



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2003106573/13, 07.09.2001

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
07.09.2001(30) Конвенционный приоритет:  
12.09.2000 (пп.1-9) US 09/659,938

(43) Дата публикации заявки: 20.08.2004

(45) Опубликовано: 27.11.2006 Бюл. № 33

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: US 5902731 A, 11.05.1999. SOCK J. et  
al., Activity staining of blotted enzymes by  
reaction coupling with transfer membrane-  
immobilized auxiliary enzymes, Anal.  
Biochem., 1988, v.171, n.2, p.310-319. RU  
2126963 C1, 27.02.1999.(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:  
11.03.2003(86) Заявка РСТ:  
US 01/28169 (07.09.2001)(87) Публикация РСТ:  
WO 02/22855 (21.03.2002)

Адрес для переписки:  
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,  
ООО "Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной

(72) Автор(ы):  
ОУЯНГ Тианмей (US),  
Ю Йеунг Сиу (US)(73) Патентообладатель(и):  
ЛАЙФСКЕН, ИНК. (US)(54) КОМПОЗИЦИЯ РЕАГЕНТОВ, РЕАГЕНТНАЯ ТЕСТ-ПОЛОСКА, СИСТЕМА, СПОСОБ И НАБОР  
ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ИЛИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИСУТСТВИЯ АНАЛИТА В ФИЗИОЛОГИЧЕСКОМ  
ОБРАЗЦЕ

(57) Реферат:  
Изобретение относится к области  
биотехнологии, конкретно к определению аналита в  
физиологическом образце, и может быть  
использовано в медицинских и диагностических  
целях. Систему, окисляющую аналит и  
генерирующую сигнал, включающую аналит-  
оксидазу и растворимую в воде соль тетразолия,  
которая способна к присоединению гидрид-иона с  
образованием растворимого в воде окрашенного

соединения формазана, наносят на поверхность  
положительно заряженной подложки. Тест-полоски,  
наборы и системы с полученной композицией  
используют для обнаружения или определения  
присутствия аналита в физиологическом образце.  
Изобретение позволяет повысить достоверность  
определения присутствия аналита в  
физиологическом образце и упростить способы  
определения указанных аналитов. 5 н. и 4 з.п. ф-  
лы, 1 ил., 3 табл.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2003106573/13, 07.09.2001**

(24) Effective date for property rights: **07.09.2001**

(30) Priority:  
**12.09.2000 (cl.1-9) US 09/659,938**

(43) Application published: **20.08.2004**

(45) Date of publication: **27.11.2006 Bull. 33**

(85) Commencement of national phase: **11.03.2003**

(86) PCT application:  
**US 01/28169 (07.09.2001)**

(87) PCT publication:  
**WO 02/22855 (21.03.2002)**

Mail address:  
**129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3,  
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i  
Partnery", pat.pov. E.E.Nazinoj**

(72) Inventor(s):  
**OJJaNG Tianmej (US),  
Ju Jeung Siu (US)**

(73) Proprietor(s):  
**LAJFSKEN, INK. (US)**

(54) **COMPOSITION OF REAGENTS, REAGENT TEST-BAND, SYSTEM, METHOD AND SET FOR DETECTING OR ASSAY OF ANALYTE PRESENCE IN PHYSIOLOGICAL SAMPLE**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, analytical chemistry.  
SUBSTANCE: invention relates to determination of analyte in physiological sample and can be used in medicinal and diagnostic aims. Method involves applying of the system for oxidizing the analyte and generating signal and comprising the analyte-oxidaze and water-soluble tetrazolium salt that is able for addition of hydride ion resulting to formation of water-soluble colored formazan compound on surface of a positively

charged backing. Test-bands, sets and systems with the prepared composition are used for detecting or determination of the analyte presence in physiological sample. Invention provides enhancing reliability of determination of the analyte presence in physiological sample and to simplify methods for assay of indicated analytes.

EFFECT: improved assay method.  
9 cl, 1 dwg, 3 tbl, 2 ex

RU 2 288 273 C 2

RU 2 288 273 C 2

Область техники, к которой относится изобретение  
Изобретение относится к области определения аналитов (анализируемых элементов и соединений).

Предпосылки изобретения

5 Значимость определения аналитов в физиологических жидкостях, например крови и ее производных, для современного общества постоянно возрастает. Анализы на определение аналитов находят применение во множестве приложений, включая клиническое лабораторное тестирование, домашнее тестирование и т.д., где результаты таких тестов играют заметную роль при постановке диагноза и лечении разнообразных заболеваний.

10 Представляющие интерес аналиты включают этанол, формальдегид, глюкозу, глутаминовую кислоту, глицерин, бета-гидроксibuтират, L-лактат, лейцин, яблочную кислоту, пировиноградную кислоту, стероиды и т.п. В ответ на возрастающую значимость определения аналитов разработано множество методик и устройств для определения аналитов для применения как в клинических, так и в домашних условиях.

15 Многие методики и устройства, разработанные к настоящему времени, используют генерирующую сигнал систему, для определения наличия представляющего интерес аналита в физиологическом образце, таком как кровь.

Несмотря на то что к настоящему времени разработано множество генерирующих сигнал систем для применения при определении широкого спектра различных аналитов, продолжает существовать потребность в дальнейшей разработке таких систем.

20 Релевантная литература

Представляющие интерес патенты включают следующие: EP 0908453 A1; WO 94/01578 и WO 94/01544.

Сущность изобретения

25 Представлены тест-полоски и способы их применения для определения аналита в образце. Описываемые тест-полоски характеризуются, по крайней мере, включением растворимой в воде соли тетразолия на поверхности положительно заряженной подложки. Во многих вариантах осуществления, растворимая в воде соль тетразолия представлена как часть окисляющей аналит, генерирующей сигнал системы, которая включает один или  
30 несколько из следующих дополнительных компонентов: фермент, окисляющий аналит, например аналит-дегидрогеназу или аналит-оксидазу; агент переноса электрона и кофактор фермента. Также представлены системы и наборы, включающие описываемые тест-полоски. Описываемые тест-полоски, системы и наборы находят применение в определении широкого спектра аналитов в образце, например физиологическом образце,  
35 таком как кровь или ее фракция, или ТЖ (внутриклеточная жидкость).

Краткое описание чертежей

На чертеже представлены результаты теста на содержание глюкозы при ее концентрации в образце 400 мг/дл, проведенного на положительно заряженной и незаряженной подложках, в которых применялся растворимый в воде тетразолий как  
40 индикатор, в соответствии с настоящим изобретением.

Примеры реализации конкретных вариантов осуществления изобретения

Представлены тест-полоски и способы их применения в определении аналита в образце. Описываемые тест-полоски характеризуются, по крайней мере, включением растворимой в воде соли тетразолия на поверхности положительно заряженной подложки. Во многих  
45 вариантах осуществления изобретения растворимая в воде соль тетразолия представлена как часть окисляющей аналит, генерирующей сигнал системы, которая включает один или несколько из следующих дополнительных компонентов: фермент, окисляющий аналит, например аналит-дегидрогеназу или аналит-оксидазу; агент переноса электрона и кофактор фермента. Также представлены системы и наборы, включающие описываемые  
50 тест-полоски. Описываемые тест-полоски, системы и наборы находят применение в определении широкого спектра аналитов в образце, таком как физиологический образец, например кровь или ее фракция, или ТЖ (внутриклеточная жидкость).

Перед тем как описать настоящее изобретение более детально, необходимо понять, что

изобретение не ограничивается частными вариантами реализации изобретения, описанными ниже, так как могут быть произведены модификации частных вариантов реализации изобретения, находящиеся в пределах объема формулы изобретения. Необходимо также понять, что применяемая терминология предназначена для описания частных вариантов реализации изобретения и не является ограничивающей. Напротив, объем настоящего изобретения будет установлен прилагаемой формулой изобретения.

В этом описании и прилагаемой формуле изобретения, единственное число включает множественное, за исключением случаев, когда контекст ясно указывает на противоположное. За исключением случаев, когда оговорено противоположное, все технические и научные термины, применяемые здесь, имеют то же значение, как это обычно понимается в области техники, к которой принадлежит данное изобретение.

#### Композиции

Как было кратко изложено выше, описываемое изобретение обеспечивает композиции для определения широкого спектра аналитов в образцах. Композиции включают положительно заряженную подложку и растворимую в воде соль тетразолия, которая находится на поверхности подложки, обычно как элемент, окисляющей аналит, генерирующей сигнал системы. Описываемые композиции обычно представлены как сухие композиции, подобные применяющимся в реагентных тест-полосках. В частности, изобретение обеспечивает полоски для анализа отдельного аналита в цельной крови или ее производной фракции, например глюкозы, этанола, гликозилированных белков и т.д. В наиболее широком смысле, реагентные тест-полоски включают положительно заряженную подложку и окисляющую аналит, генерирующую сигнал систему, которая присутствует на поверхности подложки и включает растворимую в воде соль тетразолия.

Кроме того, упомянутые выше элементы описываемых композиций определены более подробно.

#### Положительно заряженная подложка

Существенным признаком описываемых композиций является наличие положительно заряженной подложки. Под положительно заряженной подложкой подразумевается подложка, имеющая, по крайней мере, на одной из ее поверхностей один или несколько, обычно большое количество, положительных зарядов, присутствующих, например, в заряженных группах или частях. Подложка может быть изготовлена из одного материала или может быть составлена из двух или нескольких различных материалов, где эти различные материалы могут быть смешанными, расположенными слоями или организованными любым другим способом для обеспечения требуемой положительно заряженной поверхности.

Кроме того, положительно заряженная подложка может быть абсорбирующей или не абсорбирующей. Под абсорбирующим подразумевается материал, который проявляет способность избирательного задержания одного или нескольких компонентов, как это может происходить, например, в материалах, способных абсорбировать или "впитывать" один или несколько компонентов, как это происходит при хроматографическом разделении. Примеры абсорбирующих материалов включают, но не ограничиваются следующими: необработанные формы бумаги, нитроцеллюлозу и подобные им, которые проявляют способность к хроматографическому разделению компонентов, содержащихся в жидкостях, пропускаемых сквозь них.

В качестве альтернативы, положительно заряженная подложка может быть не абсорбирующей. Не абсорбирующая положительно заряженная подложка включает пористые инертные матрицы, которые обеспечивают поддержку для различных элементов генерирующей сигнал системы, описанной ниже, и имеют положительный заряд. Такие матрицы обычно сформированы так, чтобы обеспечить зону для нанесения физиологического образца, например крови, и регистрацию хромогенного продукта, образованного красителем генерирующей сигнал системы. Таким образом, матрица обычно позволяет водному флюиду протекать через нее и обеспечивает достаточно свободного пространства для прохождения химических реакций генерирующей сигнал системы. Было

разработано некоторое количество различных положительно заряженных пористых матриц для применения в различных анализах на определение аналита, которые могут различаться в отношении материалов, размера пор, объема и т.п., где типичные матрицы включают описанные в патентах США №№55932431; 5874099; 5871767; 5869077; 5866322; 5834001; 5800829; 5800828; 5798113; 5670381; 5663054; 5459080; 5459078; 5441894 и 5212061; описания которых включены в заявку в качестве ссылки. Размеры и пористость тест-полосок могут сильно различаться, при этом матрица может иметь, а может не иметь градиент пористости, например, с большими порами вблизи или в зоне нанесения образца и меньшими порами в зоне регистрации. Положительно заряженные мембраны могут быть 10 приготовлены с применением положительно заряженных полимеров, таких как полиамид. В качестве альтернативы, такие мембраны могут быть приготовлены различными способами, такими как покрытие поверхности с применением катионных поверхностно-активных веществ или полимеров. Такое покрытие может наноситься методами окунания, химической обработки, фотопереноса, полимеризации в плазме и т.д. Помимо этого, в 15 других вариантах осуществления мембрана может быть приготовлена при помощи смешивания одного или нескольких положительно заряженных материалов с полимером, формирующим мембрану. Примерами положительно заряженных полимеров являются полиамид, поли(винил пиридин), поли(винил имидазол), поли(аллиламин), поли(винилбензилдиметилхлорид аммония), полилизин или хитозан. Примеры катионных 20 поверхностно-активных веществ включают те, которые содержат первичные, вторичные или четвертичные аминогруппы. Материал может быть, а может и не быть функционализирован для того, чтобы обеспечить ковалентное или нековалентное присоединение различных элементов генерирующей сигнал системы, описанной более детально ниже.

Во многих вариантах осуществления, матрица формируется как мембранная тестовая прокладка и прикрепляется к твердой основе, где основа может быть листом пластика (например, полистирол, нейлон или полиэфир) или металла, или любым другим 25 подходящим материалом, известным в этой области техники. Представляющими интерес для многих вариантов осуществления являются конфигурации тест-полосок, описанные в патентах США №№5972294; 5968836; 5968760; 5902731; 5846486; 5843692; 5843691; 30 5789255; 5780304; 5753452; 5753429; 5736103; 5719034; 5714123; 383550; 381591; 5620863; 5605837; 5563042; 5526120; 5515170; 367109; 5453360; 5426032; 5418142; 5306623; 5304468; 5179005; 5059394, 5049487; 4935346; 4900666 и 4734360, описания которых включены в заявку в качестве ссылки.

Генерирующие сигнал системы

Как было кратко отмечено выше, существенным признаком описываемых композиций является то, что они включают, по крайней мере, одну растворимую в воде соль 35 тетразолия, которая обычно присутствует в сочетании с одним или несколькими элементами окисляющей аналит, генерирующей сигнал системы. Более точно, существенным признаком описываемых композиций является наличие растворимой в воде соли тетразолия, которая способна к присоединению гидридиона с образованием 40 растворимого в воде, окрашенного соединения формазана. Представляющие интерес растворимые в воде соли тетразолия включают описанные в европейской патентной заявке EP 0908453, описание которой включено в заявку в качестве ссылки. Один класс 45 представляющих интерес растворимых в воде солей тетразола включает описанные в европейской патентной заявке EP 0908453 формулой 2 на странице 2, строки от 35 до 48. Другой класс представляющих интерес растворимых в воде солей тетразолия включает описанные в европейской патентной заявке EP 0908453 формулой 1 на странице 3, строки 10-25.

50 Конкретные виды растворимых в воде соединений или солей тетразолия, которые представляют отдельный интерес, включают, но не ограничиваются следующими: 2,2'-добензотиазолил-5,5'-бис[4-ди(2-сульфоэтил)карбонилфенил]-3,3'-(3,3'-диметокси-4,4'-бифинил)дитетразолий, двунатриевая соль (WST-5); 2-бензотиазолил-3-(4-карбокси-2-

метоксифенил)-5-[4-(2-сульфоэтилкарбомоил)фенил]-2Н-тетразолий (WST-4) и им подобные. WST-5 является более предпочтительным во многих вариантах осуществления, потому что он хорошо растворяется в водной среде, которая наиболее совместима с биологическими образцами. Более того, получающееся в результате соединения

5 формазана обнаруживает сильное спектральное поглощение в фиолетово-голубой части спектра, таким образом уменьшая потребность в коррекции для учета фонового сигнала от гемоглобина.

Как упоминалось выше, растворимая в воде соль тетразолия обычно присутствует как элемент окисляющей аналит, генерирующей сигнал системы. Под генерирующей сигнал

10 системой подразумевается набор из двух или нескольких веществ или молекул, которые способны согласованно действовать при соединении, производя регистрируемый сигнал, который является индикатором наличия, и часто количества конкретного аналита в данном образце. Термин генерирующая сигнал система широко применяется для того, чтобы

15 охватить как смесь всех компонентов реагента генерирующей сигнал системы, так и систему, в которой один или несколько компонентов реагента отделены от остальных составляющих реагента как, например, в наборе.

Как упоминалось выше, генерирующая сигнал система описываемых композиций и тест-полосок является окисляющей аналит, генерирующей сигнал системой. Агент, окисляющий аналит, обычно является ферментом, который способен перемещать гидрид-ион из

20 представляющего интерес аналита для образования окисленной формы аналита. Представляющие интерес ферменты, окисляющие аналит, включают аналит-оксидазы и аналит-дегидрогеназы. Представляющие интерес аналит-оксидазы включают, но не ограничиваются следующими: глюкозооксидазу (где аналитом является глюкоза), холестеролоксидазу (где аналитом является холестерин), алкогольоксидазу (где аналитом

25 является этанол), билирубиоксидазу (где аналитом является билирубин), холиноксидазу (где аналитом является холин), формальдегид-дегидрогеназу (где аналитом является формальдегид), глутаматоксидазу (где аналитом является L-глутаминовая кислота), глицеролоксидазу (где аналитом является глицерин), галактозооксидаза (где аналитом является галактоза), L-аскорбатоксидаза (где аналитом является аскорбиновая кислота),

30 лактатоксидаза (где аналитом является молочная кислота), лейцинооксидаза (где аналитом является лейцин), малатоксидаза (где аналитом является яблочная кислота), пируватоксидаза (где аналитом является пировиноградная кислота), уратоксидаза (где аналитом является мочевая кислота) и т.п.

Представляющие интерес аналит-дегидрогеназы включают, но не ограничиваются

35 следующими: алкогольдегидрогеназу для этанола, формальдегид-дегидрогеназу для формальдегида, глюкозодегидрогеназу для глюкозы, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназу для глюкозо-6-фосфата, глутаматдегидрогеназу для глутаминовой кислоты, глицеролдегидрогеназу для глицерина,  $\beta$ -гидроксibuтиратдегидрогеназу для  $\beta$ -гидроксibuтирата, гидроксистероид-дегидрогеназу для стероида, L-

40 лактатдегидрогеназу для L-лактата, лейциндегидрогеназу для лейцина, малатдегидрогеназу для яблочной кислоты и пируватдегидрогеназу для пировиноградной кислоты.

Во многих вариантах осуществления, описываемые генерирующие сигнал системы также включают кофактор фермента, который способен взаимодействовать с окисляющим

45 агентом таким образом, что при окислении представляющего интерес аналита окисляющим агентом указанный агент попутно восстанавливает кофактор фермента. Представляющие интерес кофакторы фермента включают, но не ограничиваются следующими: например,  $\beta$ -никотинамид-аденин-динуклеотид( $\beta$ -НАД),  $\beta$ -никотинамид-аденин-

50 динуклеотид-фосфат ( $\beta$ -НАДФ), тионикотинамид-аденин-динуклеотид, тионикотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат, никотинамид-1, N6-этенаденин-динуклеотид, никотинамид-1, N6-этенаденин-динуклеотид-фосфат и пироллохинолин хинон (ПХХ). Кофакторы ферментов, которые могут быть включены в описываемую генерирующую сигнал систему и представляющие особенный интерес, включают НАДН или НАД(Ф)Н.

В дополнении к агенту, окисляющему аналит, описываемая генерирующая сигнал система обычно включает агент переноса электрона. Под агентом переноса электрона имеется в виду химическое соединение или молекула, которая может переносить электрон в форме гидрид-иона, от восстановленного кофактора фермента к растворимому в воде соединению тетразолия. Представляющий интерес агент переноса электрона включает агенты переноса электрона как с высоким, так и низким молекулярным весом. В данном описании низкий молекулярный вес означает молекулярный вес, который не превышает 2000 дальтон, обычно около 1000 дальтон и во многих вариантах осуществления около 500 дальтон. Высокий молекулярный вес означает молекулярный вес, по крайней мере, около 5000 дальтон, во многих вариантах осуществления 10000 или 20000 дальтон или выше. Молекулярный вес агентов переноса электрона с высоким молекулярным весом часто превышает 100000 дальтон. Во многих вариантах осуществления агент переноса электрона с низким молекулярным весом является небелковым соединением, в то время как агент переноса электрона с высоким молекулярным весом является белковым соединением. Под белковым подразумевается полипептид или его полимерный заменитель.

Представляют интерес ряд агентов переноса электрона с низким молекулярным весом. Такие агенты включают: флавины, такие как рибофлавин (РБФ), аллоксазин (АЛЛ) и люмихром (ЛХ); феназины, такие как феназин, феназин метасульфат (ФМС), феназинэтосульфат, метоксифеназин метасульфат и сафранин; метил-1,4-нафтол (менадион), фенотиазины, такие как ФТ и его катион-радикал, ФТ+, тионин (ТН), азур А (АА), азур В (АВ), азур С (АС), метиленовый голубой (МГ), метиленовый зеленый (МЗ) и толуидин голубой О (ТГО), феноксазины, такие как феноксазин (ФФА), базовый синий 3 (БС 3), и бриллиантовый крезоловый синий АLD (БКС), бензо-а-феназоксоний хлорид (Medola's blue); индофенолы, такие как 2,6-дихлорфенол индофенол (ДХФ); и индамины, такие как зелень Биндшедлера и фенилен голубой и т.п. Особый интерес во многих вариантах осуществления представляют соединения феназина, например ФМС, феназин этосульфат, метоксифеназин метасульфат и сафранин, где ФМС является небелковым агентом переноса электрона с низким молекулярным весом во многих вариантах осуществления.

Во многих вариантах осуществления белковым агентом переноса электрона с высоким молекулярным весом является фермент, который способен окислять восстановленный кофактор, например НАД(Ф)Н, попутно восстанавливая соль тетразолия генерирующей сигнал системы. Во многих вариантах осуществления переносящим электрон ферментом является диафороза, такая как дегидрогеназа липоевой кислоты, ферредоксин-НАДФ-редуктаза, липоамиддегидрогеназа, НАДФН-дегидрогеназа и т.д. Ряд диафораз доступен и может быть использован, где промышленно производящиеся диафоразы, которые могут присутствовать в описываемых генерирующих сигнал системах, включают диафорузу бациллы, диафорузу клостридиума, диафорузу вибриона, свиную диафорузу т.п.

Генерирующие сигнал системы, описанные выше, как правило, содержатся в описываемых композициях как реагентные композиции. Во многих вариантах осуществления реагентные композиции являются сухими композициями. Как минимум, реагентные композиции являются такими составами, которые включают растворимую в воде соль тетразолия. Однако во многих вариантах осуществления, реагентные композиции дополнительно включают кофактор фермента, фермент, окисляющий аналит и агент переноса электрона, описанные выше.

#### Реагентные тест-полоски

Во многих вариантах осуществления настоящего изобретения особый интерес представляют реагентные тест-полоски, которые включают описанные выше композиции и предназначены для применения при определении наличия или концентрации аналита в образце. В частности, изобретение представляет сухие полоски для количественного анализа определенного аналита в цельной крови, например  $\beta$ -гидроксibuтирата, глюкозы и т.д. В самом широком смысле, реагентная тест-полоска включает положительно заряженную твердую основу и нанесенную на нее сухую реагентную композицию, где сухая

реагентная композиция включает все компоненты реагентной композиции, необходимые для того, чтобы генерировать регистрируемый сигнал в присутствии представляющего интерес аналита. В большинстве вариантов осуществления описываемого изобретения сухая реагентная композиция на описываемой тест-полоске включает следующие элементы:

5 фермент, окисляющий аналит, кофактор фермента, агент переноса электрона и растворимую в воде соль тетразолия, где каждый из этих составных элементов подробно описан выше.

Во многих вариантах осуществления, описываемые тест-полоски включают мембранную тестовую прокладку, которая фиксируется на твердой основе. Основа может быть  
10 пластиковым, например, из полистирола, нейлона или полиэфира, или металлическим листом, или любым другим пригодным материалом, известным в данной области техники. Реагентная композиция связана с тестовой прокладкой, например, нанесена на тестовую прокладку, внедрена в тестовую прокладку и т.д. Полоска также может быть сформирована более сложным образом, например, когда тестовая прокладка расположена между основой  
15 и поверхностным слоем, причем один или более реагентов, используемых при обработке образца, могут находиться на поверхностном слое. Дополнительно, на тест-полоске могут находиться протоки или каналы, как это известно в данной области техники. Формы тест-полосок, представляющие интерес для многих вариантов осуществления, описаны в патенте США №5902731, описание которой включено в заявку в качестве ссылки.

20 Описываемые тест-полоски могут быть изготовлены при помощи любой подходящей методики. Одной из подходящих методик является приведение в контакт, по крайней мере, тестовой прокладки полоски с водной композицией, включающей все элементы реагентной композиции, которая должна быть связанной с тестовой прокладкой реагентной тест-полоски, получаемой в результате. Удобно погрузить тестовую прокладку в водную  
25 композицию, продержать ее там в течение достаточного периода времени и затем высушить, таким способом приготавливается тестовая прокладка реагентной тест-полоски, связанная с указанной реагентной композицией. Как указано выше, водная композиция включает различные компоненты реагентной композиции, предназначенные для связывания с тестовой прокладкой реагентной тест-полоски, где различные элементы  
30 присутствуют в количествах, достаточных для обеспечения требуемого их количества в реагентной композиции, которая образуется на тестовой прокладке. При этом, когда агент переноса электрона является небелковым, концентрация агента переноса электрона, присутствующего в водной композиции, обычно находится в пределах примерно от 10 до 50000, чаще примерно от 50 до 10000 и наиболее часто от 100 до 5000 мкМ. В другом  
35 варианте осуществления, когда агент переноса электрона является белковым, концентрация агента переноса электрона в водной композиции обычно находится в пределах примерно от 10 до 10000, часто примерно от 50 до 5000 и наиболее часто от 100 до 3000 ед/мл. Концентрация соли тетразолия, присутствующей в водной композиции, находится в пределах примерно от 3 мМ до 36 мМ, обычно примерно от 6 мМ до 24 мМ.  
40 Концентрация кофактора фермента, если он присутствует, находится в пределах примерно от 1,5 мМ до 28 мМ, обычно примерно от 3,5 мМ до 14 мМ. Аналогично, концентрация фермента агента, окисляющего аналит, если он присутствует, находится в пределах от примерно 100 ед. до 2000 ед., обычно примерно от 200 ед. до 1000 ед. Далее приведен экспериментальный раздел для более детального описания типичного способа  
45 приготовления описываемых реагентных тест-полосок.

#### Способы определения аналита

Описанные выше генерирующие сигнал системы, реагентные композиции и тест-полоски находят применение в способах определения наличия аналита в образце, и часто, определения его количества, т.е. концентрации. При применении описываемых способов  
50 может быть зарегистрирован ряд различных аналитов, где типичные аналиты включают те, что описаны выше, например этанол, формальдегид, глюкозу, глутаминовую кислоту, глицерин, β-гидроксibuтират, L-лактат, лейцин, яблочную кислоту, пировиноградную кислоту, стероиды и т.д. Хотя в принципе описываемые способы могут быть применены для



определения наличия и часто концентрации аналита в широком спектре различных физиологических образцов, таких как мочевины, слезная жидкость, слюна, и т.п., в особенности они подходят для применения при определении концентрации аналита в крови или фракции крови, например образцах производных крови и особенно в цельной крови и ТЖ (внутриканальной жидкости).

В описываемых способах, образец и генерирующая сигнал система объединяются в реакционную смесь, реакция протекает в течение периода времени, достаточного для генерации сигнала, являющегося индикатором наличия (а часто количества) аналита в образце, и получающийся в результате сигнал регистрируется и соотносится с фактом наличия (а часто и с количеством) аналита в образце. Указанные стадии происходят на реагентной тест-полоске, описанной выше.

Существенным признаком описываемых способов является то, что сигнал, поддающийся обнаружению, образуется в виде несмываемого пятна, которое формируется на поверхности подложки полоски. Несмываемое пятно формируется растворимым в воде соединением формазана, который тесно связан с поверхностью подложки таким образом, что он не может быть легко удален с поверхности при стандартных условиях промывки. Под стандартными условиями промывки подразумеваются условия, испытываемые поверхностью подложки при анализах на определение аналита, когда несвязанный компонент должен быть удален с поверхности. Примером стандартных условий промывки являются используемые специалистами в данной области техники при гибридационном анализе нуклеиновых кислот с использованием микропланшетов, когда не вступившие в гибридацию нуклеиновые кислоты удаляются с поверхности микропланшета на стадии, следующей после гибридации. Такие условия хорошо известны специалистам в данной области техники. Таким образом, существенным признаком описываемых способов является получение несмываемого пятна на поверхности положительно заряженной подложки, где несмываемое пятно формируется растворимым в воде соединением формазана.

При применении описываемых способов первой стадией является нанесение некоторого количества физиологического образца на тест-полоску, где тест-полоска описана выше.

Количество физиологического образца, например крови, наносимого на тест-полоску, может меняться, но в общем случае находится в пределах примерно от 2 мкл до 40 мкл, но обычно примерно от 5 мкл до 20 мкл. Благодаря строению описываемой тест-полоски объем образца крови, который наносится на тест-полоску, может быть относительно небольшим, в пределах примерно от 2 мкл до 40 мкл, но обычно примерно от 5 мкл до 20 мкл. Когда физиологическим образцом является кровь, описываемым способом могут быть проанализированы образцы крови с различными показателями гематокрита, при этом показатель гематокрита может находиться в пределах примерно от 20% до 65%, но обычно примерно от 25% до 60%.

Вслед за нанесением образца на тест-полоску образец вводят в реакцию с компонентами генерирующей сигнал системы, и вследствие этого образуется поддающийся обнаружению продукт, а именно несмываемое пятно, в количестве, пропорциональном исходному количеству интересующего аналита в образце. Количество продукта, поддающегося обнаружению, т.е. сигнал, который образуется генерирующей сигнал системой, в форме несмываемого пятна, затем определяется и соотносится с количеством аналита в исходном образце. В определенных вариантах осуществления, используются автоматические устройства, реализующие вышеупомянутые стадии обнаружения и соотношения. Выше описанные стадии: реакция, обнаружение и соотношение, так же как устройства для их выполнения, более полно описаны в патентах США №№4734360; 4900666; 4935346; 5059394; 5304468; 5306623; 5418142; 5426032; 5515170; 5526120; 5563042; 5620863; 5753429; 5573452; 5780304; 5789255; 5843691; 5846486; 5902731; 5968836 и 5972294; описание которых включено в заявку в качестве ссылки. На стадии соотношения, при выводе концентрации аналита учитывают постоянный вклад конкурирующих реакций в наблюдаемый сигнал, например, путем соответствующей

калибровки инструмента.

#### Наборы

Описываемое изобретение также представляет наборы для применения описываемых способов на практике. Наборы настоящего изобретения, по крайней мере, включают описанную выше генерирующую сигнал систему, где компоненты генерирующей сигнал системы могут быть объединены в одну реагентную композицию или быть разделены, например находиться в отдельных емкостях. В определенных вариантах осуществления генерирующая сигнал система может находиться в наборах в форме реагентной тест-полоски, как это описано выше. Описываемые наборы могут дополнительно включать средства для получения физиологического образца. Например, когда физиологическим образцом является кровь, описываемые наборы могут дополнительно включать средства для получения образца крови, такие как ланцет для прокалывания пальца, средство для применения ланцета и т.п. Дополнительно описываемые наборы могут включать контрольный раствор или стандарт, например контрольный раствор аналита, содержащий аналит стандартной концентрации. В определенных вариантах осуществления, наборы также включают автоматическое устройство, как это описано выше, для определения количества продукта, полученного на полоске после нанесения образца и соотнесения обнаруженного продукта с количеством аналита в образце. И, наконец, наборы включают инструкции по применению компонентов описываемого набора для определения концентрации аналита в физиологическом образце. Такие инструкции могут находиться на одной или нескольких упаковках, вложенной этикетке, на контейнерах, присутствующих в наборах и т.п.

Следующие примеры предлагаются в качестве иллюстрации, но не с целью ограничения.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ

##### Пример 1

0,8 мкм нейлоновая мембрана, полученная от Pall Corporation (East Hills, NY), была погружена в реагент, приведенный в табл.1, до полной пропитки. Избыток реагента был осторожно соскоблен стеклянной палочкой. Полученная в результате мембрана была подвешена для просушки в печи при 56°C в течение 10 мин. Porex (0,6 мм толщиной) был размочен в растворе нитрита, приведенного в табл.2, и затем подвешен для просушки в печи при 100°C в течение 10 часов. В заключение мембрана была ламинирована между основой из полиэфира (0,4 мм Melenex® полиэфир от ICI America, Wilmington, DE) и Porex, пропитанным нитритом.

##### Пример 2

Была повторена процедура Примера 1, за исключением того, что для первого погружения был использован реагент из табл.3, а второго погружения не было, т.к. Porex не требовался.

Таблица 1 Реагент для тестовой прокладки на глюкозу	
Компоненты	Количество
Вода	100 мл
(2-[Морфолино]этансульфокислоты)натриева соль MES (MW 217.2, Sigma, St. Louis, MO, USA). Довести pH до 5-7 путем добавления 6M HCl)	2,2 г
Тетоник 1307 (BASF Corporation, Mount Olive, New Jersey, USA)	1-3 г
PCCK, Полистеролсульфокислоты, натрия соль (MW 70,000, Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA)	2-4 г
Кротин (Croda Inc., Parsippany, NJ, USA)	2-4 г
Маннит (MW 182, Sigma, St. Louis, MO, USA)	1-10 г
Феназин метасульфат (PMS, MW 306.34, Sigma, St. Louis, MO, USA)	30-300 мг
WST-5 (MW 1331.37, Dojindo Laboratory, Japan)	0,8-4 г
Глюкозооксидаза (GO, TOYOBO)	100-1000 ед. *10 <sup>3</sup>
Таблица 2 Нитритный реагент	
Компоненты	Количество
10 mM соли фосфатного буфера, pH 7,4, (P-3813, Sigma, St. Louis, MO, USA)	70 мл

	Этанол	30 мл
	Нитрит натрия (MW69, Aldrich Chemicals, Milwaukee, WI, USA)	5 г
	Поливинилпиридин (MW 40,000, Sigma, St. Louis, MO, USA)	200 мг
	Таблица 3 Реагенты для тестовой прокладки на глюкозу	
5	Компоненты	Количество
	Вода	100 мл
	(2-[Морфолино]этансульфокислоты)натриева соль MES (MW 217.2, Sigma, St. Louis, MO, USA)	2,2 г
	Поли(метил-винил-эфир-изо-малеиновый ангидрид)* 6%	20 мл
	Довести pH до 5,5-7 путем добавления 50% NaOH	
10	Тритон X-305 (BASF Corporation, Moun Olive, New Jersey, USA)	0,5-2 г
	Маннит (MW 182, Sigma, St. Louis, MO, USA)	1-10 г
	Нитрит натрия (MW69, Aldrich Chemicals, Milwaukee, WI, USA)	1-5 г
	WST-5 (MW 1331.37, Dojindo Laboratory, Japan)	0,8-4 г
	Хлорид магния (MW 203, Sigma, St. Louis, MO, USA)	3-5 г
	Феназин этосульфат (PMS, MW 334.4, Sigma, St. Louis, MO, USA)	100-1000 г
15	Глюкозооксидаза (GO, TOYOBO)	100-1000 ед. *10 <sup>3</sup>
	*Поли(метил-винил-эфир-изо-малеиновый ангидрид), MW 1,080,000, Cat# 41632-0, Aldrich Chemicals, Milwaukee, WI, USA. Отмерить поли(метил-винил-эфир-изо-малеиновый ангидрид) 6% в воде (в отношении вес к объему, в/о) и суспензию нагревать при 95°C в течение 45 минут. Полученный раствор, после охлаждения до комнатной температуры, готов для применения.	

Были протестированы различные стандартные препараты глюкозы на незаряженной и положительно заряженной мембранах. Сигналы были линейными при уровне глюкозы в крови от 50 до 450 мг/дл. Чертеж демонстрирует одно и то же покрытие на различных мембранах. Одной мембраной является положительно заряженная из нейлона, другой мембраной - не имеющая заряда из полисульфона. Мембраны с нанесенным покрытием были испытаны раствором глюкозы с уровнем 400 мг/дл.

Применяя нижеследующий протокол, 10 мкл водных образцов, состоящих из 400 мг/дл глюкозы, были протестированы на полосках, описанных выше, где полоски различались мембранами - положительно заряженной нейлоновой мембраной и (не заряженной положительно)(незаряженной) мембраной из полисульфона - на полосках. На свежеприготовленную тест-полоску наносилось 10 мкл водного образца. Полоска помещалась в рефлектометр, и начинался прием данных. Коэффициент отражения исследуемых полосок регистрировался при 615 нм и при интервалах 1-2 секунд в течение 45 секунд. Затем данные были загружены из буферной памяти рефлектометра в персональный компьютер при помощи модифицированного кабеля для связи через последовательный порт. Профиль реакции был нанесен на график зависимости коэффициента отражения (в K/S) от времени (в секундах).

(K/S является мерой коэффициента отражения, который был обсужден и определен в патенте США 4935346, столбец 14, описание которой включено в заявку в качестве ссылки).

Из приведенных выше результатов и обсуждения очевидно, что описываемое изобретение представляет усовершенствование предыдущих форм реагентных тест-полосок. За счет применения растворимой в воде соли тетразолия в сочетании с положительно заряженной подложкой описываемое изобретение обладает всеми положительными свойствами соединений тетразолия и может генерировать несмываемый ответный сигнал от получающегося в результате растворимого в воде соединения формазана. Таким образом, описываемое изобретение вносит значительный вклад в соответствующую область техники.

Все публикации и патенты, упомянутые в данном описании, включены в него в качестве ссылки, как если бы каждая отдельная публикация или патент были включены в качестве ссылки индивидуально. Цитирование любой публикации предназначено для ее раскрытия до даты подачи патентной заявки и не может быть истолковано как признание того, что приоритет настоящего изобретения может быть оспорен на основании такой публикации.

Хотя вышеупомянутое изобретение было описано с некоторой степенью детализации посредством иллюстрации и примеров для большей ясности и понимания, для специалистов в данной области техники должно быть очевидным, что могут быть

произведены определенные модификации и изменения без выхода за границы сущности и объема прилагаемой формулы изобретения.

#### Формула изобретения

- 5 1. Композиция реагентов для обнаружения или определения присутствия аналита в физиологическом образце, включающая положительно заряженную подложку и, по крайней мере, одну растворимую в воде соль тетразолия, которая способна к присоединению гидрид-иона с образованием растворимого в воде окрашенного соединения формазана на, по крайней мере, одной поверхности указанной положительно заряженной подложки, в
- 10 которой указанная растворимая в воде соль тетразолия является частью окисляющей аналит, генерирующей сигнал системы и указанная окисляющая аналит, генерирующая сигнал система включает аналит-оксидазу.
2. Композиция по п.1, в которой указанная положительно заряженная подложка является адсорбирующей подложкой.
- 15 3. Композиция по п.1, в которой указанная положительно заряженная подложка является неадсорбирующей подложкой.
4. Композиция по п.1, в которой указанная окисляющая аналит, генерирующая сигнал система присутствует как реагентная композиция.
5. Реагентная тест-полоска для применения при обнаружении или определении
- 20 присутствия аналита в физиологическом образце, включающая мембранную тестовую прокладку с нанесенной на нее сухой композицией реагентов по любому из пп.1-4, которая зафиксирована на твердой основе.
6. Система для обнаружения или определения присутствия аналита в физиологическом образце, включающая
- 25 (а) реагентную тест-полоску по п.5 и  
(б) автоматический инструмент.
7. Способ обнаружения наличия или определения концентрации аналита в физиологическом образце, где указанный способ включает
- (а) нанесение указанного физиологического образца на реагентную тест-полоску по
- 30 п.5, в которой несмываемое пятно, содержащее указанное соединение формазана, образуется на указанной подложке;
- (б) обнаружение указанного несмываемого пятна и
- (в) соотнесение указанного обнаруженного несмываемого пятна с наличием или концентрацией указанного аналита в указанном физиологическом образце.
- 35 8. Набор для применения при определении концентрации аналита в физиологическом образце, где указанный набор включает
- (а) реагентную тест-полоску по п.5 и
- (б) по крайней мере, один компонент из
- (i) средства для получения указанного физиологического образца и
- 40 (ii) стандартного препарата аналита.
9. Набор по п.8, в котором указанный набор включает средство для получения указанного физиологического образца и стандартный препарат аналита.

45

50

