, $-Br$, $-I$, $-C(=O)-R_{10}$, $-C(=O)-O-R_{10}$ и $-O-C(=O)-R_{10}$,

где $-R_{10}$ независимо представляет собой H , $-C_{1-8}$ -алкил, $-C_{1-8}$ -гетероалкил, $-арил$, $-гетероарил$, $-C_{1-3}$ -алкил- $арил$, $-C_{1-3}$ -гетероалкил- $арил$, $-C_{1-3}$ -алкил-гетероарил, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-гетероарил, $-арил-C_{1-3}$ -алкил, $-арил-C_{1-3}$ -гетероалкил, $-гетероарил-C_{1-3}$ -алкил, $-гетероарил-C_{1-3}$ -гетероалкил, $-C_{1-3}$ -алкил- $арил-C_{1-3}$ -алкил, $-C_{1-3}$ -гетероалкил- $арил-C_{1-3}$ -алкил, $-C_{1-3}$ -алкил- $арил-C_{1-3}$ -гетероалкил, $-C_{1-3}$ -гетероалкил-гетероарил- $арил-C_{1-3}$ -алкил, $-C_{1-3}$ -гетероалкил- $арил-C_{1-3}$ -гетероалкил, $-C_{1-3}$ -алкил-гетероарил- $арил-C_{1-3}$ -гетероалкил или $-C_{1-3}$ -гетероалкил-гетероарил- $арил-C_{1-3}$ -гетероалкил;

R_{20} представляет собой $-H$ или $-CH_3$; и

R_{21} представляет собой $-R_{11}-X-E$, где R_{11} , X и E являются такими, как определено для формулы V; или его соль или стереоизомер (включая энантиомеры и диастереомеры).

В некоторых вариантах осуществления формулы VIII каждый из R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 и R_8 представляет собой водород. В других вариантах осуществления по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6 или по меньшей мере 7 из R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 представляют собой водород.

В некоторых вариантах осуществления формулы VIII R_{20} представляет собой H . В некоторых вариантах осуществления R_{20} представляет собой $-CH_3$.

В некоторых вариантах осуществления формулы VIII R_{21} представляет собой $-R_{11}-X-E$, где R_{11} , X и E являются такими, как определено для формулы V. В некоторых вариантах осуществления R_{11} представляет собой $-C_{1-8}$ -алкил-, например, метил или этил. В некоторых вариантах осуществления R_{11} представляет собой линейный $-C_{1-8}$ -алкил-. В некоторых вариантах осуществления R_{11} представляет собой $-(CH_2)-$, $-(CH_2)_2-$, $-(CH_2)_3-$, $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_6-$, $-(CH_2)_7-$ или $-(CH_2)_8-$.

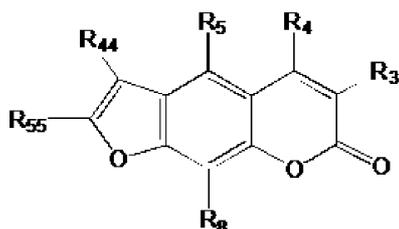
В некоторых вариантах осуществления формулы VIII X представляет собой $-R_{11}-$, где $-R_{11}-$ представляет собой $-C_{1-8}$ -алкил-. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент $-R_{11}-X-$ представляет собой $-C_{1-8}$ -алкил-. В некоторых таких вариантах осуществления R_{20} представляет собой $-CH_3$. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент $-R_{11}-X-$ представляет собой $-(CH_2)-$, $-(CH_2)_2-$, $-(CH_2)_3-$, $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_6-$, $-(CH_2)_7-$ или $-(CH_2)_8-$. В некоторых таких вариантах осуществления R_{20} представляет собой H . В некоторых таких вариантах осуществления R_{20} представляет собой $-CH_3$.

В некоторых вариантах осуществления формулы VIII E представляет собой $-N(R_{12})_2$, где R_{12} представляет собой $-CH_2CH_2-G$. В некоторых таких вариантах осуществления каждый G независимо представляет собой $-Cl$, $-Br$ или $-I$. В некоторых таких вариантах осуществления оба функциональных фрагмента G представляют собой $-Cl$.

В некоторых вариантах осуществления формулы VIII R_{21} представляет собой $-C_{1-8}$ -алкил- $N(CH_2CH_2Cl)_2$. В некоторых вариантах осуществления R_{21} представляет собой $-(CH_2)-N(CH_2CH_2Cl)_2$, $-(CH_2)_2-N(CH_2CH_2Cl)_2$, $-(CH_2)_3-N(CH_2CH_2Cl)_2$, $-(CH_2)_4-N(CH_2CH_2Cl)_2$, $-(CH_2)_5-N(CH_2CH_2Cl)_2$, $-(CH_2)_6-N(CH_2CH_2Cl)_2$, $-(CH_2)_7-N(CH_2CH_2Cl)_2$ или $-(CH_2)_8-N(CH_2CH_2Cl)_2$. В некоторых таких вариантах осуществления R_{20} представляет собой H . В некоторых таких вариантах осуществления R_{20} представляет собой $-$

CH₃. В любом из приведенных выше вариантов осуществления каждый из R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ и R₈ может представлять собой водород.

Формула IX представляет собой:



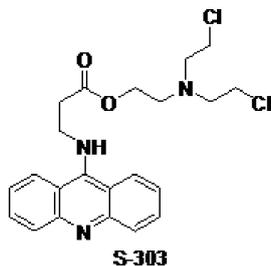
(IX)

где по меньшей мере один из R₄₄, R₅₅, R₃, R₄, R₅ и R₈ представляет собой -V-X-E, где V, X и E являются такими, как определено для формулы VI;

и остальные из R₄₄, R₅₅, R₃, R₄, R₅ и R₈ независимо выбраны из группы, состоящей из -H, -R₁₀, -O-R₁₀, -NO₂, -NH₂, -NH-R₁₀, N(R₁₀)₂, -F, -Cl, -Br, -I, -C(=O)-R₁₀, -C(=O)-O-R₁₀ и -O-C(=O)-R₁₀, где -R₁₀ независимо представляет собой H, -C₁₋₈-алкил, -C₁₋₈-гетероалкил, -арил, -гетероарил, -C₁₋₃-алкил-арил, -C₁₋₃-гетероалкил-арил, -C₁₋₃-алкил-гетероарил, -C₁₋₃-гетероалкил-гетероарил, -арил-C₁₋₃-алкил, -арил-C₁₋₃-гетероалкил, -гетероарил-C₁₋₃-алкил, -гетероарил-C₁₋₃-гетероалкил, -C₁₋₃-алкил-арил-C₁₋₃-алкил, -C₁₋₃-гетероалкил-арил-C₁₋₃-алкил, -C₁₋₃-алкил-гетероарил-C₁₋₃-алкил, -C₁₋₃-гетероалкил-арил-C₁₋₃-гетероалкил, -C₁₋₃-алкил-гетероарил-C₁₋₃-гетероалкил или -C₁₋₃-гетероалкил-гетероарил-C₁₋₃-гетероалкил;

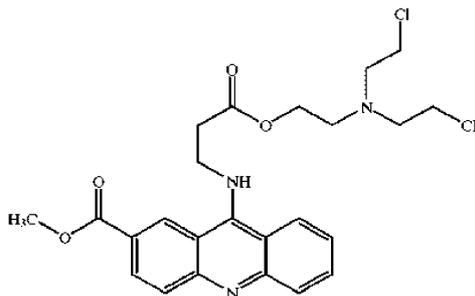
или его соль или стереоизомер (включая энантиомеры и диастереомеры).

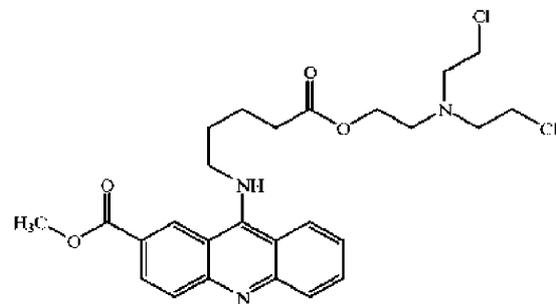
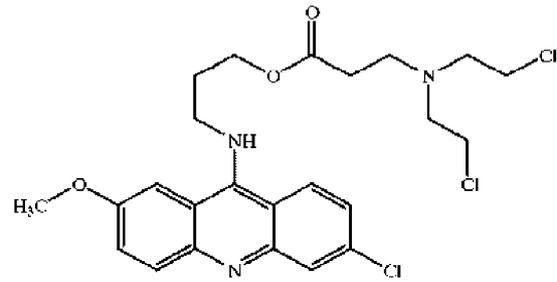
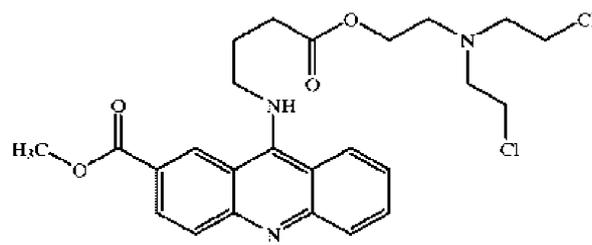
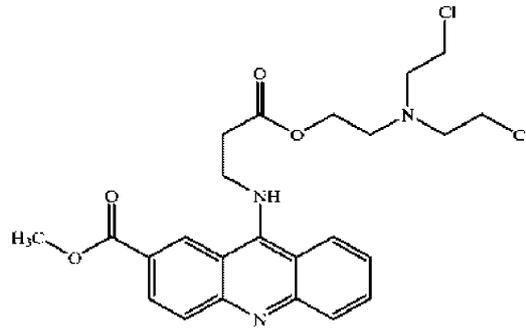
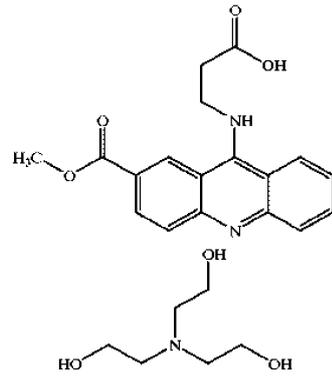
Конкретным примером подходящего патоген-инактивирующего соединения для использования в композициях и способах по изобретению является β-аланин, N-(акридин-9-ил), 2-[бис(2-хлорэтил)амино]этиловый сложный эфир (также обозначаемый в настоящем описании как "S-303"), структура которого является следующей, включая их соли.



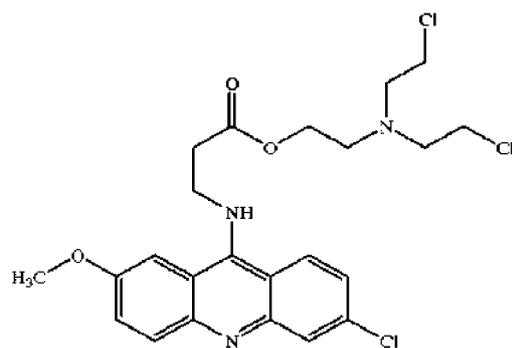
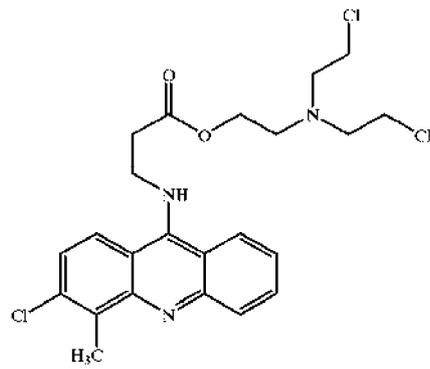
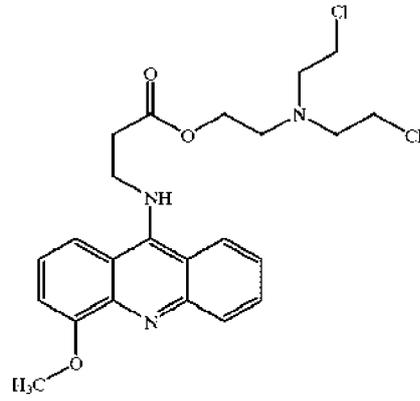
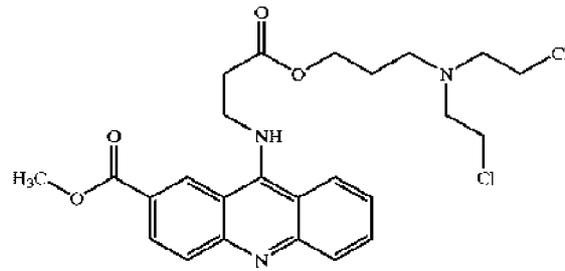
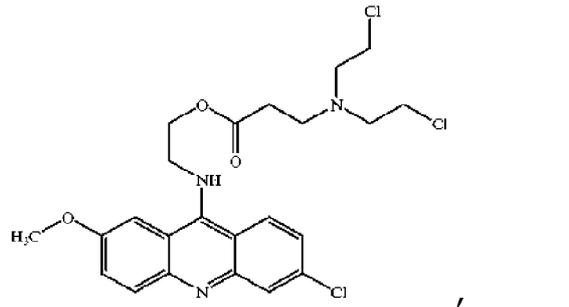
В некоторых вариантах осуществления соединения, которым обрабатывают субстрат, представленный в настоящем описании, или получаемый функциональный фрагмент, связанный с поверхностью субстрата, представленного в настоящем описании, является S-303. В некоторых вариантах осуществления соединения, которым обрабатывают субстрат, представленный в настоящем описании, или получаемый функциональный фрагмент, связанный с поверхностью субстрата, представленного в настоящем описании, является производным S-303. В некоторых вариантах осуществления соединения, которым обрабатывают субстрат, представленный в настоящем описании, или получаемый функциональный фрагмент, связанный с поверхностью субстрата, представленного в настоящем описании, является труднорасщепляемым аналогом S-303 или его производным.

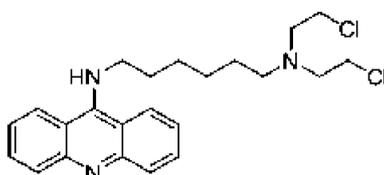
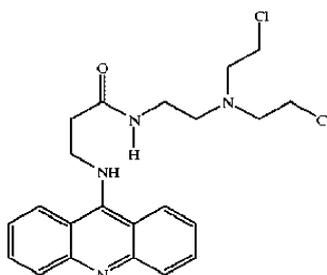
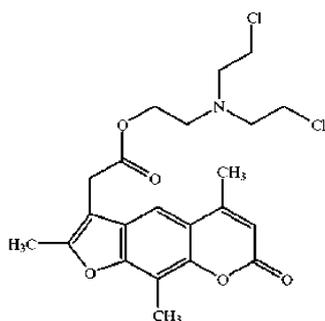
В некоторых вариантах осуществления соединения, которым обрабатывают субстрат, представленный в настоящем описании, или получаемый функциональный фрагмент, связанный с поверхностью субстрата, представленного в настоящем описании, является соединением, выбранным из следующих соединений, или его солью или стереоизомером (включая энантиомеры и диастереомеры):





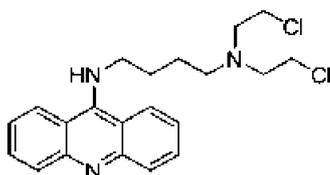
044190





(S-197)

ИЛИ



(S-220).

В некоторых вариантах осуществления любого из указанных выше соединений соединение является хлоридом. В некоторых вариантах осуществления любого из указанных выше соединений соединение является дигидрохлоридом. В некоторых вариантах осуществления соединения является дигидрохлоридом S-197. В некоторых вариантах осуществления соединения является дигидрохлоридом S-220.

В некоторых вариантах осуществления соединения, которым обрабатывают субстрат, представленный в настоящем описании, или получаемый функциональный фрагмент, связанный с поверхностью субстрата, представленного в настоящем описании, является производным (например, гидролизированным производным) любого из указанных выше соединений. В некоторых вариантах осуществления соединения, которым обрабатывают субстрат, представленный в настоящем описании, или получаемый функциональный фрагмент, связанный с поверхностью субстрата, представленного в настоящем описании, является труднорасщепляемым аналогом любого из указанных выше соединений.

Производное соединения, представленного в настоящем описании, может включать воздействующий на нуклеиновые кислоты функциональный фрагмент, часть воздействующего на нуклеиновые кислоты функционального фрагмента, электрофильный функциональный фрагмент или часть электрофильного функционального фрагмента. Производное соединения, представленного в настоящем описании, может включать а) воздействующий на нуклеиновые кислоты функциональный фрагмент или часть воздействующего на нуклеиновые кислоты функционального фрагмента, и б) электрофильный функциональный фрагмент или часть электрофильного функционального фрагмента. Производное соединения, представленного в настоящем описании, может включать только воздействующий на нуклеиновые кислоты функциональный фрагмент или часть воздействующего на нуклеиновые кислоты функционального фрагмента. Производное соединения, представленного в настоящем описании, может включать только электрофильный функциональный фрагмент или часть электрофильного функционального фрагмента. Если соединение является труднорасщепляемым, его производное может включать а) воздействующий

на нуклеиновые кислоты функциональный фрагмент или часть воздействующего на нуклеиновые кислоты функционального фрагмента, и б) электрофильный функциональный фрагмент или часть электрофильного функционального фрагмента, где а) и б) связаны друг с другом посредством негидролизуемого линкера. Если соединение является легкорасщепляемым, его производное может включать а) воздействующий на нуклеиновые кислоты функциональный фрагмент или часть воздействующего на нуклеиновые кислоты функционального фрагмента и б) электрофильный функциональный фрагмент или часть электрофильного функционального фрагмента, где а) и б) связаны друг с другом посредством гидролизуемого линкера. Если соединение является легкорасщепляемым, его производное может включать а) воздействующий на нуклеиновые кислоты функциональный фрагмент или часть воздействующего на нуклеиновые кислоты функционального фрагмента, связанные с функциональным фрагментом, представляющим собой продукт гидролиза гидролизуемого линкера. Если соединение является легкорасщепляемым, его производное может включать электрофильный функциональный фрагмент или часть электрофильного функционального фрагмента, связанные с функциональным фрагментом, представляющим собой продукты гидролиза гидролизуемого линкера. Функциональные фрагменты, представляющие собой продукты гидролиза, включают, в качестве неограничивающих примеров, спирты, амины, карбоновые кислоты, сложные эфиры и соли или стереоизомеры любого из указанных выше соединений.

Любое из соединений или производных, представленных в настоящем описании, может являться исходным материалом для реакции с субстратом для получения любой из композиций, представленных в настоящем описании. Альтернативно, любое из соединений или производных, представленных в настоящем описании, может быть связано с субстратом в любой из композиций, представленных в настоящем описании. Любое производное, представленное в настоящем описании, можно получать из соединения, производным которого оно является, или можно получать эквивалентную молекулярную структуру (например, синтезировать) независимо от соединения, производным которого оно является.

Следует понимать, что указанная единица субстрата (например, один эритроцит, одна полистироловая бусина) будет содержать один или более связанных с поверхностью функциональных фрагментов. Связанные с поверхностью функциональные фрагменты могут быть гомогенными относительно указанной единицы субстрата. Альтернативно, связанные с поверхностью функциональные фрагменты могут быть гетерогенными относительно указанной единицы субстрата (например, эритроцита). Гетерогенность относительно указанной единицы субстрата может являться результатом реакции единицы субстрата с гетерогенным набором соединений или производных. Гетерогенность относительно указанной единицы субстрата также может являться результатом реакции единицы субстрата с гомогенным соединением или производным, где реакция соединения или производного с субстратом приводит к образованию двух или более разных продуктов реакции, связанных с поверхностью субстрата. В некоторых случаях связанные с поверхностью функциональные фрагменты могут быть гомогенными относительно любой конкретной единицы субстрата, но гетерогенными относительно группы единиц субстрата (например, эритроцитов). Это может являться результатом реакции разных единиц субстрата с разными соединениями или производными с последующим смешиванием получаемых единиц субстрата для получения гетерогенной группы единиц субстрата со связанной поверхностью (например, эритроцитов).

В любом из вариантов осуществления, представленных в настоящем описании, связанный с поверхностью функциональный фрагмент может присутствовать на поверхности субстрата в количестве, также обозначаемом как уровень загрузки субстрата. Уровень загрузки можно описать в пересчете на единицу субстрата, например, в пересчете на клетку (например, эритроцит), на бусину или на частицу (например, функциональные фрагменты на клетку, функциональные фрагменты на бусину, функциональные фрагменты на частицу). В некоторых вариантах осуществления уровень загрузки субстрата может составлять по меньшей мере приблизительно 1000, по меньшей мере приблизительно 2000, по меньшей мере приблизительно 3000, по меньшей мере приблизительно 4000, по меньшей мере приблизительно 5000, по меньшей мере приблизительно 6000, по меньшей мере приблизительно 8000, по меньшей мере приблизительно 10000, по меньшей мере приблизительно 12000, по меньшей мере приблизительно 14000, по меньшей мере приблизительно 17000, по меньшей мере приблизительно 20000, по меньшей мере приблизительно 25000, по меньшей мере приблизительно 30000, по меньшей мере приблизительно 35000, по меньшей мере приблизительно 40000 или по меньшей мере приблизительно 50000 функциональных фрагментов на единицу субстрата (например, на эритроцит). В некоторых вариантах осуществления уровень загрузки субстрата может составлять не более приблизительно 50000, приблизительно 75000 или приблизительно 100000 функциональных фрагментов на единицу субстрата (например, на эритроцит). В некоторых вариантах осуществления уровень загрузки субстрата может составлять от приблизительно 1000 до приблизительно 100000, от приблизительно 1000 до приблизительно 75000, от приблизительно 1000 до приблизительно 50000, от приблизительно 1000 до приблизительно 25000, от приблизительно 5000 до приблизительно 50000, от приблизительно 5000 до приблизительно 25000, от приблизительно 5000 до приблизительно 50000, от приблизительно 8000 до приблизительно 15000, от приблизительно 25000 до приблизительно 50000, от приблизительно 25000 до приблизительно 40000, от приблизительно 25000 до приблизительно 35000, от приблизительно 25000 до приблизительно 30000, от приблизительно 30000 до приблизительно 40000 или от приблизительно 30000 до приблизительно 35000

функциональных фрагментов на единицу субстрата (например, на эритроцит). В некоторых вариантах осуществления уровень загрузки субстрата может составлять приблизительно 1000, приблизительно 2000, приблизительно 3000, приблизительно 4000, приблизительно 5000, приблизительно 6000, приблизительно 7000, приблизительно 8000, приблизительно 9000, приблизительно 10000, приблизительно 11000, приблизительно 12000, приблизительно 13000, приблизительно 14000, приблизительно 15000, приблизительно 16000, приблизительно 17000, приблизительно 18000, приблизительно 20000, приблизительно 22000, приблизительно 24000, приблизительно 26000, приблизительно 28000, приблизительно 30000, приблизительно, приблизительно 32000, приблизительно 35000, приблизительно 40000, приблизительно 45000, приблизительно 50000, приблизительно 60000, приблизительно 70000, приблизительно 80000, приблизительно 90000 или приблизительно 100000 функциональных фрагментов на единицу субстрата (например, на эритроцит).

Уровень загрузки можно описать в пересчете на единицу площади, например, в пересчете на единицу площади поверхности (например, функциональные фрагменты на мкм^2 площади поверхности субстрата). В некоторых вариантах осуществления уровень загрузки субстрата может составлять по меньшей мере приблизительно 5, по меньшей мере приблизительно 7, по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 15, по меньшей мере приблизительно 20, по меньшей мере приблизительно 25, по меньшей мере приблизительно 30, по меньшей мере приблизительно 35, по меньшей мере приблизительно 40, по меньшей мере приблизительно 50, по меньшей мере приблизительно 60, по меньшей мере приблизительно 70, по меньшей мере приблизительно 80, по меньшей мере приблизительно 90, по меньшей мере приблизительно 100, по меньшей мере приблизительно 120, по меньшей мере приблизительно 140, по меньшей мере приблизительно 160, по меньшей мере приблизительно 180, по меньшей мере приблизительно 200, по меньшей мере приблизительно 225, по меньшей мере приблизительно 250, по меньшей мере приблизительно 275, по меньшей мере приблизительно 300, по меньшей мере приблизительно 350, по меньшей мере приблизительно 400, по меньшей мере приблизительно 450 или по меньшей мере приблизительно 500 функциональных фрагментов/ мкм^2 . В некоторых вариантах осуществления уровень загрузки субстрата может составлять не более приблизительно 500, приблизительно 750 или приблизительно 1000 функциональных фрагментов/ мкм^2 . В некоторых вариантах осуществления уровень загрузки субстрата может составлять от приблизительно 5 до приблизительно 1000, от приблизительно 5 до приблизительно 750, от приблизительно 5 до приблизительно 500, от приблизительно 20 до приблизительно 500, от приблизительно 20 до приблизительно 400, от приблизительно 20 до приблизительно 200, от приблизительно 20 до приблизительно 100, от приблизительно 30 до приблизительно 200, от приблизительно 30 до приблизительно 100, от приблизительно 50 до приблизительно 100, от приблизительно 100 до приблизительно 500, от приблизительно 100 до приблизительно 400, от приблизительно 140 до приблизительно 400, от приблизительно 140 до приблизительно 300, от приблизительно 140 до приблизительно 250 или от приблизительно 180 до приблизительно 300 функциональных фрагментов/ мкм^2 . В некоторых вариантах осуществления уровень загрузки субстрата может составлять приблизительно 5, приблизительно 7, приблизительно 10, приблизительно 15, приблизительно 20, приблизительно 25, приблизительно 30, приблизительно 35, приблизительно 40, приблизительно 45, приблизительно 50, приблизительно 55, приблизительно 60, приблизительно 65, приблизительно 70, приблизительно 75, приблизительно 80, приблизительно 85, приблизительно 90, приблизительно 95, приблизительно 100, приблизительно 110, приблизительно 120, приблизительно 130, приблизительно 140, приблизительно 150, приблизительно 160, приблизительно 170, приблизительно 180, приблизительно 190, приблизительно 200, приблизительно 225, приблизительно 250, приблизительно 275, приблизительно 300, приблизительно 325, приблизительно 350, приблизительно 375, приблизительно 400, приблизительно 425, приблизительно 450, приблизительно 475, приблизительно 500, приблизительно 600, приблизительно 700, приблизительно 800, приблизительно 900, или приблизительно 1000 функциональных фрагментов/ см^2 .

Уровень загрузки может быть, по существу, гомогенным относительно группы единиц субстрата или может быть гетерогенным относительно группы единиц субстрата. Уровни загрузки, представленные в настоящем описании, могут представлять средневзвешенный уровень загрузки относительно группы единиц субстрата. Уровень загрузки можно измерять любым известным в этой области способом, например, посредством мечения (например, радиоактивного мечения, иммунного мечения, химического мечения, хемилюминесцентного мечения, флуоресцентного мечения) соединения перед добавлением к субстрату, а затем детекции метки после комбинирования соединения с субстратом. Альтернативно или дополнительно, уровень загрузки можно измерять посредством прямого или непрямого мечения (например, иммунного мечения, иммунофлуоресцентного мечения, хемилюминесцентного мечения) соединения после добавления к субстрату, а затем детекции метки.

Как правило, такое мечение осуществляют отдельно (например, в качестве контроля, в качестве стандартной кривой) от соединения, используемого в наборах и способах, представленных в настоящем описании, в качестве компаратора или эталона при определении абсолютных уровней загрузки или относительных уровней загрузки. Такое мечение можно напрямую количественно анализировать с использованием количественного или полуколичественного способа или можно сравнивать с эталоном, таким как,

например, клетки, бусы или другие материалы с известным количеством аналогично меченой молекулы на поверхности (например, анализ FACS).

В некоторых вариантах осуществления композиция (например, связанный с функциональным фрагментом субстрат) стабильна при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления композиция стабильна при температуре охлаждения (например, 2-8°C). В некоторых вариантах осуществления композиция стабильна при температуре 0°C и/или менее 0°C (например, -20°C). В некоторых вариантах осуществления композиция стабильна при -80°C. Композиция может подходить для хранения в течение по меньшей мере приблизительно 1 ч, приблизительно 2 ч, приблизительно 4 ч, приблизительно 12 ч, приблизительно 24 ч, приблизительно 48 ч, приблизительно 72 ч, приблизительно 1 недели, приблизительно 2 недель, приблизительно 3 недель, приблизительно 4 недель, приблизительно 5 недель, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 6 месяцев, приблизительно 9 месяцев или приблизительно 12 месяцев или более при комнатной температуре. Композиция может подходить для хранения в течение по меньшей мере приблизительно 1 ч, приблизительно 2 ч, приблизительно 4 ч, приблизительно 12 ч, приблизительно 24 ч, приблизительно 48 ч, приблизительно 72 ч, приблизительно 1 недели, приблизительно 2 недель, приблизительно 3 недель, приблизительно 4 недель, приблизительно 5 недель, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 6 месяцев, приблизительно 9 месяцев или приблизительно 12 месяцев или более при температуре охлаждения.

Композиция может подходить для хранения в течение по меньшей мере приблизительно 1 ч, приблизительно 2 ч, приблизительно 4 ч, приблизительно 12 ч, приблизительно 24 ч, приблизительно 48 ч, приблизительно 72 ч, приблизительно 1 недели, приблизительно 2 недель, приблизительно 3 недель, приблизительно 4 недель, приблизительно 5 недель, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 6 месяцев, приблизительно 9 месяцев или приблизительно 1 года или более при температуре 0°C и/или менее 0°C. Композиция может подходить для хранения в течение по меньшей мере приблизительно 1 часа, приблизительно 2 ч, приблизительно 4 ч, приблизительно 12 ч, приблизительно 24 ч, приблизительно 48 ч, приблизительно 72 ч, приблизительно 1 недели, приблизительно 2 недели, приблизительно 3 недель, приблизительно 4 недель, приблизительно 5 недель, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 6 месяцев, приблизительно 9 месяцев, или приблизительно 1 года или более при -80°C. Композицию можно хранить в присутствии жидкости, буфера или любого подходящего раствора (например, химически неактивного раствора). Например, если субстрат представляет собой эритроциты, композицию можно хранить в растворе добавки для эритроцитов, физиологическом растворе для банка крови, забуференной суспензионной среде или другом подходящем растворе. Растворы добавок для эритроцитов и забуференная суспензионная среда известны в этой области. Если субстрат представляет собой эритроциты, композиции можно хранить в виде суспензии от приблизительно 0,3% до приблизительно 10% эритроцитов, от приблизительно 0,5% до приблизительно 5% эритроцитов, приблизительно от 0,5% до приблизительно 1% эритроцитов, от приблизительно 1% до приблизительно 1,5% эритроцитов, от приблизительно 1,5% до приблизительно 2% эритроцитов, от приблизительно 2% до приблизительно 2,5% эритроцитов, от приблизительно 2,5% до приблизительно 3% эритроцитов, от приблизительно 3% до приблизительно 3,5% эритроцитов, от приблизительно 3,5% до приблизительно 4% эритроцитов, от приблизительно 4% до приблизительно 4,5% эритроцитов, от приблизительно 4,5% до приблизительно 5% эритроцитов или приблизительно 0,5%, приблизительно 1%, приблизительно 1,5%, приблизительно 2%, приблизительно 2,5%, приблизительно 3%, приблизительно 3,5%, приблизительно 4%, приблизительно 4,5% или приблизительно 5% эритроцитов. Если композицию будут замораживать для хранения, также можно добавлять криоконсервант, такой как, например, любой криоконсервант, известный в этой области.

Стабильность композиций (например, связанных с функциональным фрагментом субстратов), представленных в настоящем описании, и их пригодность для хранения может зависеть от природы связанного с поверхностью функционального фрагмента. Например, связанный с поверхностью функциональный фрагмент, в котором отсутствует гидролизуемый линкер (например, труднорасщепляемое соединение, или его производное, или продукт гидролиза легкорасщепляемого соединения), может быть более стабильным, чем связанный с поверхностью функциональный фрагмент, содержащий гидролизуемый линкер (например, легкорасщепляемое соединение или его производное). В некоторых вариантах осуществления композиция, представленная в настоящем описании, содержащая связанный с поверхностью функциональный фрагмент, в котором отсутствует гидролизуемый линкер, является стабильной при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления композиция стабильна при температуре охлаждения. В некоторых вариантах осуществления композиция стабильна при температуре 0°C и/или менее 0°C. В некоторых вариантах осуществления композиция стабильна при -80°C. Композиция может подходить для хранения в течение по меньшей мере приблизительно 1 ч, приблизительно 2 ч, приблизительно 4 ч, приблизительно 12 ч, приблизительно 24 ч, приблизительно 48 ч, приблизительно 72 ч, приблизительно 1 недели, приблизительно 2 недель, приблизительно 3 недель, приблизительно 4 недель, приблизительно 5 недель, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 6 месяцев, приблизительно 9 месяцев или более при комнатной температуре. Композиция может подходить для хранения в течение по меньшей мере приблизительно 1 ч, при-

появляющимся аналогом S-303 или его производным. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент, связанный с поверхностью первого субстрата, выбран из группы, состоящей из соединений формулы I, II, III, IV, IV(a)-IV(h), V, VI, VII, VIII и XI и их производных и солей и сольватов любых из указанных выше соединений. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент, связанный с поверхностью первого субстрата, выбран из группы, состоящей из соединений формулы I, II, III, VII, VIII и XI и их производных и солей и сольватов любых из указанных выше соединений. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент, связанный с поверхностью первого субстрата, выбран из группы, состоящей из соединений формулы IV, V и VI и их производных и солей и сольватов любых из указанных выше соединений. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент, связанный с поверхностью первого субстрата, выбран из группы, состоящей из соединений формулы IV(a)-IV(h) и их производных и солей и сольватов любых из указанных выше соединений.

Первый и второй субстраты могут состоять из любого подходящего материала субстрата, такого как любой материал субстрата, представленный в настоящем описании. Первый и второй субстраты могут состоять из клеток (например, эритроцитов). Альтернативно, первый и второй субстраты могут состоять из мембран клеток или материала клеточного происхождения. Например, первый и второй субстраты могут содержать препараты мембран, полученные из эритроцитов, например, тени эритроцитов (т.е. мембраны лизированных эритроцитов). Альтернативно, первый и второй субстраты могут состоять из твердой подложки. Как представлено в настоящем описании, твердая подложка может состоять из материала (например, биологического, синтетического) или матрицы, включающей, в качестве неограничивающих примеров, полимеры или сополимеры (например, сложные полиэфиры, простые полиэфиры, полиолефины, полиамиды, полисахариды, полиуретаны, стиролы и производные стиролов, полистиролы, целлюлозы), пластик, стекло, золото и другие металлы и т.д. Твердая подложка может экспонировать связанный с поверхностью функциональный фрагмент в двухмерном формате (например, планшет, многоруночный планшет) или трехмерном формате (например, клетка, бусина или другой сферический или квазисферический объект). Субстрат может являться частью аналитического планшета. Конкретные твердые подложки состоят из одного или более материалов, с которыми биологический образец не будет связываться или, по существу, не будет связываться. Например, твердая подложка может состоять из материала, с которым антитела (например, антитела, специфические для соединения или его частей) не связываются или, по существу, не связываются. В частности, твердая подложка состоит из материала, с которым антитела против эритроцитов с инактивированными патогенами не связываются или, по существу, не связываются. Как правило, первый и второй субстраты будут состоять из одного и того же материала. В некоторых вариантах осуществления первый и второй субстраты могут содержать эритроциты или полученные из них препараты мембран, иммобилизованные на поверхности твердой подложки, такой как, например, указанная выше твердая подложка. Эритроциты или препараты мембран можно иммобилизовать на поверхности твердой подложки различными способами, известными в этой области, например, с помощью антитела против антигена, не относящегося к группам крови, экспрессирующегося на поверхности клетки или с помощью адгезии с использованием поли-L-лизина, органических красителей или лектинов (например, лектинов, имеющих специфичность к галактозиальным функциональным фрагментам). Предпочтительно, используемый реагент совместим с поверхностью клетки и может стабильно поддерживать связывание клеток или мембран с твердой подложкой на всем протяжении анализа.

В некоторых вариантах осуществления первый и второй субстраты являются эритроцитами. Эритроциты из первого и второго субстратов можно получать от одного или более общих доноров или разных доноров крови. В некоторых случаях эритроциты из первого субстрата и эритроциты из второго субстрата обладают одним или более общими свойствами, такими как группа крови ABO (например, группа крови O), тип Rh или наличие или отсутствие других антигенов эритроцитов (например, общих антигенов эритроцитов, клинически значимых антигенов эритроцитов). В других случаях эритроциты из первого субстрата и эритроциты из второго субстрата отличаются конкретными свойствами, такими как группа крови ABO или наличие или отсутствие других антигенов эритроцитов (например, общих антигенов эритроцитов, клинически значимых антигенов эритроцитов). В некоторых вариантах осуществления первый и второй субстраты имеют один или более антигенов, как правило, обнаруживаемых в биологическом образце (например, цельной крови, эритроцитах, сыворотке или плазме). Наличие такого антигена может служить в качестве контроля, свидетельствующего о том, что биологический образец соответствующим образом контактирует с первым и/или вторым субстратом.

Уровень загрузки связанного с поверхностью функционального фрагмента на первом субстрате (например, эритроциты) может являться любым уровнем загрузки, представленным в настоящем описании, таким как, например, уровень загрузки, достаточный для детекции антител против соединения или его функциональных фрагментов. В некоторых вариантах осуществления уровень загрузки первого субстрата может составлять по меньшей мере приблизительно 1000, по меньшей мере приблизительно 2000, по меньшей мере приблизительно 3000, по меньшей мере приблизительно 4000, по меньшей мере приблизительно 5000, по меньшей мере приблизительно 6000, по меньшей мере приблизительно 8000, по меньшей мере приблизительно 10000, по меньшей мере приблизительно 12000, по меньшей мере приблизительно 14000, по меньшей мере приблизительно 17000, по меньшей мере приблизительно 20000, по

ответ (например, уже существующие антитела) на эритроцит с инактивированными патогенами (например, эритроциты, вводимые посредством инфузии).

Набор может дополнительно включать третий контейнер, содержащий третий субстрат, где первый уровень функционального фрагмента связан с поверхностью первого субстрата, второй уровень функционального фрагмента связан с третьим субстратом, и второй уровень меньше первого уровня. Специалисту в этой области будет понятно, что второй уровень функционального фрагмента может представлять собой внутренний эталон для детекции антитела против связанного с поверхностью функционального фрагмента на первом уровне функционального фрагмента. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления относительные уровни загрузки первого и третьего субстратов будут достаточными для различения биологического образца от пациента, который имеет или, как ожидают, будет иметь иммунный ответ (например, уже существующие антитела) на эритроцит с инактивированными патогенами (например, эритроциты, вводимые посредством инфузии) и биологического образца от пациента, который не имеет, или не ожидают, что он будет иметь, иммунный ответ (например, уже существующие антитела) на вводимые посредством инфузии эритроциты с инактивированными патогенами. Уровень загрузки первого субстрата может по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, приблизительно 2 раза, приблизительно 3 раза, приблизительно 4 раза, приблизительно 5 раз, приблизительно 6 раз, приблизительно 7 раз, приблизительно 8 раз, приблизительно 9 раз, приблизительно 10 раз, приблизительно 20 раз, приблизительно 30 раз, приблизительно 40 раз, приблизительно 50 раз, приблизительно 100 раз, приблизительно 250 раз, приблизительно 500 раз, 1000 раз, приблизительно 5000 раз, или приблизительно 10000 раз или более превышать уровень загрузки третьего субстрата. В некоторых вариантах осуществления уровень загрузки первого субстрата в от приблизительно 2 раз до приблизительно 500 раз, от приблизительно 2 раз до приблизительно 100 раз, от приблизительно 2 раз до приблизительно 50 раз, от приблизительно 2 раз до приблизительно 20 раз, от приблизительно 2 раз до приблизительно 10 раз, от приблизительно 2 раз до приблизительно 5 раз, от приблизительно 4 раз до приблизительно 100 раз, от приблизительно 4 раз до приблизительно 50 раз, от приблизительно 4 раз до приблизительно 20 раз или от приблизительно 4 раз до приблизительно 10 раз превышает уровень загрузки третьего субстрата. В некоторых вариантах осуществления уровень загрузки первого субстрата составляет по меньшей мере приблизительно 100, приблизительно 110, приблизительно 120, приблизительно 130, приблизительно 140, приблизительно 150, приблизительно 160, приблизительно 180, приблизительно 200, приблизительно 225, приблизительно 250, приблизительно 275, приблизительно 300, приблизительно 325, приблизительно 350, приблизительно 400, приблизительно 450, приблизительно 500 функциональных фрагментов/мкм², и уровень загрузки третьего субстрата составляет не более приблизительно 100, приблизительно 90, приблизительно 80, приблизительно 70, приблизительно 60, приблизительно 50, приблизительно 40, приблизительно 30 функциональных фрагментов/мкм². В некоторых вариантах осуществления уровень загрузки первого субстрата составляет от приблизительно 110 до приблизительно 750, от приблизительно 110 до приблизительно 500, от приблизительно 110 до приблизительно 400, от приблизительно 110 до приблизительно 300, от приблизительно 140 до приблизительно 750, от приблизительно 140 до приблизительно 500, от приблизительно 140 до приблизительно 400, от приблизительно 140 до приблизительно 300, от приблизительно 200 до приблизительно 400, от приблизительно 200 до приблизительно 300 функциональных фрагментов/мкм², и уровень загрузки третьего субстрата составляет от приблизительно 10 до приблизительно 100, от приблизительно 20 до приблизительно 100, от приблизительно 30 до приблизительно 100, от приблизительно 40 до приблизительно 100, от приблизительно 50 до приблизительно 100 функциональных фрагментов/мкм². В некоторых вариантах осуществления уровень загрузки первого субстрата составляет приблизительно 110, приблизительно 120, приблизительно 130, приблизительно 140, приблизительно 150, приблизительно 160, приблизительно 180, приблизительно 200, приблизительно 225, приблизительно 250, приблизительно 275, приблизительно 300, приблизительно 325, приблизительно 350, приблизительно 400, приблизительно 450, приблизительно 500 функциональных фрагментов/мкм², и уровень загрузки третьего субстрата составляет приблизительно 10, приблизительно 20, приблизительно 30, приблизительно 40, приблизительно 50, приблизительно 60, приблизительно 70, приблизительно 80, приблизительно 90, приблизительно 100 функциональных фрагментов/мкм². В некоторых вариантах осуществления уровень загрузки первого субстрата составляет по меньшей мере приблизительно 15000, приблизительно 17000, приблизительно 20000, приблизительно 25000, приблизительно 30000, приблизительно 40000 или приблизительно 50000 функциональных фрагментов на единицу субстрата (например, эритроцит), и уровень загрузки третьего субстрата составляет не более приблизительно 14000, приблизительно 12000, приблизительно 10000, приблизительно 8000, приблизительно 6000 или приблизительно 5000 функциональных фрагментов на единицу субстрата (например, эритроцит). В некоторых вариантах осуществления уровень загрузки первого субстрата составляет от приблизительно 15000 до приблизительно 75000, от приблизительно 17000 до приблизительно 75000, от приблизительно 20000 до приблизительно 75000, от приблизительно 25000 до приблизительно 75000, от приблизительно 30000 до приблизительно 75000, от приблизительно 40000 до приблизительно 75000, от приблизительно 15000 до приблизительно 50000, от приблизительно 17000 до приблизительно 50000, от приблизительно 20000 до приблизительно 50000, от приблизительно 25000 до приблизительно 50000, от приблизительно

30000 до приблизительно 50000, от приблизительно 40000 до приблизительно 50000 функциональных фрагментов на единицу субстрата (например, эритроцит), и уровень загрузки третьего субстрата составляет от приблизительно 1000 до приблизительно 15000, от приблизительно 3000 до приблизительно 15000, от приблизительно 5000 до приблизительно 15000, от приблизительно 10000 до приблизительно 15000, от приблизительно 1000 до приблизительно 14000, от приблизительно 3000 до приблизительно 14000, от приблизительно 5000 до приблизительно 14000, от приблизительно 7000 до приблизительно 14000, от приблизительно 10000 до приблизительно 14000, от приблизительно 5000 до приблизительно 12000, от приблизительно 5000 до приблизительно 10000 функциональных фрагментов на единицу субстрата (например, эритроцит). В некоторых вариантах осуществления уровень загрузки первого субстрата составляет приблизительно 15000, приблизительно 17000, приблизительно 20000, приблизительно 25000, приблизительно 30000, приблизительно 35000, приблизительно 40000, приблизительно 45000, приблизительно 50000, приблизительно 60000, приблизительно 75000 функциональных фрагментов на единицу субстрата (например, эритроцит), и уровень загрузки третьего субстрата составляет приблизительно 1000, приблизительно 3000, приблизительно 5000, приблизительно 7000, приблизительно 10000, приблизительно 12000, приблизительно 14000 функциональных фрагментов на единицу субстрата (например, эритроцит). Уровни загрузки, как представлено в настоящем описании, могут включать абсолютные количества, такие как количества, приведенные выше, или относительные уровни загрузки, такие как уровень загрузки первого субстрата относительно третьего субстрата.

Как правило, третий субстрат будет состоять из того же материала, что и первый и/или второй субстраты. В некоторых вариантах осуществления первый, второй и третий субстраты являются одинаковыми. В случае если есть гетерогенность химической структуры или типа связывания связанного с поверхностью функционального фрагмента на первом и третьем субстратах, третий субстрат может иметь то же или другое распределение связанных с поверхностью функциональных фрагментов по сравнению с первым субстратом. В некоторых вариантах осуществления первый, второй и третий субстраты состоят из эритроцитов, и эритроциты из этих трех субстратов получают от одного или более общих доноров. В некоторых вариантах осуществления все из первого, второго и третьего субстратов имеют один или более антигенов, как правило, обнаруживаемых в биологическом образце (например, цельной крови, эритроцитах, сыворотке или плазме).

В дополнение к первичной панели, представленной в настоящем описании, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения можно использовать вторичную панель. Эритроциты из вторичной панели можно получать от одного или более общих доноров. Эритроциты из вторичной панели можно получать из того же или разных доноров по сравнению с эритроцитами из первичной панели. Связанные с поверхностью функциональные фрагменты из второй панели могут быть теми же, что и связанные с поверхностью функциональные фрагменты из первой панели, или отличаться от них. Связанные с поверхностью функциональные фрагменты из вторичной панели могут быть теми же, что и связанные с поверхностью функциональные фрагменты из первой панели, и уровни загрузки для двух панелей могут быть одинаковыми или отличаться. Субстраты из первой и второй панелей могут иметь дополнительные антигены, такие как один или более антигенов, как правило, обнаруживаемых в биологическом образце (например, цельной крови, эритроцитах, сыворотке или плазме). Дополнительные антигены из первой панели могут быть теми же, что и дополнительные антигены из второй панели, или отличаться от них.

Первый, второй и необязательный третий контейнеры из наборов, представленных в настоящем описании, можно делать из любого материала, подходящего для хранения первого, второго и необязательного третьего субстратов, которые могут содержать или не содержать связанные с поверхностью функциональные фрагменты. Контейнеры можно делать из стекла, пластика или любого подходящего полимерного материала. Контейнеры могут являться стерильными и дополнительно могут включать среду для поддержания стерильности содержимого контейнеров. Следует понимать, что контейнеры будут подходить для хранения их содержимого при соответствующей температуре (например, комнатной температуре, температуре охлаждения, температуре замораживания, 0°C, -20°C, 80°C).

Наборы, представленные в настоящем описании, могут дополнительно содержать растворы добавок, буферы или другие растворы, которые можно использовать для осуществления любого из способов, представленных в настоящем описании. Растворы добавок, буферы или другие растворы можно использовать для хранения субстратов (например, субстратов, содержащих связанные с поверхностью функциональные фрагменты, или субстратов, не содержащих связанные с поверхностью функциональные фрагменты) из наборов. Растворы добавок, буферы или другие растворы можно использовать в приведении субстратов (например, субстратов, содержащих связанные с поверхностью функциональные фрагменты, или субстратов, не содержащих связанные с поверхностью функциональные фрагменты) из наборов с одним или более биологическими образцами. В зависимости от предполагаемого использования растворов добавок, буферов или других растворов, эти компоненты можно предварительно смешивать с субстратами (например, субстратами, содержащими связанные с поверхностью функциональные фрагменты, или субстратами, не содержащими связанные с поверхностью функциональные фрагменты) из набора или их можно включать в набор раздельно.

Наборы, представленные в настоящем описании, могут дополнительно содержать дополнительные

компоненты (например, реагенты) для применения в визуализации или другом определении наличия или отсутствия антител, связанных со связанными с поверхностью функциональными фрагментами, до или после приведения в контакт с биологическим образцом. Они могут включать антиглобулиновую сыворотку или другой материал, вызывающий агглютинацию, а также любые другие компоненты, которые можно использовать в способах визуализации, таких как IAT или DAT. В определенных вариантах осуществления наборы, представленные в настоящем описании, могут содержать материалы, подходящие для использования в качестве контролей (например, стандартов).

Изобретение также относится к системам, содержащим указанные выше наборы, как будет понятно специалисту в этой области. Например, система дополнительно включает автоматизированное оборудование, которое можно использовать в способах, представленных в настоящем описании.

Способы получения.

Настоящее изобретение относится к способам получения панели субстратов (например, полимерных частиц, эритроцитов). В некоторых вариантах осуществления способ включает получение первого и второго образца, каждый из которых содержит субстрат, и обработку субстрата из первого образца соединением или производным, представленным в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления способ включает получение первого и второго образцов, содержащих полимерные частицы (например, бусы, микросферы), и обработку полимерных частиц из первого образца соединением или производным, представленным в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления способ включает получение первого и второго образцов, содержащих эритроциты, и обработку эритроцитов из первого образца соединением или производным, представленным в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления эритроциты из первого и второго образцов получают от одного донора крови. Стадия обработки может дополнительно включать дополнительные реагенты, такие как кислота, основание, подходящий катализатор или любой другой реагент, который может облегчать реакцию соединения или производного с субстратом. На стадии обработки можно использовать подходящие растворители (например, воду) или буферы (например, растворы добавок для эритроцитов, физиологический раствор для банка крови). Стадия обработки может приводить к ковалентному или нековалентному связыванию функционального фрагмента с поверхностью субстрата (например, полимерными частицами, эритроцитами) из первого образца. В некоторых вариантах осуществления получаемый связанный с поверхностью функциональный фрагмент имеет ту же или, по существу, ту же химическую структуру, что и соединение или производное, используемое для обработки субстрата (например, полимерных частиц, эритроцитов) из первого образца. В некоторых вариантах осуществления получаемый связанный с поверхностью функциональный фрагмент имеет, по существу, иную химическую структуру, чем соединение или производное, используемое для обработки субстрата (например, полимерных частиц, эритроцитов) из первого образца. Например, получаемый связанный с поверхностью функциональный фрагмент может представлять собой тип гидролизованного продукта реакции. Т.к. второй образец не обрабатывают соединением, вместе с первым образцом он представляет собой панель, включающую первый образец субстрата (например, полимерных частиц, эритроцитов) со связанным с поверхностью функциональным фрагментом и второй образец субстрата (например, полимерных частиц, эритроцитов), в котором отсутствует связанный с поверхностью функциональный фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления способ получения панели субстратов (например, полимерных частиц, эритроцитов) может дополнительно включать одну или более стадий реакций первого и второго образца с одним или более дополнительными антигенами, такими как один или более антигенов, как правило, обнаруживаемых в биологическом образце (например, цельной крови, эритроцитах, сыворотке или плазме). Реакцию с одним или более дополнительными антигенами можно проводить до, во время или после обработки соединением или производным. В реакции с одним или более дополнительными антигенами при необходимости можно использовать растворители и дополнительные реагенты.

Способ получения панели субстратов (например, полимерных частиц, эритроцитов) может дополнительно включать одну или более стадий промывки первого и второго образцов после стадии обработки субстрата (например, полимерных частиц, эритроцитов) соединением или производным. Способ также может дополнительно включать стадию тушения для облегчения удаления избытка свободного соединения или производного из смеси для обработки субстрата. В некоторых вариантах осуществления гаситель может являться глутатионом. Стадию тушения можно осуществлять до, во время или после стадии промывки. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию суспендирования первого и второго образцов (например, полимерных частиц, эритроцитов) в забуференной суспензионной среде. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию добавления криоконсерванта в первый и второй образцы после промывки.

В некоторых вариантах осуществления второй образец обрабатывают аналогично или идентично первому образцу, за исключением того, что на стадии обработки исключают соединение или производное. Это можно использовать для оптимизации характеристик первого и второго образцов таким образом, что второй образец является подходящим контролем.

Способ может дополнительно включать обработку третьего образца, содержащего субстрат (например, полимерные частицы, эритроциты), соединением или производным аналогично обработке пер-

вого образца, таким образом, что обработка соединением или производным приводит к более низкому уровню функционального фрагмента, связанного с поверхностью субстрата (например, полимерных частиц, эритроцитов) из третьего образца, относительно уровня функционального фрагмента, связанного с поверхностью субстрата (например, полимерных частиц, эритроцитов) из первого образца. Таким образом, первый уровень функционального фрагмента связан с поверхностью субстрата (например, полимерных частиц, эритроцитов) из первого образца, и второй уровень меньше первого уровня. В некоторых вариантах осуществления этого можно достигнуть посредством обработки субстрата (например, полимерных частиц, эритроцитов) из третьего образца иным количеством соединения или производного, чем субстрат (например, полимерные частицы, эритроциты) из первого образца. В некоторых вариантах осуществления, альтернативно, этого можно достигнуть посредством обработки субстрата (например, полимерных частиц, эритроцитов) из третьего образца соединением или производным в течение более короткого периода времени, чем время обработки эритроцитов из первого образца. Альтернативно, третий образец обрабатывают меньшим количеством соединения или производного, чем используют в обработке первого образца, и обработку третьего образца осуществляют в течение более короткого периода времени, чем время обработки первого образца. Кроме того, любую из дополнительных стадий получения, представленных в настоящем описании в отношении первого образца, также можно осуществлять в отношении третьего образца.

В некоторых вариантах осуществления проводят реакцию третьего образца с одним или более дополнительными антигенами, такими как один или более антигенов, как правило, обнаруживаемых в биологическом образце (например, цельной крови, эритроцитах или плазме). Реакцию с одним или более дополнительными антигенами можно проводить до, во время или после лечения соединением или производным. При необходимости, в реакции с одним или более дополнительными антигенами можно использовать растворители и дополнительные реагенты.

В некоторых вариантах осуществления третий образец подвергают одной или более стадиям промывки после стадии обработки субстрата (например, полимерных частиц, эритроцитов) соединением или производным. Способ также может дополнительно включать стадию тушения для облегчения удаления избытка свободного соединения или производного из смеси для обработки. Стадию тушения можно осуществлять до, во время или после стадии промывки. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию суспендирования третьего образца (например, полимерных частиц, эритроцитов) в забуференной суспензионной среде. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию добавления криоконсерванта в третий образец после промывки.

В некоторых вариантах осуществления первый, второй и третий образцы обрабатывают идентично, за исключением того, что количество соединения или производного, используемого на стадии обработки третьего образца, меньше количества для первого образца, и из стадии обработки второго образца исключают соединение или производное.

Характеристики и уровень загрузки связанного с поверхностью функционального фрагмента на субстрате можно оценивать любым подходящим, известным в этой области способом. Уровни загрузки можно определять, например, посредством мечения (например, радиоактивного мечения, иммунного мечения, химического мечения, флуоресцентного мечения, хемилюминесцентного мечения) соединения перед добавлением к субстрату, а затем детекции метки после комбинирования соединения с субстратом. Альтернативно или дополнительно, уровень загрузки можно измерять посредством прямого или непрямого мечения (например, иммунного мечения, иммунофлуоресцентного мечения, хемилюминесцентного мечения) соединения после добавления к субстрату, а затем детекции метки. Как правило, такое мечение осуществляют отдельно (например, в качестве контроля, в качестве стандартной кривой) от соединения, используемого в наборах и способах, представленных в настоящем описании, в качестве компаратора или эталона при определении абсолютных уровней загрузки или относительных уровней загрузки. Такое мечение можно напрямую количественно анализировать с использованием количественного или полуквантитативного способа или можно сравнивать с эталоном, таким как, например, клетки, бусы или другие материалы с известным количеством аналогично меченой молекулы на поверхности (например, анализ FACS). Субстрат можно подвергать мониторингу на наличие по меньшей мере некоторого уровня конкретного получаемого связанного с поверхностью функционального фрагмента. Субстрат можно подвергать мониторингу на наличие по меньшей мере некоторого уровня загрузки всех получаемых связанных с поверхностью функциональных фрагментов.

Первый, второй и необязательный третий образцы можно стерилизовать любым известным в этой области способом. Стерилизацию можно осуществлять до или после обработки соединением или производным.

Панель субстратов (например, полимерных частиц, эритроцитов), включающую первый, второй и необязательный третий образец, можно упаковывать для хранения. Можно использовать любой подходящий контейнер для хранения (например, коробку, пакет, банку, пробирку), известный в этой области. В некоторых вариантах осуществления контейнер для хранения является стерильным. В некоторых вариантах осуществления необходимо замораживание. Например, если связанный с субстратом функциональный фрагмент содержит гидролизуемый линкер, как описано выше, образцы в панели можно замо-

раживать для хранения. В других вариантах осуществления образцы в панели можно не замораживать.

Способы применения

Настоящее изобретение относится к способам тестирования биологического образца с использованием набора, представленного в настоящем описании. В различных вариантах осуществления субстрат в наборе, представленном в настоящем описании, содержит полимерные частицы, матрицу, часть аналитического планшета или клетки, такие как, например, эритроциты.

Способы тестирования образца.

Изобретение относится к способу тестирования образца на наличие антитела, связывающегося с соединением, включающему: а) получение образца, содержащего сыворотку или плазму; б) приведение образца в контакт с субстратом, где функциональный фрагмент связан с поверхностью субстрата; и где функциональный фрагмент выбран из группы, состоящей из соединений любой из формул I, II, III, IV, IV(a)-IV(h), V, VI, VII, VIII и IX и их производных или соли или стереоизомера любого из указанных выше соединений; с) анализ степени связывания между антителом из образца и связанным с поверхностью функциональным фрагментом на субстрате, где связывание между антителом и связанным с поверхностью функциональным фрагментом свидетельствует о том, что антитело связывается с соединением.

В некоторых вариантах осуществления способ тестирования образца на наличие антитела, связывающегося с соединением, включает: а) получение образца, содержащего сыворотку или плазму; б) приведение образца в контакт с полимерной частицей (например, бусиной, микросферой), матрицей или частью аналитического планшета, где функциональный фрагмент связан с поверхностью полимерной частицы (например, бусины, микросферы), матрицы или части аналитического планшета; и где функциональный фрагмент выбран из группы, состоящей из соединений любой из формул I, II, III, IV, IV(a)-IV(h), V, VI, VII, VIII и IX и их производных или соли или стереоизомера любого из указанных выше соединений; с) анализ степени связывания между антителом из образца и связанным с поверхностью функциональным фрагментом на полимерной частице (например, бусине, микросфере), матрице или части аналитического планшета, где связывание между антителом и связанным с поверхностью функциональным фрагментом свидетельствует о том, что антитело связывается с соединением.

В некоторых вариантах осуществления способ тестирования образца на наличие антитела, связывающегося с соединением включает: а) получение образца, содержащего сыворотку или плазму; б) приведение образца в контакт с эритроцитами, где функциональный фрагмент связан с поверхностью эритроцитов; и где функциональный фрагмент выбран из группы, состоящей из соединений любой из формул I, II, III, IV(a)-IV(h), VII, VIII и IX и их производных или соли или стереоизомера любого из указанных выше соединений; с) анализ степени связывания между антителом из образца и связанным с поверхностью функциональным фрагментом на эритроцитах, где связывание между антителом и связанным с поверхностью функциональным фрагментом свидетельствует о том, что антитело связывается с соединением.

Изобретение относится к способу тестирования образца на наличие антитела, связывающегося с соединением. В некоторых вариантах осуществления способ включает получение образца, содержащего сыворотку или плазму, и приведение образца в контакт с субстратом (например, эритроцитами), где функциональный фрагмент связан с поверхностью субстрата, после чего осуществляют анализ степени связывания между антителом из образца и связанным с поверхностью функциональным фрагментом на субстрате.

В некоторых вариантах осуществления стадия анализа включает сравнение степени связывания между антителом из образца и связанным с поверхностью функциональным фрагментом с эталоном, где повышенная степень связывания по сравнению с эталоном свидетельствует о наличии антитела в образце. В некоторых вариантах осуществления эталон является тем же субстратом, что и субстрат, содержащий связанный с поверхностью функциональный фрагмент, за исключением того, что связанный с поверхностью функциональный фрагмент отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления стадия анализа включает анализ степени связывания между антителом из образца и субстратом (например, эритроцитами), в котором отсутствует связанный с поверхностью функциональный фрагмент. Способ может дополнительно включать анализ степени связывания между антителом из образца и субстратом (например, эритроцитами), содержащим меньшее количество связанного с поверхностью функционального фрагмента по сравнению с образцом.

В некоторых вариантах осуществления стадия анализа степени связывания между антителом из образца и субстратом (например, эритроцитами) включает приведение субстрата, к которому добавлен образец, с антиглобулиновой сывороткой, и стадия анализа включает анализ степени агглютинации. Можно использовать общепринятые способы измерения, такие как твердофазный анализ адгезии эритроцитов (например, Galileo System, Immucor) или IAT и DAT (например, гелевая карта, гелевая карта ID-Card DiAScreen, Bio-Rad).

В некоторых вариантах осуществления способ тестирования, представленный в настоящем описании, используют для определения того, можно ли ожидать, что у индивидуума будет иммунный ответ на инфузию эритроцитов с инактивированными патогенами. Примеры композиций эритроцитов с инактив-

винованными патогенами, которые можно использовать для инфузии индивидууму, описывают в патенте США № 6270952, патентной заявке США № 2003/0113704, патенте США № 7655392 и WO 2009/126786, содержание которых включено, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления связанный с поверхностью функциональный фрагмент на субстрате, используемом в способе, является тем же, что и патоген-инактивирующее соединение, используемое для обработки эритроцитов для инфузии, или производное такого патоген-инактивирующего соединения. В других вариантах осуществления связанный с поверхностью антиген на субстрате, используемом в способе, является аналогом патоген-инактивирующего соединения, используемого для обработки эритроцитов для инфузии, или производным такого аналога. Например, если патоген-инактивирующее соединение, используемое для обработки эритроцитов для инфузии, является легкорасщепляемым соединением (например, S-303), труднорасщепляемый аналог патоген-инактивирующего соединения можно использовать в качестве связанного с поверхностью функционального фрагмента на субстрате. Труднорасщепляемый аналог может иметь эпитоп для связывания с антителом, схожий с патоген-инактивирующим соединением, и может демонстрировать аффинность связывания с антителом, схожую с самим патоген-инактивирующим соединением. Преимуществом использования труднорасщепляемого аналога в качестве связанного с поверхностью функционального фрагмента может являться то, что субстрат, содержащий труднорасщепляемый связанный с поверхностью функциональный фрагмент, может быть более стабильным, чем субстрат, содержащий легкорасщепляемый связанный с поверхностью функциональный фрагмент. Таким образом, субстрат, содержащий труднорасщепляемый связанный с поверхностью функциональный фрагмент, может подходить для хранения при комнатной температуре или температуре охлаждения, в то время как для субстрата, содержащего соответствующий легкорасщепляемый связанный с поверхностью функциональный фрагмент, может потребоваться хранение в морозильной камере во избежание деградации связанного с поверхностью функционального фрагмента (например, посредством гидролиза легкорасщепляемого линкера).

В некоторых вариантах осуществления образец получают от индивидуума, нуждающегося в инфузии эритроцитов. Например, образец может являться образцом сыворотки, образцом плазмы или другим образцом крови от индивидуума, нуждающегося в инфузии эритроцитов. В некоторых вариантах осуществления способ тестирования образца, представленного в настоящем описании, включает первую стадию получения образца от индивидуума. Образец можно получать от индивидуума любым известным в этой области способом, например, посредством стандартного забора крови из плеча или пальца.

Способ можно осуществлять с использованием любых из композиций или наборов, представленных в настоящем описании. Если композицию или набор хранят в морозильной камере, композицию или набор убирают из морозильной камеры и размораживают перед приведением субстрата (например, эритроцитов) из набора или композиции в контакт с образцом. Набор можно размораживать в холодильнике или при комнатной температуре.

Способ осуществления переливания крови.

Изобретение относится к способу осуществления переливания крови нуждающемуся в этом индивидууму, где переливание крови включает эритроциты, обработанные патоген-инактивирующим соединением (например, патоген-инактивирующим соединением, представленными в настоящем описании). Способ включает получение образца от индивидуума (например, образца сыворотки или образца плазмы); приведение образца в контакт с субстратом (например, полимерными частицами, эритроцитами), где функциональный фрагмент связан с поверхностью субстрата, анализ степени связывания между антителом из образца и связанным с поверхностью функциональным фрагментом из образца по сравнению с эталоном, определение того, превышает ли степень связывания между антителом и связанным с поверхностью функциональным фрагментом эталон; и, если определено, что степень связывания не превышает эталон, осуществление инфузии эритроцитов с инактивированными патогенами индивидууму. Связанный с поверхностью функциональный фрагмент может быть тем же, что и патоген-инактивирующее соединение, используемое для обработки эритроцитов для инфузии. Альтернативно, связанный с поверхностью функциональный фрагмент может являться производным (например, гидролизированным производным) патоген-инактивирующего соединения, используемого для обработки эритроцитов для инфузии. Альтернативно, связанный с поверхностью функциональный фрагмент может являться аналогом патоген-инактивирующего соединения, используемого для обработки эритроцитов для инфузии. Например, если патоген-инактивирующее соединение, используемое для обработки эритроцитов для инфузии, содержит легкорасщепляемый линкер (например, S-303), связанный с поверхностью функциональный фрагмент может являться его труднорасщепляемым аналогом или производным такого труднорасщепляемого аналога.

В некоторых аспектах, способ включает получение образца от индивидуума (например, образца сыворотки или образца плазмы); приведение образца в контакт с субстратом (например, полимерными частицами, эритроцитами), где функциональный фрагмент связан с поверхностью субстрата, анализ степени связывания между антителом из образца и связанным с поверхностью функциональным фрагментом из образца по сравнению с эталоном, определение того, превышает ли степень связывания между антителом и связанным с поверхностью функциональным фрагментом эталон; и, если определено, что степень

связывания превышает эталон, осуществление инфузии эритроцитов, не подвергнутых инактивации патогенов, индивидууму. Связанный с поверхностью функциональный фрагмент может быть тем же, что и патоген-инактивирующее соединение, используемое для обработки эритроцитов для инфузии. Альтернативно, связанный с поверхностью функциональный фрагмент может являться производным (например, гидролизированным производным) патоген-инактивирующего соединения, используемого для обработки эритроцитов для инфузии. Альтернативно, связанный с поверхностью функциональный фрагмент может являться аналогом патоген-инактивирующего соединения, используемого для обработки эритроцитов для инфузии. Например, если патоген-инактивирующее соединение, используемое для обработки эритроцитов для инфузии, содержит легкорасщепляемый линкер (например, S-303), связанный с поверхностью функциональный фрагмент может являться его труднорасщепляемым аналогом или производным такого труднорасщепляемого аналога.

В некоторых вариантах осуществления способ включает получение образца, содержащего сыворотку или плазму, и приведение образца в контакт с субстратом (например, полимерными частицами, эритроцитами), где функциональный фрагмент связан с поверхностью субстрата, затем осуществляют анализ степени связывания между антителом из образца и связанным с поверхностью функциональным фрагментом на субстрате.

В некоторых вариантах осуществления стадия анализа включает сравнение степени связывания между антителом из образца и связанным с поверхностью функциональным фрагментом с эталоном, где повышенная степень связывания по сравнению с эталоном свидетельствует о наличии антитела в образце. В некоторых вариантах осуществления эталон является тем же субстратом, что и субстрат, содержащий связанный с поверхностью функциональный фрагмент, за исключением того, что связанный с поверхностью функциональный фрагмент отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления стадия анализа включает анализ степени связывания между антителом из образца и субстратом (например, полимерными частицами, эритроцитами), в котором отсутствует связанный с поверхностью функциональный фрагмент. Способ может дополнительно включать анализ степени связывания между антителом из образца и субстратом (например, полимерными частицами, эритроцитами), содержащим меньшее количество связанного с поверхностью функционального фрагмента по сравнению с образцом.

В некоторых вариантах осуществления стадия анализа степени связывания между антителом из образца и субстратом (например, полимерными частицами, эритроцитами) включает приведение субстрата, к которому добавляют образец, в контакт с антиглобулиновой сывороткой, и стадия анализа включает анализ степени агглютинации. Можно использовать общепринятые способы измерения, такие как IAT и DAT.

В некоторых вариантах осуществления определение того, что степень связывания антитела со связанным с поверхностью функциональным фрагментом на субстрате не превышает эталон, осуществляют с использованием субстрата, в котором отсутствует связанный с поверхностью функциональный фрагмент, в качестве эталона. В некоторых вариантах осуществления определение того, что степень связывания антитела со связанным с поверхностью функциональным фрагментом на субстрате не превышает эталон, осуществляют с использованием субстрата, имеющего более низкий уровень загрузки связанного с поверхностью функционального фрагмента, в качестве эталона. Предпочтительным может являться использование эталонного субстрата, отличающегося от тестового субстрата только присутствием или отсутствием связанного с поверхностью функционального фрагмента или уровнем загрузки связанного с поверхностью функционального фрагмента.

Образец от индивидуума можно получать и тестировать на связывание антитела со связанным с поверхностью функциональным фрагментом непосредственно перед намеченной инфузией эритроцитов или в пределах 5 мин, 10 мин, 30 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 12 ч или 24 ч, 48 ч, 72 ч, 1 недели, 2, недель, 3 недель, 4 недель, 5 недель или более перед намеченной инфузией эритроцитов. Если индивидуума необходимо подвергнуть нескольким инфузиям эритроцитов в течение периода времени, образец от индивидуума можно тестировать способами, представленными в настоящем описании, перед каждой инфузией эритроцитов (например, эритроцитов с инактивированными патогенами), или только перед первой инфузией эритроцитов (например, эритроцитов с инактивированными патогенами), или периодически по решению медицинского работника.

Примеры

Изобретение дополнительно проиллюстрировано с помощью следующих неограничивающих примеров.

Пример 1: Получение панелей эритроцитов.

Панель эритроцитов с S-303.

Обработанные S-303 эритроциты, являющиеся контрольным реагентом, получали так, чтобы они включали 1) контрольные эритроциты без связанных аддуктов из S-303, 2) эритроциты, обработанные S-303 и гасителем глутатионом (GSH) в условиях для получения высоких уровней связанных аддуктов из S-303, и 3) эритроциты, обработанные S-303 и гасителем глутатионом (GSH) в условиях для получения низких уровней связанных аддуктов из S-303. Более конкретно, единицы эритроцитов получали от лю-

дей-доноров стандартными способами забора крови и каждую единицу эритроцитов разделяли на три совпадающие меньшие (суб-) единицы-образцы по 100 мл, которые затем использовали для получения панели клеток-реагентов в трех разных условиях обработки. Для получения высоких уровней связанных аддуктов одну из трех совпадающих единиц эритроцитов смешивали в растворе для обработки (см., например, патенты США №№ 7655392 и 8900805) с приблизительно 0,2 мМ S-303 и приблизительно 2 мМ GSH, инкубировали в течение ночи при комнатной температуре и промывали 0,9% NaCl перед замораживанием при -80°C в глицеролите. Для получения низких уровней связанных аддуктов одну из трех совпадающих единиц эритроцитов смешивали в растворе для обработки с приблизительно 0,2 мМ S-303 и приблизительно 20 мМ GSH, инкубировали в течение ночи при комнатной температуре и промывали 0,9% NaCl перед замораживанием при -80°C в глицеролите. Контрольные эритроциты не подвергали обработке S-303/GSH, но промывали 0,9% NaCl перед замораживанием при -80°C в глицеролите.

Оценивали панель реагентов для определения того, обеспечивают ли реагентные эритроциты с более высокими уровнями поверхностных аддуктов более высокую чувствительность при детекции антитела по сравнению с реагентными эритроцитами с более низкими уровнями поверхностных аддуктов. Для этой оценки титровали ранее охарактеризованное моноклональное антитело против акридинового функционального фрагмента S-303 (полученное посредством иммунизации мышей KLN-конъюгированным S-197, труднорасщепляемым аналогом S-303) и использовали различные разведения mAb в анализе с помощью гелевой карты (например, ID-MTS™ Ortho Diagnostics, Raritan, NJ). Титрование mAb против акридиновой части S-197 относительно эритроцитов с низким уровнем аддуктов S-303 приводило к получению медианного титра (противоположно наибольшему разведению) 8000. И наоборот, разведения mAb против акридиновой части S-197, тестируемые относительно эритроцитов с высоким уровнем аддуктов S-303, приводили к медианному титру 32000. Эти данные свидетельствуют о том, что эритроциты с высоким уровнем аддуктов обеспечивают лучшую детекцию антитела против акридинового функционального фрагмента на эритроцитах с S-303.

Стабильность связывания соединения труднорасщепляемого аналога.

Осуществляли исследования для анализа связывания соединения S-220, являющегося труднорасщепляемым аналогом S-303, с эритроцитарным субстратом. В этом исследовании также сравнивали стабильность связанного с поверхностью функционального фрагмента соединения S-220 со стабильностью аналогично связанного легкорасщепляемого S-303. Более конкретно, гаситель глутатион (GSH) и соединение S-220 добавляли к используемым в качестве субстрата эритроцитам человека в концентрациях 2,0 мМ и 0,2 мМ, соответственно, а затем инкубировали в течение ночи при 37°C или 4°C. Для сравнения, гаситель GSH и легкорасщепляемое соединение S-303 аналогичным образом добавляли к эритроцитам человека в концентрациях 2,0 мМ и 0,2 мМ, соответственно, и инкубировали в течение ночи при 37°C или 4°C. Труднорасщепляемое соединение S-220 и легкорасщепляемое соединение S-303 содержат акридиновый функциональный фрагмент как часть своей структуры. После инкубации обработанные GSH/S-220 и GSH/S-303 эритроциты окрашивали моноклональным антителом мыши (mAb) или поликлональным антителом кролика (поли-Ab) против акридина (также при 4°C или 37°C) и образцы анализировали на связывание антитела (количественно анализируемого как MFI) посредством проточной цитометрии стандартными способами. mAb и поли-Ab против акридина получали с использованием иммунизации соединением S-197.

Как показано на фиг. 1-6, в случае эритроцитов, обработанных труднорасщепляемым S-220 и легкорасщепляемым S-303, можно достигать схожих уровней связывания. Кроме того, хотя наблюдали некоторые различия между связыванием моноклонального и поликлонального антитела обработанными эритроцитами, данные, полученные с использованием обоих антител, свидетельствуют о том, что связывание S-303 с эритроцитами является менее стабильным, чем связывание S-220 с эритроцитами при 37°C, что позволяет предполагать преимущество использования труднорасщепляемых соединений в способах и наборах, представленных в настоящем описании.

Панели эритроцитов.

Эритроциты получают от доноров с группой крови O стандартными способами забора крови. Клетки экспрессируют один или более из антигенов C, c, E, e, K, k, Fya, Fyb, Jka, Jkb, M, N, S, s, Pi, Lea и Leb. Каждую единицу эритроцитов (приблизительно 350 мл) разделяют на 3 совпадающие меньшие единицы (например, субъединицы) приблизительно равного объема (обозначаемые как субъединицы A, B и C). Субъединицу A обрабатывают труднорасщепляемым аналогом S-303 (например, S-220, S-197) и 2 мМ глутатиона с последующей промывкой 0,9% NaCl, для получения "высокого" уровня связанных с поверхностью аддуктов. Субъединицу B от того же донора обрабатывают тем же труднорасщепляемым аналогом S-303 и 20 мМ глутатиона с последующей промывкой 0,9% NaCl для получения "низкого" уровня связанных с поверхностью аддуктов. Варьируя концентрацию труднорасщепляемого аналога и/или глутатиона, можно получать другие уровни связанных с поверхностью аддуктов. Субъединицу C не обрабатывают труднорасщепляемым аналогом S-303 или глутатионом. Субъединицу C промывают 0,9% NaCl. После стадий обработки, представленных в настоящем описании, каждую из субъединиц суспендируют в забуференной суспензионной среде (например, при 3% эритроцитов) и переносят в один или более контейнеров для хранения. Необязательно, в каждую из субъединиц A, B и C добавляют гли-

церолит, а затем субъединицы хранят при -80°C . Субъединицы А, В и С образуют первичную панель.

Вторичную панель получают аналогично первичной панели, за исключением того, что эритроциты из каждой из субъединиц А, В и С получают от другого донора с группой крови О.

Пример 2: Тестирование образца сыворотки пациента.

Одну, две или три первичные панели из примера 1 размораживают до комнатной температуры. Каждая первичная панель содержит субъединицы А, В и С от одного донора с группой крови О. Сыворотку пациента и антиглобулиновую сыворотку добавляют к каждой из субъединиц А, В и С каждой из первичных панелей. Субъединицы из каждой первичной панели подвергают мониторингу на агглютинацию и приписывают баллы 0, 1, 2 или 3, где 0 соответствует отсутствию агглютинации, и 1, 2 и 3 соответствуют прогрессивно повышающимся степеням агглютинации.

Если баллы антитела представляют собой 0 (т.е. не наблюдают агглютинацию) для субъединиц А, В и С каждой из первичных панелей, образец считают "нереакционноспособным", и пациента можно подвергать инфузии эритроцитов, обработанных S-303 в качестве патоген-инактивирующего соединения.

Если баллы антитела составляют ≥ 1 при использовании любых из эритроцитов в первичных панелях, образец пациента подвергают дополнительному тестированию с использованием вторичной панели, как описано в примере 1. Если баллы для всех трех первичных панелей составляют \geq в случае "высоких" или "низких" уровней связанных с поверхностью аддуктов (т.е. субъединицы А или субъединицы В), и баллы для соответствующих необработанных контрольных эритроцитов (т.е. субъединицы С) составляют 0, образец классифицируют как "исходно реакционноспособный". Если для баллов вторичной панели наблюдают тот же профиль реактивности, что и для любой из первичных панелей, образец классифицируют как "подтвержденно-реакционноспособный". Пациента по мере необходимости подвергают инфузиям эритроцитов, необработанных S-303.

Если баллы для антитела составляют ≥ 1 в случае "высоких" или "низких" уровней связанных с поверхностью аддуктов (т.е. субъединицы А или субъединицы В) на одной или двух, но не всех трех первичных панелей, и баллы для соответствующих необработанных контрольных реagentных эритроцитов составляют 0 на всех из первичных панелей, образец классифицируют как "промежуточно-реакционноспособный". Если в случае вторичной панели не наблюдают агглютинацию эритроцитов со связанными с поверхностью аддуктами, образец классифицируют как "нереакционноспособный", и пациента можно подвергать инфузии эритроцитов, обработанных S-303 в качестве патоген-инактивирующего соединения.

Если для трех первичных панелей наблюдают реактивность в трех из трех, двух из трех или одной из трех панелей в отношении эритроцитов со связанными с поверхностью аддуктами и соответствующих контрольных необработанных эритроцитов, образец будут считать содержащим "предполагаемое алло-реактивное" антитело против характерного антигена эритроцитов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Набор для скрининга потенциального реципиента переливания эритроцитов с инактивированными патогенами на антитела, реагирующие с эритроцитами с инактивированными патогенами, содержащий:

(а) первый контейнер, содержащий первый субстрат, где первый уровень функционального фрагмента связан с поверхностью первого субстрата;

(б) второй контейнер, содержащий второй субстрат, где на поверхности второго субстрата отсутствует связанный функциональный фрагмент; и

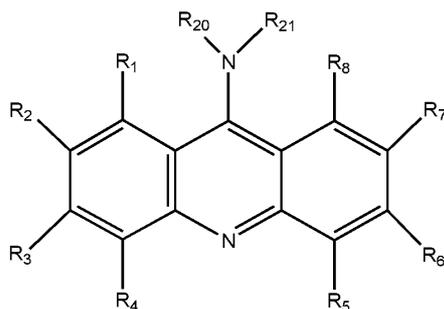
(с) третий контейнер, содержащий третий субстрат, где второй уровень функционального фрагмента связан с поверхностью третьего субстрата, и где второй уровень меньше первого уровня,

где набор сконфигурирован для анализа степени связывания между антителами потенциального реципиента, реагирующими с эритроцитами с инактивированными патогенами, и связанным с поверхностью функциональным фрагментом;

где повышенная степень связывания антител со связанным с поверхностью функциональным фрагментом в первом и/или третьем контейнере по сравнению со вторым контейнером указывает на наличие антител, реагирующих с эритроцитами с инактивированными патогенами, у потенциального реципиента;

где связанный с поверхностью функциональный фрагмент в первом и третьем субстратах образуется в результате обработки первого и третьего субстратов соединением формулы VIII или его солью, или стереоизомером любого из указанных выше соединений; и

где формула VIII имеет следующую структуру:



Формула VIII

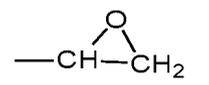
где каждый из $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7$ и R_8 представляет собой -H;

R_{20} представляет собой -H или -CH₃; и

R_{21} представляет собой -R₁₁-X-E,

где -R₁₁- независимо представляет собой -C₁₋₈-алкил-, -C₁₋₃-гетероалкил-, -арил-, -гетероарил-, -C₁₋₃-алкил-арил-, -C₁₋₃-гетероалкил-арил-, -C₁₋₃-алкил-гетероарил-, -C₁₋₃-гетероалкил-гетероарил-, -арил-C₁₋₃-алкил-, -арил-C₁₋₃-гетероалкил-, гетероарил-C₁₋₃-алкил-, -гетероарил-C₁₋₃-гетероалкил-, -C₁₋₃-алкил-арил-C₁₋₃-алкил-, -C₁₋₃-гетероалкил-арил-C₁₋₃-алкил-, -C₁₋₃-алкил-гетероарил-C₁₋₃-алкил-, -C₁₋₃-алкил-арил-C₁₋₃-гетероалкил-, -C₁₋₃-гетероалкил-гетероарил-C₁₋₃-алкил-, -C₁₋₃-гетероалкил-арил-C₁₋₃-гетероалкил-, -C₁₋₃-алкил-гетероарил-C₁₋₃-гетероалкил- или -C₁₋₃-гетероалкил-гетероарил-C₁₋₃-гетероалкил-;

X независимо представляет собой -R₁₁-; и



E независимо выбран из группы, состоящей из -N(R₁₂)₂-, -N(R₁₂)(R₁₃)-, -S-R₁₂ и

где -R₁₂ представляет собой -CH₂CH₂-G, где каждый G независимо представляет собой -Cl-, -Br-, -I-, -O-S(=O)₂-CH₃-, -O-S(=O)₂-CH₂-C₆H₅ или -O-S(=O)₂-C₆H₄-CH₃; и где R₁₃ независимо представляет собой -C₁₋₈-алкил-, -C₁₋₃-гетероалкил-, -арил-, -гетероарил-, -C₁₋₃-алкил-арил-, -C₁₋₃-гетероалкил-арил-, -C₁₋₃-алкил-гетероарил-, -C₁₋₃-гетероалкил-гетероарил-, -арил-C₁₋₃-алкил-, -арил-C₁₋₃-гетероалкил-, -гетероарил-C₁₋₃-алкил-, -гетероарил-C₁₋₃-гетероалкил-, -C₁₋₃-алкил-арил-C₁₋₃-алкил-, -C₁₋₃-гетероалкил-арил-C₁₋₃-алкил-, -C₁₋₃-алкил-гетероарил-C₁₋₃-алкил-, -C₁₋₃-алкил-арил-C₁₋₃-гетероалкил-, -C₁₋₃-гетероалкил-гетероарил-C₁₋₃-алкил-, -C₁₋₃-алкил-гетероарил-C₁₋₃-гетероалкил или -C₁₋₃-гетероалкил-гетероарил-C₁₋₃-гетероалкил.

2. Набор по п.1, где R₂₀ представляет собой H.

3. Набор по п.1 или 2, где функциональный фрагмент -R₁₁-X-представляет собой -C₁₋₈-алкил-.

4. Набор по любому из пп.1-3, где E представляет собой -N(R₁₂)₂-, где R₁₂ представляет собой -CH₂CH₂-G.

5. Набор по п.4, где каждый G независимо представляет собой -Cl-, -Br- или -I-.

6. Набор по любому из пп.1-5, где R₂₁ представляет собой -C₁₋₈-алкил-N(CH₂CH₂Cl)₂.

7. Набор по п.1, где функциональный фрагмент является труднорасщепляемым аналогом S-303 или его солью; необязательно, где труднорасщепляемый аналог S-303 является S-197 или S-220.

8. Набор по любому из пп.1-7, где функциональный фрагмент, связанный с поверхностью первого и/или третьего субстрата, присутствует при уровне загрузки по меньшей мере приблизительно 10000 функциональных фрагментов на единицу субстрата, или где функциональный фрагмент, связанный с поверхностью первого и/или третьего субстрата, присутствует при уровне загрузки по меньшей мере приблизительно 50 функциональных фрагментов/мкм².

9. Набор по любому из пп.1-8, где каждый из первого, второго и третьего субстратов содержит полимерную частицу, матрицу или часть аналитического планшета, или где первый субстрат содержит эритроциты, где второй субстрат содержит эритроциты, где третий субстрат содержит эритроциты, и где эритроциты из первого, второго и третьего субстратов получают от одного или более общих доноров.

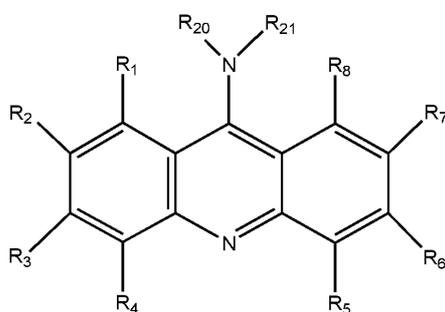
10. Набор по любому из пп.1-9, где первый уровень функционального фрагмента, связанного с поверхностью первого субстрата, по меньшей мере в 3 раза превышает второй уровень функционального фрагмента, связанного с поверхностью третьего субстрата.

11. Набор по п.9 или 10, где первый субстрат содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 образцов, где каждый из образцов первого субстрата содержит эритроциты, полученные от другого донора крови, и где второй субстрат содержит соответствующий образец, содержащий эритроциты от каждого из разных доноров крови; необязательно, где 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 образцов соответствуют множеству групп крови.

12. Способ осуществления переливания эритроцитов пациенту, где переливание эритроцитов включает эритроциты, обработанные патоген-инактивирующим соединением, включающий:

- a) получение образца, содержащего сыворотку или плазму пациента;
- b) приведение образца в контакт с i) первым субстратом; ii) вторым субстратом; и iii) третьим субстратом, где первый уровень функционального фрагмента связан с поверхностью первого субстрата, на поверхности второго субстрата отсутствует связанный функциональный фрагмент, и второй уровень функционального фрагмента связан с поверхностью третьего субстрата, и второй уровень меньше первого уровня;
- c) анализ степени связывания между антителом из образца и связанным с поверхностью функциональным фрагментом на i) первом субстрате; ii) втором субстрате; и iii) третьем субстрате, где связывание между антителом и связанным с поверхностью функциональным фрагментом свидетельствует о том, что антитело связывается с эритроцитами, обработанными патоген-инактивирующим соединением;
- d) определение того, выше ли степень связывания в первом субстрате и/или третьем субстрате, чем во втором субстрате; и
- f) если определено, что степень связывания с первым субстратом и/или третьим субстратом не выше, чем со вторым субстратом, осуществление переливания эритроцитов пациенту, где связанный с поверхностью функциональный фрагмент в первом и третьем субстратах образуется в результате обработки первого и третьего субстратов соединением формулы VIII или его солью или стереоизомером любого из указанных выше соединений;

где формула VIII имеет следующую структуру:



Формула VIII

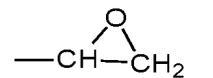
где каждый из R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ и R₈ представляет собой -H;

R₂₀ представляет собой -H или -CH₃; и

R₂₁ представляет собой -R₁₁-X-E,

где -R₁₁- независимо представляет собой -C₁₋₈-алкил-, -C₁₋₈-гетероалкил-, -арил-, -гетероарил-, -C₁₋₃-алкил-арил-, -C₁₋₃-гетероалкил-арил-, -C₁₋₃-алкил-гетероарил-, -C₁₋₃-гетероалкил-гетероарил-, -арил-C₁₋₃-алкил-, -арил-C₁₋₃-гетероалкил-, гетероарил-C₁₋₃-алкил-, -гетероарил-C₁₋₃-гетероалкил-, -C₁₋₃-алкил-арил-C₁₋₃-алкил-, -C₁₋₃-гетероалкил-арил-C₁₋₃-алкил-, -C₁₋₃-алкил-гетероарил-C₁₋₃-алкил-, -C₁₋₃-алкил-арил-C₁₋₃-гетероалкил-, -C₁₋₃-гетероалкил-гетероарил-C₁₋₃-алкил-, -C₁₋₃-гетероалкил-арил-C₁₋₃-гетероалкил-, -C₁₋₃-алкил-гетероарил-C₁₋₃-гетероалкил- или -C₁₋₃-гетероалкил-гетероарил-C₁₋₃-гетероалкил-;

X независимо представляет собой -R₁₁-; и



E независимо выбран из группы, состоящей из -N(R₁₂)₂, N(R₁₂)(R₁₃), -S-R₁₂ и

где -R₁₂ представляет собой -CH₂CH₂-G, где каждый G независимо представляет собой -Cl, -Br, -I, -O-S(=O)₂-CH₃, -O-S(=O)₂-CH₂-C₆H₅ или -O-S(=O)₂-C₆H₄-CH₃; и

где R₁₃ независимо представляет собой -C₁₋₈-алкил-, -C₁₋₈-гетероалкил-, -арил-, -гетероарил-, -C₁₋₃-алкил-арил-, -C₁₋₃-гетероалкил-арил-, -C₁₋₃-алкил-гетероарил-, -C₁₋₃-гетероалкил-гетероарил-, -арил-C₁₋₃-алкил-, -арил-C₁₋₃-гетероалкил-, -гетероарил-C₁₋₃-алкил-, -гетероарил-C₁₋₃-гетероалкил-, -C₁₋₃-алкил-арил-C₁₋₃-алкил-, -C₁₋₃-гетероалкил-арил-C₁₋₃-алкил-, -C₁₋₃-алкил-гетероарил-C₁₋₃-алкил-, -C₁₋₃-алкил-арил-C₁₋₃-гетероалкил-, -C₁₋₃-гетероалкил-гетероарил-C₁₋₃-алкил-, -C₁₋₃-гетероалкил-арил-C₁₋₃-гетероалкил-, -C₁₋₃-алкил-гетероарил-C₁₋₃-гетероалкил- или -C₁₋₃-гетероалкил-гетероарил-C₁₋₃-гетероалкил-.

13. Способ по п.12, где R₂₀ представляет собой H.

14. Способ по п.12 или 13, где функциональный фрагмент -R₁₁-X- представляет собой -C₁₋₈-алкил-.

15. Способ по любому из пп.12-14, где E представляет собой -N(R₁₂)₂, где R₁₂ представляет собой -CH₂CH₂-G.

16. Способ по п.15, где каждый G независимо представляет собой -Cl, -Br или -I.

17. Способ по любому из пп.12-16, где R₂₁ представляет собой -C₁₋₈-алкил-N(CH₂CH₂Cl)₂.

18. Способ по п.12, где связанный с поверхностью функциональный фрагмент является труднорасщепляемым аналогом S-303 или его солью; необязательно, где труднорасщепляемый аналог S-303 является S-197 или S-220.

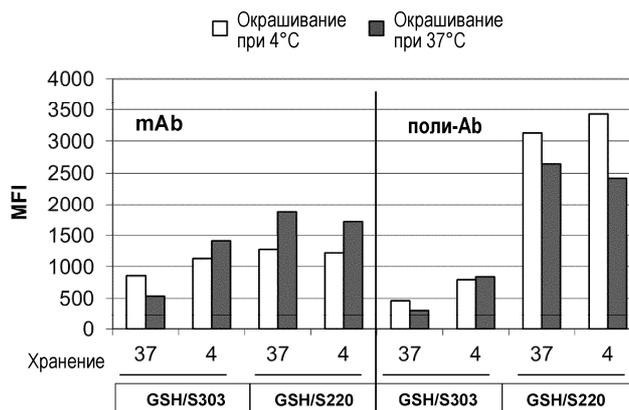
19. Способ по любому из пп.12-18, где патоген-инактивирующее соединение и связанный с поверхностью функциональный фрагмент являются одинаковыми.

20. Способ по любому из пп.12-18, где патоген-инактивирующее соединение и связанный с поверхностью функциональный фрагмент отличаются.

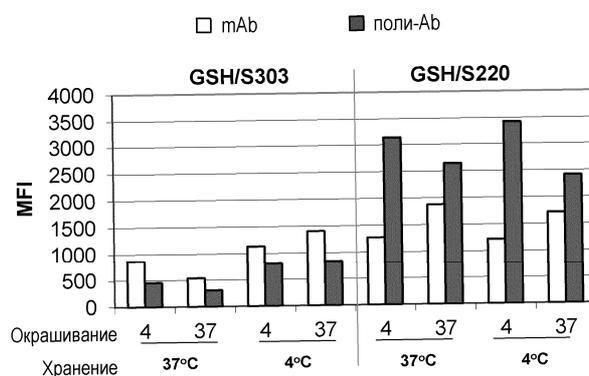
21. Способ по любому из пп.12-20, где каждый из первого, второго и третьего субстратов содержит полимерную частицу, матрицу или часть аналитического планшета, или где первый субстрат содержит эритроциты, где второй субстрат содержит эритроциты, где третий субстрат содержит эритроциты, и где эритроциты из первого, второго и третьего субстратов получают от одного или более общих доноров.

22. Способ по любому из пп.12-21, где стадия (b) включает приведение образца и субстрата(ов) в контакт с антиглобулиновой сывороткой, и где стадия (c) включает анализ степени агглютинации.

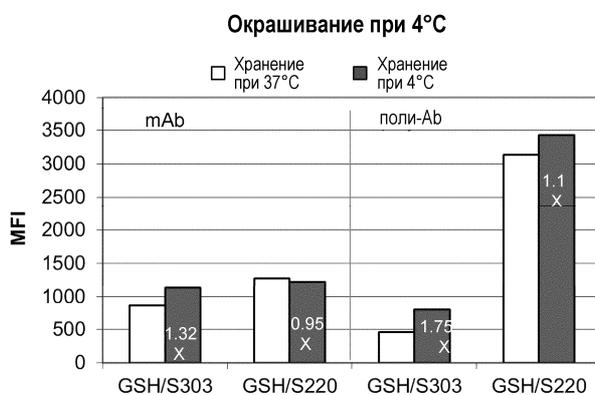
23. Способ по любому из пп.12-22, где функциональный фрагмент, связанный с поверхностью субстрата(ов), не является тем же, что и патоген-инактивирующее соединение.



Фиг. 1

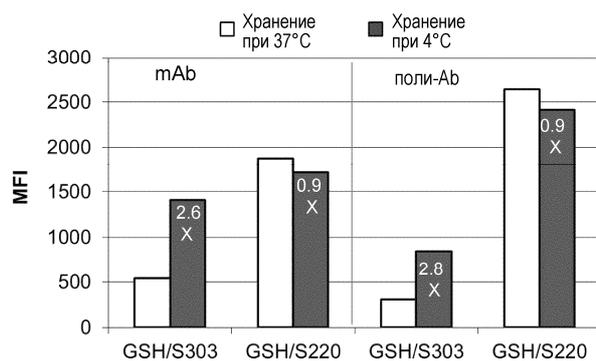


Фиг. 2



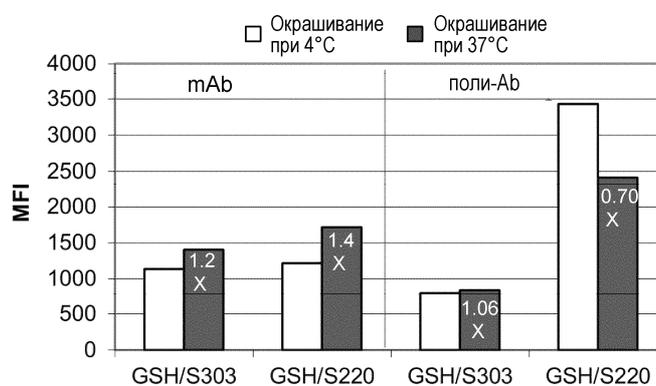
Фиг. 3

Окрашивание при 37°C



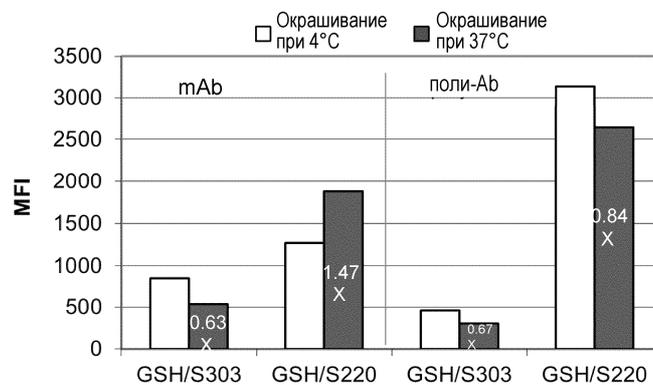
Фиг. 4

Хранение при 4°C



Фиг. 5

Хранение при 37°C



Фиг. 6

