



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105264086 B

(45)授权公告日 2018.06.15

(21)申请号 201480031254.8

(22)申请日 2014.04.01

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105264086 A

(43)申请公布日 2016.01.20

(30)优先权数据
61/807,185 2013.04.01 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.11.30

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/032567 2014.04.01

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/165536 EN 2014.10.09

(73)专利权人 贝克顿·迪金森公司
地址 美国新泽西州

(72)发明人 R·坎贝尔 K·G·多兰

E·法洛斯 R·A·霍克
R·雅各布森 J·B·皮特纳
G·冯克 R·卡赫尔 U·古拉蒂
H·伊梅尔
R·B·埃文斯斯托姆斯

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 赵蓉民 丁秀云

(51)Int.Cl.
C12Q 1/00(2006.01)

(56)对比文件
CN 101437550 A,2009.05.20,
CN 101553732 A,2009.10.07,
WO 2010139047 A1,2010.12.09,
CN 1324954 A,2001.12.05,

审查员 江涵

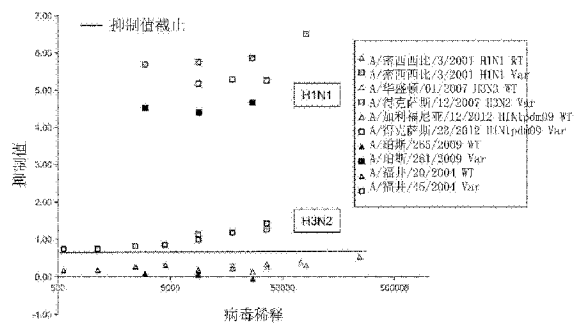
权利要求书12页 说明书33页 附图14页

(54)发明名称

用于流感诊断的方法和试剂盒

(57)摘要

本文提供的一些实施方式涉及组合分析。在一些实施方式中,鉴别A型流感或B型流感的分析与测定流感神经氨酸酶对抗病毒药物的敏感性的分析组合。



1. 测试物在制备用于检测流感病毒的试剂盒中的应用,所述测试物包括:
适于检测A型流感病毒或B型流感病毒的免疫分析的免疫分析缓冲剂;
检测A型或B型流感的免疫分析物;
交换基质,所述交换基质包括用于将免疫分析测试样品转化为神经氨酸酶分析测试样品的神经氨酸酶分析缓冲剂或用于将神经氨酸酶分析测试样品转化为免疫分析测试样品的免疫分析缓冲剂;和
神经氨酸酶分析物。
2. 权利要求1所述的应用,其中所述免疫分析缓冲剂与用于神经氨酸酶活性的分析不相容。
3. 权利要求1所述的应用,其中所述免疫分析缓冲剂抑制神经氨酸酶活性。
4. 权利要求1所述的应用,其中容器包含所述基质。
5. 权利要求4所述的应用,其中所述容器包括多个室。
6. 权利要求4所述的应用,其中所述容器包括含所述交换基质的室,和包含用于所述神经氨酸酶分析的试剂的室。
7. 权利要求1所述的应用,其中所述交换基质包括交联多糖。
8. 权利要求1所述的应用,其中所述交换基质选自葡聚糖凝胶和琼脂糖。
9. 权利要求4所述的应用,其中容器经调整使得免疫分析测试样品和神经氨酸酶测试样品可通过选自重力、毛细作用和扩散的一种或多种力在所述容器中移动。
10. 权利要求4所述的应用,其中所述容器包括套筒。
11. 权利要求4所述的应用,其中所述容器包括适于使用光电倍增器读取的多孔套筒。
12. 权利要求11所述的应用,其中所述光电倍增器选自光电倍增管和微光电倍增管。
13. 权利要求11所述的应用,其中所述光电倍增器为便携式的。
14. 权利要求11所述的应用,其中所述光电倍增器处于适合于初级护理医师办公室的便携式读取器中。
15. 权利要求11所述的应用,其中所述光电倍增管表面为圆形且具有6mm到9mm的直径,或所述微光电倍增管为矩形且具有1mm到3mm的尺寸。
16. 权利要求1所述的应用,其中所述神经氨酸酶分析缓冲剂包括用于测定神经氨酸酶对测试化合物的敏感性的试剂。
17. 权利要求16所述的应用,其中所述神经氨酸酶分析包括用于如下的试剂:
 - (a) 获得抑制值比率,其中所述比率包括与不存在测试化合物情况下的所述神经氨酸酶活性水平相比的存在所述测试化合物情况下的所述神经氨酸酶活性水平;和
 - (b) 比较所述抑制值与抑制阈值的比率,进而测定所述神经氨酸酶活性对所述测试化合物的敏感性。
18. 权利要求17所述的应用,其中所述抑制阈值通过检测A型或B型病毒测定。
19. 权利要求18所述的应用,其中如果检测A型病毒,那么使用第一抑制阈值,如果检测B型病毒,那么使用第二抑制阈值。
20. 权利要求19所述的应用,其中所述第一阈值比所述第二阈值低。
21. 权利要求17所述的应用,其中所述抑制阈值通过所述测试化合物测定。
22. 权利要求17所述的应用,进一步包括选择用于治疗所述流感的所述测试化合物。

23. 权利要求1所述的应用,其中所述神经氨酸酶分析物包括包含信号传导酶的双酶分析物。

24. 权利要求23所述的应用,其中神经氨酸酶活性产生用于所述信号传导酶的底物。

25. 权利要求23所述的应用,其中所述神经氨酸酶分析物包括包含N-乙酰基神经氨酸和荧光素的缀合物或N-乙酰基神经氨酸和荧光素的缀合物的衍生物的试剂。

26. 权利要求23所述的应用,其中神经氨酸酶活性产生用于所述信号传导酶的抑制剂。

27. 权利要求23所述的应用,其中所述神经氨酸酶分析物包括包含N-乙酰基神经氨酸和三氟甲基酮的缀合物或N-乙酰基神经氨酸和三氟甲基酮的缀合物的衍生物的试剂。

28. 权利要求23所述的应用,其中所述信号传导酶包括荧光素酶。

29. 权利要求28所述的应用,其中所述免疫分析缓冲剂抑制荧光素酶活性。

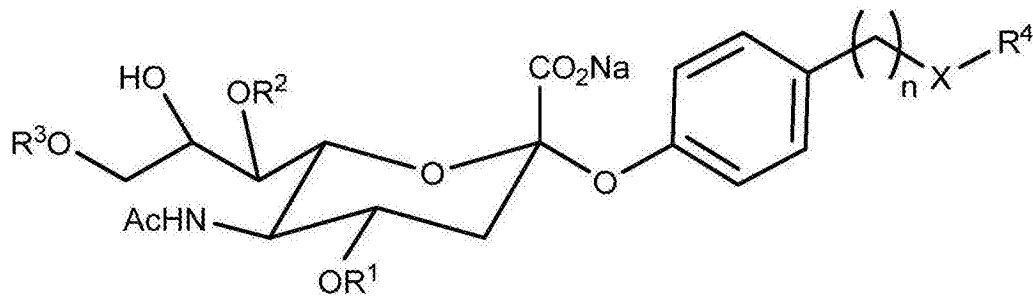
30. 权利要求1所述的应用,其中所述神经氨酸酶活性水平使用光电倍增管测量。

31. 权利要求17所述的应用,其中所述测试化合物为抗病毒药物。

32. 权利要求17所述的应用,其中所述测试化合物为选自以下的抗病毒药物:奥司他韦(Oseltamivir)、扎那米韦(Zanamivir)、拉那米韦(Lanamivir)和帕拉米韦(Peramivir)。

33. 权利要求1到32中任一项所述的应用,其中所述免疫分析包含夹心分析。

34. 权利要求27所述的应用,其中所述N-乙酰基神经氨酸和三氟甲基酮的缀合物或所述N-乙酰基神经氨酸和三氟甲基酮的缀合物的衍生物包括用于双酶流感神经氨酸酶敏感性分析的经遮蔽抑制剂化合物,所述经遮蔽抑制剂化合物具有式(I)的结构:



其中 R^1 、 R^2 和 R^3 各自独立地为氢或 C_{1-5} 烷基;

n 为0、1、2或3;

R^4 为 $-(CH_2)_mC(=O)CF_3$;

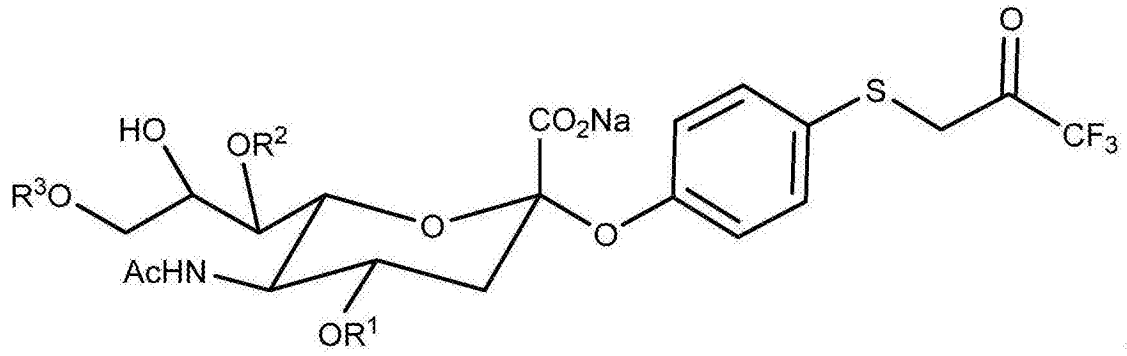
m 为0或1;

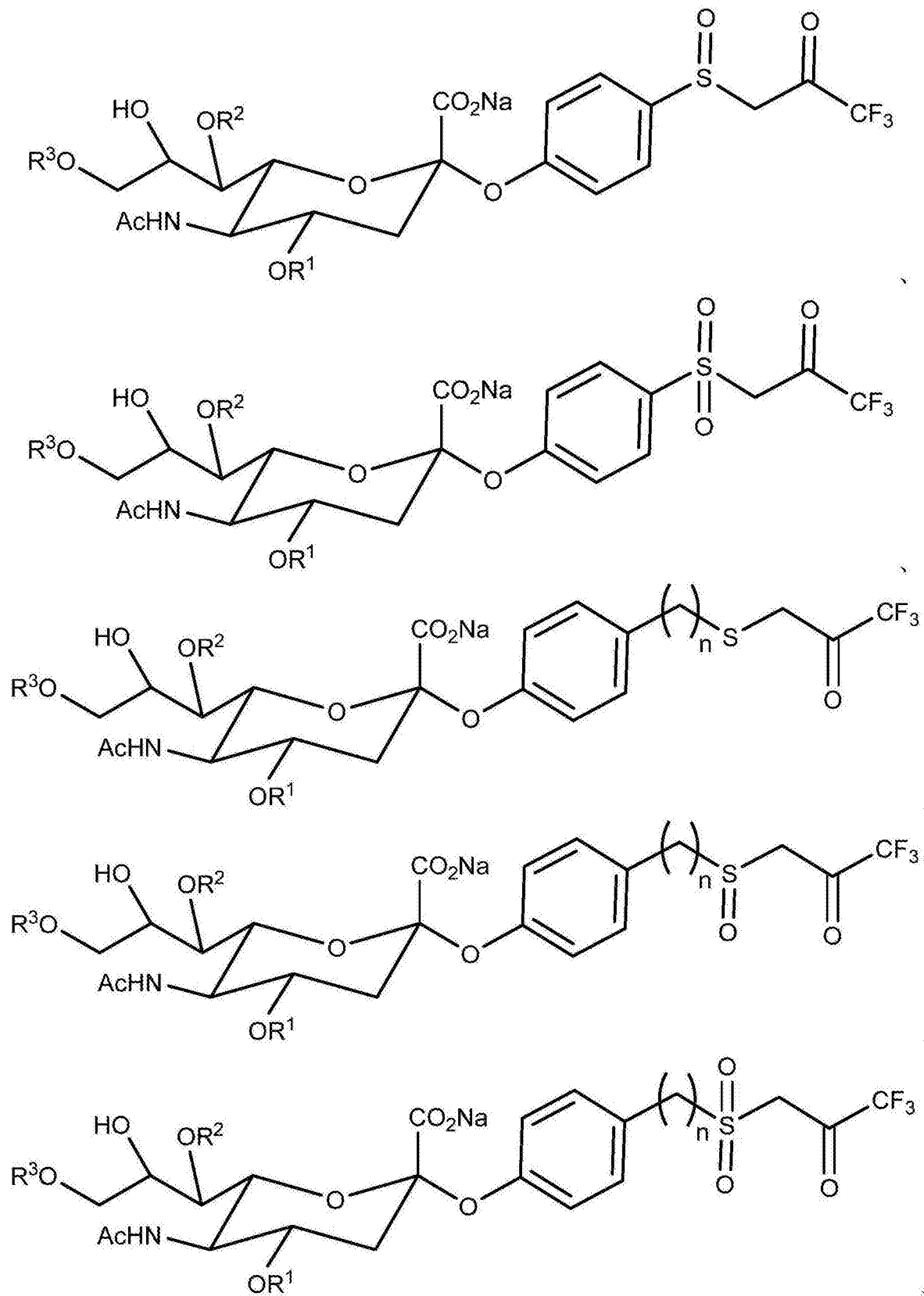
X 为 $-S(O)_z-$ 或 $-CH(R^5)-$;

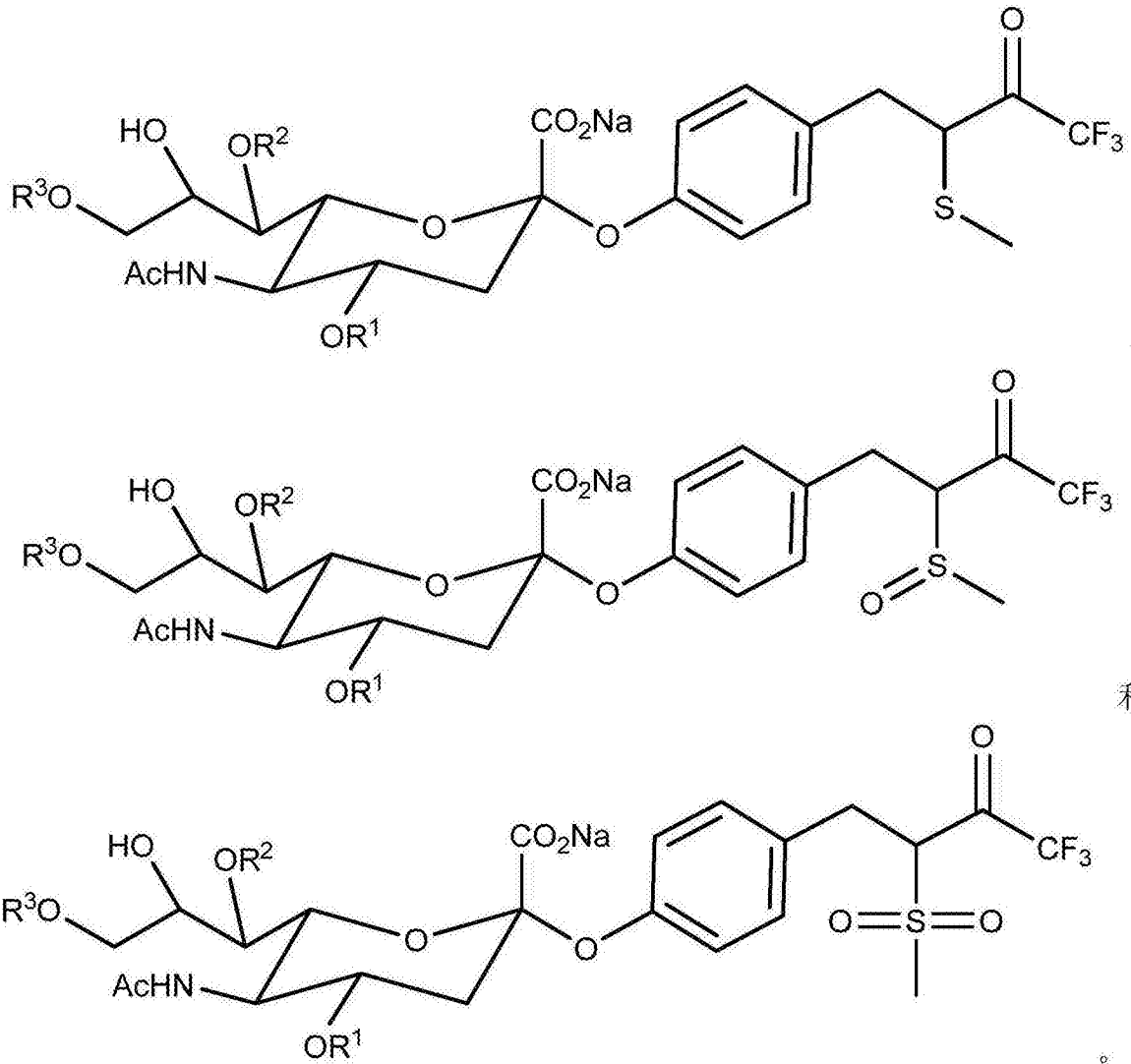
R^5 为 $-S(O)_zCH_3$;且

z 为0、1或2。

35. 权利要求34所述的应用,其中式(I)的化合物选自:







36. 用于检测流感病毒的诊断系统,其包括:

测定样品中的神经氨酸酶活性的套筒,其中所述套筒包括基质室,所述基质室包括套筒基质,所述套筒基质被配置以将包含对于所述测定不相容的缓冲剂的样品处理为包含对于所述测定相容的缓冲剂的样品;

检测所述样品中的A型或B型流感的测试物,其中所述测试物包括测试基质,所述测试基质被配置以将包含对于所述检测不相容的缓冲剂的样品处理为包含对于所述检测相容的缓冲剂的样品;

被配置以测量来自所述测试物的信号的第一检测器;和

被配置以测量来自所述套筒的信号的第二检测器。

37. 权利要求36所述的系统,其中所述套筒基质含有对于所述测定相容的缓冲剂,并且所述套筒包括包含用于所述神经氨酸酶活性测定的试剂的试剂室。

38. 权利要求36所述的系统,其中所述神经氨酸酶活性分析试剂选自荧光素酶、N-乙酰基神经氨酸和荧光素的缀合物、N-乙酰基神经氨酸和荧光素的缀合物的衍生物、N-乙酰基神经氨酸和三氟甲基酮的缀合物、N-乙酰基神经氨酸和三氟甲基酮的缀合物的衍生物、和抗病毒药物。

39. 权利要求38所述的系统,其中所述抗病毒药物选自奥司他韦、扎那米韦、拉那米韦

和帕拉米韦。

40. 权利要求37所述的系统,其中所述套筒基质包括交联多糖。

41. 权利要求40所述的系统,其中所述套筒基质选自葡聚糖凝胶和琼脂糖。

42. 权利要求37所述的系统,其中所述基质室和试剂室流体连通,使得施用到所述基质室的样品从所述基质室流动到所述试剂室。

43. 权利要求42所述的系统,其中所述样品通过一个或多个选自重力、毛细作用和扩散的力在所述套筒中流动。

44. 权利要求36所述的系统,其中所述套筒包括适于使用光电倍增管或微光电倍增管读取的多孔套筒。

45. 权利要求36到44中任一项所述的系统,其中所述测试物包含免疫分析物。

46. 权利要求45所述的系统,其中所述免疫分析为夹心分析。

47. 权利要求45所述的系统,其中所述免疫分析物包括选自下列的试剂:对A型流感抗原特异的抗体、和对B型流感抗原特异的抗体。

48. 权利要求36到44中任一项所述的系统,其中所述测试基质含有对于所述检测相容的缓冲剂。

49. 权利要求48所述的系统,其中所述基质包含硝化纤维素。

50. 权利要求36到44中任一项所述的系统,其中对于所述检测相容的所述缓冲剂经冻干或干燥。

51. 权利要求36到44中任一项所述的系统,其中所述第一检测器包括光度计。

52. 权利要求36到44中任一项所述的系统,其中所述第二检测器包括光电倍增管或微光电倍增管。

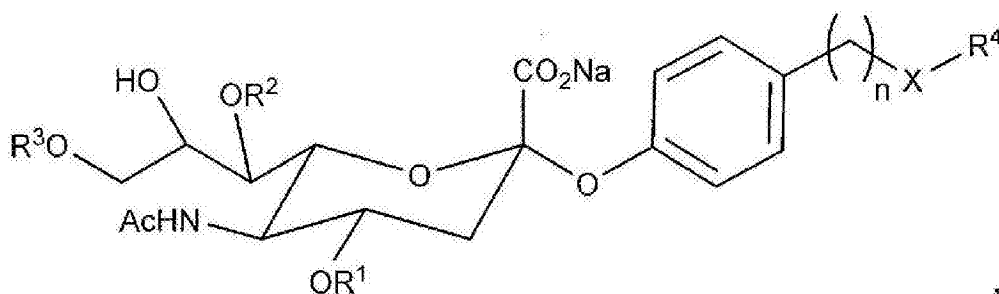
53. 权利要求36到44中任一项所述的系统,其中装置包括所述第一和第二检测器。

54. 权利要求36到44中任一项所述的系统,其中所述第一和第二检测器相同。

55. 权利要求53所述的系统,其中所述装置为便携式的。

56. 权利要求53所述的系统,其中所述装置为手持式的。

57. 权利要求38所述的系统,其中所述N-乙酰基神经氨酸和三氟甲基酮的缀合物或所述N-乙酰基神经氨酸和三氟甲基酮的缀合物的衍生物包括用于双酶流感神经氨酸酶敏感性分析的经遮蔽抑制剂化合物,所述经遮蔽抑制剂化合物具有式(I)结构:



其中:

R^1 、 R^2 和 R^3 各自独立地为氢或 C_{1-5} 烷基;

n 为0、1、2或3;

R^4 为 $-(CH_2)_mC(=O)CF_3$;

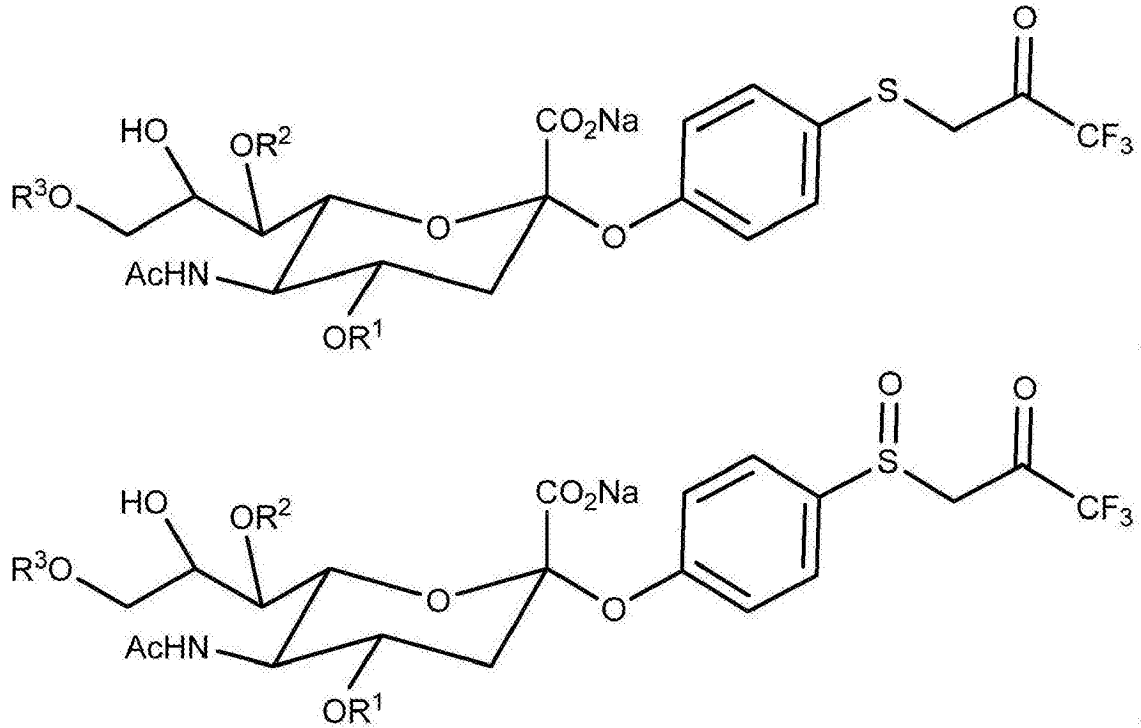
m 为0或1;

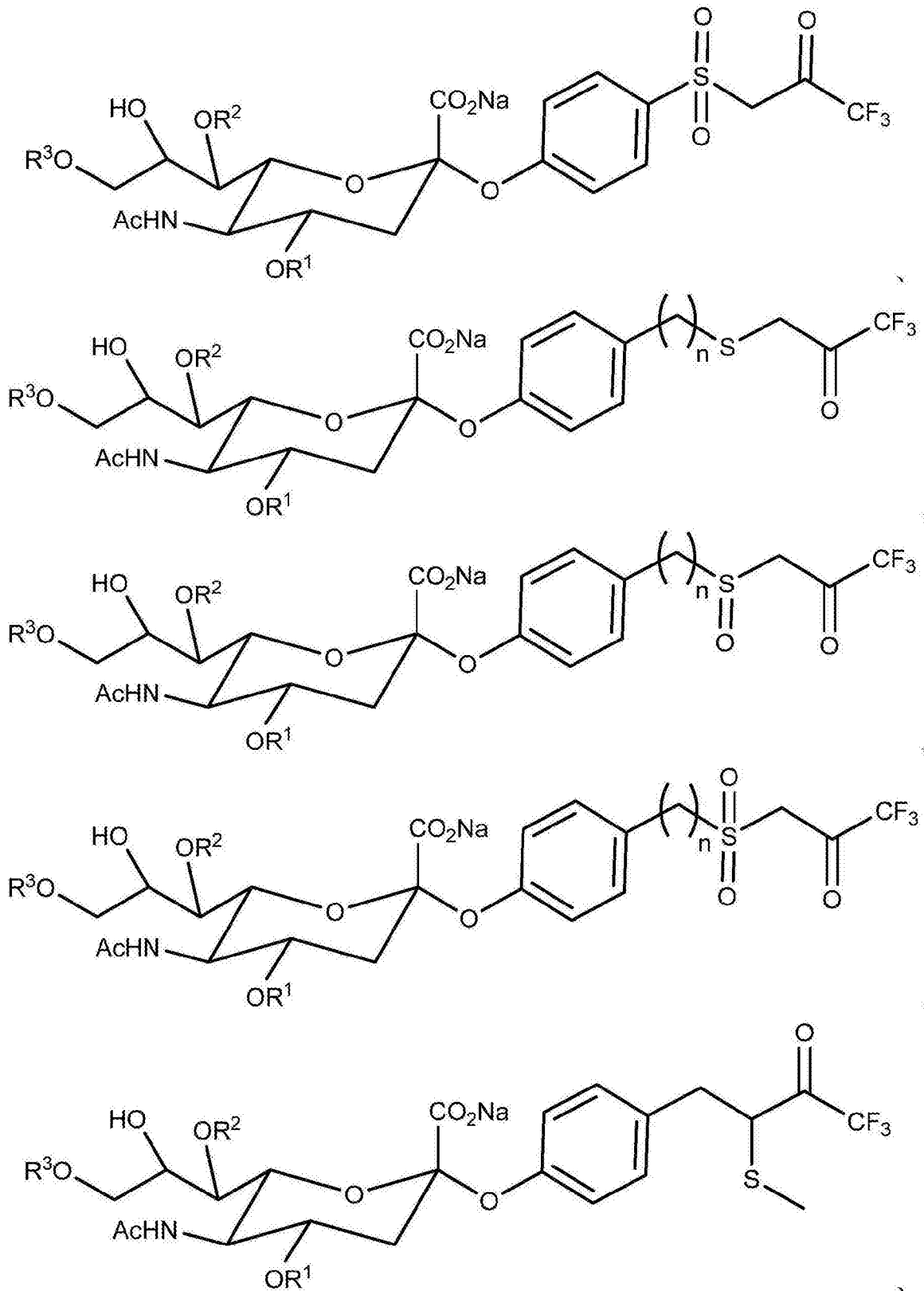
X为 $-S(O)_z-$ 或 $-CH(R^5)-$;

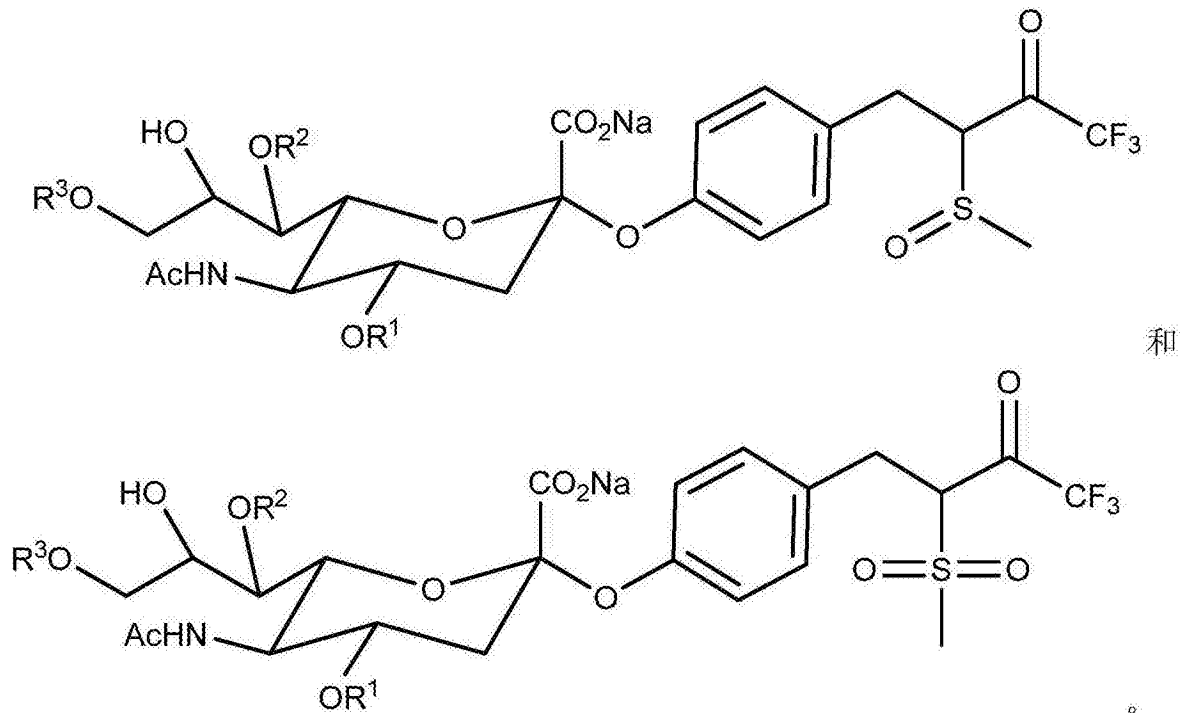
R^5 为 $-S(O)_zCH_3$;且

z为0、1或2。

58. 权利要求57所述的系统,其中式(I)的化合物选自:







59. 用于检测流感病毒的试剂盒,其包括:

测定样品中的神经氨酸酶活性的套筒,其中所述套筒包括套筒基质,所述套筒基质被配置以将包含对于所述测定不相容的缓冲剂的样品处理为包含对于所述测定相容的缓冲剂的样品;和

检测所述样品中的A型或B型流感的测试物,其中所述测试物包括测试基质,所述测试基质被配置以将包含对于所述检测不相容的缓冲剂的样品处理为包含对于所述检测相容的缓冲剂的样品。

60. 权利要求59所述的试剂盒,其进一步包括:

被配置以测量来自所述测试物的信号的第一检测器;和

被配置以测量来自所述套筒的信号的第二检测器。

61. 权利要求59所述的试剂盒,其进一步包括用于神经氨酸酶活性分析的试剂。

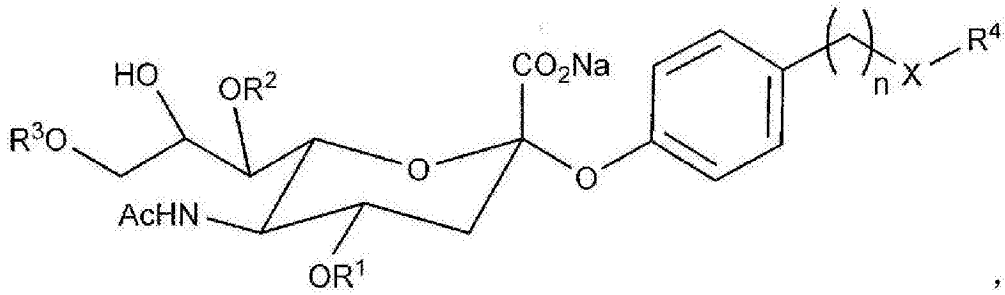
62. 权利要求61所述的试剂盒,其中所述神经氨酸酶活性分析试剂选自:荧光素酶、N-乙酰基神经氨酸和荧光素的缀合物、N-乙酰基神经氨酸和荧光素的缀合物的衍生物、N-乙酰基神经氨酸和三氟甲基酮的缀合物、N-乙酰基神经氨酸和三氟甲基酮的缀合物的衍生物、和抗病毒药物。

63. 权利要求62所述的试剂盒,其中所述抗病毒药物选自:奥司他韦、扎那米韦、拉那米韦和帕拉米韦。

64. 权利要求59到63中任一项所述的试剂盒,其进一步包括用于免疫分析的试剂。

65. 权利要求64所述的试剂盒,其中所述免疫分析试剂选自:对A型流感抗原特异的抗体、和对B型流感抗原特异的抗体。

66. 权利要求62所述的试剂盒,其中所述N-乙酰基神经氨酸和三氟甲基酮的缀合物或所述N-乙酰基神经氨酸和三氟甲基酮的缀合物的衍生物包括用于双酶流感神经氨酸酶敏感性分析的经遮蔽抑制剂化合物,其具有式(I)结构:



其中：

R^1 、 R^2 和 R^3 各自独立地为氢或 C_{1-5} 烷基；

n 为0、1、2或3；

R^4 为 $-(CH_2)_mC(=O)CF_3$ ；

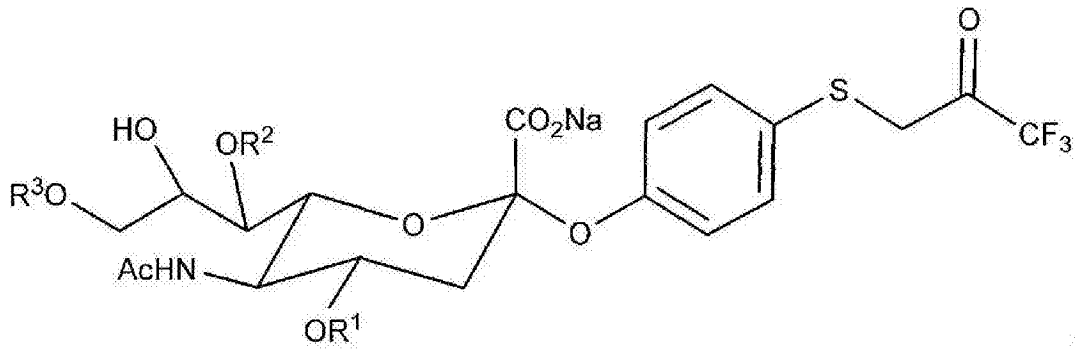
m 为0或1；

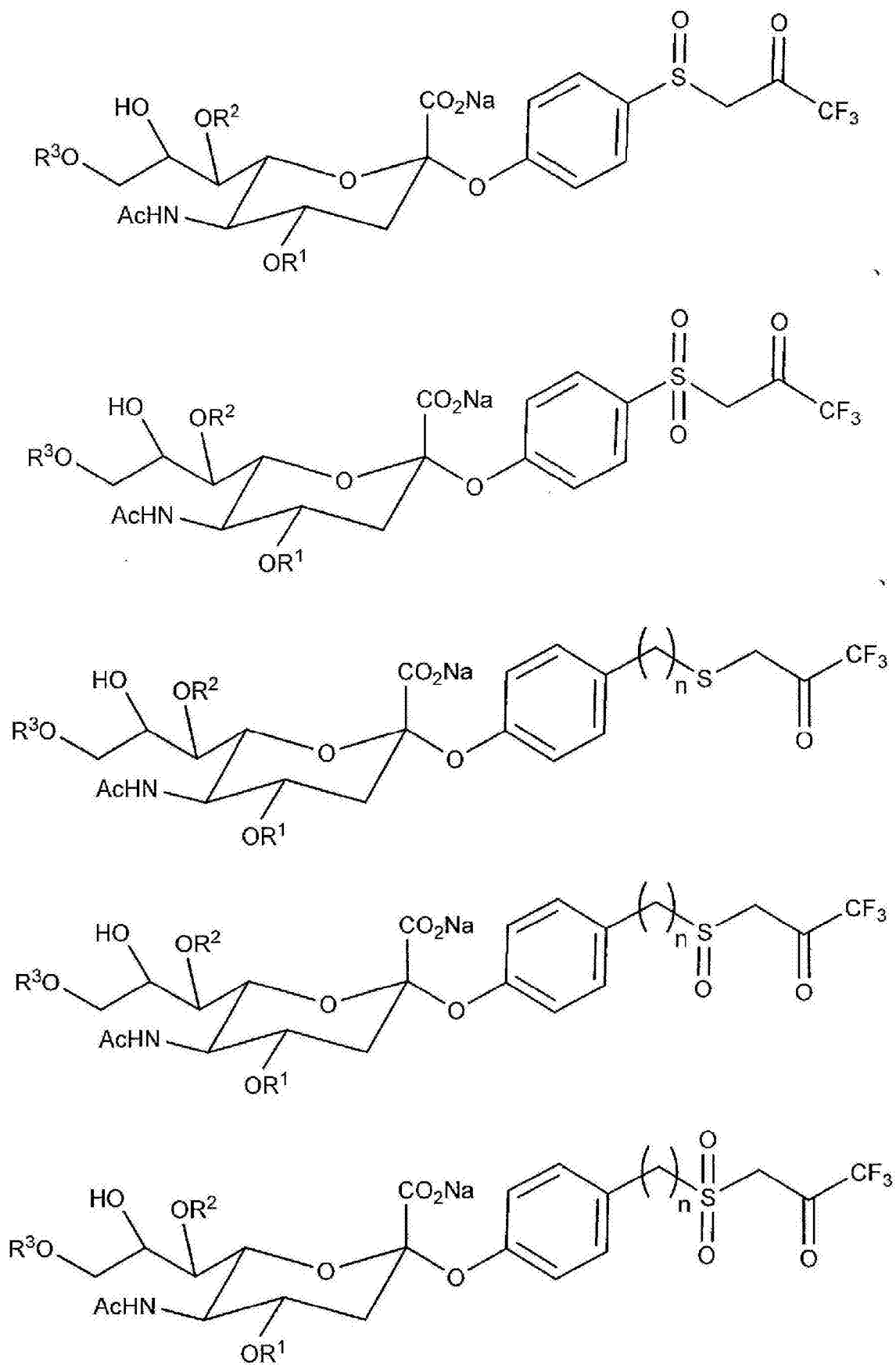
X 为 $-S(O)_z-$ 或 $-CH(R^5)-$ ；

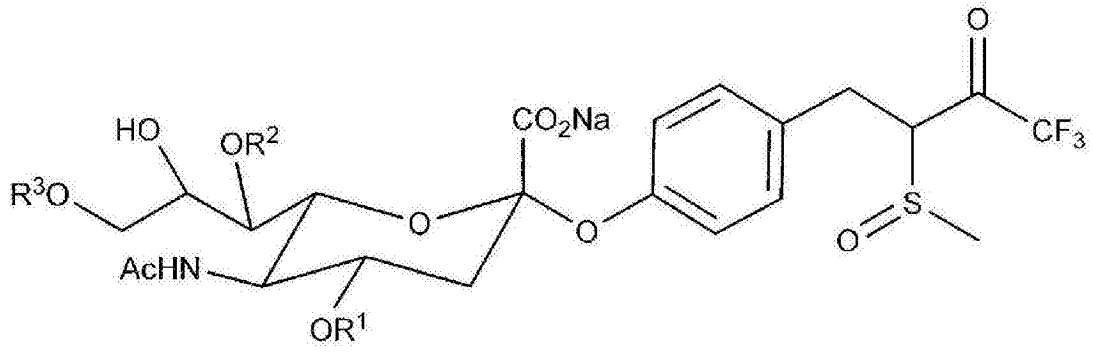
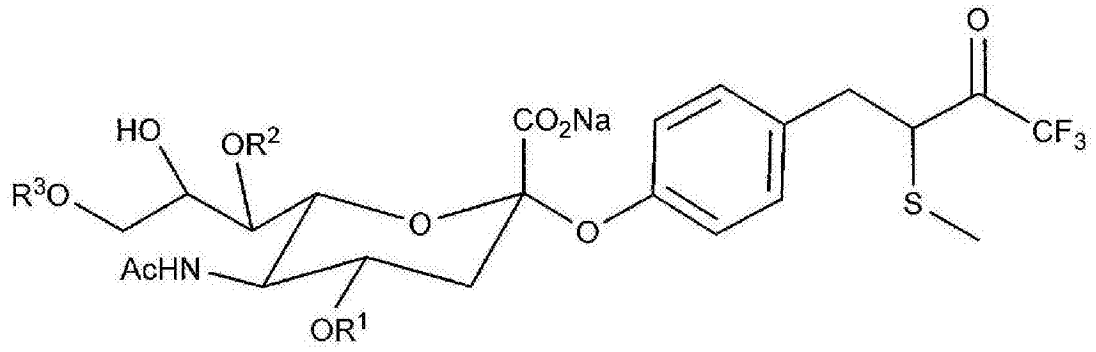
R^5 为 $-S(O)_zCH_3$ ；且

z 为0、1或2。

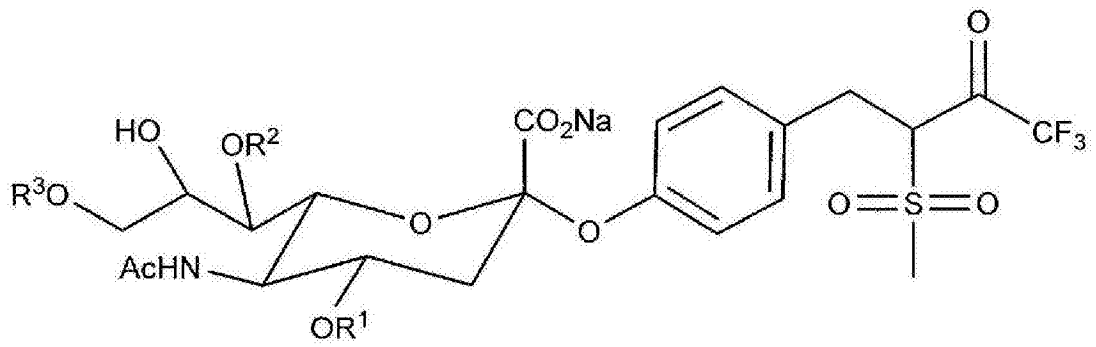
67. 权利要求66所述的试剂盒，其中式(I)的化合物选自：







和



用于流感诊断的方法和试剂盒

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2013年4月1日提交的名称为“床旁(POC)流感抗病毒易感性测试(Point Of Care Influenza Antiviral Susceptibility Test)”的美国临时申请第61/807,185号的权益,其通过引用以其全文并入本文。

技术领域

[0003] 本文提供的一些实施方式涉及用于床旁流感测试的方法、组合物、装置和系统。一些实施方式涉及组合分析。在一些实施方式中,鉴别A型流感或B型流感的分析与测定流感神经氨酸酶对抗病毒药物的敏感性的分析组合。

背景技术

[0004] 流感为公共健康的持续和严重威胁。每年,流感相关疾病在美国导致大约200,000例住院和36,000例死亡。从国家影响视角来看,2010年源于流感的总经济成本估计为290亿美元。流感的抗病毒疗法在以及时方式给予为治疗或给予用于预防时有效。若干研究得出神经氨酸酶药物减少症状持续时间的结论。特敏福(Tamiflu)和瑞乐沙(Relenza)均在针对季节性流感的预防中80%有效。当治疗患有流感的患者时,推荐的是患者在症状的48小时内开始治疗且延迟越小越好。即时诊断和开始抗病毒治疗导致最佳患者结果。

[0005] 基于对M2通道阻断剂的广泛抗性,推测广泛使用神经氨酸酶抑制剂可能最后导致在季节性或大流行流感病毒中出现其抗性并非不合理。已在临床研究期间鉴别多种抗神经氨酸酶抑制剂突变体。在三年期间的监测中,分离了八种对奥司他韦的易感性具有>10倍降低的病毒变体。当考虑用于季节性流感管理的基于神经氨酸酶抑制剂的药物的质量分布时,这些发现应引起暂停。在2007-2008冬季期间出现传染性奥司他韦抗性流感病毒和在HSN1和大流行流感H1N1中检测到奥司他韦抗性(2009)之后,WHO在2010年于香港召开关于抗病毒抗性的第一届全球磋商会。此磋商会的关键结果是在临床环境中或作为国家监测的部分而以正式状态报导对流感的抗病毒抗性的要求。此外,一些抗病毒剂(如奥司他韦)引起不良事件,使得仅在需要时开处方是重要的。各种抗病毒药物的覆盖范围可以随着提供商而变化且具有对于患者的不同成本。医师有责任仅在需要时开处方。尽管成本次于有效性,如果患者可以用较不昂贵的药物对付过去,那么医师有义务使患者了解该选项。因此,对于可以提供特异性菌株的诊断以避免不良事件、减缓抗药性的演化且为患者和美国保健系统产生节约的床旁测试存在未满足的需要。

发明内容

[0006] 本文提供的方法、试剂盒、系统和组合物的一些实施方式包括检测流感病毒的方法,其包括:(a)使样品与适于检测A型流感病毒或B型流感病毒的免疫分析的免疫分析缓冲剂接触,进而获得免疫分析测试样品;(b)使免疫分析测试样品的第一部分与包括检测A型或B型流感的免疫分析的测试物接触,进而检测样品中A型或B型流感的存在或不存在;(c)

使免疫分析测试样品的第二部分与包括神经氨酸酶分析缓冲剂的基质接触,进而获得神经氨酸酶测试样品;以及(d)使神经氨酸酶测试样品接触神经氨酸酶分析物,进而检测样品中神经氨酸酶的存在。在一些实施方式中,免疫分析缓冲剂与用于神经氨酸酶活性的分析不相容。在一些实施方式中,免疫分析缓冲剂抑制神经氨酸酶活性。在一些实施方式中,步骤(c)和(d)在相同容器中进行。

[0007] 本文提供的一些实施方式包括检测流感病毒的方法,其包括:(a)使样品与适于神经氨酸酶分析的神经氨酸酶分析缓冲剂接触,进而获得神经氨酸酶测试样品;(b)使神经氨酸酶测试样品的第一部分与包括检测A型或B型流感的免疫分析的测试物接触,其中神经氨酸酶测试样品接触包含免疫分析缓冲剂的基质,进而获得免疫分析测试样品且检测样品中A型或B型流感的存在或不存在;和(c)使神经氨酸酶测试样品的第二部分与神经氨酸酶分析物接触,进而检测样品中神经氨酸酶的存在。在一些实施方式中,神经氨酸酶分析缓冲剂与检测A型或B型流感的免疫分析不相容。在一些实施方式中,神经氨酸酶分析缓冲剂抑制抗体与选自A型流感和B型流感的抗原的特异性结合。在一些实施方式中,基质包括冻干或干燥的免疫分析缓冲剂。在一些实施方式中,步骤(c)在包含多个室的容器中进行。

[0008] 在检测流感病毒的方法的一些实施方式中,容器包括多个室。在一些实施方式中,容器包括包含基质的室,和包含用于神经氨酸酶分析的试剂的室。在一些实施方式中,基质包含交联多糖。在一些实施方式中,基质选自葡聚糖凝胶和琼脂糖。

[0009] 在一些实施方式中,免疫分析测试样品和神经氨酸酶测试样品通过选自重力、毛细作用和扩散的一种或多种力在容器中移动。

[0010] 在一些实施方式中,容器包括套筒。在一些实施方式中,容器包含适于使用光电倍增器读取的多孔套筒。在一些实施方式中,光电倍增器选自光电倍增管和微光电倍增管。在一些实施方式中,光电倍增器为便携式的。在一些实施方式中,光电倍增器在适合于初级护理医师办公室的便携式读取器中。在一些实施方式中,光电倍增管表面为圆形且具有约6mm到9mm的直径,或微光电倍增管为矩形且具有约1mm到3mm的尺寸。

[0011] 在一些实施方式中,神经氨酸酶分析包括测定神经氨酸酶对测试化合物的敏感性。在一些实施方式中,神经氨酸酶分析包括:(a)获得抑制值比率,其中比率包括与不存在测试化合物情况下相比的神经氨酸酶活性水平的存在测试化合物情况下的神经氨酸酶活性水平;和(b)比较抑制值与抑制阈值的比率,进而测定神经氨酸酶活性对测试化合物的敏感性。在一些实施方式中,抑制阈值通过检测A型或B型病毒确定。在一些实施方式中,如果检测A型病毒,那么使用第一抑制阈值,且如果检测B型病毒,那么使用第二抑制阈值。在一些实施方式中,第一阈值比第二阈值低。在一些实施方式中,抑制阈值通过测试化合物确定。

[0012] 一些实施方式也包括选择用于治疗流感的测试化合物。

[0013] 在一些实施方式中,神经氨酸酶分析包含包括含信号传导酶的双酶分析。在一些实施方式中,神经氨酸酶活性产生用于信号传导酶的底物。在一些实施方式中,神经氨酸酶分析包括N-乙酰基神经氨酸和荧光素或其衍生物的缀合物。在一些实施方式中,神经氨酸酶活性产生用于信号传导酶的抑制剂。在一些实施方式中,神经氨酸酶分析包括N-乙酰基神经氨酸和三氟甲基酮或其衍生物的缀合物。在一些实施方式中,信号传导酶包括荧光素酶。在一些实施方式中,免疫分析缓冲剂抑制荧光素酶活性。在一些实施方式中,神经氨酸

酶活性水平使用光电倍增管测量。

[0014] 在一些实施方式中,测试化合物为抗病毒药物。在一些实施方式中,测试化合物为选自以下的抗病毒药物:奥司他韦(Oseltamivir)、扎那米韦(Zanamivir)、拉那米韦(Lanamivir)和帕拉米韦(Peramivir)。

[0015] 在一些实施方式中,免疫分析包括夹心分析。

[0016] 在一些实施方式中,样品获自受试者。在一些实施方式中,受试者疑似患有流感。在一些实施方式中,受试者为人类。

[0017] 本文提供的一些实施方式包括选择用于流感病毒的治疗的方法,其包括:(a)使样品与适于检测A型流感病毒或B型流感病毒的免疫分析的免疫分析缓冲剂接触,进而获得免疫分析测试样品;(b)使免疫分析测试样品的第一部分与包含检测A型或B型流感的免疫分析的测试物接触,进而检测样品中A型或B型流感的存在或不存在;(c)使免疫分析测试样品的第二部分与包含神经氨酸酶分析缓冲剂的基质接触,进而获得神经氨酸酶测试样品;(d)使神经氨酸酶测试样品与神经氨酸酶分析物接触,进而测定神经氨酸酶测试样品的神经氨酸酶对测试化合物的敏感性,所述测定包括:(i)获得抑制值比率,其中比率包括与不存在一种或多种测试化合物情况下的神经氨酸酶活性水平相比的存在一种或多种测试化合物情况下的神经氨酸酶活性水平,和(ii)比较抑制值与抑制阈值的比率,进而测定神经氨酸酶活性对测试化合物的敏感性;和(e)从经测定抑制神经氨酸酶活性的一种或多种测试化合物选择测试化合物。在一些实施方式中,免疫分析缓冲剂与用于神经氨酸酶活性的分析不相容。在一些实施方式中,免疫分析缓冲剂抑制神经氨酸酶活性。在一些实施方式中,步骤(c)和(d)在相同容器中进行。

[0018] 本文提供的一些实施方式包括选择用于流感病毒的治疗的方法,其包括:(a)使样品与适于神经氨酸酶分析的神经氨酸酶分析缓冲剂接触,进而获得神经氨酸酶测试样品;(b)使神经氨酸酶测试样品的第一部分与包含检测A型或B型流感的免疫分析物接触,其中神经氨酸酶测试样品与包含免疫分析缓冲剂的基质接触,进而获得免疫分析测试样品和检测样品中A型或B型流感的存在或不存在;和(c)使神经氨酸酶测试样品的第二部分与神经氨酸酶分析物接触,进而测定神经氨酸酶测试样品的神经氨酸酶对测试化合物的敏感性,所述测定包括:(i)获得抑制值比率,其中比率包含相比于不存在一种或多种测试化合物情况下神经氨酸酶活性水平的存在一种或多种测试化合物情况下的神经氨酸酶活性水平,和(ii)比较抑制值与抑制阈值的比率,进而测定神经氨酸酶活性对测试化合物的敏感性;和(e)从经测定抑制神经氨酸酶活性的一种或多种测试化合物中选择测试化合物。在一些实施方式中,基质包含冻干或以其他方式干燥的免疫分析缓冲剂。在一些实施方式中,步骤(c)在相同容器中进行。在一些实施方式中,步骤(c)在包含多个室的容器中进行。

[0019] 在选择用于流感病毒的治疗的方法的一些实施方式中,抑制阈值通过检测A型或B型病毒确定。在一些实施方式中,如果检测A型病毒,那么使用第一抑制阈值,且如果检测B型病毒,那么使用第二抑制阈值。在一些实施方式中,第一阈值比第二阈值低。

[0020] 在一些实施方式中,容器包括适于使用光电倍增管或微光电倍增管读取的多孔条带或套筒。在一些实施方式中,光电倍增管微光电倍增管为便携式的。在一些实施方式中,光电倍增管在适合于初级护理医师办公室的便携式读取器中。在一些实施方式中,光电倍增管表面为圆形且具有约6mm到9mm的直径,或微光电倍增管为矩形且具有约1mm到3mm的尺

寸。

[0021] 一些方法也包括选择用于治疗流感的测试化合物。

[0022] 在一些实施方式中,神经氨酸酶分析包括含信号传导酶的双酶分析。在一些实施方式中,神经氨酸酶活性产生用于信号传导酶的底物。在一些实施方式中,神经氨酸酶分析包括N-乙酰基神经氨酸和荧光素或其衍生物的缀合物。在一些实施方式中,神经氨酸酶活性产生用于信号传导酶的抑制剂。在一些实施方式中,神经氨酸酶分析包括N-乙酰基神经氨酸和三氟甲基酮或其衍生物的缀合物。在一些实施方式中,信号传导酶包括荧光素酶。

[0023] 在一些实施方式中,神经氨酸酶活性水平使用光电倍增管测量。

[0024] 在一些实施方式中,测试化合物为抗病毒药物。在一些实施方式中,测试化合物是选自以下的抗病毒药物:奥司他韦(Oseltamivir)、扎那米韦(Zanamivir)、拉那米韦(Lanamivir)和帕拉米韦(Peramivir)。

[0025] 在一些实施方式中,免疫分析包含夹心分析。

[0026] 在一些实施方式中,样品获自受试者。在一些实施方式中,受试者疑似患有流感。在一些实施方式中,受试者为人类。在一些实施方式中,受试者样品获自受试者,且受试者被建议服用选定测试化合物以治疗流感。在一些实施方式中,受试者样品获自受试者,且受试者被提供有选定测试化合物以治疗流感。

[0027] 一些实施方式包括检测流感病毒的诊断系统,其包括:用于测定样品中神经氨酸酶活性的套筒,其中套筒经配置以将包含对于测定不相容的缓冲剂的样品处理为包含对于测定相容的缓冲剂的样品;用于检测样品中A型或B型流感的测试物,其中测试物经配置以将包含对于检测不相容的缓冲剂的样品处理为包含对于检测相容的缓冲剂的样品;经配置以测量来自测试的信号的第一检测器;和经配置以测量来自套筒的信号的第二检测器。

[0028] 在一些实施方式中,套筒包括基质室,所述基质室包括含有对于测定相容的缓冲剂的套筒基质,和包含用于神经氨酸酶活性测定的试剂的试剂室。在一些实施方式中,套筒基质包含交联多糖。在一些实施方式中,套筒基质选自葡聚糖凝胶和琼脂糖。

[0029] 在一些实施方式中,基质室和套筒室流体连通,使得施用到基质室的样品从基质室流动到试剂室。在一些实施方式中,样品通过选自重力、毛细作用和扩散的一种或多种力在套筒中流动。

[0030] 在一些实施方式中,套筒包含适于使用光电倍增管或微光电倍增管读取的多孔套筒。

[0031] 在一些实施方式中,测试包括免疫分析。在一些实施方式中,免疫分析为夹心分析。在一些实施方式中,测试包括含对于检测相容的缓冲剂的基质。在一些实施方式中,基质包含硝化纤维素。在一些实施方式中,对于检测相容的缓冲剂经冻干或干燥。

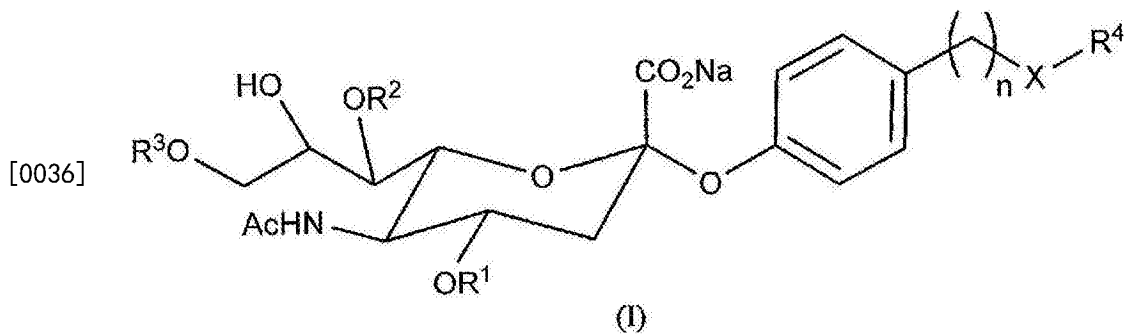
[0032] 在一些实施方式中,第一检测器包括光度计。在一些实施方式中,第一检测器包括反射率读取器。在一些实施方式中,第二检测器包括光电倍增管或微光电倍增管。在一些实施方式中,装置包括第一和第二检测器。在一些实施方式中,第一和第二检测器相同。

[0033] 在一些实施方式中,装置为便携式的。在一些实施方式中,装置为手持式的。

[0034] 一些实施方式包括用于检测流感病毒的试剂盒,其包括:用于测定样品中的神经氨酸酶活性的套筒,其中套筒经配置以将包含对测定不相容的缓冲剂的样品处理为包含对测定相容的缓冲剂的样品;和用于检测样品中的A型或B型流感的测试物,其中测试物经配

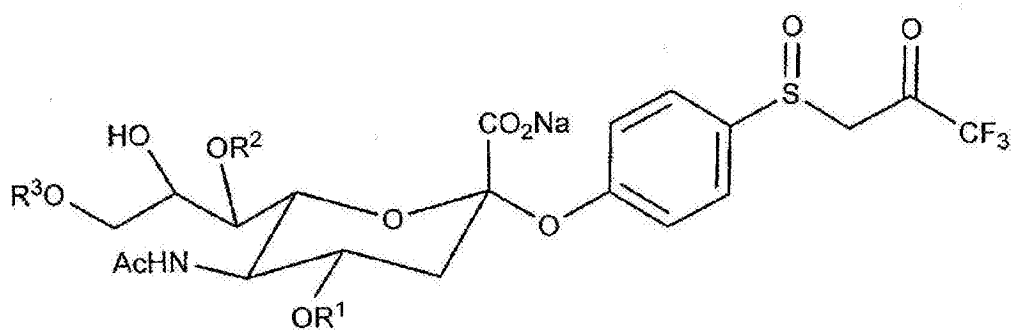
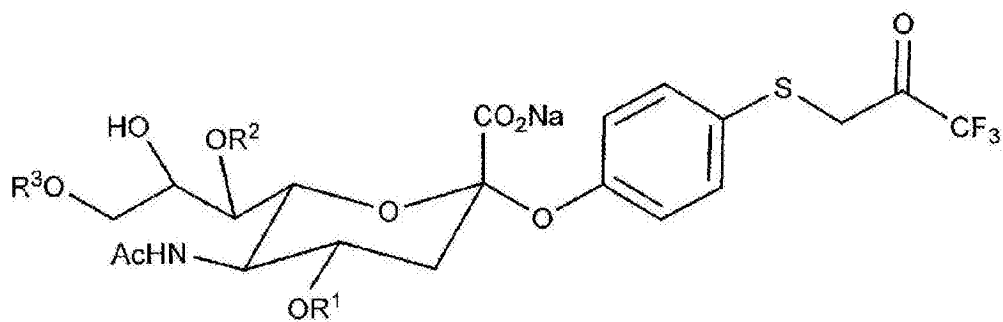
置以将包含对检测不相容的缓冲剂的样品处理为包含对检测相容的缓冲剂的样品。一些实施方式包括经配置以测量来自测试的信号的第一检测器；和经配置以测量来自套筒的信号的第二检测器。一些实施方式包括用于神经氨酸酶活性分析的试剂。在一些实施方式中，神经氨酸酶活性分析试剂选自：荧光素酶，N-乙酰基神经氨酸和荧光素或其衍生物、N-乙酰基神经氨酸和三氟甲基酮或其衍生物的缀合物，和抗病毒药物。在一些实施方式中，抗病毒药物选自：奥司他韦、扎那米韦、拉那米韦和帕拉米韦。一些实施方式包括用于免疫分析的试剂。在一些实施方式中，免疫分析试剂选自：对A型流感抗原特异的抗体，和对B型流感抗原特异的抗体。

[0035] 一些实施方式包括用于双酶流感神经氨酸酶敏感性分析的经遮蔽抑制剂化合物，其具有式(I)结构：

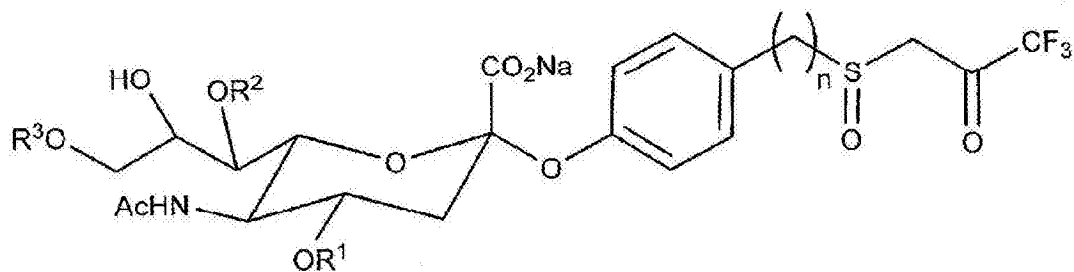
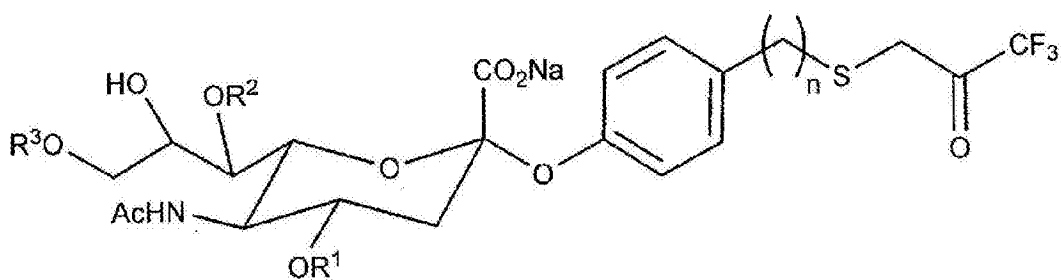
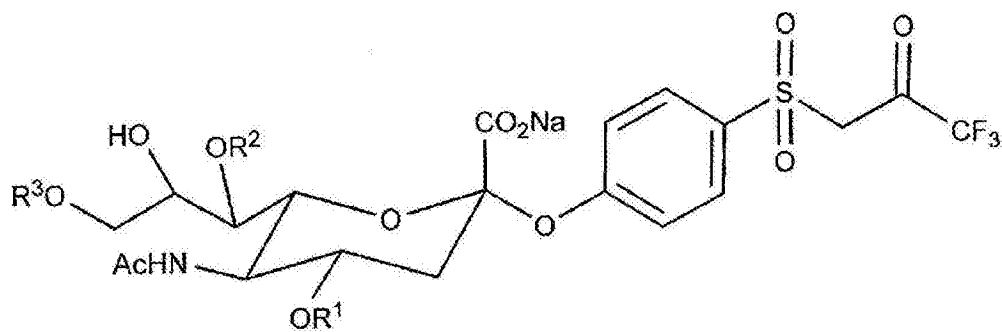


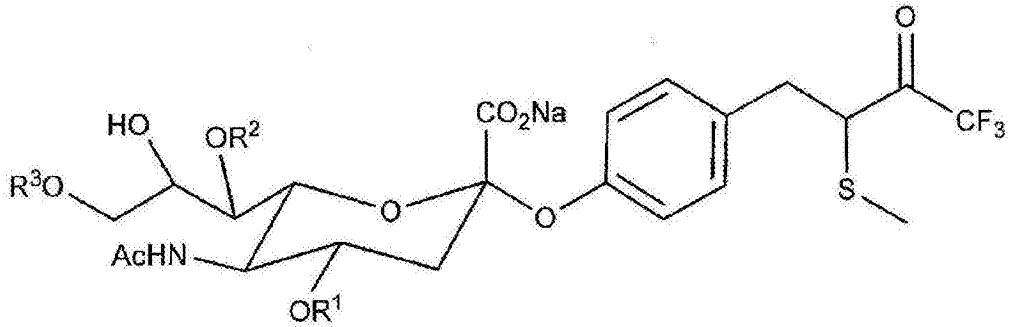
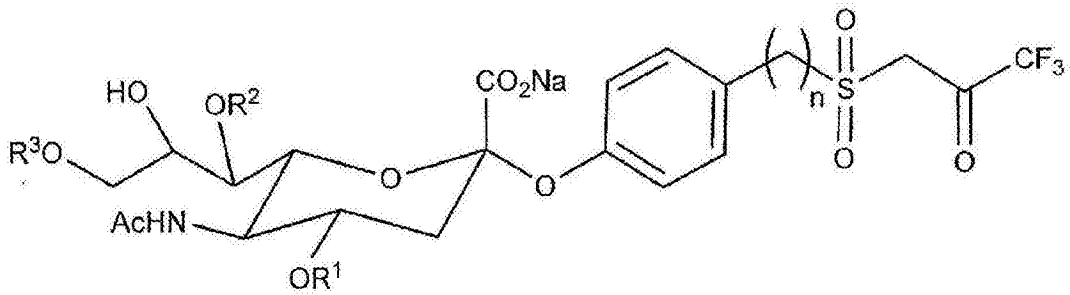
[0037] 其中： R^1 、 R^2 和 R^3 各自独立地为氢或 C_{1-5} 烷基； n 为0、1、2或3； R^4 为 $-(CH_2)_mC(=O)CF_3$ ； m 为0或1； X 为 $-S(O)_z-$ 或 $-CH(R^5)-$ ； R^5 为 $-S(O)_zCH_3$ ；且 z 为0、1或2。

[0038] 在一些实施方式中，式(I)化合物选自：

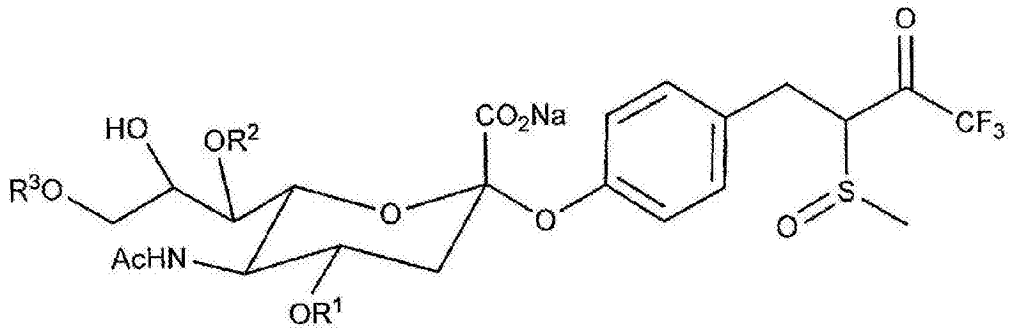


[0039]

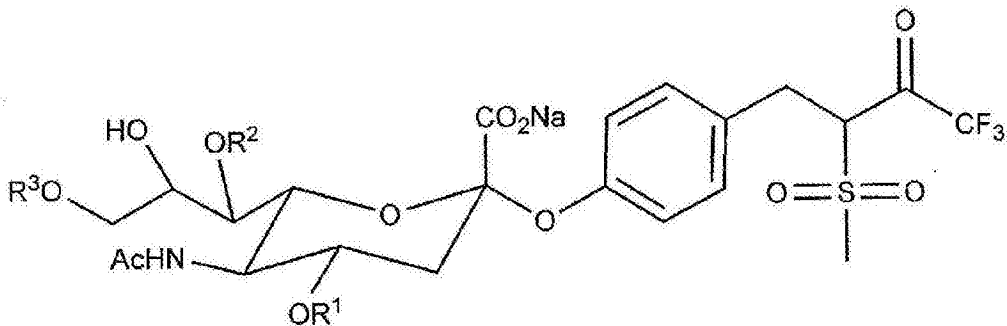




[0040]



、和



附图说明

[0041] 图1描绘用于威利特 (Veritor) 系统 (百克顿-迪金森公司 (Becton Dickinson)) 的免疫分析测试条带和读取器的实施方式。

[0042] 图2描绘组合侧流免疫分析和药物易感性分析的工作流的实施方式。

[0043] 图3描绘测定药物易感性分析中的信号比率的实施方式。

[0044] 图4描绘经遮蔽抑制剂的合成的实施方式。

[0045] 图5描绘用于动态流神经氨酸酶分析的套筒的实施方式。

[0046] 图6为使用便携式读取器测量的荧光对照的相对光单位和浓度的图示。

[0047] 图7为神经氨酸酶分析的相对光单位的图示,且表明双酶分析选择用于治疗的最

佳NA基抗病毒剂的能力。在实例中,瑞乐沙 (Relenza) 表现优于特敏福 (Tamiflu)。

[0048] 图8为各种稀释度的各种A型流感病毒的抑制值的图示,且表明存在可用于辨别流感A抗药菌株与流感A药物敏感菌株的相异抑制值,其不同于流感B菌株的值,且BD具有在AST测试跟随提供A/B分型的常规流感ID测试时在POC环境中作出判断的能力。

[0049] 图9为各种稀释度的各种B型流感病毒的抑制值的图示,且表明存在可用于辨别流感B抗药菌株与流感B药物敏感菌株的相异抑制值,其不同于流感A菌株的值,且BD具有在AST测试跟随提供A/B分型的常规流感ID测试时在POC环境中作出判断的能力。

[0050] 图10为各种稀释度的病毒混合物的抑制值的图示,且表明本文所述技术在抗药菌株存在于混合培养物中时标记其存在的能力。甚至更显著的为显示标记具有pH敏感性NA的高度抗药性流感的能力。

[0051] 图11显示用于抗病毒易感性测试的双酶级联的实施方式中的示例性神经氨酸酶底物NANA-CF3 (经遮蔽抑制剂) 和三氟酮 (游离抑制剂) 的化学结构。

[0052] 图12描绘涉及经遮蔽和游离抑制剂的完整双酶级联的实施方式。

[0053] 图13为两种不同双酶分析的图示,且表明可以用双酶检测化学反应实现的敏感性的范围。

[0054] 图14描绘免疫分析侧流测试条带的实施方式,包括在条带上提前安置免疫分析核壳体提取试剂。

具体实施方式

[0055] 本文提供的方法、组合物、试剂盒、装置和系统的一些实施方式包括能够鉴别流感A或B且指导抗病毒疗法的床旁 (POC) 组合诊断。在一些实施方式中,便携式平台可由具有有限实验室技能的医务人员可操作。一些实施方式包括用在无任何细胞培养扩增情况下直接从临床分离物检测抗病毒抗药性菌株的分析进行流感检测的侧流技术。

[0056] 本文提供的方法和组合物的一些实施方式包括组合分析,其中样品被分析以 (1) 鉴别样品中的A型或B型流感病毒;和 (2) 流感病毒神经氨酸酶对一种或多种抗病毒药物的敏感性。通常,制备用于免疫分析以鉴别A型或B型流感病毒的样品对于用于与病毒神经氨酸酶活性相关的分析不相容。举例来说,用于免疫分析中的溶解缓冲剂可以抑制神经氨酸酶活性分析。本文提供的方法和组合物的实施方式包括在与分析中的一个相容的初始缓冲剂中使用来自单一样品的免疫分析和神经氨酸酶活性分析的方法。一些此类实施方式提供流感类型的快速测试且提供选择用于治疗 of 的抗病毒药物的指导。

[0057] 另外,本文提供的一些实施方式极大增强此类分析的灵敏度。在一些实施方式中,鉴别样品中的流感类型的分析有利地告知检验 (分析, assay) 的分析以测定流感神经氨酸酶对抗病毒药物的敏感性或抗性。在一些实施方式中,特定抗病毒药物的A型或B型病毒的阈值抑制值可经选择且可以用于确定神经氨酸酶是否对抗病毒药物敏感或具抗性。

[0058] 本文提供的一些实施方式包括出于对患者的较大益处而整合两种分析。本文提供的实施方式显著提高流感鉴别分析的灵敏度。另外,两种分析可以用相同量的标本进行。在一些实施方式中,用于此类分析的初始免疫分析和提取缓冲剂可以保持不变,避免使已商业化的分析受到新临床试验的需要。在一些实施方式中,适合于测定流感类型的流感免疫分析的缓冲剂中的标本可以转化为适合于神经氨酸酶药物敏感性分析的缓冲剂中的标本。

在一些实施方式中,适合于神经氨酸酶药物敏感性分析的缓冲剂中的标本可以转化为适合于测定流感类型的流感免疫分析的缓冲剂中的标本。在前述实施方式中的一些中,转化可以在适合于床旁诊断测试的时段中发生。在一些实施方式中,适合于床旁诊断测试的时段可包含小于约1天、小于约12小时、小于约6小时、小于约3小时、小于约1小时、小于约30分钟、小于约10分钟、小于约5分钟、小于约1分钟和前述时间中的任一个之间的时段。

[0059] 本文提供的方法和组合物的一些实施方式可以在神经氨酸酶药物敏感性分析中提供显著低于其它先前分析的特定药物抑制值。此类药物抑制值允许确定流感变体是否为抗药性或药物敏感的。提高的灵敏度导致较少错误结果,在错误结果中,流感在其实际上为抗药性的时鉴别为非抗药性的。

[0060] 一些实施方式包括流感鉴别组件,其包括侧流免疫分析,所述侧流免疫分析利用纳米粒子进行检测、聚焦于流感核壳体的存在且具有能够将流感分型结果(流感A相对于流感B)自动转发到读取器模块且进而应用最适当的药物抑制值以用于后续测试中以区分药物敏感性与抗药性的读取器。在一些实施方式中,流感鉴别组件在无另外人类干预的情况下提供关于流感类型的信息到药物敏感性组件。

[0061] 一些实施方式包括用于药物易感性测试的双重或两酶分析,其利用(lverage)流感神经氨酸酶的活性,且借此第一酶(神经氨酸酶)作用于第一底物,其释放可以通过涉及信号产生的第二酶起作用的第二底物。

[0062] 多个版本的两酶分析或双酶分析与本文中公开的实施方式相容。在一些实施方式中,第一酶-底物反应的结果可以通过第二酶起作用的底物,其中信号随着更多流感抗原而增加且在存在有效流感抗病毒时减少。在一些实施方式中,第一酶-底物反应的结果可以是充当第二酶反应的抑制剂的化合物。在一些实施方式中,第一底物为经遮蔽抑制剂,也就是说,其为抑制剂的前体。在一些实施方式中,信号在存在更多流感抗原时下降且信号在存在有效流感抗病毒时上升。本文提供的方法和组合物的一些实施方式包括可以对于流感神经氨酸酶传递良好灵敏度的双酶分析且灵敏度可在10皮摩尔到100飞摩尔范围内变化。

[0063] 当前,流感治疗的最有效抗病毒剂以神经氨酸酶为目标。两种支柱神经氨酸酶抑制剂药物为扎那米韦(瑞乐沙™)和奥司他韦(特敏福™)。对这些药物具抗性的流感株可能在初始医师问诊期间未被检测到,引起对患者的额外压力,其可以用POC抗病毒抗药性测试避免。在美国和其它工业化国家,抗病毒易感性测试主要由政府实验室远离患者且在其对初级护理医师问诊很久之后进行,作为监测的组分。直到最近,此类测试可以在医师办公实验室中进行是不可想象的。另外,抗病毒易感性试剂缺乏考虑在非培养扩增标本上直接测试所需的敏感性。需要相同或较好敏感性且涉及独立抗原的化学反应,且能够读取多个信号输出,如反射率、荧光、发光的便携式读取器为缺失的。因此,对将促进抗病毒治疗剂的更合理使用的流感抗药性的敏感和快速测试存在需要。

[0064] 本文提供的一些实施方式包括关于流感A+B的存在的POC测试,其经由免疫分析靶向一组流感抗原表位且通过靶向独立流感抗原神经氨酸酶而评估流感抗药性。组合这些抗原致使总体而言较好的流感检测,同时提供疗法的指导。

[0065] 本文提供的一些实施方式包括用于核壳体的敏感性免疫分析和用于测量神经氨酸酶活性的动态分析。在一些实施方式中,动态分析可以包括双酶动态分析。伴以用于核壳体的免疫分析的用于神经氨酸酶活性的双酶动态分析可以包括作为第二酶的荧光素酶和

作为底物的荧光素基缀合物。A和B型流感病毒具有表面糖蛋白,能够水解含有 α -酮昔连接N-乙酰基神经氨酸(有时称为Neu5Ac)的底物的神经氨酸酶。在一些实施方式中,用于神经氨酸酶基抗病毒易感性测试的底物可以是由N-乙酰基神经氨酸和荧光素组成的混合分子(缀合物)。当荧光素在存在荧光素酶的情况下释放时,光以与标本中的残余神经氨酸酶活性成正比的量产生。在一些实施方式中,N-乙酰基神经氨酸-萤火虫荧光素缀合物可以包括用于仙丽施(Cellex) QFlu™组合试剂盒中的那些。

[0066] 本文提供的一些实施方式包括读取器。在一些实施方式中,读取器包括威利特™系统(百克顿-迪金森公司)的读取器,其包括发光测试能力。光度计可以与各种测试一次性用品——包括用于威利特™系统的侧流套筒——和微孔条带一起使用。额外的敏感性和一次性物品柔性可以是当前仅用于鉴别流感A或B的存在的标本得到第二结果的有用选项。

[0067] 当前,当流感进入社区时,标本经获取且流感A或B的测定由初级护理医师进行。其余的标本可以发送到监测实验室用于药物易感性测试且结果发布于政府网站上以供社区中的其它医师查看。尽管本文提供的方法和组合物中的一些力图引导医师到最佳神经氨酸酶抑制剂(NAI)抗病毒剂,此类实施方式也可以提供对基础医师办公实验室流感测试作出就敏感性来说的进一步改进的机会,因为神经氨酸酶和核壳体两者可以在相同标本上测量。本文提供的方法和组合物中的一些还提供收集用于监测的更精确抗病毒抗性数据的机会,因为对于所述主题,许多主要权威相信真实神经氨酸酶表现型可以在病毒通过MDCK培养(传统的费力 IC_{50} 药物敏感性分析所需的步骤)扩增时改变。

[0068] 有药物和无药物情况下的神经氨酸酶活性测量作为流感监测的组分在全世界的实验室中常规地进行。尽管基于组织培养的神经氨酸酶活性分析可以受益于额外标准化,分析为在已由细胞培养产生足够量的病毒之后测定临床标本抗药性的可接受且可靠的方法。如NA-Star™(应用生物系统公司(Applied Biosystems))的化学发光底物常规地用于测量流感神经氨酸酶活性。相比之下,本文提供的方法和组合物中的一些将另一酶包括到试剂混合物中,其可以作用于由神经氨酸酶反应产生的底物。在这样做时,本文提供的方法和组合物中的一些放大由天然流感病毒酶产生的信号。第二酶反过来起作用以替换用于更传统实验室监测程序中的培养扩增步骤。在一些实施方式中,来自威利特™系统的免疫分析信号可以验证存在足够用于神经氨酸酶分析的病毒抗原,替代费力的病毒滴定,在建立 IC_{50} 分析时有时进行的一个步骤。当在免疫分析中达到特定信号强度时,发光信号比(无药物情况下的酶活性:有药物情况下的酶活性)是有效的。

[0069] 本文提供的方法和组合物中的一些包括可能快速、易于使用且低成本的平台。一些实施方式可以多个测试情形为目标,为POC医师办公实验室和需要较高通量的实验室提供工具。这些相同的品质对于资源有限环境和大流行病期间的使用是有用的。

[0070] 本文提供的方法和组合物中的一些包括威利特™系统——便携式(必要时手持式)系统,其在很大程度上归因于新的专有检测器粒子而具有提高的敏感性。参见图1。装有仪表的读取(read)产生待定量的电位,提出的抗病毒易感性测试所需的一种系统属性。

[0071] 用于宽分布的威利特™系统的属性中的一些包括:1)对于相对不熟练看护者的易用性和推出到远程测试位点(医师办公室、药房、康复中心和潜在移动使用)的足够便携性。2)可能的最广泛患者范围,包括对首次床旁(POC)流感抗病毒易感性测试的聚焦。3)生物环境中的使用。4)低部署成本。5)用于测定存在于鼻拭出物、鼻咽洗涤物或抽出物中的流感A

和B,也具有标记流感的抗药株的能力的组合系统。因此增强诊断、治疗和监测。6) 电池供电。7) 轻量型读取器,具有小占据面积(footprint)-15cm(W)×15cm(H)×15cm(D)。

[0072] 图1中示出的侧流设计和膜可用于整合涉及不同化学反应的两个或更多个分析。侧流底物允许涉及两种相异酶的化学反应以恰当顺序放置,其中缓冲剂可以交换,其它试剂可以提前安置且不同类型的信号可以在侧流底物的不同区中读取。

[0073] 在一些实施方式中,用于反应垫和检测器粒子中的固体载体(如硝化纤维素)为侧流分析装置中的常用组分。参见例如US 5,998,221和US 6,194,220,其各自涉及定量侧流且以全文引用的方式并入本文中。在一些实施方式中,定量侧流为验证足够病毒抗原可用于抗病毒抗性测试的有用步骤。在一些实施方式中,侧流条带可以使用用于标本垫和用于缀合物垫的分离膜。在一些实施方式中,侧流条带可以包括多个膜。在一些实施方式中,侧流条带可以包括四个膜。在一些实施方式中,侧流条带可以包括处于侧流盒中的四个膜。在其它实施方式中,一个膜用于接纳标本和保持干燥的缀合物两者。

[0074] 本文提供的方法和组合物中的一些包括双酶系统。在一些实施方式中,可以使用仙丽施底物-酶试剂系统的组件。关于酯酶双酶化学反应的更多细节可见于以下出版物中:迈兹(Mize)等人,双酶级联(Dual Enzyme Cascade),分析化学(Analytical Chemistry), 179, (1989)第229至235页;美国专利4,904,583;和美国专利4,835,099,其各自以全文引用的方式并入本文中。

[0075] 本文提供的方法和组合物中的一些包括经修饰荧光素酶和用于此类酶的底物,包括神经氨酸-荧光素缀合物。在一些实施方式中,扩增可以另外通过引入不同得第二酶(酯酶)和氟酮基阻断(经遮蔽)抑制剂实现。图4显示经遮蔽酯酶抑制剂的实施方式的合成。图4显示作为神经氨酸酶底物的包括氨基甲酸酯或碳酸酯键的底物的实施方式。

[0076] 本文提供的方法和组合物中的一些包括一系列可能的格式配置。在一些实施方式中,免疫分析和双酶分析的完整执行可以包括侧流格式。在一些此类实施方式中,通过相同提取试剂处理的标本可以加载于侧流样品垫上且片刻之后,可以关于流感的存在读取侧流盒终端且也可以提供疗法推荐。在一些实施方式中,颜色改变可以使用反射率读取器测量。在一些实施方式中,可以从用于流感检测的侧流膜直接获取测量结果,如反射率测量结果,且可以获取另一类型的测量结果,如化学发光、荧光或发色团测量结果以用于药物易感性。在一些实施方式中,可以使用读取器获取测量结果是指用于检测和/或定量数据(如在测试条带上)的仪器。此类读取器公开和描述于美国专利第6,267,722号、第6,394,952号和第6,867,051号中,所述专利以全文引用的方式并入。在一些实施方式中,反射率读取器是指适于使用反射光,包括荧光或任何波长的电磁辐射读取测试条带的仪器。反射率可以使用光检测器或其它检测器,如电荷耦合二极管(CCD)检测。

[0077] 免疫分析和易感性信号均可使用公用检测器,如CCD相机观测。在一些实施方式中,免疫分析和易感性分析可以使用不同检测器,如CCD和光电倍增管读取。在一些实施方式中,可以使用定量“场上(on field)”化学发光测量结果的便携式冷却型CCD相机。在一些实施方式中,化学发光抗病毒易感性分析也可以通过具有低噪音放大器的PIN二极管读取

[0078] 在一些实施方式中,其中双酶分析中的第一酶反应与免疫分析试剂不相容,双酶分析的前端离线(offline)进行且具有裂解底物的经部分处理的标本加载到侧流样品垫上,其可以通过毛细作用沿侧流条带下行到含有荧光素酶和其它产生发光信号必需的试剂

的固体载体。在此配置中,免疫分析和易感性信号可以使用公用检测器,如CCD相机读取。在一些实施方式中,免疫分析和易感性分析可以使用不同检测器,如CCD和光电倍增管读取。

[0079] 在一些实施方式中,侧流上的双酶分析可以通过将含有裂解荧光素的经处理侧流盒的部分浸没到具有荧光素酶和产生发光信号所需要的其它试剂的孔中实现。产生自双酶分析的光随后通过Luminoskan TL Pus或等效管光度计测量。

[0080] 在一些实施方式中,免疫分析在侧流盒上进行和读取且双酶分析在孔条带上进行和读取。两个分析可以共用公用提取标本,但以不同格式执行,随后在可以调节侧流反射率和孔条带化学发光(或荧光或其它光学信号)的公用仪器上读取。免疫分析和易感性信号均可以使用公用检测器,如CCD相机观测,或免疫分析和双酶分析可以使用不同检测器,如CCD和光电倍增管读取。

[0081] 测定实施方式的一般方法:

[0082] 如图2所示,申请人研究在单一样品上运行流感分型(typing)和抗病毒敏感性测试的若干选项。在一个实施方式中,标本经分离且用两种不同提取缓冲剂处理,其中标本的每一部分仅用于一个分析。此方法的限制为在一些情形中,不足够的标本可用于运行流感ID和AST分析两者。在一个实施方式中,可用于两种分析的公用提取试剂和缓冲剂被测试。此方法的限制为用于免疫分析和动态分析的条件不同,利用公用缓冲剂不太理想。在另一实施方式中,使用适合于Flu ID或AST分析的单一提取缓冲剂,其中缓冲剂实时转化到相对分析。此实施方式为两种分析均提供足够样品体积和敏感性。图2也显示产生的流感ID和易感性测试两者的分析格式的多个实施方式。使用用于组合侧流免疫分析和双酶分析的适当读取器和一次性物品(一种或多种)(例如,如果孔条带用于AST,那么可以使用独立孔条带读取器,而如果使用侧流条带,那么单一侧流读取器可以用于两个测试)。

[0083] 在一些实施方式中,使用用于免疫分析和抗病毒抗性测量两者的公用提取试剂。

[0084] 在一些实施方式中,侧流格式用于免疫分析和双酶分析两者,其中对穿过硝化纤维素垫的神经氨酸酶进行抗病毒抗性测量。在一些实施方式中,分析可以对于约150 μ l标本进行,所述标本通常在免疫分析侧流套筒已加载之后保留。在一些实施方式中,一个或两个体积可以在孔条带中以均质分析形式测量。

[0085] 在一些实施方式中,系统包括光度计,如特洛匹克斯(Tropix)或贝瑟德(Bethold),便携式光度计,如来自上海互帼科学仪器公司(Shanghi Huguo Science Instrument Company)的HG-2。

[0086] 在一些实施方式中,病毒来源可以包括在存在人类鼻拭出物情况下验证功能动力学和免疫分析的冷冻、已知流感阳性的临床标本。

[0087] 双酶抗病毒易感性分析

[0088] 如图3中所展示,神经氨酸酶活性的双酶动态分析的一些实施方式可以包括作为第二酶的荧光素酶和作为底物的荧光素基缀合物。尤尔肯(Yolken)在1980年报导用于神经氨酸酶的荧光底物。巴克斯顿(Buxton)在2000年报导用于神经氨酸酶的化学发光底物,而汉密尔顿(Hamilton)在2004年进行美国食品和药品管理局(FDA)批准的ZestatFlu-II测试的并排比较(side comparison),其使用用于流感鉴别的化学发光神经氨酸酶底物。单酶-单底物系统中没有一个演化成适合于在医师办公实验室中进行的稳固药物易感性测试。这可能是灵敏度的问题,可通过更好的信号放大系统解决。本文提供的一些实施方式包括双

酶系统,其涉及荧光素缀合物。一旦通过流感神经氨酸酶起作用,缀合物释放游离荧光素,其又通过荧光素酶起作用。在本文公开的实施方式中,此类双酶化学发光系统可以提供用于POC抗病毒易感性诊断的足够扩增。用于本文提供的方法和组合物的试剂的实例包括仙丽施的用于QFlu™组合测试的试剂。

[0089] 表明在公用提取标本上进行流感A/B免疫分析和药物易感性测试的能力

[0090] 本文提供的一些实施方式包括表明哪些分析反应步骤/试剂在相同时间范围内且很靠近(如果不在相同空间中)地进行时是相容地。在一些实施方式中,可以关于敏感性、特异性、分析范围、解析和得到结果的时间(time-to-result)对用于核壳体的免疫分析和用于神经氨酸酶活性的双酶分析密切监测。并非来自两种分析的所有步骤都需要相容以取得成功。在一些实施方式中,威利特™免疫分析试剂和仙丽施QFlu™分析(当前部署用于监测目的)中使用的当前双酶试剂用于所公开的方法、组合物、试剂盒、装置和系统中。一种评估的试剂为用于两种分析的溶解试剂。在一些实施方式中,来自威利特™免疫分析的溶解试剂用于制备流感A/B和药物敏感性测试两者中使用的样品。在另一实施方式中,使用来自仙丽施QFlu™分析的溶解试剂以用于制备流感A/B和药物敏感性测试两者中使用的样品。

[0091] 抗病毒易感性/抗性分析的干扰筛选

[0092] A和B型流感病毒具有表面糖蛋白,能够水解含有 α -酮苷连接N-乙酰基神经氨酸(有时称为Neu5Ac)的底物的神经氨酸酶。评估用于神经氨酸酶基抗病毒易感性测试中的底物包括由N-乙酰基神经氨酸和荧光素组成的混合分子(缀合物)。当荧光素在存在荧光素酶情况下释放时,光以与标本中的残余神经氨酸酶活性成正比的量产生。在一个实施方式中,评估用于仙丽施QFlu™组合试剂盒中的N-乙酰基神经氨酸-萤火虫荧光素缀合物,所述试剂盒当前分布用于监测应用。在一些实施方式中,用培养的病毒备料进行基准实验(benchmarking experiments),借此对于每一测试条件进行两个分离反应,一个反应例如含有抗病毒剂(实例:奥司他韦)且另一个神经氨酸酶活性测量在无抗病毒抑制剂情况下进行。对照标本可以通过开发中的快速方法和推荐的WHO IC50方法中的一种分析。在一些实施方式中,筛选抗病毒易感性试剂可以在微孔、管或比色杯或板中进行且读取化学发光或荧光。筛选可以用流感的抗病毒抗性和敏感性株进行。当应急时,纯的神经氨酸酶可以扎进标本中且用于干扰筛选中。冰冻的已知阳性临床标本也可定期(on a regular basis)测试,主要用以确保鼻拭出物的其它组分不干扰双酶分析。

[0093] 免疫分析的干扰筛选

[0094] 在一些实施方式中,流感检测(免疫分析)试剂的筛选可以侧流格式进行且读取反射率,如当前在美国食品药品监督管理局批准的CLIA Waived威利特™产品中所进行的。BD威利特™免疫分析使用针对流感核壳体的两种单克隆抗体。一种抗体固定到专有金粒子的表面而另一种固定到侧流盒中的硝化纤维素。硝化纤维素反应条带上检测的信号的量与标本中流感病毒的量成比例。关于对威利特™免疫分析潜在干扰的测试双酶试剂可以在存在制备的流感A(流感A/PR/8/34)和流感B(流感B/李(Lee)/40)阳性样品的情况下进行以产生对应于中度阳性的最终浓度(检测的约5倍水平)。测试干扰可以流感A或流感B阴性样品情况下的假阳性结果或流感A或流感B阳性样品情况下的假阴性结果的形式被看到。仅不展现干扰的那些双酶试剂可以前进。当应急时,纯的核壳体可以扎进标本中且用于性能筛选。

[0095] 其它双酶化学

[0096] 其它双酶试剂系统包括与包括N-乙酰基神经氨酸和荧光素缀合物组分的仙丽施系统类似但利用不同连接体的底物。在一些实施方式中,可以使用不同荧光素酶。

[0097] 测定用于药物易感性分析的格式/一次性物品

[0098] 本文提供的方法和组合物的一些实施方式包括选择用于组合分析的适当格式。在发现化学性质相容的一些实施方式中,随后免疫分析和双酶分析的完整执行可以侧流格式最佳地处置。当侧流格式用于两个分析时,通过相同提取试剂处理的标本可以加载于侧流样品垫上,且片刻之后,可以关于流感(包括A/B型)的存在读取侧流盒的终端,且也可以提供基于药物易感性的疗法推荐。反射率测量结果可以直接获自用于流感检测的侧流膜且获取化学发光测量结果以用于药物易感性。在一些实施方式中,可以使用定量“场上”化学发光测量结果的便携式冷却型CCD相机。

[0099] 在一些实施方式中,其中双酶分析中的第一酶反应与其它免疫分析试剂不相容,双酶分析的前端离线进行且具有裂解底物的经部分处理的标本加载到侧流样品垫上,其可以通过毛细作用沿侧流条带下行到含有荧光素酶和其它产生发光信号必需的试剂的固体载体。

[0100] 在一些实施方式中,侧流的双酶分析可以通过将含有裂解荧光素的经处理侧流盒的部分浸没到具有荧光素酶和其它产生发光信号所需要的试剂的孔中实现。产生自双酶分析的光随后通过Luminoskan TL Pus或等效光度计测量。

[0101] 在一些实施方式中,免疫分析在侧流盒上进行和读取且流线型仙丽施Qflu™组合分析在孔条带上进行和读取。两个分析可以共用公用提取标本,但以不同格式执行,随后在可以调节侧流反射率和孔条带化学发光的公用仪器上读取。在一些实施方式中,使用两个独立仪器。在一些实施方式中,单个或多个装置为便携式、电池供电装置,具有小的占据面积,适合放置于医生办公室中,例如设计尺寸以适配于柜台或便携式医用置物架上。

[0102] 系统验证

[0103] 可以培养和列举20个流感株的测试集,允许最终组合平台(整合的一次性物品、读取器和试剂)分析下至 $10E3$ 病毒体(以 $TCID_{50}/ml$ 或 $CEID_{50}/ml$ 单位界定)的浓度的敏感性。20个株的测试集可以含有平衡的流感A和B株。流感A株可以是流感H1N1和H3N2的混合物。测试集可以含有特敏福(Tamiflu)™抗药和易感性株。测试集也可以包括对第二NAI药物具抗性的和易感的株。为了进展和最终整合系统进行基准测试,可使用几乎100个冷冻的已知阳性临床分离株。

[0104] 用于开发和验证的抗病毒剂

[0105] 表1提供用于本文提供的方法和组合物的示例性NAI(神经氨酸酶抑制剂)抗病毒剂。由于群体无法依赖于新循环流感株始终对奥司他韦和扎那米韦具有敏感性,用生物区(Biota)药物在POC抗病毒易感性诊断中产生数据期望的。

[0106] 表1

[0107]

NAI 抗病毒剂和制造商
特敏福™ 羧酸奥司他韦（活性）/磷酸奥司他韦（前药），经口传递，基于扎那米韦的 DANA w\知识罗氏（Roche），USP, 红杉研究实验室（Sequoia Res Labs）
瑞乐沙™ 扎那米韦，吸入，基于 DANA-亲和力比 DANA 高 葛兰素史克（GSK）
伊那韦（Inavir）™ 辛酸拉尼娜米韦（Laninamivir octononate），吸入，第 2 代=长效 NAI，基于扎那米韦生物区药物（Biota Pharmaceuticals），近来的生物区和 NABI 合并公司/第一三共株式会社（Daiichi Sankyo Co, Limited）
拉帕科塔（Rapiacta）™/佩拉敏福（Peramiflu）™ 帕拉米韦，肠胃外，基于 DANA，具有扎那米韦和奥司他韦的特征
DANA=2,3,-脱氢-2-脱氧-N-乙酰基神经氨酸麦基姆-布列奇金（McKimm-Breschkin）（2012） 流感神经氨酸酶抑制剂：抗病毒作用和抗性机制（Influenza neuraminidase inhibitors: Antiviral action and mechanisms of resistance），流感和其它呼吸道病毒（Influenza and other Respiratory Viruses）7（增刊 1），25-36。 沃森 M（Wathen M），巴洛 M（Barro M），布莱特 R（Bright R），（2012）季节性和大流行性流感中的抗病毒剂-未来观点（Antivirals in seasonal and pandemic influenza - future perspectives），流感和其它呼吸道病毒 7（增刊），76-80。

[0108] 流感株、分离株和对照集合

[0109] 表2包括用于本文提供的方法和组合物的一些实施方式的示例性特异表现型和基因型。可以获得对于神经氨酸酶药物具抗性和易感性的流感A和流感B株 (BSL-2) 以用于发展。在一些实施方式中，本文提供的方法和组合物包括主要流感A亚型神经氨酸酶，以及流感B神经氨酸酶。

[0110] 表2

[0111]

广泛表征的抗药性株 约 20 个分离株	ISIRV 8 成员小组 抗药性流感 B WT+基因型 D1973、流感 A (H3N2) WT+基因型 E119V、流感 A (H1N1) WT+基因型 H275Y、流感 A (H1N1 pdm09) WT+基因型 H275Y 的混合物 磷酸奥司他韦 (Oselt) 抗性 A/华盛顿 (Washington) /29/2009 (H1N1pdm) H275Y 磷酸奥司他韦 (IC50=1462) A/乔治亚 (Georgia) /20/2006 (H1N1) H274Y 磷酸奥司他韦 (IC50=383) A/马萨诸塞 (Massachusetts) /5/2007 (H1N1) H274Y 磷酸奥司他韦 (IC50=258) A/德克萨斯 (Texas) /12/2007 (H3N2) E1 19V 磷酸奥司他韦 (IC50=9.18) 扎那米韦抗性 A/蒙大拿 (Montana) /8/2007 (H3N2) D151V/D 扎那米韦 (IC50=191.9) 磷酸奥司他韦+扎那米韦抗性 B/香港/36/2005 B)R371K 磷酸奥司他韦 (IC50=1778) 扎那米韦 (IC50=154) 磷酸奥司他韦抗性 (回收自不具有磷酸奥司他韦疗法的既往史的患者)
已知流感阳性 至多 100 个分离株	各式各样的已知流感阳性培养物, 其可能回收自抽出物、鼻咽洗涤物、拭出物等。在许多情况下, BD 仅可以称为流感 A/B。在一些情况下, 神经氨酸酶和血球凝集素名称可以是已知的。
流感阴性 NPW 至多 10 个集合	出于阴性对照目的收集的鼻咽洗涤物和用于加标流感抗原的稀释剂

[0112] 基准测试

[0113] 本文提供的一些实施方式包括对于单点QFlu™组合和免疫分析进行IC50。威利特™和QFlu™系统可根据包装说明书使用。针对IC50制备的试剂盒存在许多选项,如来自应用生物系统公司/生命技术公司(Life Technologies)的NA-Star™试剂盒。表3提供可用于抗病毒测试的供应品的来源和料号的实例。

[0114] 表3

[0115]

描述	供应商	目录编号
NA-Star™ 流感 NAI 抗性检测试剂盒 (初级)	应用生物系统公司	4374348
NA-XTD™ 流感 NAI 抗性检测试剂盒 (替代)		4457534
NA-Fluor™ 流感 NAI 抗性检测试剂盒 (替代)		4457091
NA-Star™+NA-XTD™ 检测微量培养板	应用生物系统公司	4374349
根据药品说明书 (包装插页, package insert) 用于基准测试的完好仙丽施 QFlu™ 组合试剂盒	仙丽施	
根据药品说明书用于基准测试的完好 BD 威利特™ 试剂盒	百克顿-迪金森公司	

[0116] IC₅₀方法

[0117] 本文提供的方法和组合物的一些实施方式可以与用可商购的 NA-Star® 试剂盒 (加利福尼亚州福斯特市 (Foster City, CA) 应用生物系统公司) 进行的化学发光 NAI 分析比

较,所述试剂盒包括 NA-Star®缓冲剂(26mM MES,4mM CaCl₂,pH 6.0)、NA-Star®底物、NA-Star®促进剂和96孔固体白色培养板。目录4374348和4374349。IC₅₀方法、制备和分析的其它细节可以见于抗菌剂和化学疗法(ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY),2008年9月,第3284-3292页第52卷,第9期中,其以全文引用的方式并入本文中。

[0118] 标本选择(拭出物相对于洗涤剂相对于抽出物)和对分析敏感性的影响

[0119] 一些实施方式包括三个标本选项(来自拭出物的直接测试相对于来自鼻咽洗涤剂或抽出物的测试)。一些实施方式包括来自冷冻标本和培养物的测试,和从单一集合进行核壳体免疫分析和神经氨酸酶活性分析的能力。

[0120] 直接从拭出物测试

[0121] 本文提供的方法和组合物的一些实施方式包括使用拭子收集标本。第一威利特™免疫分析是基于干燥拭子集合,借此整个标本有意提交到“加工试剂”(400 μl体积)且药品说明书要求(call for)标本在一小时内施用到侧流条带。通常,在约80μl体积加载到侧流盒上之后残留数百微升,留下大量未使用的经处理抗原,其可以被引导到抗病毒易感性测试。尽管此标本处理路径并未分出用于病毒培养的样品,在一些实施方式中,免疫和动态分析均可以在其峰值检测水平处或附近进行,其中剩余一些标本,其可以补充有核酸稳定剂以用于随后PCR检测。

[0122] 测试鼻咽洗涤剂/抽出物

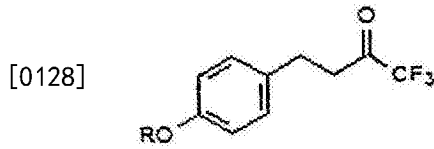
[0123] 威利特™平台包括这样的方法,其中浓缩粘液溶解(mucolytic)试剂在负载于侧流盒上之前以3份比1份添加到收集的标本。三百\微升的每一有机体悬浮液添加到含有如由BD销售的RV试剂C或RV试剂D的组合管(utilized tube)(例如,在用于快速诊断流感A&B的威利特™系统的试剂盒(产品号256045)中)。大于10种保存-运送培养基已在这些洗涤剂/抽出物标本的情况下成功地测试。保存-运送培养基的实例包括:M4RT、M4、M5、UTM、艾姆斯(Ames)培养基(液体)、巴特尔维拉特兰斯(Bartel Vira Trans)™培养基、汉克斯(Hanks)平衡盐溶液、标准生理盐水、磷酸盐缓冲盐水。M4RT培养基在25℃下为pH 7.3且含有汉克斯平衡盐:CaCl₂、MgCl₂-6H₂O、MgSO₄-7H₂O、KCl、KH₂PO₄、NaCl、Na₂HPO₄-7H₂O、葡萄糖。因此,在一些实施方式中,用于病毒传播的样品可以在添加粘液溶解剂之前收集有鼻咽洗涤剂/抽出物。可能的抗原稀释影响可以在使用鼻咽洗涤剂/抽出物标本时考虑在内。威利特™分析比市场上的任何其它快速分析具有更大敏感性。

[0124] 获取敏感性的化学发光方法和度量

[0125] 用于本文提供的方法和组合物的化学发光方法包括美国专利第8,221,976号;第8,163,237号;第7,947,820号;第7,642,060号;第7,291,488号;第5,736,365号;第5,639,428号;第5,561,044号;第5,518,884号;第5,470,723号;第5,457,027号;第5,314,801号;第5,017,473号;和第4,810,631号中所公开那些,所述专利中的每一个以全文引用的方式并入。在一些实施方式中,双酶测试的度量大体类似于诸如使用威利特™免疫分析获得的流感病毒体的检测水平的度量。在一些实施方式中,检测神经氨酸酶的存在化学反应可以在10³TCID₅₀处产生足够信号以也允许在用药物与w\o药物进行的反应之间将观测到的稳固5:1比率。在一些实施方式中,敏感性和长线性范围均可评估。在一些实施方式中,可以使用仙丽施。

[0126] 某些化学

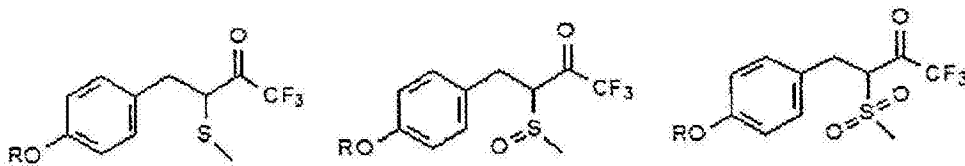
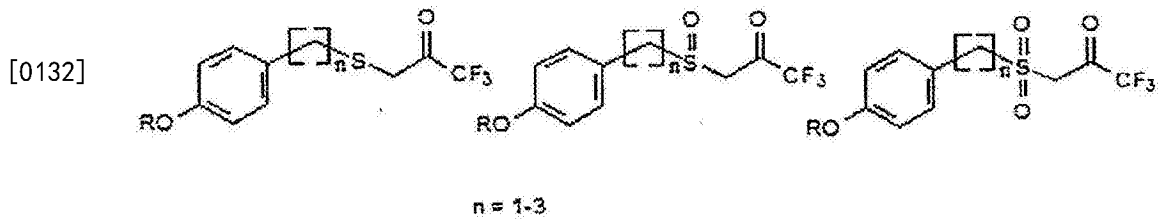
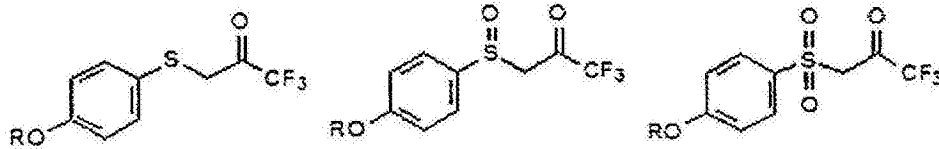
[0127] 图12显示可以与本文中提供的组合物和方法一起使用以分析神经氨酸酶活性的酯酶基化学反应。用于本文提供的方法和组合物的实施方式的方法包括以下所公开的那些：迈兹 (Mize) 等人, 双酶级联 (Dual Enzyme Cascade), 分析化学 (Analytical Chemistry), 179, (1989) 第229至235页; 美国专利4,904,583; 美国专利4,835,099, 其各自以全文引用的方式并入本文中。一些实施方式包括经修饰荧光素酶和其底物, 如经修饰神经氨酸-荧光素缀合物。可以使用的其它抑制剂包括以下:



[0129] R=H酯酶抑制剂

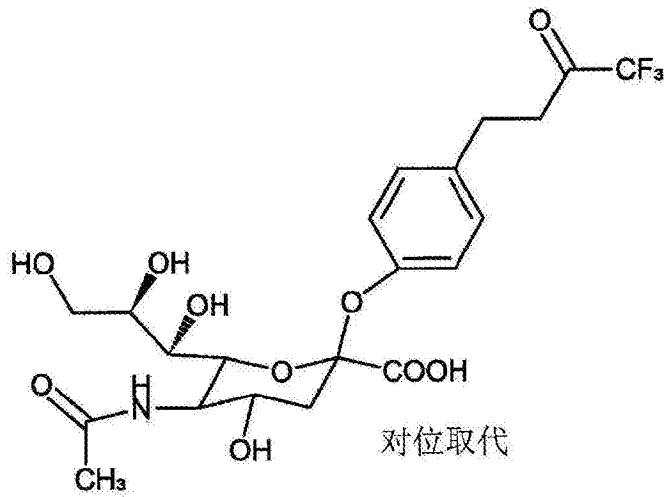
[0130] R=NANA经遮蔽酯酶抑制剂

[0131] 一些可能的Bets-硫基变体抑制剂/经遮蔽抑制剂

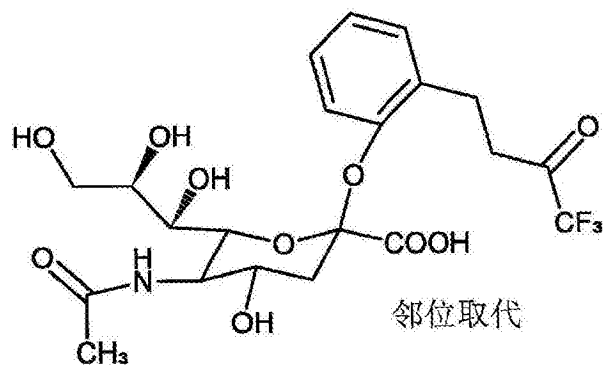
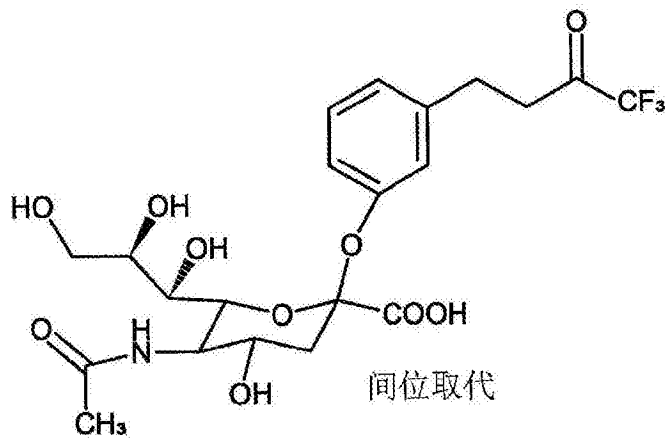


[0133] 图12中的化合物在对位具有三氟酮。更多酯酶抑制剂包括1,1,1-三氟-4-(4-羟基苯基)丁-2-酮(对位); 1,1,1-三氟-4-(3-羟基苯基)丁-2-酮(间位); 和1,1,1-三氟-4-(2-羟基苯基)丁-2-酮(邻位)。

[0134] 用于本文中公开的实施方式的可选经遮蔽抑制剂底物包括在间位和邻位具有三氟酮的那些, 如下文所提供:



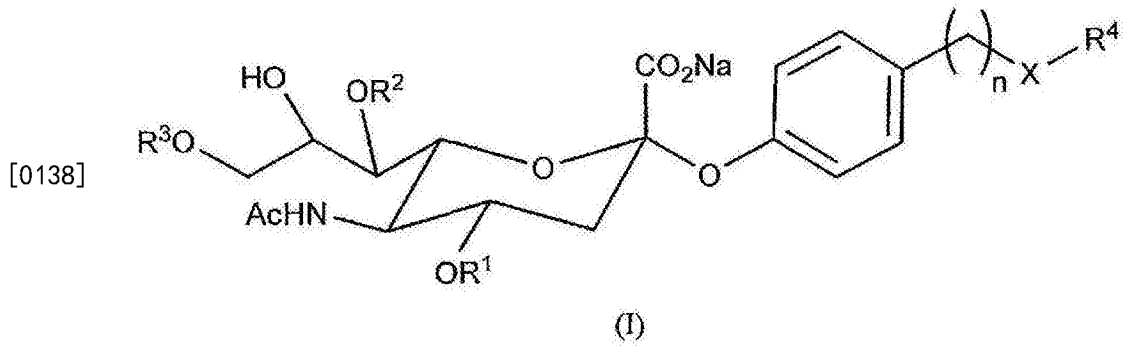
[0135]



[0136] 在另一实施方式中,4,7甲基化N-乙酰基神经氨酸(NANA)-三氟酮可以在对于流感神经氨酸酶更多特异性的情况下用于DE经遮蔽抑制剂分析。

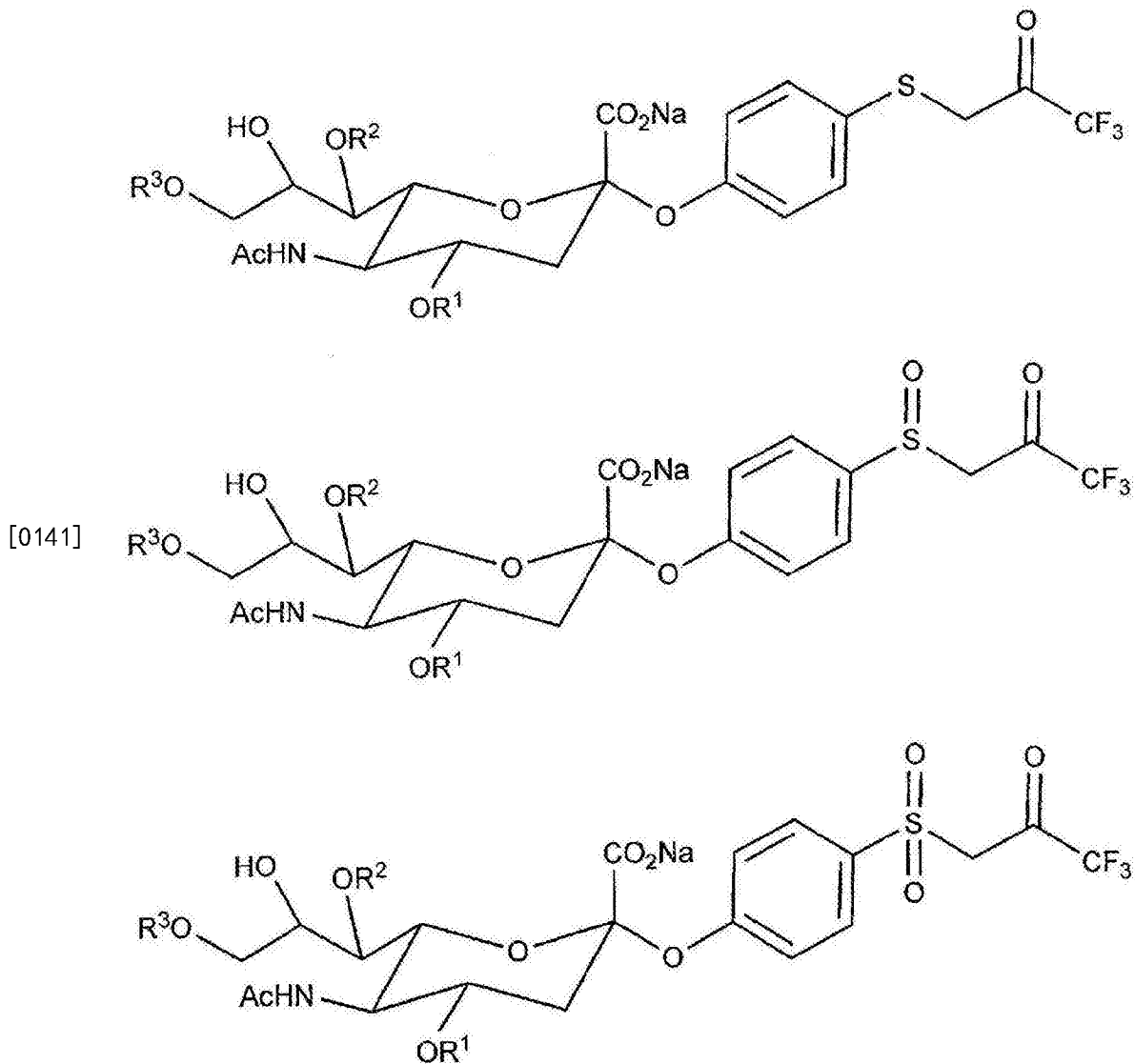
[0137] 一些实施方式包括用于双酶流感神经氨酸酶敏感性分析的经遮蔽抑制剂化合物,

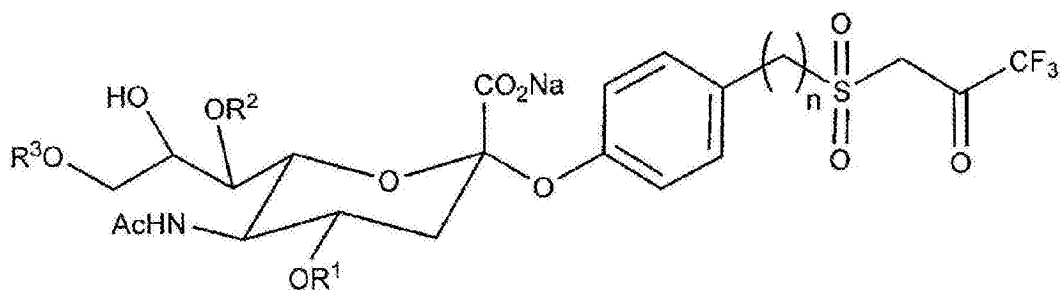
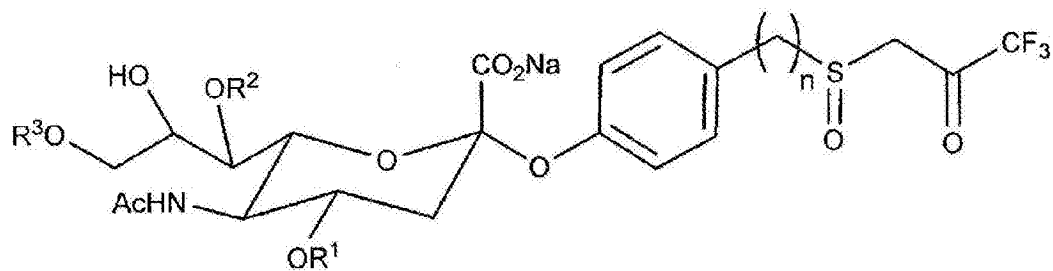
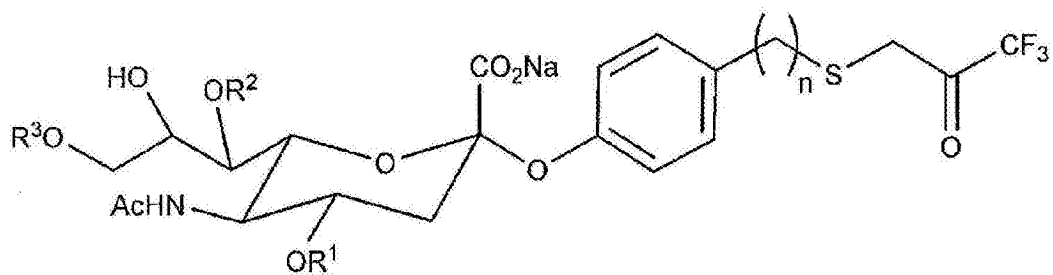
其具有式 (I) 结构:



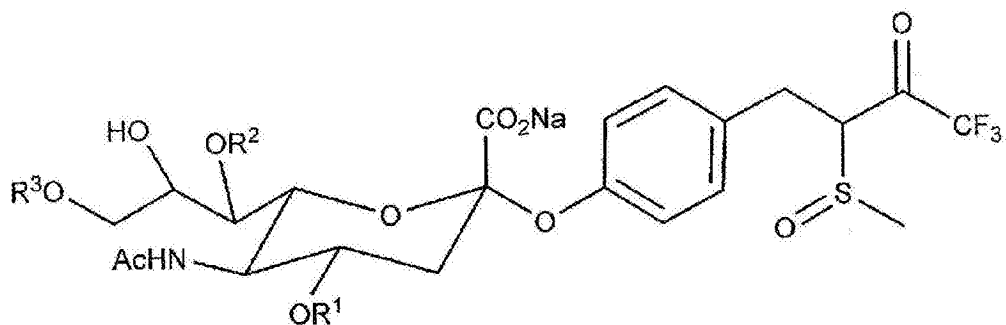
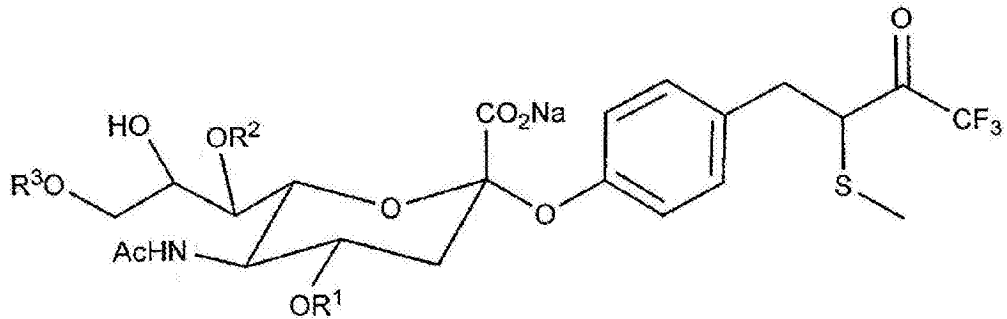
[0139] 其中: R^1 、 R^2 和 R^3 各自独立地为氢或 C_{1-5} 烷基; n 为0、1、2或3; R^4 为 $-(CH_2)_mC(=O)CF_3$; m 为0或1; X 为 $-S(O)_z-$ 或 $-CH(R^5)-$; R^5 为 $-S(O)_zCH_3$; 且 z 为0、1或2。

[0140] 在一些实施方式中, 式 (I) 化合物选自以下:

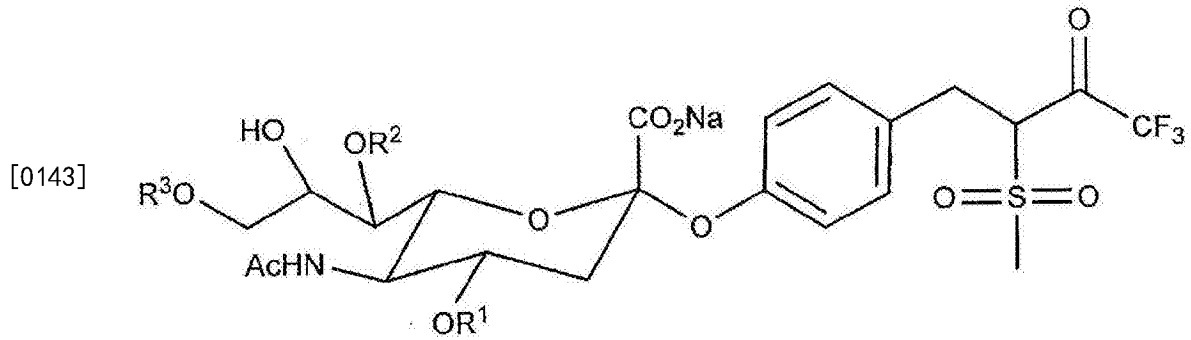




[0142]



和



[0144] DNA测序

[0145] 在一些实施方式中,基因型数据获自标本的流感病毒体。在一些实施方式中,特定病毒分离株可以用基准组织培养IC50方法产生不同于来自快速POC测试的曲线(profile)的药物敏感度曲线。不同曲线可归因于神经氨酸酶活性位点内的残基处的突变和已知赋予NA中的其它地方的特异性流感亚型或框架取代的抗性。对来自标本的核酸进行测序的方法在本领域中是众所周知的。

[0146] 来自其它病原体的干扰

[0147] 在一些实施方式中,设想来自疑似患有流感感染的患者的一些标本可以含有产生神经氨酸酶的其它病原体。表4提供最常发现于流感阳性临床标本中的病原体的实例。

[0148] 表4

	参考文献	常见共同感染
	佩奇(Peci)等人,安大略前哨实践的患者中的社区获得性呼吸道病毒和协同感染(Community-acquired respiratory viruses and co-infection among patients of Ontario sentinel practices) (2012) 1750-2659	在RSV下的流感 在肠病毒下的流感 在鼻病毒下的流感 在副流感I、II和III下的流感 在冠状病毒下的流感 在腺病毒下的流感
[0149]	王(Wang)等人,20世纪的流感和细菌性病原体协同感染(Influenza and Bacterial Pathogen Coinfections in the 20 th Century) 传染病跨学科视角(Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases),第2011卷(2011) 文章编号146376	在肺炎链球菌下的流感
	岛崎(Shimasaki)等人,快速诊断学:作为用于高特异性标靶的技术的神经氨酸酶活性检测(Rapid Diagnostics: the detection of neuraminidase activity as a technology for high-specificity targets),英国皇家学会(The Royal Society), (2001) 356, 1925-1931 由ZymeTx公司, ZstatFlu Dx的制造者。	1型副流感 2型副流感 3型副流感 流行性腮腺炎病毒 呼吸道病毒 腺病毒

[0150] 表5提供可以在标本干扰测试中测试的病原体的实例。可以测试此类病原体对本文提供的方法和组合物的任何影响。干扰在全病毒或纯化神经氨酸酶情况下测试。这些病原体可以在预期存在于临床集中的浓度下分析。

[0151] 表5

[0152]	病毒	人类呼吸道融合性病毒, 株 9320 (美国模式培养物保藏库 (ATCC) -VR-955)
		人类副流感病毒 1, 株 C35 (美国模式培养物保藏库 VR-94)
		人类副流感病毒 2, 菌株格里尔 (Greer) (美国模式培养物保藏库 VR-92)
		人类副流感病毒 3, 株 C243 (美国模式培养物保藏库 VR-93)
		人类冠状病毒, 株 OC43 (美国模式培养物保藏库 1558)
		人类鼻病毒 17, 株 33342 (美国模式培养物保藏库 VR-1633)
		人类肠病毒 71, 株 H (美国模式培养物保藏库 1432)
		人类腺病毒 1, 腺样增殖体株 71 (美国模式培养物保藏库 VR-1)
细菌	肺炎链球菌 (美国模式培养物保藏库-6301)	

[0153] 在一些实施方式中, 样品可包括鼻咽洗涤物、抽出物和拭出物。

[0154] 检测A型流感或B型流感

[0155] 本文提供的实施方式中的一些包括检测标本中A型流感病毒或B型流感病毒的存在。一些实施方式包括使用免疫分析鉴别可以区分流感类型, 如A/B的病毒抗原。在一些实施方式中, 抗原为核壳体。在一些实施方式中, 免疫分析包括夹心分析。在一些此类实施方式中, 第一抗体特异性结合到目标抗原, 且结合的抗原和第一抗体随后特异地结合到产生信号的第二抗体。在一些实施方式中, 信号为比色、荧光、化学发光和放射性的。在一些实施方式中, 免疫分析可以包括侧流系统。在一些实施方式中, 测试条带包括免疫分析。用于本文提供的方法和组合物的系统和组合物包括用于快速检测流感A+B的威利特™系统(百克顿-迪金森公司)。在一些情况下, 来自测试条带的输出将为反射率。在一些实施方式中, 来自测试条带的输出为可以使用反射率读取器测量的颜色改变。除侧流免疫分析格式以外, 测定A型或B型流感病毒的实施方式可以包括在溶液相中、在基底如膜、表面和粒子上的分子和免疫检测。在一些实施方式中, 微孔ELISA、纳米标签-磁性分离分析和粒子凝集。分子检测分析的实例包括 Xpert® 流感系统(加利福尼亚州森尼韦尔市赛沛(Cepheid, Sunnyvale, CA))。包括纳米标签的实施方式包括表面增强拉曼光谱测学(SERS)纳米标签。参见例如美国化学学会·纳米(ACS Nano), 2009, 3(10), 第2859-2869页, 其以全文引用的方式并入本文中。包括粒子凝集的实施方式为众所周知的且包括使流体中的抗原与抗原结合要素, 如包被于粒子上的抗体接触。参见例如U.S. 4, 590, 169, 其以全文引用的方式并入本文中。

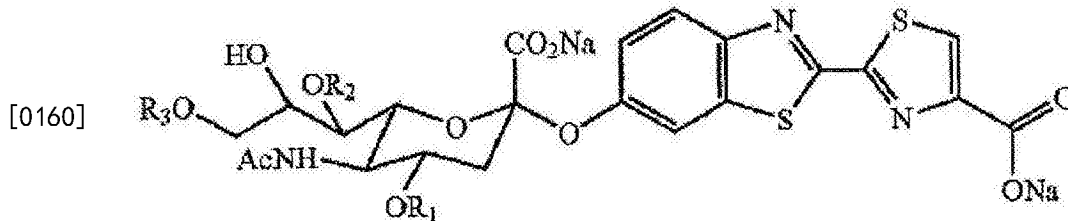
[0156] 本文提供的实施方式中的一些包括在包括非免疫分析方法的标本中检测A型流感病毒或B型流感病毒的存在。在一些实施方式中, A型流感病毒或B型流感的存在可以使用基于核酸的方法, 如PCR、核酸杂交和核酸测序检测。

[0157] 测量神经氨酸酶活性

[0158] 本文提供的一些实施方式包括检测和/或测量样品中的神经氨酸酶活性。在一些实施方式中, 神经氨酸酶为病毒神经氨酸酶, 如A型或B型流感神经氨酸酶。在一些实施方式中, 检测的酶为唾液酸酶。在一些实施方式中, 神经氨酸酶活性可以使用双酶分析测量。用于本文提供的方法和组合物的一些实施方式的试剂包括QFlu™NI分析(马里兰州仙丽施公司(Cellex, Inc., Maryland))和QFlu™组合分析的那些。

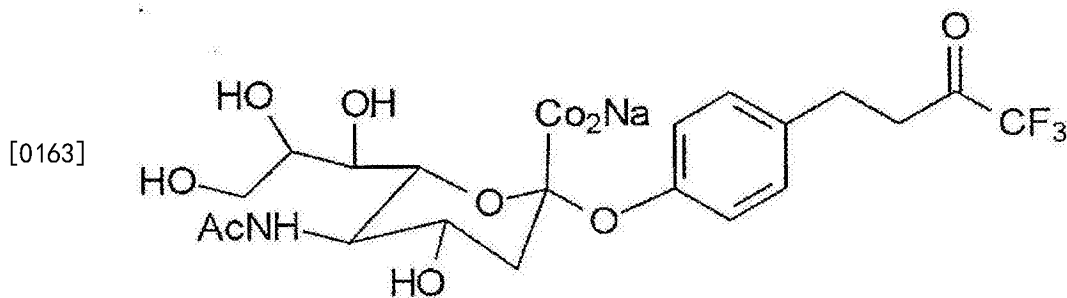
[0159] 在一些实施方式中, 神经氨酸酶的底物转化为第二酶, 如酯酶, 如荧光素酶的底物。在一些实施方式中, 神经氨酸酶的底物包括N-乙酰基神经氨酸(唾液酸)的衍生物和荧光素的衍生物的缀合物。在一些实施方式中, N-乙酰基神经氨酸或其衍生物与荧光素之间

的缀合物通过糖苷键经由N-乙酰基神经氨酸糖环上的--OH基团连接在一起。在一些实施方式中,糖环上的位置为2'位置,因为此为流感神经氨酸酶偏爱的糖苷键。唾液酸衍生物的实例包括4-烷基或7-烷基或4,7-烷基N-乙酰基神经氨酸(例如美国专利第6,303,764号和美国专利第6,420,552号、第6,680,054号中描述的那些,所述专利以全文引用的方式并入本文中)。一个实例为4,7-甲基化N-乙酰基神经氨酸-萤火虫荧光素缀合物。此类缀合物的实施方式提供于美国专利第7,893,272号中,其以全文引用的方式并入本文中。在一些实施方式中,用作神经氨酸酶底物的缀合物可以由关于Na盐显示的下式表示:

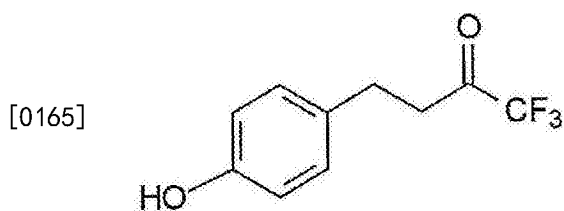


[0161] 在一些实施方式中,R1、R2、R3各自彼此独立地为氢或具有1-5个碳原子的烷基。

[0162] 在一些实施方式中,神经氨酸酶的底物转化为第二酶,如酯酶,如荧光素酶的抑制剂。在一些实施方式中,神经氨酸酶的底物包括N-乙酰基神经氨酸(唾液酸)的衍生物和三氟甲基酮(CF₃)的衍生物的缀合物。N-乙酰基神经氨酸的衍生物描述于上文中。在一些实施方式中,神经氨酸酶的底物为:



[0164] 在一些实施方式中,三氟甲基酮抑制剂包括:



[0166] 在一些实施方式中,其中神经氨酸酶的底物转化为第二酶,如酯酶的抑制剂,底物也被称作经遮蔽抑制剂。用于本文中提供的方法中的一些的经遮蔽抑制剂的实例公开于本文中。

[0167] 示例性合成显示于图4中。在一些实施方式中,样品可以含有来自除流感病毒以外的来源的神经氨酸酶。在一些实施方式中,不期望的神经氨酸酶使用特异性抗体和抑制剂抑制。不期望的神经氨酸酶活性使用特异性多克隆或单克隆抗体抑制。举例来说,为了检测流感病毒神经氨酸酶,来自样品,如细菌物种肺炎链球菌和粘性放线菌(*Actinomyces viscosus*)的可能污染的有机体的非特异性神经氨酸酶活性使用对来自这些来源的神经氨酸酶特异的抗体抑制。此方法是可能的,因为来自不同有机体的神经氨酸酶具有相异氨基

酸序列,其准许产生种特异性或亚种特异性神经氨酸酶抗体。举例来说,特异性抗体通常用于在神经氨酸酶中和分析中区分流感病毒的神经氨酸酶亚型。

[0168] 组合分析

[0169] 本文提供的一些实施方式包括组合分析,其中样品经分析以(1)鉴别样品中的A型或B型流感病毒;和(2)流感病毒神经氨酸酶对某些抗病毒药物的敏感性。在一些实施方式中,鉴别样品中的A型或B型流感病毒的免疫分析在不同于所述分析的缓冲剂中进行以测量流感病毒神经氨酸酶对某些抗病毒药物的敏感性。

[0170] 在一些实施方式中,获得标本。在一些实施方式中,标本可包括鼻咽洗涤物、抽出物和拭出物。在一些实施方式中,可以存在不充分量的标本以在不同缓冲剂中制备若干初始样品。在一些实施方式中,标本放置于第一缓冲剂中以获得用于第一分析的第一测试样品。在一些实施方式中,第一测试样品包括与第二分析不相容的缓冲剂。举例来说,第一缓冲剂可以抑制第二分析。在一些此类实施方式中,第一测试样品转化为包括与第二分析相容的第二缓冲剂的第二测试样品。在一些实施方式中,第一或第二分析包括鉴别样品中的A型或B型流感病毒的免疫分析。在一些实施方式中,第一或第二分析为测定流感病毒神经氨酸酶对某一抗病毒药物的敏感性的分析。

[0171] 在一些实施方式中,标本添加到与鉴别A型或B型流感病毒的免疫分析相容的第一缓冲剂中以制备免疫分析测试样品。免疫分析测试样品的第一部分可以应用到免疫分析以鉴别A型或B型流感病毒。第二部分可以通过使免疫分析测试样品与用与神经氨酸酶活性分析相容的第二缓冲剂平衡的交换基质接触转化为神经氨酸酶分析测试样品。基质的实例包括交联多糖,如葡聚糖凝胶和琼脂糖。在一些实施方式中,神经氨酸酶包括套筒,其包括含基质的室。葡聚糖凝胶品种可以是G25中等(medium)、G25粗(course)、G25细(fine)。床高度可以是一厘米到15厘米的任何位置。在一些实施方式中,树脂可在促进流感神经氨酸酶的释放和后续神经氨酸酶活性测量的缓冲剂中预洗涤和预平衡地提供。此类试剂与NA-STARTM和NA-FLUORTM试剂盒和ZstatFluTM产品中见到的那些类似。这些缓冲剂将通常含有低氯化钠含量,如小于100mM且通常小于10mM。在一些实施方式中,氯化钠含量为从100mM和0.1mM、100mM和1mM、10mM和0.1mM以及10mM和1mM。这些缓冲剂将通常含有0.1mM到50mM、1mM到20mM或和4mM到10mM范围内的钙和/或镁离子以产生最佳的神经氨酸酶活性测量。用于平衡树脂的缓冲剂的pH应在5与8之间以确保后续神经氨酸酶活性分析可以在含有pH敏感神经氨酸酶的稀有株,如致死性流感H7N9上操作。穿过树脂套筒的流感标本可以含有少量与用于释放核壳体以用于流感身份免疫分析的洗涤剂类似的洗涤剂。洗涤剂可以包括NP-40、胆汁盐、布里杰(Brij)-35和曲拉通(Triton)。曲拉通的实例为曲拉通-X-100。胆汁盐的实例为脱氧胆酸钠。这些组织和病毒裂解剂可以出现于液体储备液中且在其它情况下以固体可用。曲拉通和NP 40可以0.01%到10%v/v或0.5%到3%V/V存在于穿过树脂套筒的样品中。固体洗涤剂可以0.1%到10%W/V,或0.5%到2%W/V范围的浓度存在。

[0172] 在一些实施方式中,标本添加到与神经氨酸酶活性分析相容的第一缓冲剂中以制备神经氨酸酶分析测试样品。神经氨酸酶分析测试样品的第一部分可以应用于神经氨酸酶活性分析。第二部分可以通过使神经氨酸酶分析测试样品与用与鉴别A型或B型流感病毒的免疫分析相容的第二缓冲剂平衡的交换基质接触而转化为免疫分析测试样品。此类基质的实例包括交联多糖,如葡聚糖凝胶、琼脂糖和硝化纤维素。在一些实施方式中,免疫分析包

含测试条带,且基质包含硝化纤维素。在一些实施方式中,第二缓冲剂经冻干或以其它方式干燥到基质中。提取缓冲剂经设计以使得可用于免疫分析检测的核壳体预先置于标本垫、缀合物垫或两者中。这些垫(膜)的合适的实例包括玻璃纤维密理博(Millipore)G041、密理博GFDX和纤维素密理博C083、密理博C048、密理博C068、密理博C083、密理博C248,合适的密理博垫的特定家族为舒尔维克生产线(SureWick Product Line)。其它合适的实例为通用电气医疗(GE Healthcare)CF1、CF3、CF4棉短绒、惠特曼融合(Whatman Fusion)5、Std 14和Std 15,且聚酯标本-缀合物垫为其它实例。图14说明免疫分析核壳体提取试剂预先置于免疫分析侧流测试条带上的实施方式。

[0173] 测量神经氨酸酶对测试化合物的敏感性

[0174] 本文提供的一些实施方式包括测量神经氨酸酶对测试化合物的敏感性。测试化合物包括抗病毒药物,如针对流感的抗病毒药物。在实施方式中,神经氨酸酶的活性在存在和不存在测试化合物的情况下测量。活性比可以用于确定抑制值,且抑制值可以与选择的抑制阈值比较以确定神经氨酸酶是否对测试化合物敏感或具抗性。

[0175] 在一些实施方式中,抑制阈值可以通过确定具有对于特定测试化合物的已知敏感性或抗性的一组不同病毒的抑制值确定。每一病毒的抑制值可绘图,且抑制阈值确定为处于对测试化合物敏感的病毒的抑制值与对测试化合物具抗性的病毒的抑制值之间。申请人已出乎意料地发现A型流感和B型流感的抑制阈值不同。在一些实施方式中,就某些测试化合物来说,A型病毒具有比B型病毒低的抑制阈值。在一些实施方式中,如果样品中的流感病毒类型为已知的(例如A型或B型),那么适当抑制阈值水平可以应用于测试的化合物,其可以显著增加分析的敏感性,使得能够具有分辨仅具有低水平抗药性的流感株与不显示任何种类的抗药性的那些株的能力。

[0176] 神经氨酸酶测试套筒

[0177] 本文提供的方法和组合物的一些实施方式包括用于神经氨酸酶分析的测试套筒。在一些实施方式中,测定对测试化合物,如测试药物和/或抗病毒药物的敏感性的神经氨酸酶分析可以在包括基质室和试剂室的套筒中进行。在一些实施方式中,套筒可以包括一个或多个测试室。测试室可以包括一多个测试室,其用于:无测试化合物的标本+分析试剂;无标本或测试化合物的分析试剂;标本+分析试剂+测试化合物;和无标本的分析试剂+测试化合物。在一些实施方式中,测试多种测试化合物,且包括用于每一额外测试化合物(例如第一、第二、第三、第四等测试化合物)的标本+分析试剂+测试化合物和无标本的分析试剂+测试化合物的额外测试室。用于标本+分析试剂和/或分析试剂的对照测试室可以用于在套筒上测试所有测试化合物。在一些实施方式中,基质室与一个或多个其它室,如经选择以含有标本的室流体连通。在一些实施方式中,测试室包括:(1)在有药物的情况下的测试,其包括标本、反应混合物和测试药物;(2)在无药物的情况下的测试,其包括标本和反应混合物;(3)用于反应混合物的对照,其包括反应混合物;和(4)用于测试药物的对照,其包括反应混合物和药物。在一些实施方式中,可以包括其它对照。

[0178] 在一些实施方式中,流体样品添加到基质室中。流体样品通过一个或多个选自扩散、毛细流动和重力的力流动通过基质室到达经选择以含有样品的室。来自室中发生的反应的信号可以使用光电倍增管测量。示例性套筒显示于图5中。

[0179] 检测流感病毒的方法

[0180] 本文提供的一些实施方式包括检测流感病毒,其包括使样品与适于检测A型流感病毒或B型流感病毒的免疫分析的免疫分析缓冲剂接触,进而获得免疫分析测试样品;使免疫分析测试样品的第一部分与包含检测A型或B型流感的免疫分析的测试条带接触,进而检测样品中A型或B型流感的存在或不存在;使免疫分析测试样品的第二部分与包含神经氨酸酶分析缓冲剂的基质接触,进而获得神经氨酸酶测试样品;和使神经氨酸酶测试样品与神经氨酸酶分析接触,进而检测样品中神经氨酸酶的存在。在一些实施方式中,免疫分析缓冲剂与用于神经氨酸酶活性的分析不相容。在一些实施方式中,免疫分析缓冲剂抑制神经氨酸酶活性。

[0181] 本文提供的方法和组合物的一些实施方式包括检测流感病毒的方法,其包括:使样品与适于神经氨酸酶分析的神经氨酸酶分析缓冲剂接触,进而获得神经氨酸酶测试样品;使神经氨酸酶测试样品的第一部分与包含检测A型或B型流感的免疫分析的测试条带接触,其中神经氨酸酶测试样品接触包含免疫分析缓冲剂的基质,进而获得免疫分析测试样品和检测样品中A型或B型流感的存在或不存在;和使神经氨酸酶测试样品的第二部分与神经氨酸酶分析接触,进而检测样品中神经氨酸酶的存在。在一些实施方式中,神经氨酸酶分析缓冲剂与检测A型或B型流感的免疫分析不相容。在一些实施方式中,神经氨酸酶分析缓冲剂抑制抗体与选自A型流感和B型流感的抗原的特异性结合。在一些实施方式中,基质包括冻干的免疫分析缓冲剂。

[0182] 在一些实施方式中,基质包括神经氨酸酶分析缓冲剂,且用于神经氨酸酶分析的试剂在相同容器,如套筒中。在一些实施方式中,容器包括多个室,如包含基质的室,和包含用于神经氨酸酶分析的试剂的室。在一些实施方式中,基质包括交联多糖,如葡聚糖凝胶和琼脂糖。在一些实施方式中,容器包括适于使用光电倍增管,如便携式光电倍增管读取的多孔套筒。多孔条带或多孔条带-树脂套筒随后移动跨越将每一孔直接定位于检测器下方的轨道。跨越轨道的移动通过经编程以暂停且允许每一孔计数的步进马达进行。

[0183] 在一些实施方式中,免疫分析测试样品和神经氨酸酶测试样品通过一个或多个选自重力、毛细作用和扩散的力在容器中移动。

[0184] 本文提供的方法和组合物的一些实施方式包括测定神经氨酸酶对测试化合物的敏感性,其包括:(a) 获得抑制值比率,其中比率包括与不存在测试化合物情况下的神经氨酸酶活性水平相比的存在测试化合物情况下的神经氨酸酶活性水平;和(b) 比较抑制值与抑制阈值的比率,进而测定神经氨酸酶活性对测试化合物的敏感性。抑制阈值以上的抑制值比率指示神经氨酸酶活性对测试化合物敏感,并且因此流感株对测试化合物具有敏感性,而阈值以下的比率指示神经氨酸酶活性对测试化合物不敏感,并且因此流感株对测试化合物具抗性。在一些实施方式中,抑制阈值通过检测A型或B型病毒确定。在一些实施方式中,抑制阈值通过测试化合物确定。在一些实施方式中,测试化合物可以根据神经氨酸酶对测试化合物的敏感性选择以治疗流感。在一些实施方式中,遭受测试流感株之苦的患者可以被建议服用测试化合物,或测试化合物可以提供给患者,其中神经氨酸酶对测试化合物敏感。

[0185] 在一些实施方式中,神经氨酸酶分析包括含信号传导酶的双酶分析。在一些实施方式中,神经氨酸酶活性产生用于信号传导酶的底物。在一些实施方式中,神经氨酸酶分析包括N-乙酰基神经氨酸和荧光素或其衍生物的缀合物。在一些实施方式中,神经氨酸酶活

性产生用于信号传导酶的抑制剂。在一些实施方式中,神经氨酸酶分析包括N-乙酰基神经氨酸和三氟甲基酮或其衍生物的缀合物。在一些实施方式中,信号传导酶包括荧光素酶。在一些实施方式中,免疫分析缓冲剂抑制荧光素酶活性。在一些实施方式中,神经氨酸酶活性水平使用光电倍增管测量。

[0186] 在一些实施方式中,测试化合物为抗病毒药物。在一些实施方式中,测试化合物为选自奥司他韦、扎那米韦、帕拉米韦和拉那米韦的抗病毒药物。

[0187] 在一些实施方式中,免疫分析包含夹心分析。

[0188] 在一些实施方式中,样品获自受试者,如人类,如疑似患有流感的受试者。

[0189] 在一些实施方式中,本文所述的组合分析具有就感染剂量来说至少2000TCID₅₀/ml、1000TCID₅₀/ml、500TCID₅₀/ml、200TCID₅₀/ml、100TCID₅₀/ml或由这些值中的任何两个限定的范围的流感病毒检测极限。在摩尔基础上,所公开的组合测试具有在至少1000fM、500fM、100fM、10fM或由这些值中的任何两个限定的范围下检测神经氨酸酶的能力。

[0190] 选择治疗的方法

[0191] 本文提供的方法和组合物的一些实施方式包括选择用于流感病毒的治疗的方法,其包括(a)使样品与适于检测A型流感病毒或B型流感病毒的免疫分析的免疫分析缓冲剂接触,进而获得免疫分析测试样品;(b)使免疫分析测试样品的第一部分与包含检测A型或B型流感的免疫分析的侧流测试条带接触,进而检测样品中A型或B型流感的存在或不存在;(c)使免疫分析测试样品的第二部分与包含神经氨酸酶分析缓冲剂的基质接触,进而获得神经氨酸酶测试样品;(d)使神经氨酸酶测试样品与神经氨酸酶分析接触,进而测定神经氨酸酶测试样品的神经氨酸酶对测试化合物(例如流感抗病毒药物)的敏感性,测定包括:(i)获得抑制值比率,其中比率包括与不存在测试化合物情况下的神经氨酸酶活性水平相比存在测试化合物情况下的神经氨酸酶活性水平,和(ii)比较抑制值与抑制阈值的比率,进而测定神经氨酸酶活性对测试化合物的敏感性;和(e)选择或鉴别测定的抑制神经氨酸酶活性的测试化合物。在一些实施方式中,抑制阈值通过检测A型或B型病毒确定。在一些实施方式中,免疫分析缓冲剂与用于神经氨酸酶活性的分析不相容。在一些实施方式中,免疫分析缓冲剂抑制神经氨酸酶活性。在一些实施方式中,步骤(c)和(d)在相同容器中进行。在一些实施方式中,受试者疑似患有流感。在一些实施方式中,受试者为人类。

[0192] 本文提供的方法和组合物的一些实施方式包括选择用于流感病毒的治疗的方法,其包括:(a)使样品与适于神经氨酸酶分析的神经氨酸酶分析缓冲剂接触,进而获得神经氨酸酶测试样品;(b)使神经氨酸酶测试样品的第一部分与包含检测A型或B型流感的免疫分析的测试条带接触,其中神经氨酸酶测试样品接触包含免疫分析缓冲剂的基质,进而获得免疫分析测试样品和检测样品中A型或B型流感的存在或不存在;和(c)使神经氨酸酶测试样品的第二部分与神经氨酸酶分析接触,进而测定神经氨酸酶测试样品的神经氨酸酶对测试化合物的敏感性,测定包括:(i)获得抑制值比率,其中比率包括与不存在测试化合物情况下的神经氨酸酶活性水平相比较的存在测试化合物情况下的神经氨酸酶活性水平,和(ii)比较抑制值与抑制阈值的比率,进而测定神经氨酸酶活性对测试化合物的敏感性;和(e)选择测定的抑制神经氨酸酶活性的测试化合物。在一些实施方式中,抑制阈值通过检测A型或B型病毒确定。在一些实施方式中,基质包含冻干的免疫分析缓冲剂。在一些实施方式中,步骤(c)在相同容器中进行。

[0193] 在一些实施方式中,抑制阈值通过检测A型或B型病毒测定,其中如果检测A型流感病毒,那么使用第一抑制阈值,如果检测B型流感病毒,那么使用第二抑制阈值。在一些实施方式中,抑制阈值在检测A型流感病毒的情况下比在检测B型流感病毒的情况下低。

[0194] 在一些实施方式中,容器包括多个室,如包含基质的室,和包含用于神经氨酸酶分析的试剂的室。在一些实施方式中,基质包括交联多糖,如葡聚糖凝胶和琼脂糖。

[0195] 在一些实施方式中,容器包括套筒,如适于使用光电倍增管读取的多孔套筒。在一些实施方式中,光电倍增管为便携式的。

[0196] 在一些实施方式中,神经氨酸酶分析包括含信号传导酶的双酶分析。在一些实施方式中,神经氨酸酶活性产生用于信号传导酶的底物。在一些实施方式中,神经氨酸酶分析包括N-乙酰基神经氨酸和荧光素或其衍生物的缀合物。在一些实施方式中,神经氨酸酶活性产生用于信号传导酶的抑制剂。在一些实施方式中,神经氨酸酶分析包括N-乙酰基神经氨酸和三氟甲基酮或其衍生物的缀合物。在一些实施方式中,信号传导酶包含荧光素酶。在一些实施方式中,神经氨酸酶活性水平使用光电倍增管测量。

[0197] 在一些实施方式中,测试化合物为抗病毒药物。在一些实施方式中,测试化合物为选自以下的抗病毒药物:奥司他韦、扎那米韦、帕拉米韦和拉那米韦。

[0198] 在一些实施方式中,免疫分析包含夹心分析。

[0199] 在一些实施方式中,样品获自受试者。

[0200] 系统和试剂盒

[0201] 本文中提供的一些实施方式包括用于检测流感病毒的诊断系统。在一些实施方式中,此类系统包括用于测定样品中的神经氨酸酶活性的套筒,其中套筒经配置以将包含对测定不相容的缓冲剂的样品处理为包含对测定相容的缓冲剂的样品;和检测样品中的A型或B型流感的测试条带,其中测试条带,如侧流条带经配置以将包含对检测不相容的缓冲剂的样品处理为包含对检测相容的缓冲剂的样品。在一些实施方式中,此类系统也包括经配置以测量来自套筒的信号的第一检测器;和经配置以测量来自测试条带的信号的第二检测器。

[0202] 在一些实施方式中,套筒包括基质室,所述基质室包括含对于测定相容的缓冲剂的套筒基质,和包括用于神经氨酸酶活性测定的试剂的试剂室。在一些实施方式中,套筒基质包括交联多糖。在一些实施方式中,套筒基质选自葡聚糖凝胶和琼脂糖。在一些实施方式中,基质室和套筒室流体连通,使得施加到基质室的样品从基质室流动到试剂室。在一些实施方式中,样品通过一个或多个选自重力、毛细作用和扩散的力在套筒中流动。在一些实施方式中,套筒包括适于使用光电倍增管读取的多孔套筒。

[0203] 在一些实施方式中,测试条带包含免疫分析。在一些实施方式中,免疫分析为夹心分析。在一些实施方式中,测试条带包括含用于检测的相容缓冲剂的基质。在一些实施方式中,基质包括硝化纤维素。在一些实施方式中,用于检测的相容缓冲剂被冻干。

[0204] 在一些实施方式中,第一检测器包括光度计。在一些实施方式中,第一检测器包括反射率读取器。在一些实施方式中,第二检测器包括光电倍增管。在一些实施方式中,装置包括第一和第二检测器。在一些实施方式中,第一和第二检测器相同。在一些实施方式中,装置为便携式的。在一些实施方式中,装置为手持式的。在一些实施方式中,侧流条带和多孔条带/树脂套筒在具有两个独立检测模式,但共用公用电源和查阅ID和AST两者的结果的

显示器的公用平台上读取。

[0205] 本文中提供的一些实施方式包括用于检测流感病毒的诊断试剂盒。在一些实施方式中,此类试剂盒包括用于测定样品中的神经氨酸酶活性的套筒,其中套筒经配置以将包括对测定不相容的缓冲剂的样品处理为包含对测定相容的缓冲剂的样品;和检测样品中的A型或B型流感的测试条带,其中测试条带经配置以将包含对检测不相容的缓冲剂的样品处理为包含对检测相容的缓冲剂的样品。

[0206] 一些实施方式也包括经配置以测量来自套筒的信号的第一检测器;和经配置以测量来自测试条带的信号的第二检测器。

[0207] 一些实施方式也包括用于神经氨酸酶活性分析的试剂。在一些实施方式中,神经氨酸酶活性分析试剂选自:荧光素酶,N-乙酰基神经氨酸和荧光素或其衍生物、N-乙酰基神经氨酸和三氟甲基酮或其衍生物的缀合物,和抗病毒药物。在一些实施方式中,抗病毒药物选自奥司他韦、扎那米韦、帕拉米韦和拉那米韦。

[0208] 一些实施方式也包括用于免疫分析的试剂。在一些实施方式中,免疫分析试剂选自:对A型流感抗原特异的抗体,和对B型流感抗原特异的抗体。

[0209] 实施例

[0210] 实施例1-组合分析

[0211] 此实例说明A型或B型流感测试和神经氨酸酶抗药性测试情况下的示例性工作流。试剂盒,包括:含有免疫分析提取缓冲剂和具有开口的盖的施用器管;包括鉴别A型或B型流感的侧流免疫分析的第一测试装置;和包括测定神经氨酸酶抗药性的动态流分析的第二测试装置,其从包装打开且每一组件标记有患者标识。使用拭子从患者的鼻子收集标本。拭子插入到提取缓冲剂中且紧靠内壁旋动三次。拭子在挤压管侧边时从提取缓冲剂去除,且随后丢弃。施用器管的盖附接到管。

[0212] 施用器管经倒置且三滴(约85 μ l)提取缓冲剂挤过盖且施用到第一测试装置。第一测试装置包括与含有用于第一测试的第一测试缓冲剂的检测器试剂不重叠的标本垫。标本通过第一测试缓冲剂扩散到第一测试装置的测试位置中。第一测试装置温育10分钟,且第一测试的结果使用读取器测量。读取器提供A型或B型流感病毒是否存在于样品中的指示。

[0213] 施用器管倒置且剩余的提取缓冲剂挤过盖且施用到第二测试装置。在此测试中,神经氨酸酶的增加导致荧光素酶信号的增加。第二装置包括缓冲剂交换室(也称为基质室)和反应室。标本通过缓冲剂交换室扩散到用于神经氨酸酶抗药性分析的反应室。抑制值为有测试药物情况下的信号与无测试药物情况下的信号的比率,考虑由反应混合物和测试药物产生的信号的背景水平。反应室显示于表5A中。

[0214] 表5A

[0215]

反应室	描述	室的内容物
1	无药物情况下的测试	反应混合物+标本
2	有药物情况下的测试	反应混合物+标本+测试抗病毒药物
3	反应混合物的对照	反应混合物
4	反应混合物和测试药物的对照	反应混合物+测试抗病毒药物

[0216] 温育第二测试装置且使用光电倍增管测量来自每一室的信号。使用下式测定来自

每一反应室的信号的抑制值:

$$[0217] \quad \text{抑制值} = \frac{(\text{有药物的情况下的测试}) - (\text{药物的对照})}{(\text{无药物的情况下的测试}) - (\text{反应混合物的对照})} \times \text{放大率}$$

[0218] 根据第一测试中测定的流感类型和使用的测试抗病毒药物选择每一测试抗病毒药物的药物敏感性阈值水平。如果抑制值低于抑制阈值,那么神经氨酸酶测定为对测试抗病毒药物具有敏感性。

[0219] 实施例2-光电倍增管设备的灵敏度

[0220] 此实施例表明滨松 (Hamamatsu) T0-Can 光电倍增管装置的敏感性灵敏度和在便携式手持系统中进行低暗噪音阅读的能力。相对光单位 (RLU) 使用滨松 T0-Can 光电倍增管装置对于各种浓度的正化学发光信号产生对照试剂 (Cell Titer Glo) 进行测量。对照包括背景对照和暗计数对照。结果显示于图6中。

[0221] 实施例3-双酶分析

[0222] 此实施例表明测试株A/密西西比 (Mississippi) /03/2001A (H1N1) H275Y 的双酶分析,所述株包含对扎那米韦具有敏感性且对奥司他韦具抗性的神经氨酸酶。包含测试株的标本稀释为1/3000或1/9000且施用到动态流测试装置。动态流测试分析中的测试室包括表5A中的那些,也就是说:(1) 反应混合物+标本;(2) 反应混合物+标本+测试抗病毒药物;(3) 对照:反应混合物;和(4) 对照:反应混合物+测试抗病毒药物。来自每一测试室的信号使用光电倍增管装置测量。结果显示于图7中。分析显示相比于奥司他韦,测试株对扎那米韦更具有敏感性。

[0223] 实施例4-各种流感A株的敏感性

[0224] 此实施例表明测定对奥司他韦具有已知敏感性或抗性的一组A型流感病毒的抑制阈值水平。标本由各种稀释度的各种流感A株制备,且施用到具有奥司他韦的动态流测试装置。关于动态流分析的测试室包括表5A中的那些,也就是说:(1) 反应混合物+标本;(2) 反应混合物+标本+测试抗病毒药物;(3) 对照:反应混合物;和(4) 对照:反应混合物+测试抗病毒药物。来自每一测试室的信号使用光电倍增管测量。如同实施例1测定每一菌株的抑制值。抑制值标绘于各种稀释度的每一株的图示上,且阈值抑制值从所述图示测定。辨别药物敏感性与药物抗性的阈值抑制值或截止值为约0.6。截止测定为其中来自药物敏感株的误差条不与流感抗性株重叠的值。参见图8。

[0225] 实施例5-各种流感B株的敏感性

[0226] 此实施例表明测定对奥司他韦具有已知敏感性或抗性的一组A型流感病毒的抑制阈值水平。如实施例4制备和测试标本。测定每一菌株的抑制值。抑制值标绘于各种稀释度的每一菌株的图示上,且阈值抑制值从所述图示测定。辨别药物敏感性与药物抗性的阈值抑制值或截止值为约1.55。参见图9。

[0227] 实施例6-缓冲剂交换对侧流分析的影响

[0228] 此实施例表明在从动态流神经氨酸酶分析缓冲剂的缓冲剂交换之后,测定标本中A型或B型流感的侧流免疫分析的敏感性。各种稀释度的流感病毒的标本:A/PR/8/34、B/佛罗里达 (Florida) /4/2006和A/德克萨斯 (Texas) /12/2007使用以下测试:(1) 根据药品说明书的侧流威利特™分析,或(2) 伴以从动态流分析提取缓冲剂到存在于侧流垫中的免疫分析提取缓冲剂的缓冲剂交换的侧流威利特™分析。信号经测量且读取器提供每一样品中A型

和/或B型流感的不存在的存在的测定。表6概括结果。值得注意的是,相比于根据药品说明书的威利特分析,A型或B型流感在使用伴以缓冲剂交换的威利特™的方案的分析中在更多稀释标本中鉴别。

[0229] 表6

[0230]

病毒	威利特™				伴以缓冲剂交换的威利特™			
	稀释度	读取器输出		原始反射率 数据	稀释度	读取器输出		原始反射率 数据
		流感 A	流感 B			流感 A	流感 B	
A/PR/8/34	2,500:1	+	-	5.92	2,500:1	+	-	6.9
	5,000:1	+	-	3.04	5,000:1	+	-	4.3
	10,000:1	-	-	1.54	10,000:1	+	-	2.23
	20,000:1	-	-	0.95	20,000:1	-	-	0.86
B/佛罗里达	100:1	-	+	8.57	100:1	-	+	11.31
	200:1	-	+	3.31	200:1	-	+	5.52

[0231]

/4/2006	400:1	-	-	1.4	400:1	-	+	2.77
	800:1	-	-	0.67	800:1	-	-	0.94
A/德克萨斯 /12/2007	10000:1	+	-	5.6	10000:1	+	-	14.97
	20000:1	+	-	3.06	20000:1	+	-	8.1
	40000:1	-	-	1.38	40000:1	+	-	4.19
	80000:1	-	-	0.48	80000:1	-	-	1.67

[0232] 实施例7-免疫分析和双酶 (DE) 分析的敏感性

[0233] 奥司他韦的威利特免疫分析和双酶神经氨酸酶动态流动分析在各种稀释液度的流感病毒:A/佩思 (Perth) /211/2001WT上进行。表7概括两个实验的结果。这些结果展示将免疫分析提取缓冲剂中的标本施用到用神经氨酸酶活性缓冲剂预平衡的G25M葡聚糖凝胶树脂对于标准 (Std) DE分析的敏感性不具有负面影响。Std DE分析能够在临床相关标本浓度下提供药物敏感性结果。

[0234] 表7

标本稀释度	威利特结果	来自套筒处理的标本的双酶分析结果	抑制值
1:250	+/+	ND	ND
1:500	+/+	ND	ND
1:1K	+/-	ND	ND
1:3K	-/-	+/+	1.48/1.34
ND: 未测定			

[0236] 实施例8-检测混合流感标本中的抗药性

[0237] 各种稀释度的标本以抗病毒药物奥司他韦使用动态流分析来分析。标本包括A\贝塞斯达 (Bethesda) (H3N2R); A\福井 (Fukui) (H3N2S); 和混合物A\贝塞斯达 (V) +A福井 (WT)。使用光电倍增管测量信号,且测定抑制值。结果概述于图10中。这些结果展示Std双酶AST检测化学方法在使用伴以单一光子检测的PMT且应用背景减除区分流感A与流感B(允许应用最适当抑制值)的分析之后可以鉴别抗药株(当存在于具有药物敏感株的标本中时)。

[0238] 实例例9-双酶分析的比较

[0239] 此实施例比较两种类型的双酶分析的灵敏度。各种稀释度的纯化流感H3N2神经氨酸酶用包括以下任一的双重酶分析来分析：(1) 作为荧光素酶的前体抑制剂 (NANA-CF3；参见图11) 的神经氨酸酶底物；和 (2) 作为荧光素酶的前体底物 (N-乙酰基神经氨酸和荧光素的缀合物) 的神经氨酸酶底物。神经氨酸酶活性将NANA-CF3裂解为酯酶抑制剂CFC。在酯酶包括荧光素酶的分析中，神经氨酸酶活性导致存在CFC抑制剂，其抑制荧光素酶活性，导致荧光素酶底物转化为发光产物的减少。参见图12。分析结果显示于图13中。分析 (1, 双酶分析w/经遮蔽抑制剂) 的检测水平 (LOD) 为约10pM。相比之下，分析 (2, 标准双酶分析) 的检测水平小于0.1pM。

[0240] 实施例10-背景信号的对照的影响

[0241] 此实施例表明如实施例1的式中所所述的减除背景水平在计算存在抗病毒药物情况下的神经氨酸酶活性的抑制值中的影响。用如实施例1的特定抗病毒药物测定各种浓度的特定病毒株的抑制值，使用下式测定来自含有反应混合物+标本+测试抗病毒药物 (有药物情况下的测试) 和反应混合物+标本 (无药物情况下的测试) 的室信号在无背景减除情况下的抑制值：

$$[0242] \quad \text{抑制值} = \frac{(\text{有药物的情况下的测试})}{(\text{无药物的情况下的测试})} \times \text{放大率}$$

[0243] 结果显示于表8中。在表8中，从左到右的柱为来自减小的病毒浓度的结果。在抑制值计算中减除背景水平 (如实例1中所示) 增加分析的灵敏度。

[0244] 表8

[0245]

	抑制值										
不具有背景减除	0.92	0.95	0.98	0.99	1.09	1.13	1.36	1.70	2.31	3.41	5.04
具有背景减除	0.91	0.94	0.96	0.94	0.99	0.95	1.00	0.98	0.93	0.92	0.92

[0246] 如本文所用的术语“包含”与“包括”、“含有”或“特征在于”同义，且为包括性的或开放式的且不排除额外未叙述的要素或方法步骤。

[0247] 以上描述公开本发明的若干方法和材料。本发明容易受到方法和材料方面的修改，以及制造方法和设备方面的更改。从本发明或本文中所公开的本发明的实践考虑，此类修改可以对所属领域的技术人员变得显而易见。因此，并不打算将本发明限制于本文中所公开的特定实施方式，但其涵盖在本发明的真实范围和精神内的所有修改和替代方案。

[0248] 本文中所引用的所有参考文献，包括 (但不限于) 已公开和未公开的申请、专利和文献参考，均以全文引用的方式并入本文中且在此成为本说明书的一部分。在以引用的方式并入的公开案和专利或专利申请与本说明书中所含有的公开内容相抵触的情况下，本说明书打算替代和/或优先于任何此类矛盾材料。

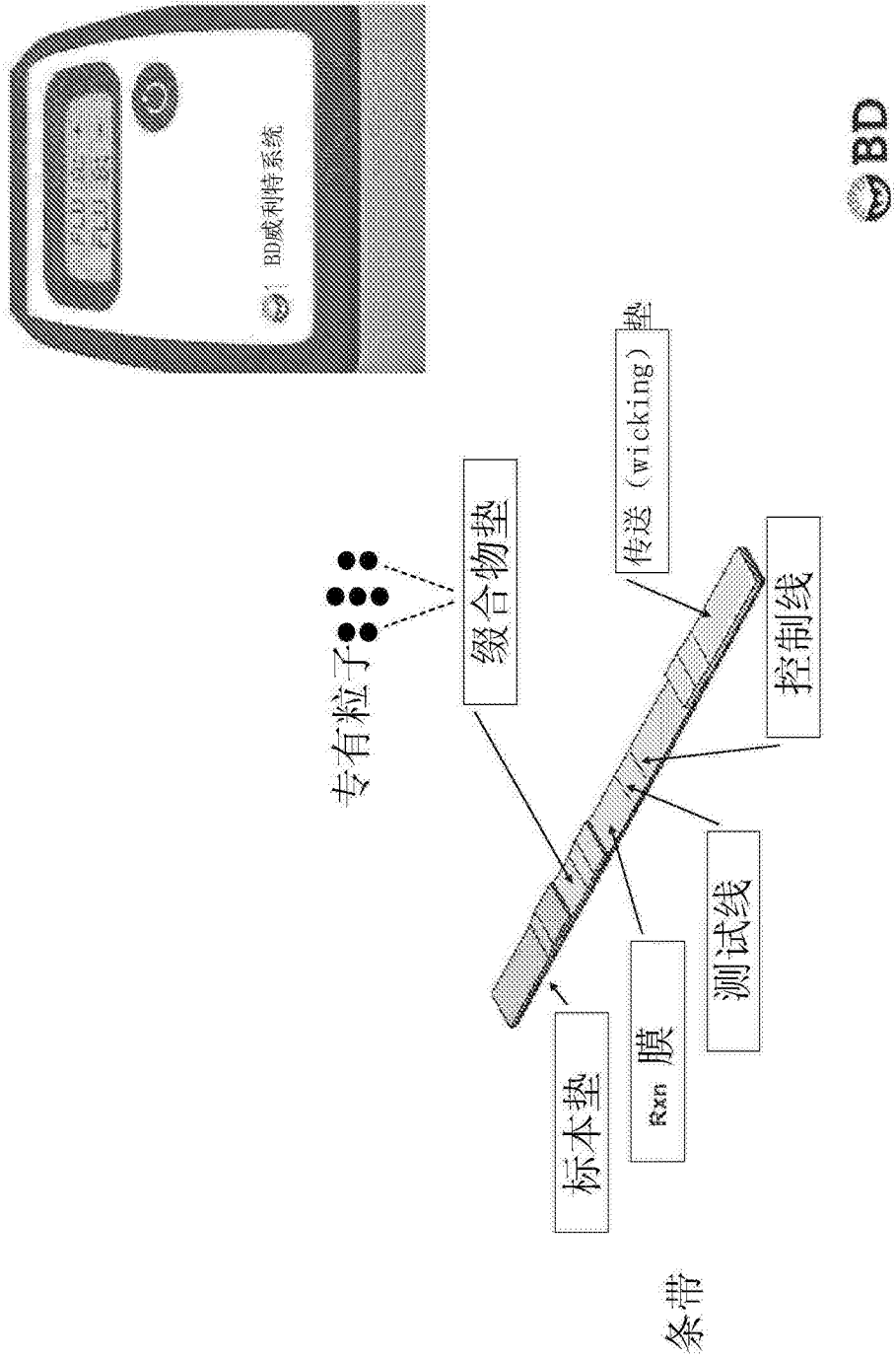


图1

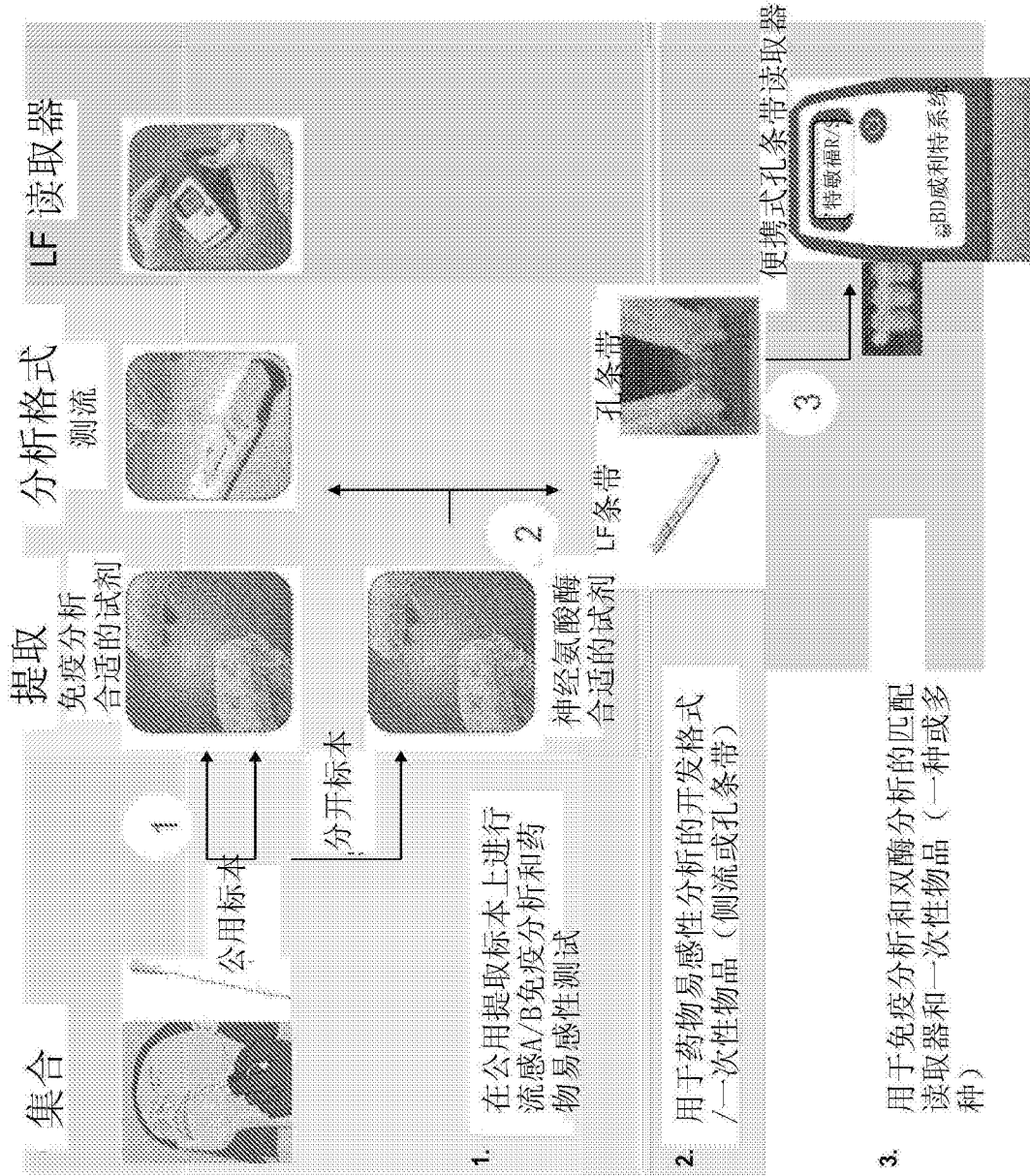


图2

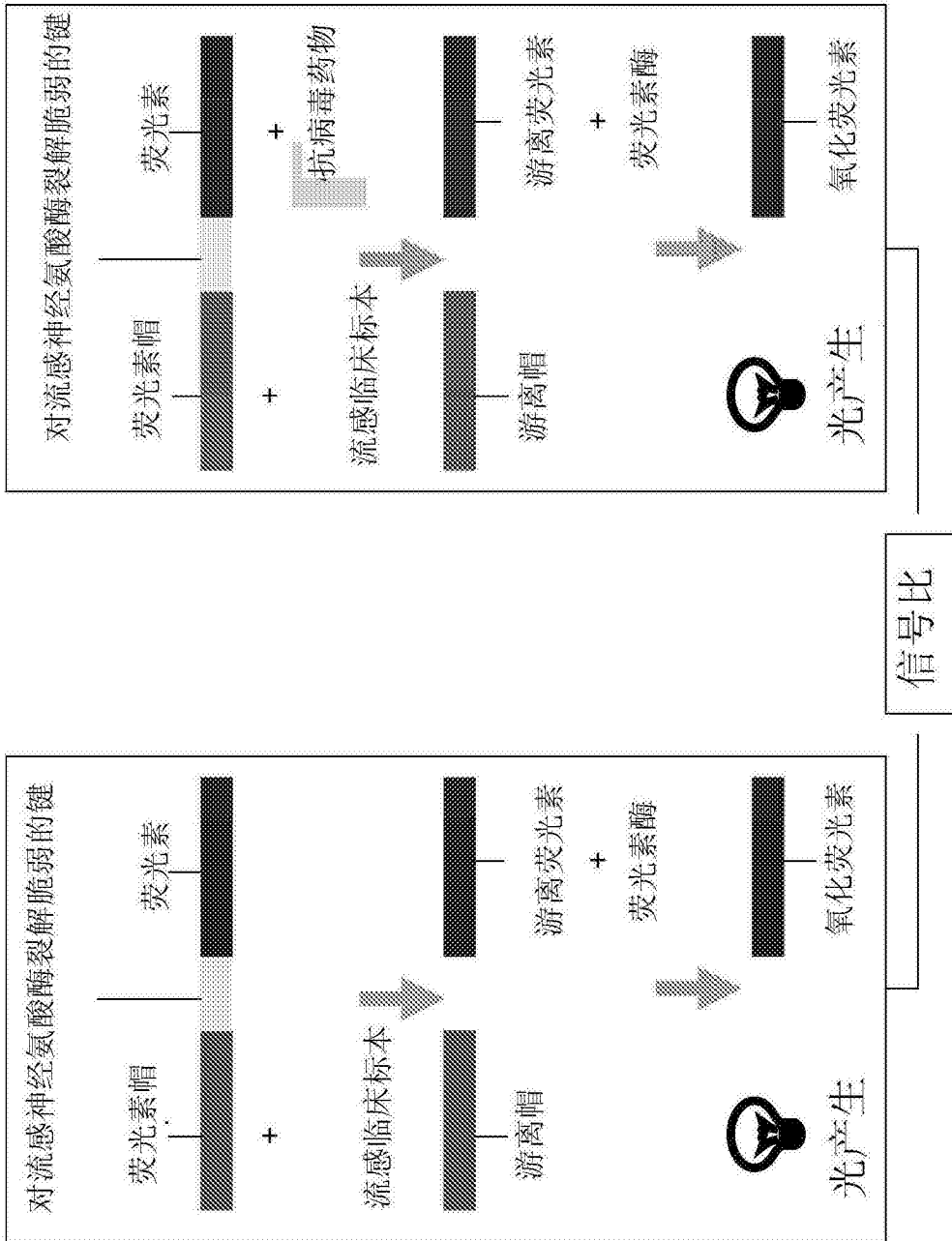
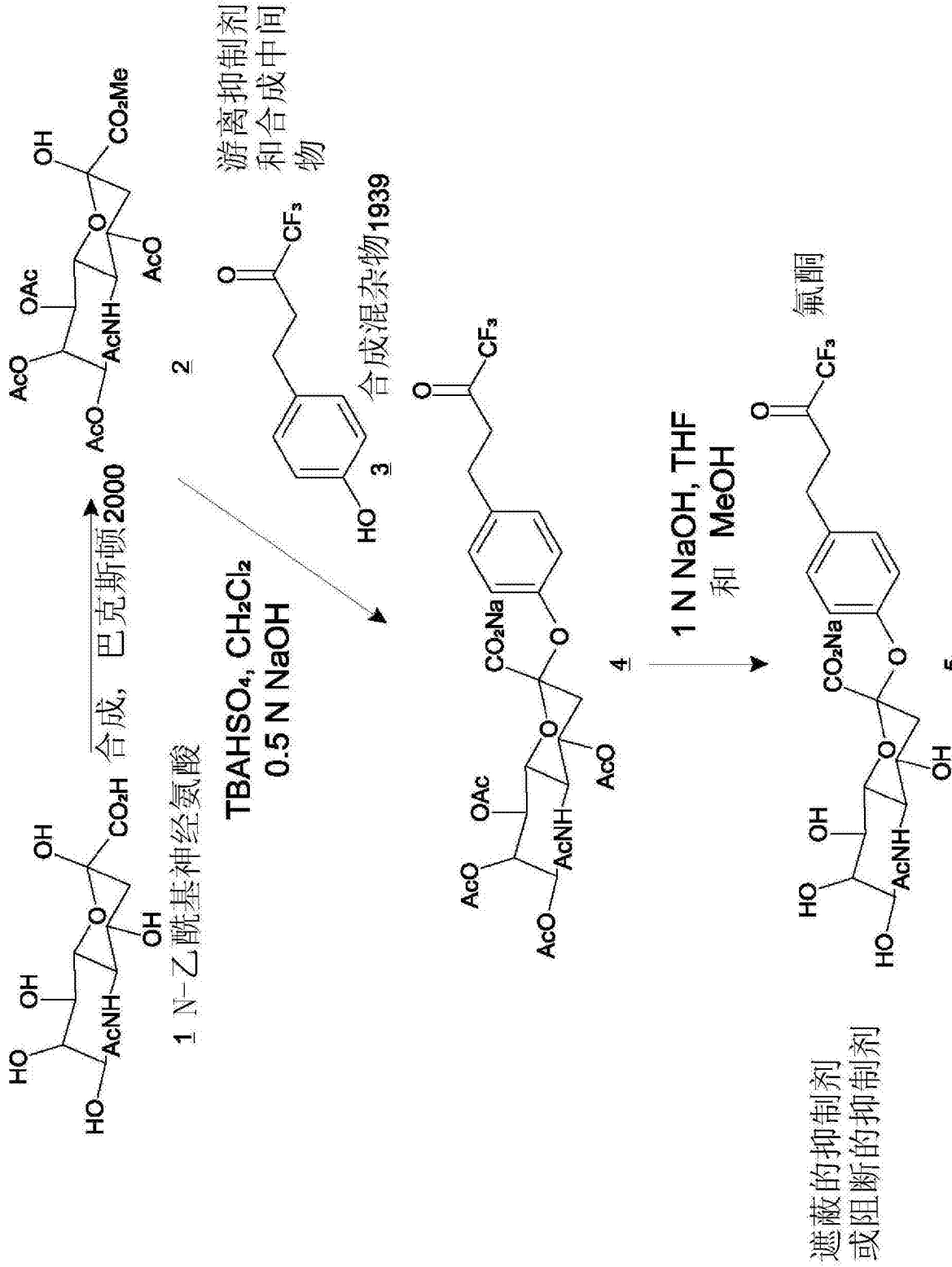


图3



来自N-乙酰基神经氨酸(1)的遮蔽的酯酶抑制剂5的合成方案

氟酮基化合物的合成

图4

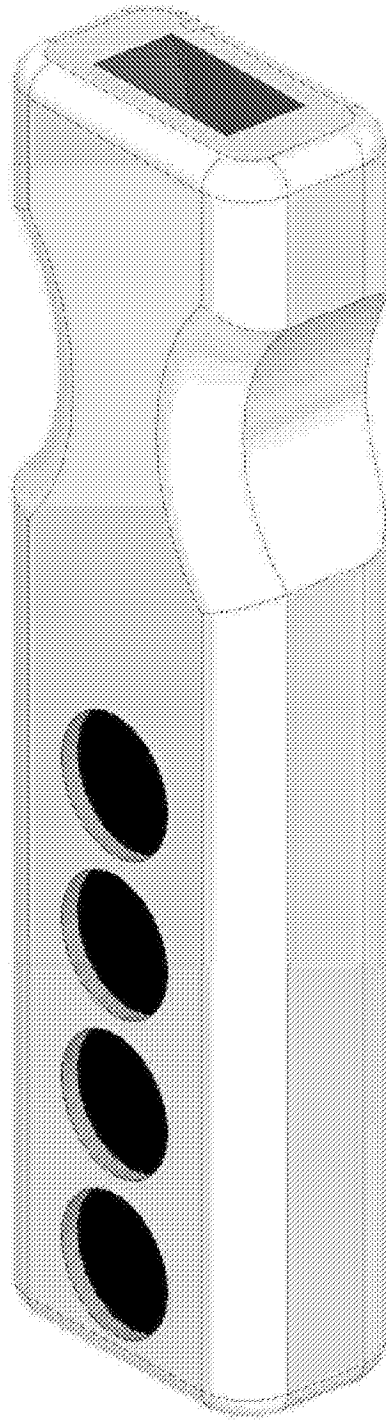


图5

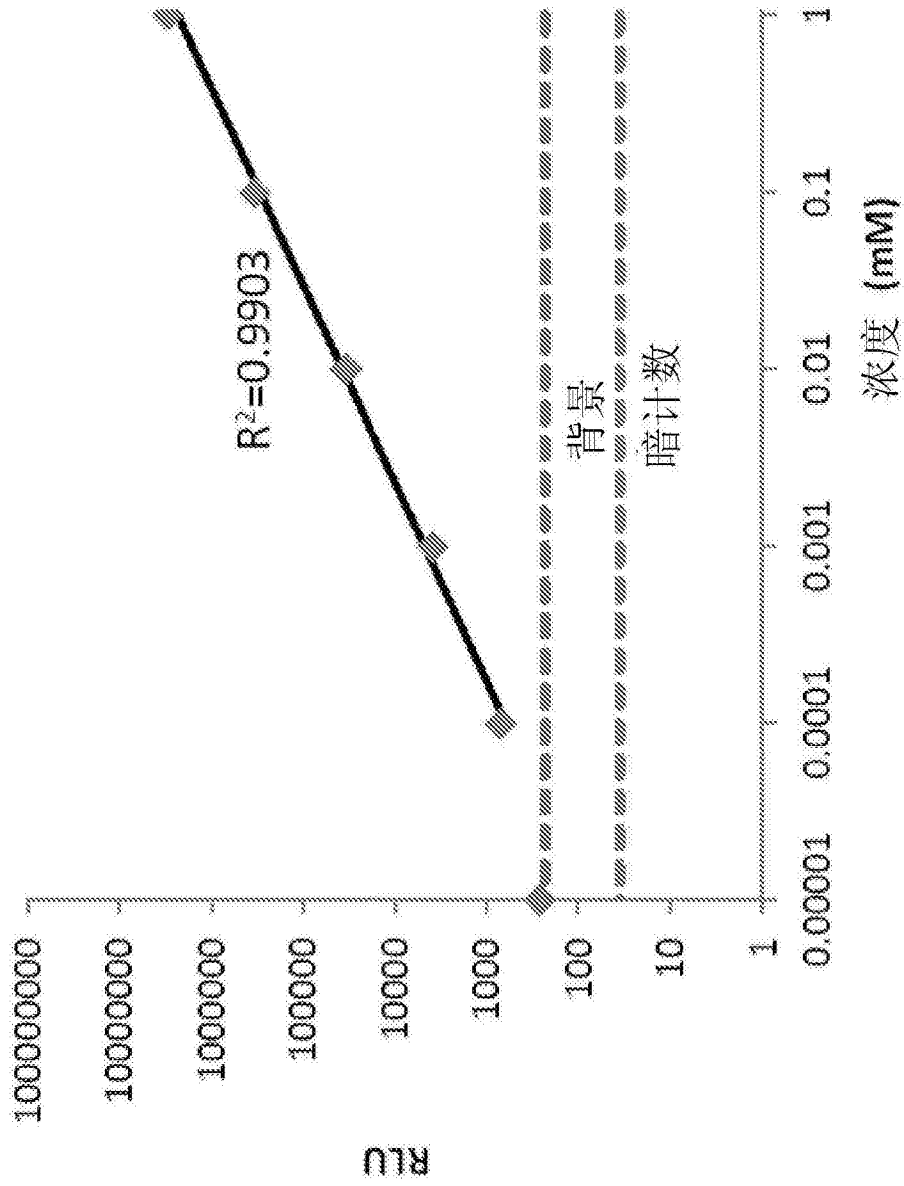


图6

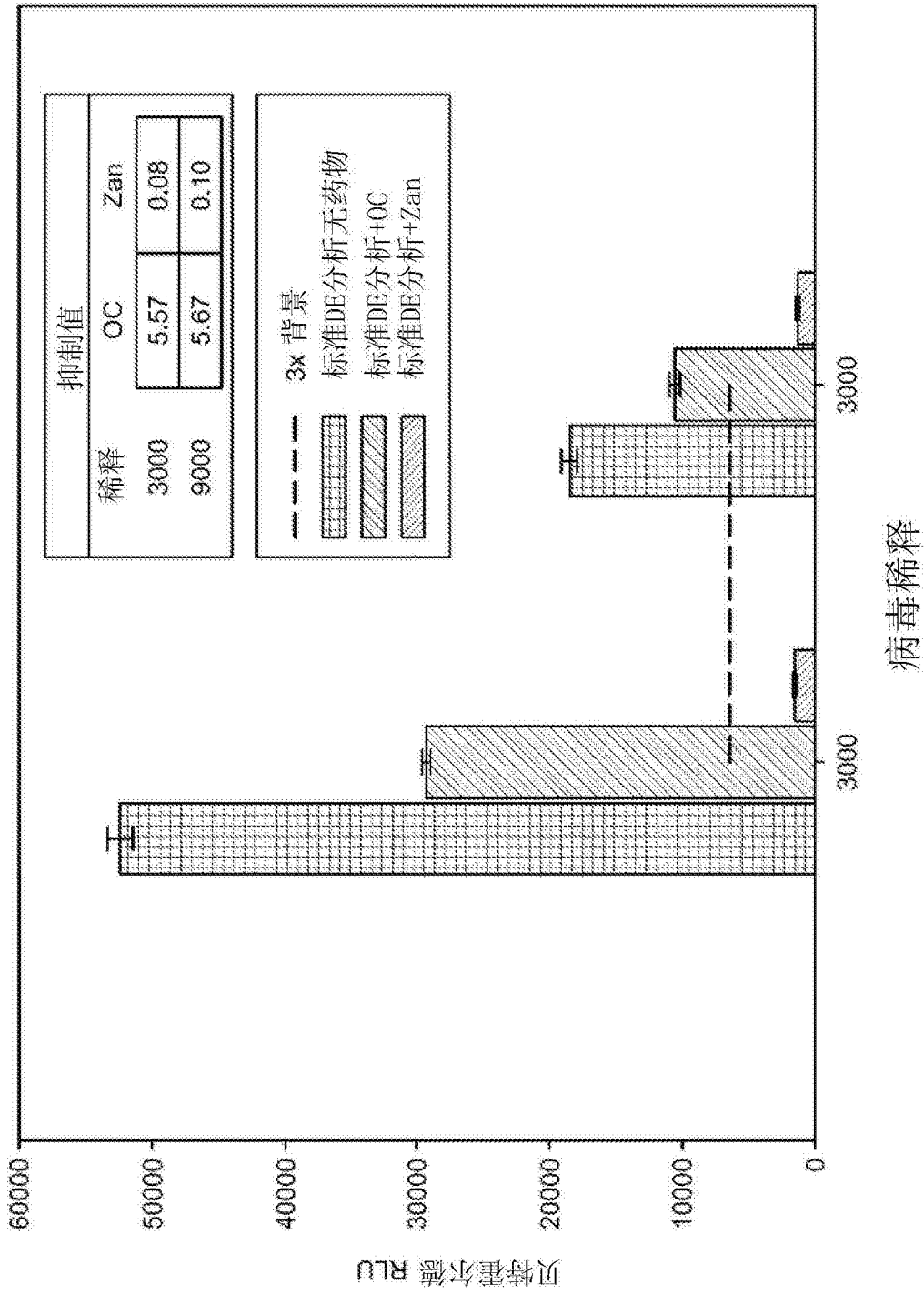


图7

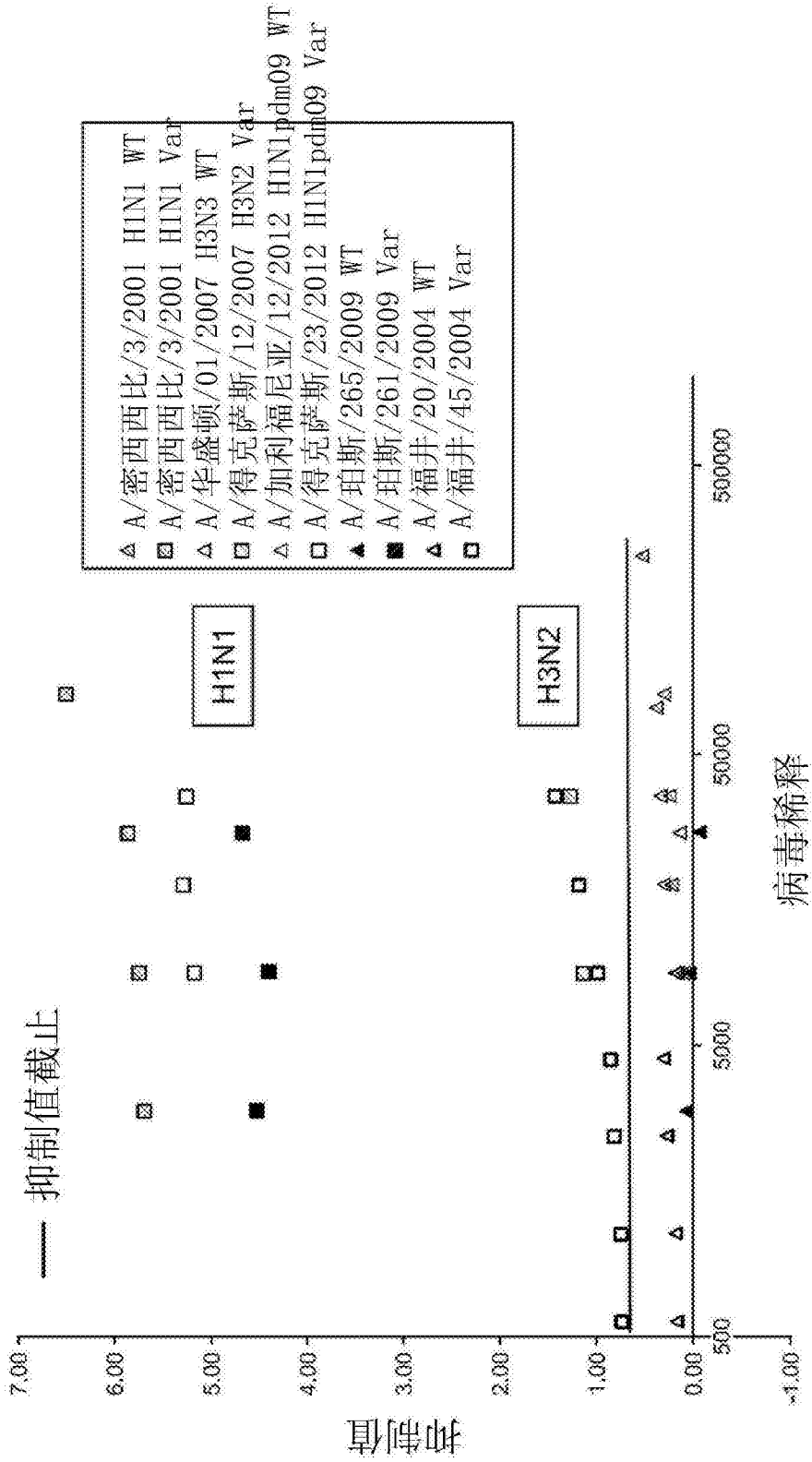


图8

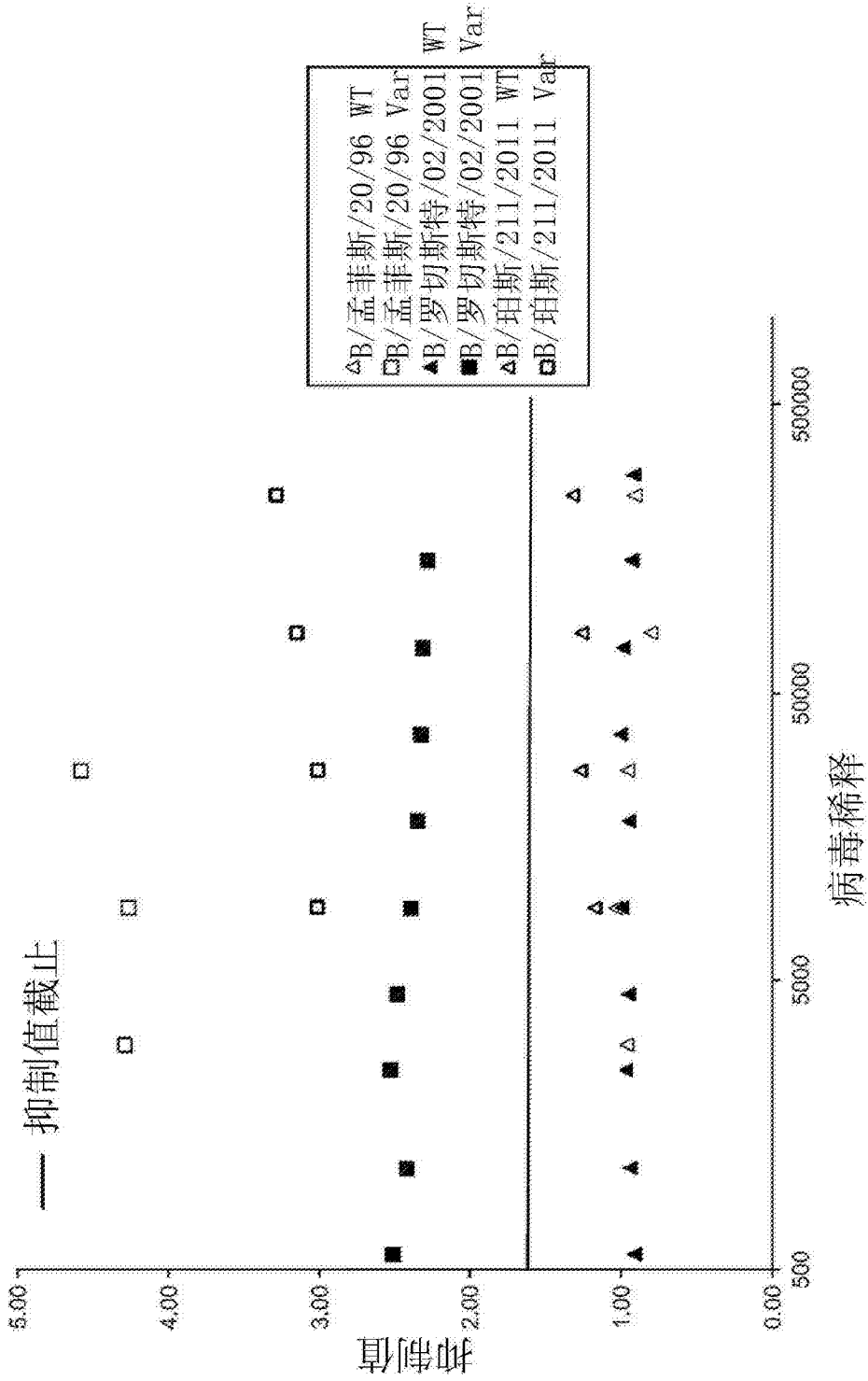


图9

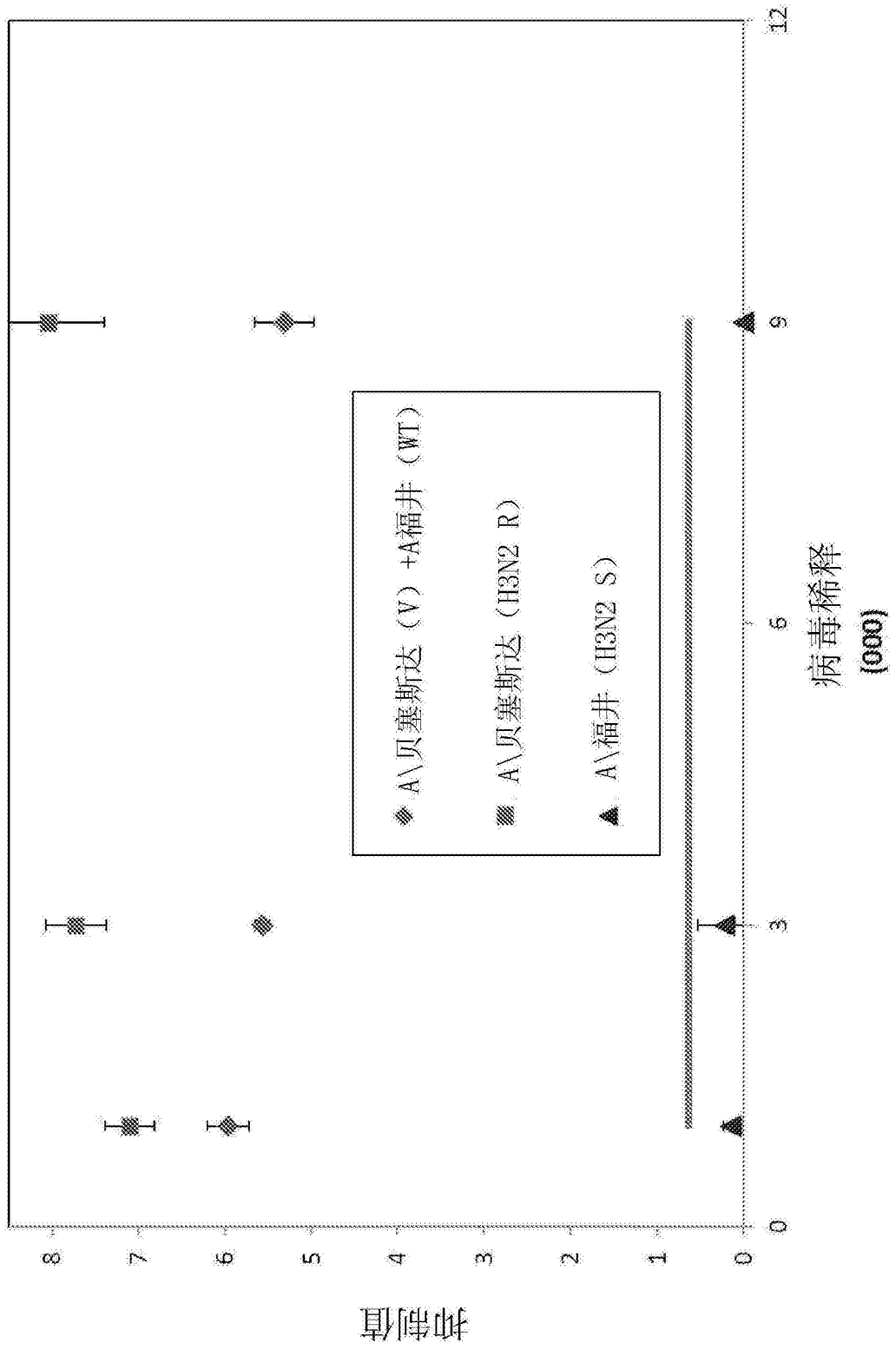


图10

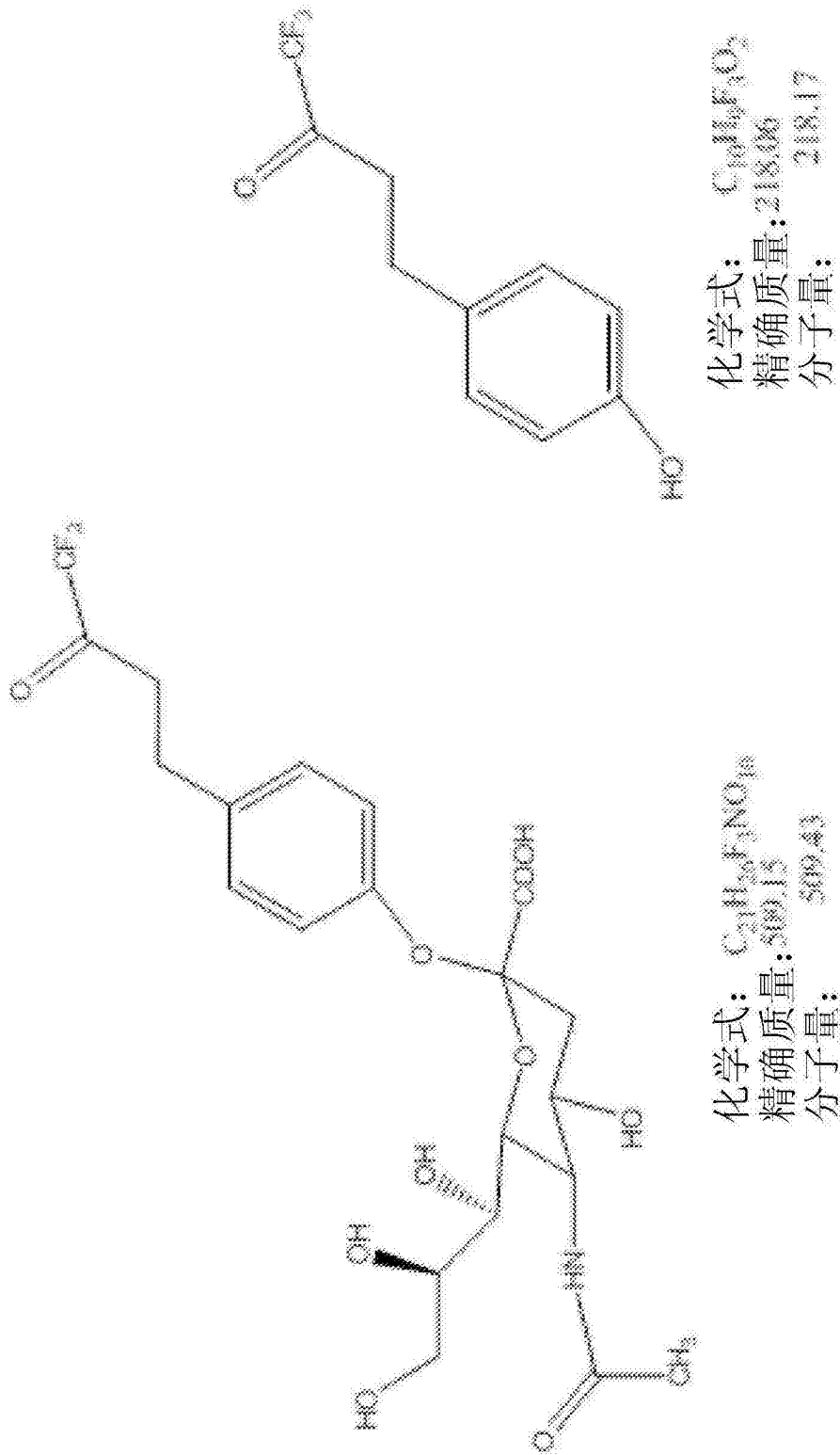


图11

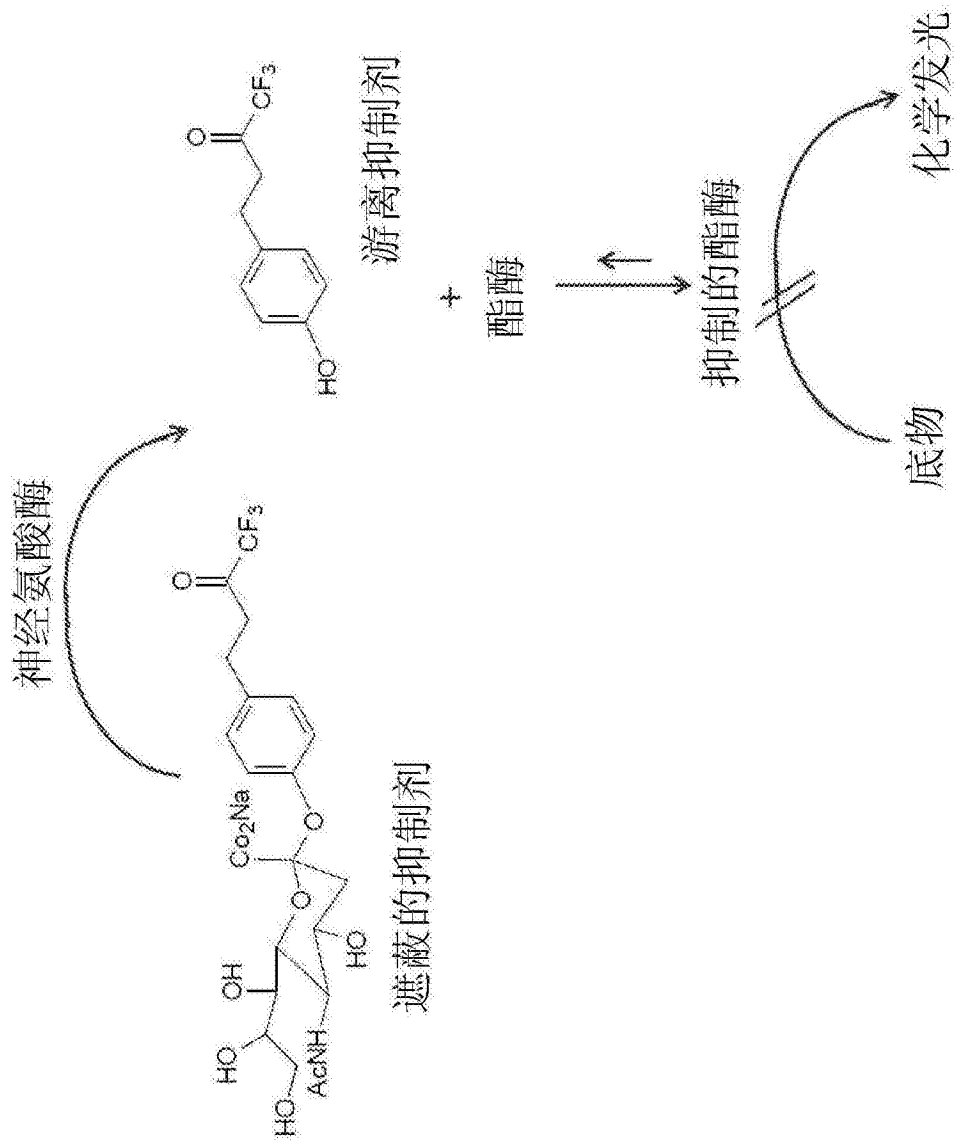


图12

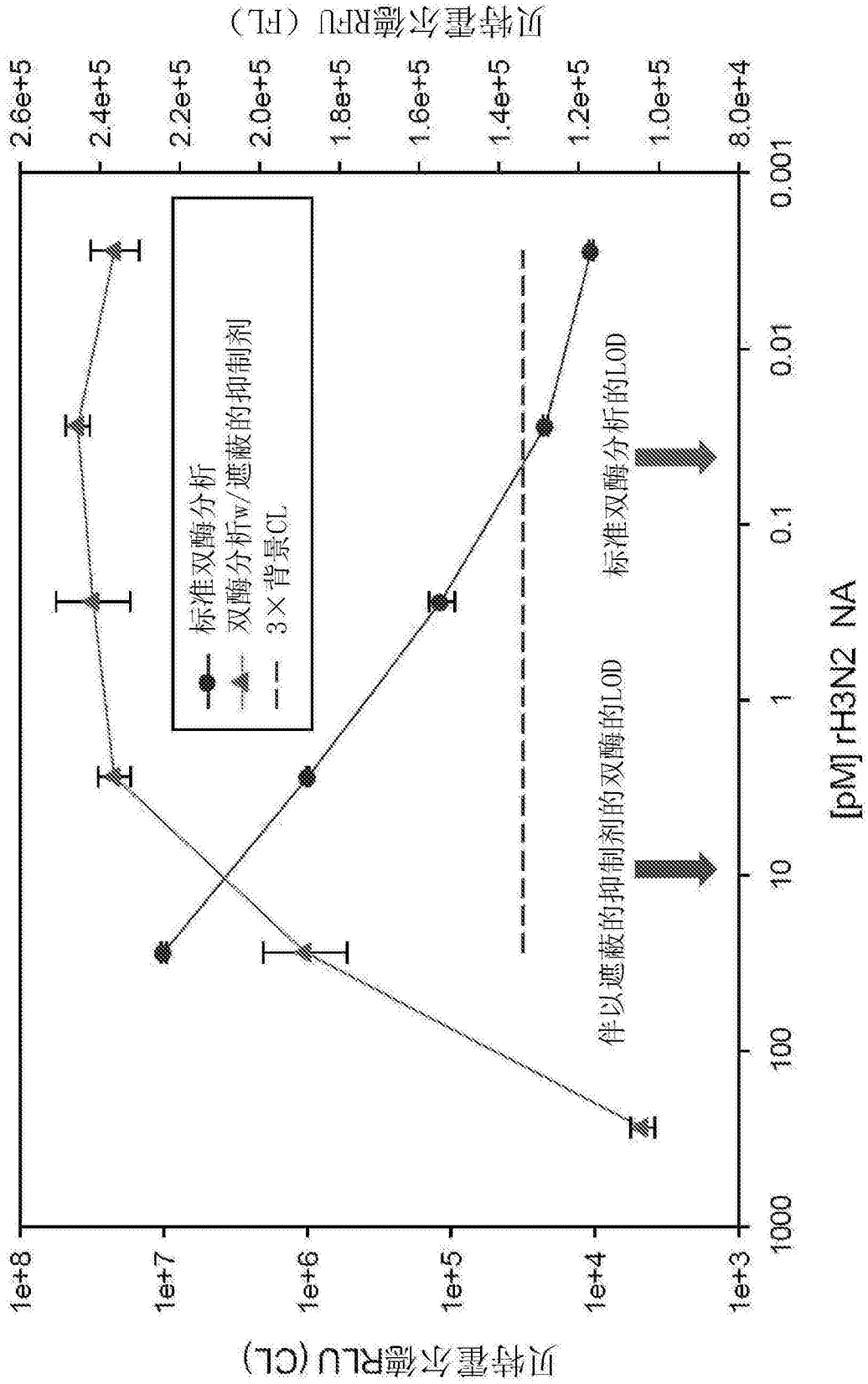


图13

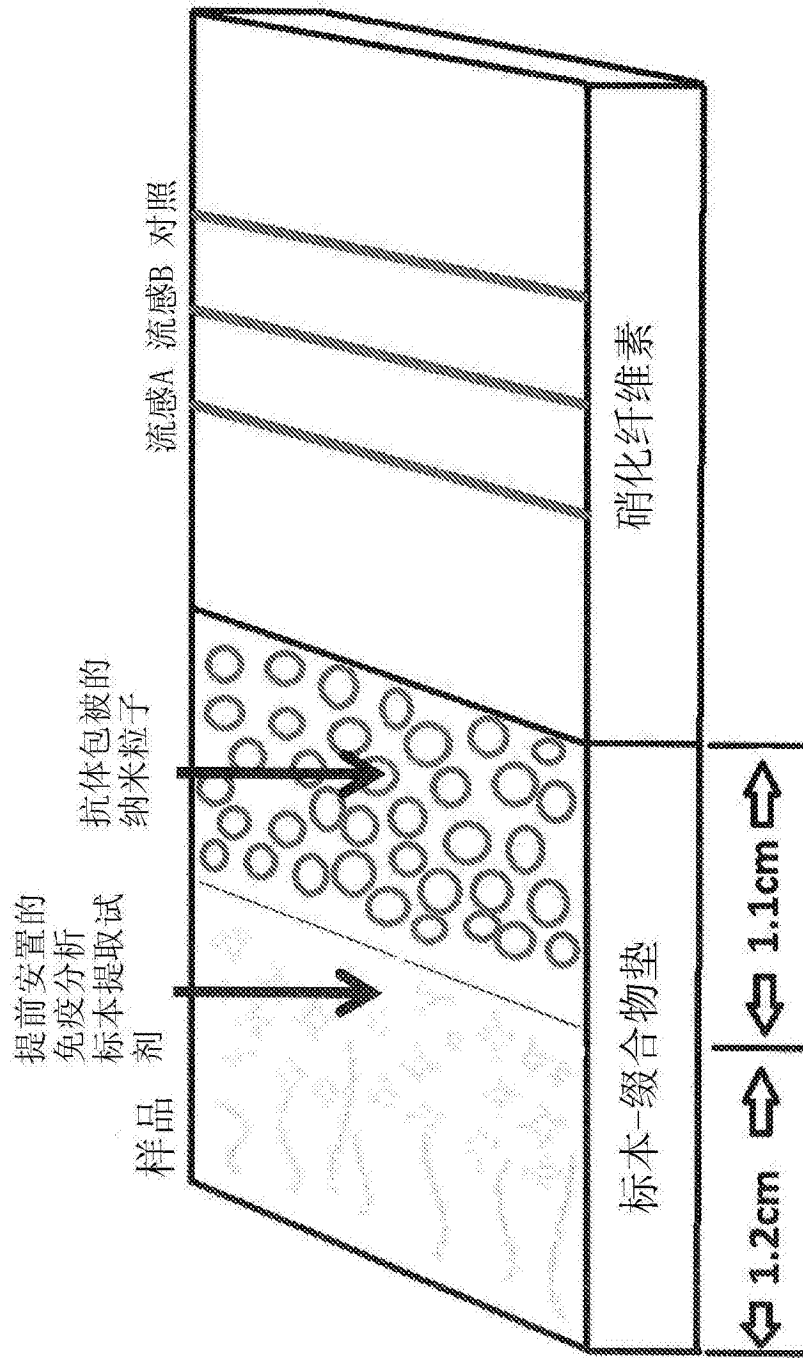


图14