

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201991097** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2019.11.29**

(51) Int. Cl. **G01N 33/74** (2006.01)  
**G01N 35/00** (2006.01)  
**G06F 19/00** (2011.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2016.11.14**

---

(54) **УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫЙ СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ HELICOBACTER PYLORI-  
АССОЦИИРОВАННОГО ГАСТРИТА И АТРОФИЧЕСКОГО ГАСТРИТА С  
СОПУТСТВУЮЩИМИ РИСКАМИ**

---

(86) **PCT/FI2016/050800**

(87) **WO 2018/087419 2018.05.17**

(71) Заявитель:  
**БИОХИТ ОИЙ (FI)**

(72) Изобретатель:  
**Суованиemi Осмо (FI)**

(74) Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

(57) Согласно иллюстративному аспекту настоящего изобретения предложен усовершенствованный способ скрининга субъектов с симптомами и без симптомов инфекции *Helicobacter pylori*, атрофического гастрита с сопутствующими рисками и/или нарушенной функции желудка на основе образцов цельной крови, времени отбора образца и температуры хранения образца, а также на основе анализа содержания соответствующего биомаркера.

**201991097** **A1**

**201991097**

**A1**

# УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫЙ СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ *HELICOBACTER PYLORI*- АССОЦИИРОВАННОГО ГАСТРИТА И АТРОФИЧЕСКОГО ГАСТРИТА С СОПУТСТВУЮЩИМИ РИСКАМИ

## ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

**[0001]** В настоящем изобретении предложены способы исследования субъекта, у которого присутствуют биомаркеры, указывающие на наличие инфекции *Helicobacter pylori* и/или атрофического гастрита с сопутствующими рисками. Более конкретно, в настоящем изобретении предложены способы улучшения этапов проведения анализа, относящегося к скринингу и выявлению вышеуказанных заболеваний и функции слизистой оболочки желудка.

## УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

**[0002]** GastroPanel®, представляющая собой уникальный тест на наличие *Helicobacter pylori*, позволяет выявить следующие состояния:

1) Инфекция *Helicobacter pylori* (НР), представляющая собой независимый фактор риска развития как рака желудка, так и язвенной болезни (язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки).

2) Вызванный инфекцией НР атрофический гастрит (АГ), в большинстве случаев являющийся бессимптомным, а также топографическая локализация АГ либо в теле желудка, либо в антральном отделе желудка. Наряду с инфекцией НР аутоиммунное заболевание слизистой оболочки желудка также может привести к развитию АГ в теле желудка со всеми его клиническими последствиями.

2.1) АГ слизистой оболочки тела желудка приводит к снижению продукции кислоты или, в конечном счете, к развитию бескислотного (ахлоргидрического) состояния желудка. Это повышает риск возникновения рака желудка или рака пищевода, а также нарушения всасывания витамина В12, кальция, магния и цинка. Кроме того, бескислотное состояние желудка приводит к нарушению абсорбции некоторых лекарственных препаратов, например, дипиридамола, ряда препаратов железа и противогрибковых лекарственных препаратов (флуконазол, итраконазол), тироксина и атазановира. Дефицит кальция может вызвать остеопороз, в то время как дефицит витамина В12 может способствовать

развитию болезни Альцгеймера, деменции, депрессии или периферическим невропатиям. Пониженная продукция кислоты в желудке также может повысить риск тяжелых инфекций желудочно-кишечного и респираторного тракта человека, в том числе лямблиоза, малярии, инфекции *Clostridium difficile*, инфекции энтерогеморрагической *E. coli* и пневмонии.

2.2) АГ антрального отдела желудка, повышающий риск развития рака желудка. АГ одновременно тела желудка и антрального отдела желудка (пангастрит) является единственным наиболее значимым состоянием, сопряженным с риском развития рака желудка.

3) Инфекция НР, в том числе у субъектов с АГ, MALT-лимфомой или кровоточащей язвой желудка и двенадцатиперстной кишки и у субъектов, принимающих препараты группы ИПП или антибиотики. В указанных случаях <sup>13</sup>С-уреазный дыхательный тест (UBT) или тест на выявление антигенов НР в кале зачастую дают ложно-отрицательные результаты, что не позволяет выявить инфекцию НР (со всеми ее возможными последствиями). UBT может привести к ложно-положительным результатам у субъектов с бескислотным состоянием желудка. Кроме того, UBT и тесты на антигены или антитела к НР не позволяют выявить АГ вследствие наличия инфекции НР или аутоиммунного заболевания (<http://www.biohithealthcare.com/limitations-of-helicobacter-pylori-diagnostics>).

4) Повышенная продукция кислоты клетками слизистой оболочки желудка, предрасполагающая к гастроэзофагеальному рефлюксу, сопровождающемуся потенциальными осложнениями. Указанные осложнения включают язвенный эзофагит, пищевод Барретта, или рак нижнего отдела пищевода.

Проявляющиеся клинически инфекция *Helicobacter pylori* (НР), атрофический гастрит (АГ) и высокая продукция кислоты являются показаниями к гастроскопии.

Инновационная панель GastroPanel® разработана на основе проведенных научно-исследовательскими группами в Финляндии и Эстонии дополнительных исследований с участием имеющих гастрит пациентов и на выявлении роли *Helicobacter pylori* в патогенезе гастрита и язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, что привело к получению Нобелевской премии в 2005 году, и кроме того на основе исследований и разработок «Biohit» и применении иммуноферментных микропланшетных анализаторов, принцип работы которых основан на изобретении принципа измерения поглощения света при вертикальном прохождении луча.

**[0003]** Более конкретно, BИОНIT GastroPanel® представляет собой тестовую панель для количественного иммуноферментного анализа (ELISA), для измерения концентрации в плазме крови четырех биологических маркеров структуры и функции слизистой оболочки желудка: пепсиногена I (PGI), пепсиногена II (PGII), гастрин-17 (G-17) и антител класса IgG к *Helicobacter pylori*. Основными показаниями к применению GastroPanel® служит необходимость в помощи при диагностике и скрининге субъектов с симптомами и без симптомов 1) инфекции *H. pylori*, 2) атрофического гастрита (АГ) и 3) нарушенной функции желудка.

**[0004]** GastroPanel® представляет собой диагностический текст первой линии для диагностики инфекции *Helicobacter pylori* (*Hp*) (5-80% населения Земли), для исследования всех пациентов, страдающих диспепсией (20-40% западного населения), а также для скрининга атрофического гастрита (АГ) с сопутствующими рисками, такими как рак желудка и рак пищевода (1-3). Атрофический гастрит также повышает риск нарушения всасывания витамина В12, железа, магния, цинка, кальция и некоторых лекарственных препаратов. <sup>13</sup>С-уреазный дыхательный тест (UBT), тест на выявление антигенов в кале и тесты на антитела к инфекции *Hp* не позволяют выявить атрофический гастрит, вызванный инфекцией *Hp*, аутоиммунное заболевание или уровень продукции кислоты. Кроме того, <sup>13</sup>С-уреазный дыхательный тест (UBT) и тест на выявление антигенов в кале могут давать ложноотрицательные результаты, если пациент имеет а) атрофический гастрит, б) MALT-лимфому, с) кровоточащую пептическую язву или d) если пациент на данный момент принимает антибиотики или ИПП.

**[0005]** GastroPanel® состоит из ключевых специфических биомаркеров состояния желудка, представляющих собой основные факторы регуляции нормальной физиологии желудка. Указанные четыре биомаркера включают пепсиноген I (PGI), пепсиноген II (PGII), амидированный гастрин-17 (G-17), и антитела к *Hp*, которые предназначены для получения данных как о структуре, так и о функции слизистой оболочки желудка (1-6). Что особенно важно, указанная тестовая панель позволяет получить точную оценку способности слизистой тела желудка и антрального отдела желудка секретировать желудочную кислоту и G-17, соответственно, а также выявить важные гастропатологии, такие как воспаление, степень и топографию атрофического гастрита (7-9), которые могут представлять повышенный риск возникновения рака желудка и его клинических последствий (1).

**[0006]** Нормальные уровни всех четырех биомаркеров в плазме указывают на то, что слизистая оболочка желудка имеет нормальную структуру и функцию, в то время как

аномальные уровни являются признаками нарушения здорового состояния желудка, отражающими нарушения механизмов обратной связи между секрецией кислоты в тела желудка, пепсиногенами и гастрином-17. Существуют два варианта оценки G-17: значения базального G-17 (G-17b) и значения стимулированного G-17 (G-17s), при этом последние являются исключительно важными для проведения различия между функциональным нарушением антрального отдела желудка (нормальный уровень G-17s) и атрофическим гастритом (АГ) в антральном отделе желудка (уровень G-17s не повышается при атрофическом гастрите в антральном отделе желудка) (10, 11).

**[0007]** Уникальность тестовой панели GastroPanel<sup>®</sup>, являющейся первой неинвазивной диагностической панелью для оценки здорового состояния слизистой оболочки желудка, также заключается в том, что интерпретация результатов осуществляется с помощью программного обеспечения (GastroSoft) (<http://www.gastropanel.com>), специально разработанного для этой цели. Результаты теста, GastroPanel<sup>®</sup> классифицируют на пять возможных диагностических категорий, а именно: 1) нормальная слизистая оболочка, 2) поверхностный (*Hp*) гастрит, 3) атрофический гастрит (АГ) в антральном отделе желудка, 4) атрофический гастрит (АГ) в теле желудка и 5) атрофический гастрит (АГ) как в антральном отделе желудка, так и в теле желудка (пангастрит) (11, 12). Таким образом, GastroPanel<sup>®</sup> оптимизирована в целях ее использования в сочетании с Обновленной Сиднейской системой (USS) классификации гастритов, основанной на указанных аналогичных 5 диагностических категориях (13).

**[0008]** Валидация тестовой панели GastroPanel<sup>®</sup> была осуществлена в ходе проведения ряда крупномасштабных исследований на основе подтверждённых биопсией гастроскопий (14, 15), при этом все из них включены в недавно проведенный метаанализ по данной теме (14). Результаты указанных исследований были использованы для установления валидированных референсных (предельных) значений для каждого отдельного биомаркера панели, при этом в качестве конечных точек использовались пять гистологических категорий. Указанные исследования подтверждают высокую точность тестовой панели GastroPanel при выявлении наиболее важной конечной точки исследования - умеренной и тяжелой формы атрофического гастрита (14-16). Таким образом, нормальные значения PGI, PGII и их соотношение (PGI/PGII) исключают АГ тела желудка с прогностической ценностью отрицательного результата теста (NPV), составляющей более 95%. В свою очередь, значения PGI и PGII, а также их соотношение ниже установленных предельных уровней позволяют предсказать умеренную и тяжелую форму АГ с показателями площади под ROC-кривой, составляющими более 0,950 в

сериях исследований достаточной статистической мощности и валидированных Обновленной Сиднейской системой классификации (1,2,3,16,17).

**[0009]** Если кратко, уровни PGI снижаются при АГ тела желудка (и при пангастрите), но остаются в пределах нормального диапазона при всех других состояниях. Повышенные уровни PGI указывают на воспаление слизистой оболочки, при этом максимальные значения выявляются при *Hp*-ассоциированном неатрофическом гастрите. Значения G-17b являются максимальными при АГ тела желудка ввиду отсутствия отрицательной обратной связи по секреции кислоты телом желудка с атрофическим гастритом, что приводит к неингибированной секреции G-17b нормальной слизистой оболочкой антрального отдела желудка. То же самое относится к ситуации, при которой секреция кислоты ингибируется длительным применением ИПП. По существу, при атрофических изменениях в слизистой оболочке антрального отдела желудка и при истощении популяции G клеток уровень секреции G-17 остается крайне низким даже после белковой стимуляции (G-17s) (17).

**[0010]** Антитела класса IgG к *Hp* придают особую дополнительную диагностическую ценность указанным трем биомаркерам. Серологическая диагностика по определению антител IgG к *Hp* позволяет определить потенциально два различных состояния: 1) персистентную инфекцию *Hp* или 2) предшествующее воздействие *Hp*. Несмотря на то, что GastroPanel<sup>®</sup> не позволяет различить два вышеуказанных состояния, данные, подтверждающие вовлеченность *Hp* в патологический процесс, придают особую дополнительную диагностическую ценность. Являясь единственным аномальным маркером, *Hp* непосредственно связана с *Hp*-ассоциированным поверхностным гастритом (при отсутствии АГ), в то время как ассоциированные с аномалиями в других трех маркерах высокие титры антител к *Hp* подтверждают диагноз *Hp*-ассоциированного АГ (антрального отдела желудка или тела желудка) (1,3,18,19).

**[0011]** Более подробная информация об интерпретации результатов тестовой панели GastroPanel<sup>®</sup> размещена на сайте <http://www.gastropanel.com>.

**[0012]** Кроме того, в WO 2009/053537 приведено описание основных способов и принципов, относящихся к инновационности тестовой панели GastroPanel.

**[0013]** Кроме того, в работе Syrjänen (2016) приведены систематический обзор и результаты метаанализа всех релевантных исследований, касающихся GastroPanel<sup>®</sup>, предназначенной для диагностирования атрофического гастрита, и подтверждается заявления международных экспертов, выступающих за применение GastroPanel<sup>®</sup> при

диагностике и скрининге АГ. GastroPanel® ввиду своей высокой специфичности как в отношении АГ антрального отдела желудка, так и в отношении АГ тела желудка, безусловно является эффективной тест-системой для диагностики здорового состояния желудка.

**[0014]** При проведении теста GastroPanel® в образце крови определяют концентрации четырех биомаркеров. Измеряют указанные биомаркеры, которые представляют собой: пепсиноген I (PGI), пепсиноген II (PGII) и гастрин-17 (G17), которые секретируются клетками слизистой оболочки желудка. Кроме того, измеряют антитела к *Helicobacter pylori*. Комплексная интерпретация результатов выявления всех четырех биомаркеров позволяет получить более достоверное и детальное понимание структуры и функции слизистой оболочки желудка, чем можно было бы достичь при использовании каждого биомаркера отдельно. При этом необходимо максимально быстро определить концентрации указанных биомаркеров, либо принять меры по обеспечению надлежащего хранения и обработки образцов до проведения анализов. Рекомендуется проведение центрифугирования образца крови в течение 30 минут с момента отбора образца. В пробирку с выделенной плазмой необходимо добавить специальное вещество – стабилизатор с целью предотвращения разложения любого из анализируемых веществ. Стабилизатор обеспечивает хранение образца при комнатной температуре (20-25 °С) в течение трех дней, либо в холодильнике (2-8 °С) - до семи дней. В случае более длительной задержки проведения анализа допускается хранение образца при -20 °С в течение периода времени до 2 недель. При необходимости более длительного хранения образец следует хранить при -70 °С. Тем не менее, при невозможности центрифугирования образца, исключается использование стабилизатора, так как происходит гемолиз эритроцитов. Таким образом, влияние температуры и времени при хранении и транспортировке образца цельной крови представляет значительный интерес.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0015]** Настоящее изобретение охарактеризовано признаками независимых пунктов формулы изобретения. Некоторые частные варианты реализации охарактеризованы в зависимых пунктах формулы изобретения.

**[0016]** Согласно первому аспекту настоящего изобретения предложен способ скрининга субъектов, у которых отсутствуют или присутствуют симптомы инфекции *Helicobacter pylori*, атрофического гастрита с сопутствующими рисками и/или

нарушенной функции желудка, при этом способ включает получение образца цельной крови, регистрацию времени отбора образца или температуры хранения образца, либо регистрацию обоих параметров, измерение концентрации представляющего интерес биомаркера, и определение начальной концентрации биомаркера и состояния слизистой оболочки желудка на основе полученных данных.

**[0017]** Согласно второму аспекту настоящего изобретения предложено устройство или программа, позволяющие определять начальную концентрацию биомаркера на основе измерения концентрации биомаркера в плазме или сыворотке, интервала времени между моментом отбора образца цельной крови и проведением анализа образца плазмы или сыворотки, и температуры хранения образца цельной крови.

**[0018]** Согласно третьему аспекту настоящего изобретения начальную концентрацию биомаркера, такого как гастрин-17, определенную вышеуказанным способом, применяют при проведении неинвазивного теста для скрининга субъектов без симптомов и с симптомами инфекции *Helicobacter pylori*, атрофического гастрита с сопутствующими рисками и/или нарушенной функции желудка.

**[0001]** Настоящее изобретение основано на обнаружении того, что концентрация, например, такого биомаркера как гастрин-17 монотонно снижается в зависимости от времени и температуры. Если концентрация превышает предел количественного определения и известна информация о температуре хранения и времени отбора образца, начальная концентрация гастрин-17 может быть достоверно рассчитана, и указанная концентрация может быть использована для интерпретации результатов оценки состояния слизистой оболочки желудка.

**[0002]** Указанные и другие аспекты наряду с их преимуществами по сравнению с известными решениями реализуются настоящим изобретением, как описано в настоящей заявке и формуле изобретения.

**[0003]** Более конкретно, способ согласно настоящему изобретению охарактеризован в пунктах 1, 2 и 3 формулы изобретения.

**[0004]** Устройство или программа в соответствии с настоящим изобретением охарактеризованы в пункте 7 формулы изобретения, и применение в соответствии с настоящим изобретением охарактеризовано в пункте 9 формулы изобретения.

**[0005]** Существенные преимущества достигаются с помощью настоящего изобретения. Например, исключается немедленное центрифугирование образцов крови



для отделения плазмы или сыворотки для проведения последующего анализа. Вместо этого образцы можно собирать, хранить и передавать для последующего анализа в виде образцов цельной крови без их предварительной обработки. На этапе проведения анализа, при котором проводят измерение биомаркеров, используют значения времени отбора образца крови и температуры хранения для интерпретации и корректировки полученных результатов, на которые могла бы повлиять, например, деградация белка. В результате этого реальная клиническая практика становится менее зависимой от времени и менее трудоемкой, а также менее затратной. Например, исключается необходимость проведения анализа каждого образца на месте, где был отобран указанный образец крови, при этом требуется лишь собрать образцы для их последующей обработки и анализа. В результате этого также совершенствуется внутренняя логистика в научно-исследовательском подразделении. Кроме того, для хранения образцов крови не требуются стабилизаторы, при этом образцы можно хранить, например, при комнатной температуре в виде образцов цельной крови до их последующего использования для анализа.

**[0006]** Ниже приведено более подробное описание технологии согласно настоящему изобретению со ссылкой на конкретные варианты реализации.

#### ВАРИАНТЫ РЕАЛИЗАЦИИ

**[0007]** Технология согласно настоящему изобретению связана с влиянием температуры и времени при хранении и транспортировке образцов цельной крови при обследовании лица, в организме которого имеются или предположительно имеются биомаркеры GP, указывающие на наличие инфекции *Helicobacter pylori* и/или атрофического гастрита с сопутствующими рисками.

**[0008]** Было продемонстрировано, что в отличие от гастриина-17 пепсиноген I, пепсиноген II и *Helicobacter pylori* обладают высокой стабильностью при хранении без существенного разложения в течение нескольких дней при обычной комнатной температуре, как проиллюстрировано на Фиг. 1. В данном контексте различные факторы, вызывающие деградацию (разрушение) белка, такие как окисление, фотодеструкция, дисульфидный скремблинг, дезамидирование, агрегация, осаждение, диссоциация, фрагментация и т.д., не представляют интерес, за исключением влияния времени и температуры хранения.

**[0009]** Фиг. 1 представляет собой график, на котором показано относительное изменение концентрации пепсиногенов и гастрин-17, при хранении образцов в виде цельной крови при 21 °С на протяжении различных периодов времени до проведения анализов.

**[0010]** Фиг. 2 - 4 представляют собой графики, на которых показана концентрация гастрин-17 после хранения образцов в течение 12, 24, 36 и 48 часов при 4 °С, при комнатной температуре (21 °С) и 30 °С. Относительное снижение концентрации составляет соответственно приблизительно 20%, 40% и 80% в течение 24 часов при 4 °С, 21 °С и 30 °С.

**[0011]** В частности, Фиг. 2а представляет собой график, на котором показана концентрация гастрин-17 в образцах, хранящихся в виде цельной крови, при 4 °С на протяжении различных периодов времени до проведения анализа

**[0012]** Фиг. 2b представляет собой график, на котором показано относительное изменение концентрации гастрин-17 в образцах, хранящихся в виде цельной крови, при 4 °С на протяжении различных периодов времени до проведения анализа.

**[0013]** Фиг. 3а представляет собой график, на котором показана концентрация гастрин-17 в образцах, хранящихся в виде цельной крови, при 21 °С на протяжении различных периодов времени до проведения анализа.

**[0014]** Фиг. 3b представляет собой график, на котором показано относительное изменение концентрации гастрин-17 в образцах, хранящихся в виде цельной крови, при 21 °С на протяжении различных периодов времени до проведения анализа.

**[0015]** Фиг. 4а представляет собой график, на котором, в частности, показана концентрация гастрин-17 в образцах, хранящихся в виде цельной крови, при 30 °С на протяжении различных периодов времени до проведения анализа.

**[0016]** Фиг. 4b представляет собой график, на котором показано относительное изменение концентрации гастрин-17 в образцах, хранящихся в виде цельной крови, при 30 °С на протяжении различных периодов времени до проведения анализа.

**[0017]** Фиг. 5 представляет собой график, на котором показано существенное влияние температуры хранения/транспортировки на скорость деградации гастрин-17. Таким образом, на Фиг. 5 представлен график, на котором показано хранение двух

различных образцов цельной крови в течение суток (24 часов) при различных температурах.

**[0018]** Фиг. 6 представляет собой график, на котором показана концентрация гастрин-17 в образцах крови, хранящихся в виде цельной крови, при 30 °С на протяжении различных периодов времени до проведения анализов. Пунктирная линия представляет высокую референсную величину гастрин-17, составляющую 7 пмоль/л (пример высокой референсной величины; любая более высокая концентрация указывает на пониженную секрецию кислоты).

**[0019]** Один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой способ скрининга субъектов, у которых отсутствуют или присутствуют симптомы инфекции *Helicobacter pylori*, атрофического гастрита с сопутствующими рисками и/или нарушенной функции желудка, при этом способ включает следующие этапы:

- a) получение образца цельной крови субъекта,
- b) регистрацию времени отбора образца цельной крови,
- c) количественное измерение концентрации гастрин-17 в образце плазмы или сыворотки, выделенном из образца цельной крови,
- d) определение начальной концентрации гастрин-17 путем сравнения значений, полученных на этапах b) и c), с референсными значениями, и
- e) интерпретацию структуры и/или функции слизистой оболочки желудка на основе проведенного сравнения значений.

**[0020]** Другой вариант реализации настоящего изобретения представляет собой способ скрининга субъектов, у которых отсутствуют или присутствуют симптомы инфекции *Helicobacter pylori*, атрофического гастрита с сопутствующими рисками и/или нарушенной функции желудка, при этом способ включает следующие этапы:

- a) получение образца цельной крови субъекта,
- b) регистрацию температуры хранения отобранного образца цельной крови,
- c) количественное измерение концентрации гастрин-17 в образце плазмы или сыворотки, выделенном из образца цельной крови,

- d) определение начальной концентрации гастрин-17 путем сравнения значений, полученных на этапах b) и c), с референсными значениями, и
- e) интерпретацию структуры и/или функции слизистой оболочки желудка на основе проведенного сравнения значений.

**[0021]** Еще один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой способ скрининга субъектов, у которых отсутствуют или присутствуют симптомы инфекции *Helicobacter pylori*, атрофического гастрита с сопутствующими рисками и/или нарушенной функции желудка, при этом способ включает следующие этапы:

- a) получение образца цельной крови субъекта,
- b) регистрацию времени отбора образца цельной крови,
- c) регистрация температуры хранения отобранного образца цельной крови,
- d) количественное измерение концентрации гастрин-17 в образце плазмы или сыворотки, выделенном из образца цельной крови,
- e) определение начальной концентрации гастрин-17 путем сравнения значений, полученных на этапах b), c) и d), с референсными значениями, и
- f) интерпретацию структуры и/или функции слизистой оболочки желудка на основе проведенного сравнения значений.

**[0022]** В рамках настоящего изобретения также предложен способ, отличающийся тем, что дополнительно к определению концентрации гастрин-17 также определяют концентрации пепсиногена I, пепсиногена II и антител класса IgG к *Helicobacter pylori* в образце плазмы или сыворотки.

**[0023]** Ниже приведена одна подходящая, но не единственно возможная, аналитическая функция для расчета начальной концентрации образцов. При допущении, что снижение концентрации пропорционально числу молекул:

$$-\frac{dN}{dt} \approx N, \text{ or } -\frac{dN}{N} = kdt, \text{ где}$$

N - число молекул, k - скорость, с которой будет происходить снижение концентрации, и t - время.

Решение дифференциального уравнения первого порядка может быть представлено следующим образом:

$$N(t) = N_0 e^{-kt}, \text{ где}$$

$N_0$  - начальное число молекул, т.е. начальная концентрация анализируемого вещества, и  $N(t)$  - измеренное число молекул ( $\approx$  концентрация).

Ввиду того, что температура хранения оказывает влияние на измеренную концентрацию, функция может быть представлена общей формулой:

$$N(t, T) = N_0 e^{-kt} f(T), \text{ где}$$

$T$  - температура хранения образца.

Полупериод концентрации ( $t_{1/2}$ ) может быть определен по следующей формуле:

$$k(T) = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} f(T)$$

Полупериод  $t_{1/2}$  и  $k(T)$  могут быть рассчитаны на основе измеренных данных.

**[0024]** Ввиду монотонного снижения концентрации в зависимости от времени и температуры, а также при превышении концентрацией предела количественного определения (LoQ) и при наличии измеренных значений температуры хранения и времени отбора образца обеспечивается возможность определения начальной концентрации и применения указанной информации при интерпретации результатов.

**[0025]** Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения высокая концентрация (в сравнении с диапазоном референсных значений) гастрин-17 указывает на бескислотное состояние желудка. Если в образце, хранившемся в течение некоторого периода времени до проведения измерений, по-прежнему отмечается высокая концентрация, то и значение начальной концентрации должно было быть высоким. Такая ситуация проиллюстрирована на графике (Фиг. 5) с использованием образца BN1999, принимая во внимание, что измерение было проведено на следующий день (через 24 часа) с момента отбора образца крови. Интерпретация результатов анализа хранившегося образца является в такой же степени достоверной, как если бы образец был проанализирован непосредственно после его отбора.

**[0026]** Кроме того, если абсолютно понятно, что ряд температурных значений не превысил определенное значение температуры, то на основе такого ряда можно предсказать концентрацию на основании сопоставления с диапазоном референсных значений и обеспечить возможность применения полученных данных при интерпретации результатов. Например, при хранении образца BN1998 (Фиг. 5) при комнатной температуре (21 °С) до проведения измерений, измеренное значение концентрации составляет 5 пмоль/л, и с учетом того, что полупериод составляет менее 24 часов, то таким образом, можно быть уверенным в том, что начальное значение превышало высокую референсную величину иллюстративного примера, составляющую 7 пмоль/л. Следовательно, данный случай также указывает на отсутствие кислоты в желудке и, например, в случае низкого уровня секреции пепсиногена, это приведет к повышению специфичности диагноза атрофический гастрит.

**[0027]** Кроме того, с учетом того, что образец хранили в течение 24 часов до проведения измерений и измеренное значение составляет приблизительно 2 пмоль/л, это указывает на нормальный уровень кислотности желудка, не превышающий верхний предел диапазона референсных значений.

**[0028]** Тем не менее, если измеренная концентрация не превышает предел количественного определения, не представляется возможным определить начальную концентрацию. В этом случае данные о гастрине-17 не могут быть использованы для интерпретации. Следовательно, необходимо интерпретировать результаты GastroPanel® на основе других значений биомаркеров.

**[0029]** Согласно одному варианту реализации отбор и хранение образца цельной крови осуществляется без стабилизаторов.

**[0030]** Согласно одному варианту реализации интервал времени между моментом отбора образца цельной крови и проведением последующего анализа образца плазмы или сыворотки крови составляет от 0 до 120 часов, более предпочтительно - от 0 до 72 часов и наиболее предпочтительно - от 0 до 48 часов.

**[0031]** Согласно одному варианту реализации, отбор и хранение образца цельной крови осуществляется при температурах в пределах от 0 до 30 °С, например, при 4 °С, 21 °С или 30 °С до выделения плазмы и/или сыворотки и проведения анализа концентраций биомаркеров.

**[0032]** В рамках настоящего изобретения предложены также устройство или программа, обеспечивающие определение начальной концентрации биомаркера на основе измерения концентрации биомаркера в плазме или сыворотке, интервала времени между моментом отбора образца цельной крови и проведением анализа образца плазмы и/или сыворотки и температуры хранения образца цельной крови.

**[0033]** Предпочтительно, концентрация биомаркера в плазме или сыворотке превышает предел количественного определения, интервал времени между моментом отбора образца цельной крови и проведением анализа образца плазмы и/или сыворотки находится в пределах 0-48 часов, и температура хранения образца цельной крови находится в пределах от 0 до 30 °С.

**[0034]** Таким образом, такое устройство или программа может представлять собой, например, программу GastroSoft, которая сконструирована для интерпретации результатов GastroPanel и которая модифицирована с учетом вышеуказанных существенных параметров настоящего изобретения.

**[0035]** Еще один вариант реализации настоящего изобретения относится к применению способов в соответствии с настоящим изобретением, для проведения неинвазивного теста для скрининга субъектов с симптомами и без симптомов инфекции *Helicobacter pylori*, атрофического гастрита с сопутствующими рисками и/или нарушенной функции желудка.

**[0036]** Следует понимать, что раскрытые варианты реализации изобретения не ограничиваются лишь конкретными конструкциями, этапами процесса или материалами, раскрытыми в данном документе, а распространяются на свои эквиваленты, которые будут понятны специалистам в соответствующих областях техники. Также следует понимать, что терминология, используемая в данной заявке, используется исключительно в целях описания конкретных вариантов реализации и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения.

**[0037]** Ссылка по всему тексту данного описания изобретения на один вариант реализации или вариант реализации означает, что конкретный признак, конструкция или характеристика, описание которых приведено в связи с указанным вариантом реализации, включены, по меньшей мере, в один вариант реализации настоящего изобретения. Таким образом, присутствие фраз «в одном варианте реализации» или «в варианте реализации» в разных местах по всему тексту данного описания изобретения не обязательно означает, что все из них относятся к одному и тому варианту реализации. В тех случаях, когда

ссылка дается на численное значение с использованием термина «такой как», «например», «приблизительно» или «по существу», также раскрывается точное численное значение.

**[0038]** В настоящей заявке несколько деталей, конструкционных элементов, композиционных элементов и/или материалов представлены для удобства в общем списке. При этом указанные списки должны истолковываться, как если бы каждый элемент списка индивидуально идентифицирован как отдельный и уникальный элемент. Следовательно, ни один отдельный элемент такого списка не должен истолковываться как фактический эквивалент любого другого элемента этого же списка исключительно исходя из их представления в общей группе, если не указано иное. Кроме того, в настоящем документе могут быть даны ссылки на различные варианты реализации и примеры настоящего изобретения наряду с альтернативными вариантами в отношении его различных компонентов. При этом понимается, что такие варианты реализации, примеры и альтернативные варианты не следует истолковывать как фактические эквиваленты друг друга, а необходимо рассматривать как отдельные и независимые представления настоящего изобретения.

**[0039]** Кроме того, описанные признаки, конструкции или характеристики могут быть скомбинированы любым подходящим образом в один или большее количество вариантов реализации. В нижеследующем описании приведены многочисленные конкретные детали с целью обеспечения глубокого понимания вариантов реализации настоящего изобретения. При этом, специалистам в данной области техники должно быть понятно, что настоящее изобретение может быть осуществлено без одной или большего количества специфических деталей, либо с помощью других способов, компонентов, материалов и т.д. В других случаях не проиллюстрированы общеизвестные конструкции, материалы или операции, либо не приведено их подробное описание во избежание затруднения понимания аспектов настоящего изобретения.

**[0040]** Выше приведен примеры, иллюстрирующие принципы настоящего изобретения в одной или нескольких конкретных областях применения, однако специалистам в данной области техники понятно, что в них могут быть внесены многочисленные изменения, касающиеся формы, использования и деталей реализации без необходимости осуществления изобретательского шага, не выходящие за пределы принципов и идей настоящего изобретения. Соответственно, не предполагается, что изобретение ограничивается вышеупомянутым, кроме как приведенной ниже формулой изобретения.



**[0041]** Глаголы «содержать» и «включать» используются в настоящем документе как открытые ограничения, которые не исключают и не требуют наличия также не перечисленных признаков. Признаки, перечисленные в зависимых пунктах формулы изобретения, являются взаимно свободно комбинируемыми, если прямо не предусмотрено иное. Кроме того, следует понимать, что использование формы единственного числа во всем тексте настоящей заявки не исключает форму множественного числа.

## ПРОМЫШЛЕННАЯ ПРИМЕНИМОСТЬ

**[0042]** По меньшей мере, некоторые варианты реализации настоящего изобретения находят промышленное применение, например, при скрининге и обследовании пациентов с диспепсией, а также для скрининга и выявления атрофического гастрита (АГ) с сопутствующими рисками, такими как рак желудка и рак пищевода.

## СПИСОК БИБЛИОГРАФИЧЕСКИХ ССЫЛОК

### Патентная литература:

1. WO 2009/053537

### Непатентная литература:

1. Agréus L, Kuipers EJ, Kupcinskis L, Malfertheiner P, Di Mario F, Leja M, Mahachai V, Yaron N, van Oijen M, Perez Perez G, Rugge M, Ronkainen J, Salaspuro M, Sipponen P, Sugano K and Sung J: Rationale in diagnosis and screening of atrophic gastritis with stomach-specific plasma biomarkers. *Scand J Gastroenterol* 2012;47:136-147.
2. Storskrubb T, Aro P, Ronkainen J, Sipponen P, Nyhlin H and Talley NJ: Serum biomarkers provide an accurate method for diagnosis of atrophic gastritis in a general population: the Kalixanda study. *Scand J Gastroenterol* 2008;43:448-1455.
3. Wikström M: Assessment of stomach health by “chemical gastroscopy”. *Eur Gastroenterol Rev* 2012;1-6.
4. Lomba-Viana R, Dinis-Ribeiro M, Fonseca F, Vieira AS, Bento MJ and Lomba-Viana H: Serum pepsinogen test for early detection of gastric cancer in a European country. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2012;24:37-41.
5. Miki K: Gastric cancer screening using the serum pepsinogen test method. *Gastric Cancer* 2006;9:245-253.
6. Bornschein J, Selgrad M, Wex T, Kuester D and Malfertheiner P: Serological assessment of gastric mucosal atrophy in gastric cancer. *BMC Gastroenterol* 2012;12:10. doi: 10.1186/1471-230X-12-10.
7. Germaná B, Di Mario F, Cavallaro LG, Moussa AM, Lecis P, Liatoupolou S, Comparato G, Carloni C, Bertiato G, Battistel M, Papa N, Aragona G, Cavestro GM, Iori V, Merli R, Bertolini S, Caruana P and Franzé

- A: Clinical usefulness of serum pepsinogens I and II, gastrin-17 and anti-*Helicobacter pylori* antibodies in the management of dyspeptic patients in primary care. *Dig Liver Dis* 2005;37:501-508.
8. Miki K, Ichinose M, Shimizu A, Huang SC, Oka H, Furihata C, Matsushima T and Takahashi K: Serum pepsinogens as a screening test of extensive chronic gastritis. *Gastroenterol Jpn* 1987;22:133-141.
  9. Samloff IM, Varis K, Ihamaki T, Siurala M and Rotter JI: Relationships among serum pepsinogen I, serum pepsinogen II, and gastric mucosal histology. A study in relatives of patients with pernicious anemia. *Gastroenterol* 1982;83:204-209.
  10. Korstanje A, den Hartog G, Biemond I and Lamers CB: The serological gastric biopsy: a non-endoscopic diagnostic approach in management of the dyspeptic patient: significance for primary care based on a survey of the literature. *Scand J Gastroenterol* 2002 236 (Suppl): 22–26.
  11. Oksanen A, Sipponen P, Miettinen A, Sarna S and Rautelin H: Evaluation of blood tests to normal gastric mucosa. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:791–795.
  12. Varis K, Sipponen P, Laxen F, Samloff IM, Huttunen JK, Taylor PR, and The Helsinki Gastritis Study Group: Implications of serum pepsinogen I in early endoscopic diagnosis of gastric cancer and dysplasia. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:950–956.
  13. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH and Correa P: Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996;20:1161-1181.
  14. Väänänen H, Vauhkonen M, Helske T, et al. Non-endoscopic diagnosis of atrophic gastritis with a blood test. Correlation between gastric histology and serum levels of gastrin-17 and pepsinogen I: a multicenter study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:885–891.
  15. Telaranta-Keerie A, Kara R, Paloheimo L, Härkönen M and Sipponen P: Prevalence of undiagnosed advanced atrophic corpus gastritis in Finland: an observational study among 4,256 volunteers without specific complaints. *Scand J Gastroenterol* 2010;45:1036-1041.
  16. Dinis-Ribeiro M, Yamaki G, Miki K, Costa-Pereira A, Matsukawa M and Kurihara M: Meta-analysis on the validity of pepsinogen test for gastric carcinoma, dysplasia or chronic atrophic gastritis screening. *J Med Screen* 2004;11:141–147.
  17. Sipponen P, Ranta P, Helske T, Kääriäinen I, Mäki T and Linnala A. Serum levels of amidated gastrin-17 and pepsinogen I in atrophic gastritis: an observational case-control study. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:785–791.
  18. Benberin V, Bektayeva R, Karabayeva R ym. Prevalence of H.pylori infection and atrophic gastritis among symptomatic and dyspeptic adults in Kazakhstan. A hospital-based screening with a panel of serum biomarkers. *Anticancer Res* 2013;33:4595-4602.
  19. Syrjänen KJ, Sipponen P, Härkönen M, Peetsalu A, Korpela S. Accuracy of GastroPanel testing in detection of atrophic gastritis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2015;27:102-104.
  20. Misiewicz JJ. The Sydney System: a new classification of gastritis. Introduction. *J Gastroenterol Hepatol*. 1991; 6:207–208.
  21. Sipponen P, Price AB. The Sydney System for classification of gastritis 20 years ago. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26: Suppl 1:31-34.

22. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzoli F, Gensini GF, Gisbert JP, Graham DY, Rokkas T, El-Omar EM, Kuipers EJ. European Helicobacter Study Group. Management of Helicobacter pylori infection - the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut* 2012;61:646-664.
23. Syrjänen K. A Panel of Serum Biomarkers (GastroPanel®) in Non-invasive Diagnosis of Atrophic Gastritis. Systematic Review and Meta-analysis. *Anticancer Research* 36: 5133-5144 (2016).

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ скрининга субъектов, у которых отсутствуют или присутствуют симптомы инфекции *Helicobacter pylori*, атрофического гастрита с сопутствующими рисками и/или нарушенной функции желудка, при этом указанный способ включает следующие этапы:

- a) получение образца цельной крови от субъекта,
- b) регистрацию времени отбора указанного образца цельной крови,
- c) количественное измерение концентрации гастрин-17 в образце плазмы или сыворотки, выделенном из указанного образца цельной крови,
- d) определение начальной концентрации гастрин-17 путем сравнения значений, полученных на этапах b) и c), с референсными значениями, и
- e) интерпретацию структуры и/или функции слизистой оболочки желудка на основании указанного сравнения.

2. Способ скрининга субъектов, у которых отсутствуют или присутствуют симптомы инфекции *Helicobacter pylori*, атрофического гастрита с сопутствующими рисками и/или нарушенной функции желудка, при этом указанный способ включает следующие этапы:

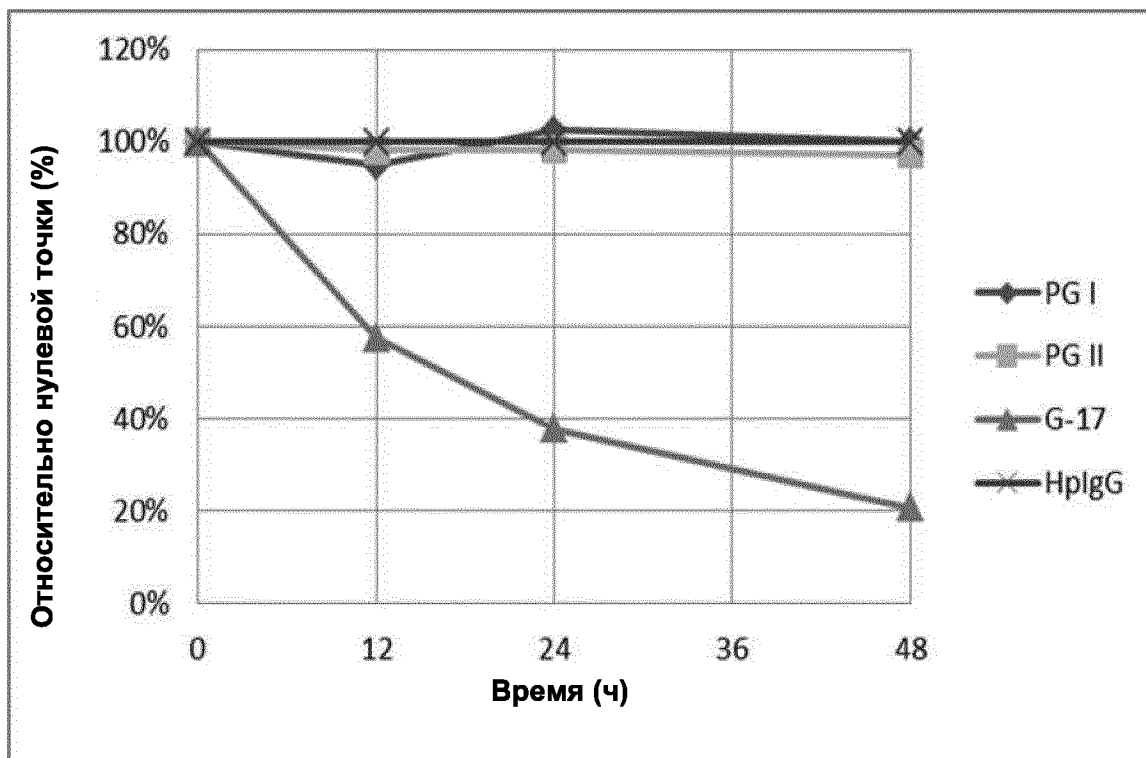
- a) получение образца цельной крови от субъекта,
- b) регистрацию температуры хранения указанного отобранного образца цельной крови,
- c) количественное измерение концентрации гастрин-17 в образце плазмы или сыворотки, выделенном из указанного образца цельной крови,
- d) определение начальной концентрации гастрин-17 путем сравнения значений, полученных на этапах b) и c), с референсными значениями, и
- e) интерпретацию структуры и/или функции слизистой оболочки желудка на основании указанного сравнения.

3. Способ скрининга субъектов, у которых отсутствуют или присутствуют симптомы инфекции *Helicobacter pylori*, атрофического гастрита с сопутствующими рисками и/или нарушенной функции желудка, при этом указанный способ включает следующие этапы:

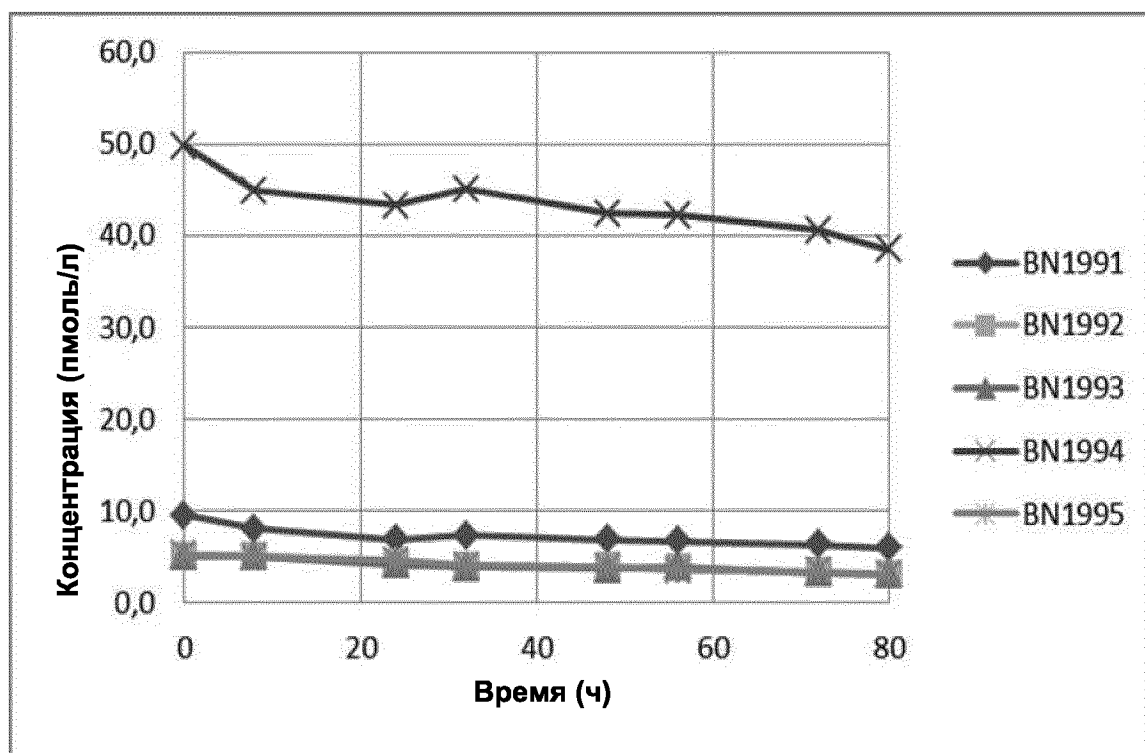
- a) получение образца цельной крови от субъекта,
- b) регистрацию времени отбора указанного образца цельной крови,
- c) регистрация температуры хранения указанного отобранного образца цельной крови,

- d) количественное измерение концентрации гастрин-17 в образце плазмы или сыворотки, выделенном из указанного образца цельной крови,
  - e) определение начальной концентрации гастрин-17 путем сравнения значений, полученных на этапах b), c) и d), с референсными значениями, и
  - f) интерпретацию структуры и/или функции слизистой оболочки желудка на основании указанного сравнения.
4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что дополнительно к концентрации гастрин-17 также измеряют концентрации пепсиногена I, пепсиногена II и антител класса IgG к *Helicobacter pylori* в указанном образце плазмы или сыворотки.
5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что отбор и хранение указанного образца цельной крови осуществляют без стабилизаторов.
6. Способ по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что отбор и хранение указанного образца цельной крови осуществляют при температурах от 0 до 30 °С до выделения плазмы и/или сыворотки и анализа концентраций биомаркера.
7. Устройство или программа, которые обеспечивают определение начальной концентрации биомаркера на основании:
- измерения концентрации биомаркера в плазме или сыворотке,
  - интервала времени между отбором образца цельной крови и анализом образца плазмы или сыворотки, и
  - температуры хранения указанного образца цельной крови.
8. Устройство или программа по п. 7, отличающиеся тем, что
- концентрация биомаркера в плазме или сыворотке превышает предел количественного определения,
  - интервал времени между отбором образца цельной крови и анализом образца плазмы или сыворотки крови находится в пределах 0-48 часов, и
  - температура хранения указанного образца цельной крови находится в пределах от 0 до 30 °С.
9. Способ по любому из пп. 1-6 для применения в неинвазивном тесте для скрининга субъектов, у которых отсутствуют или присутствуют симптомы инфекции *Helicobacter*

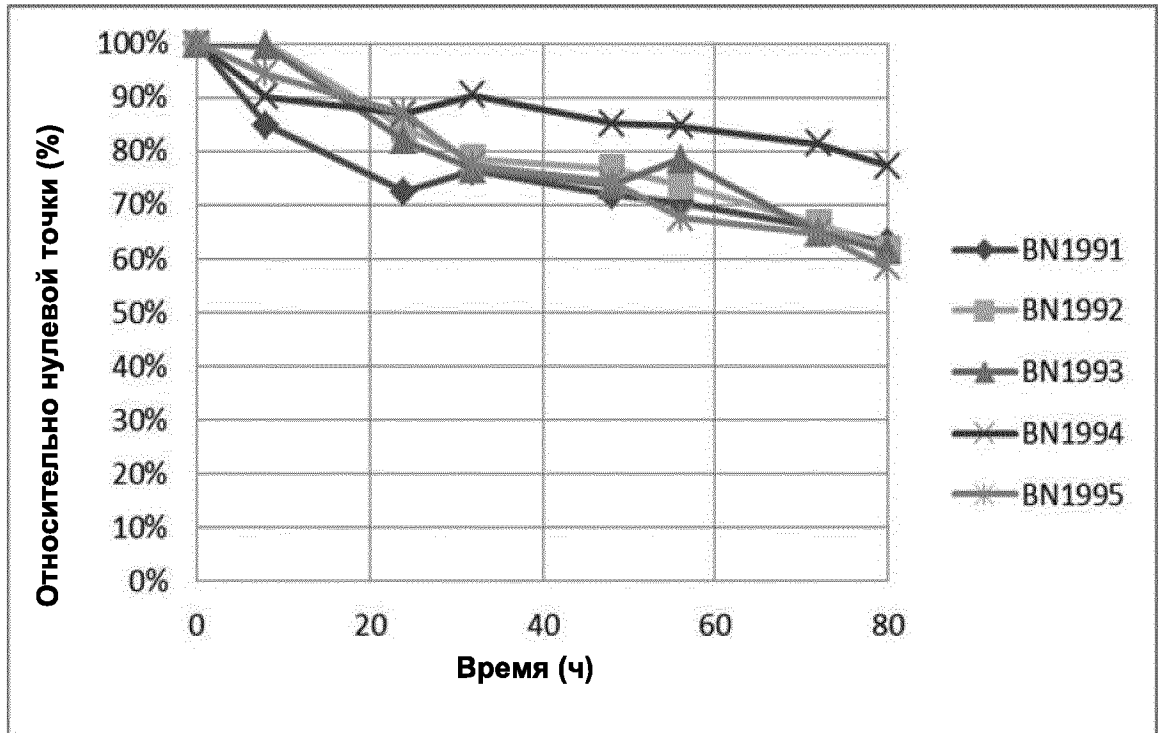
*pylori*, атрофического гастрита с сопутствующими рисками и/или нарушенной функции желудка.



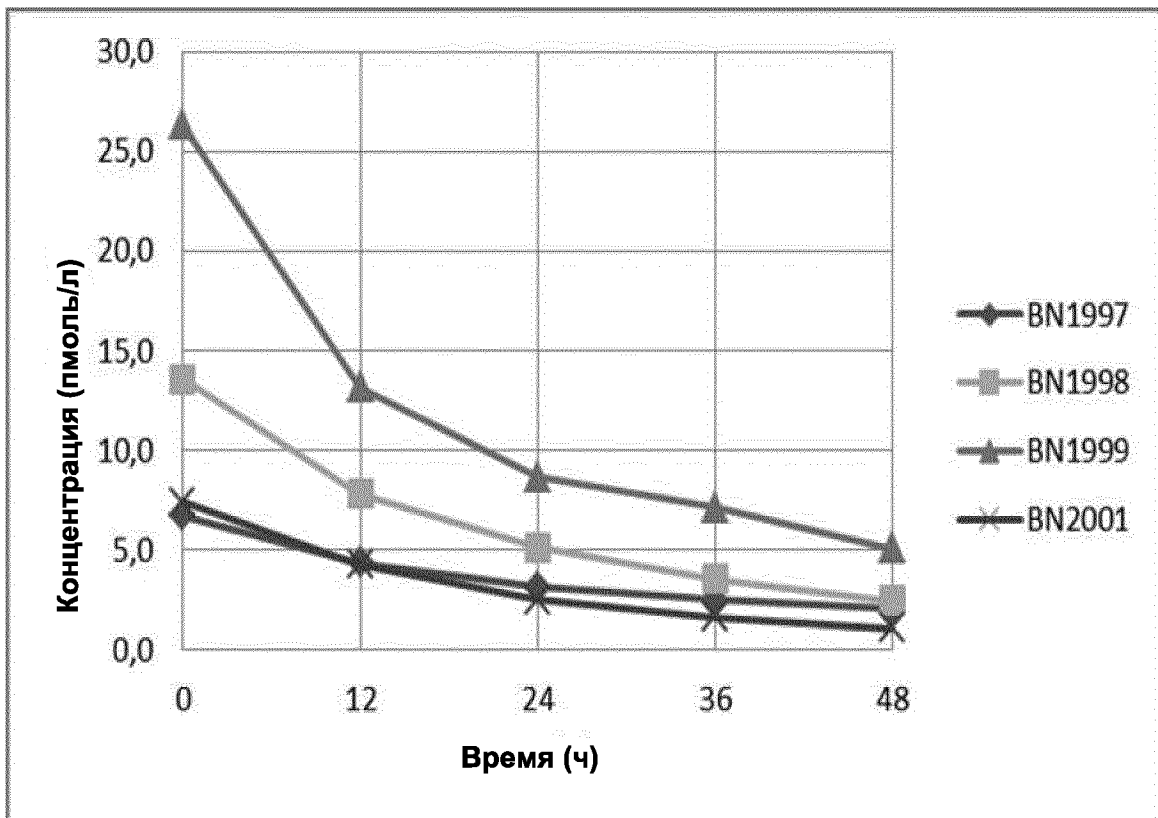
Фиг. 1



Фиг. 2а

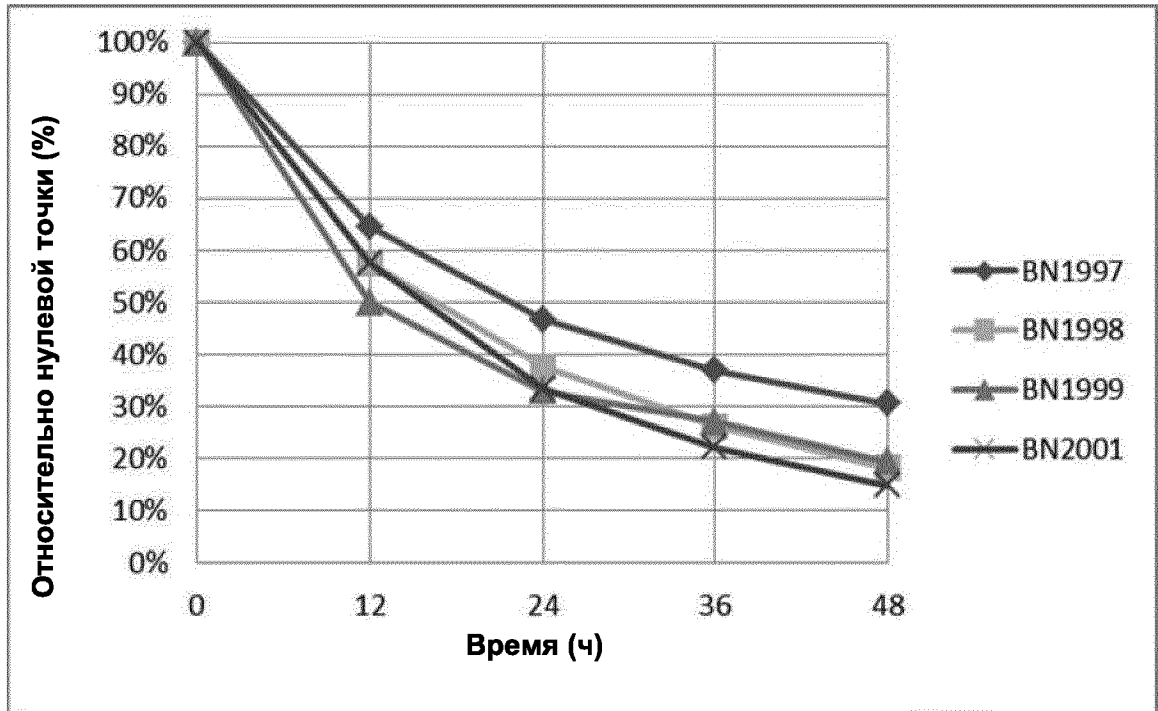


Фиг. 2б

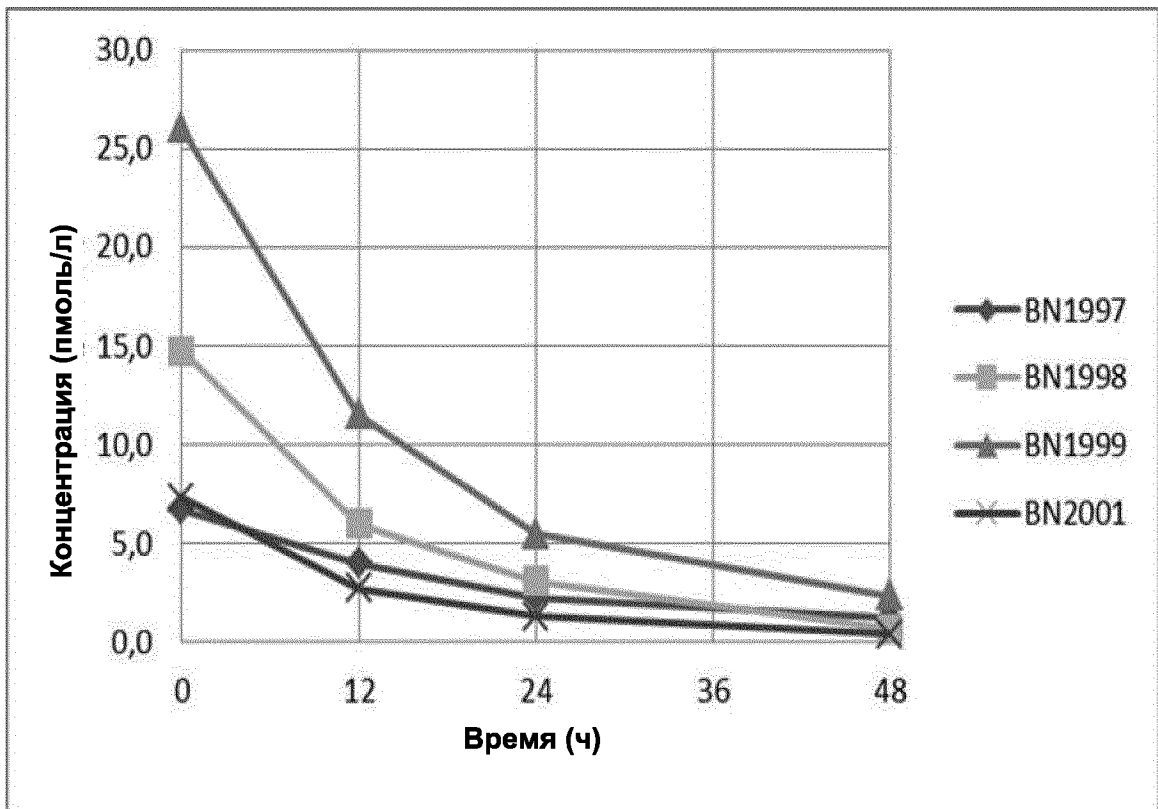


Фиг. 3а

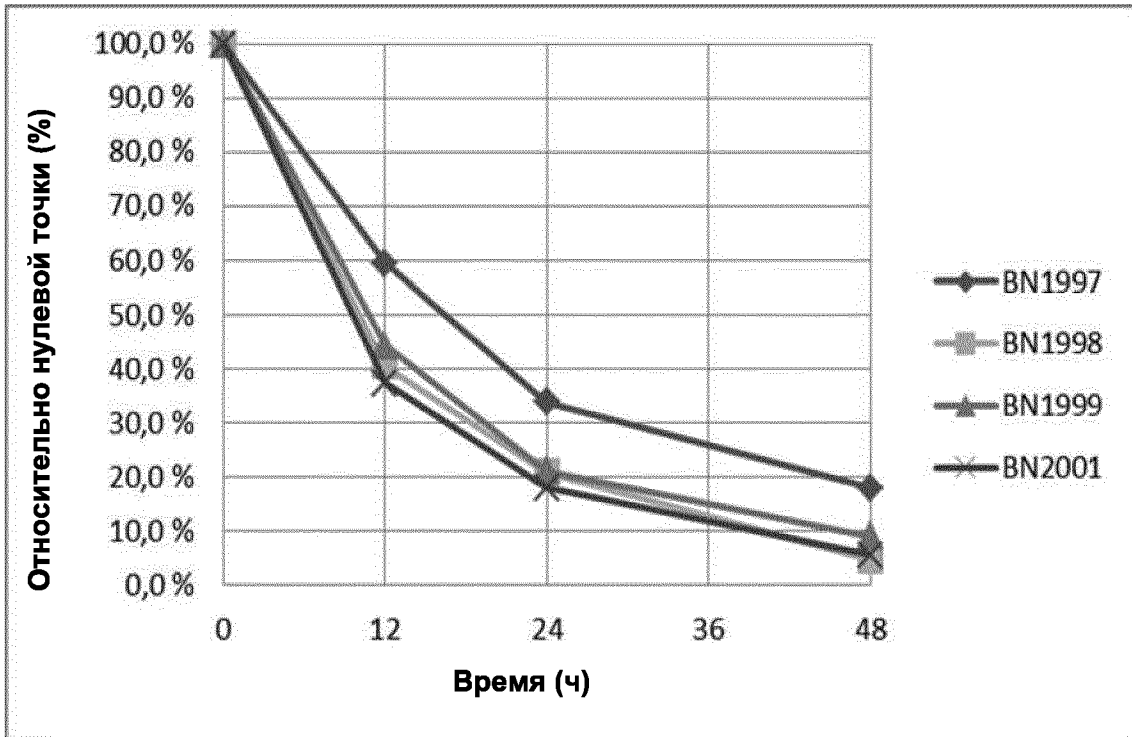




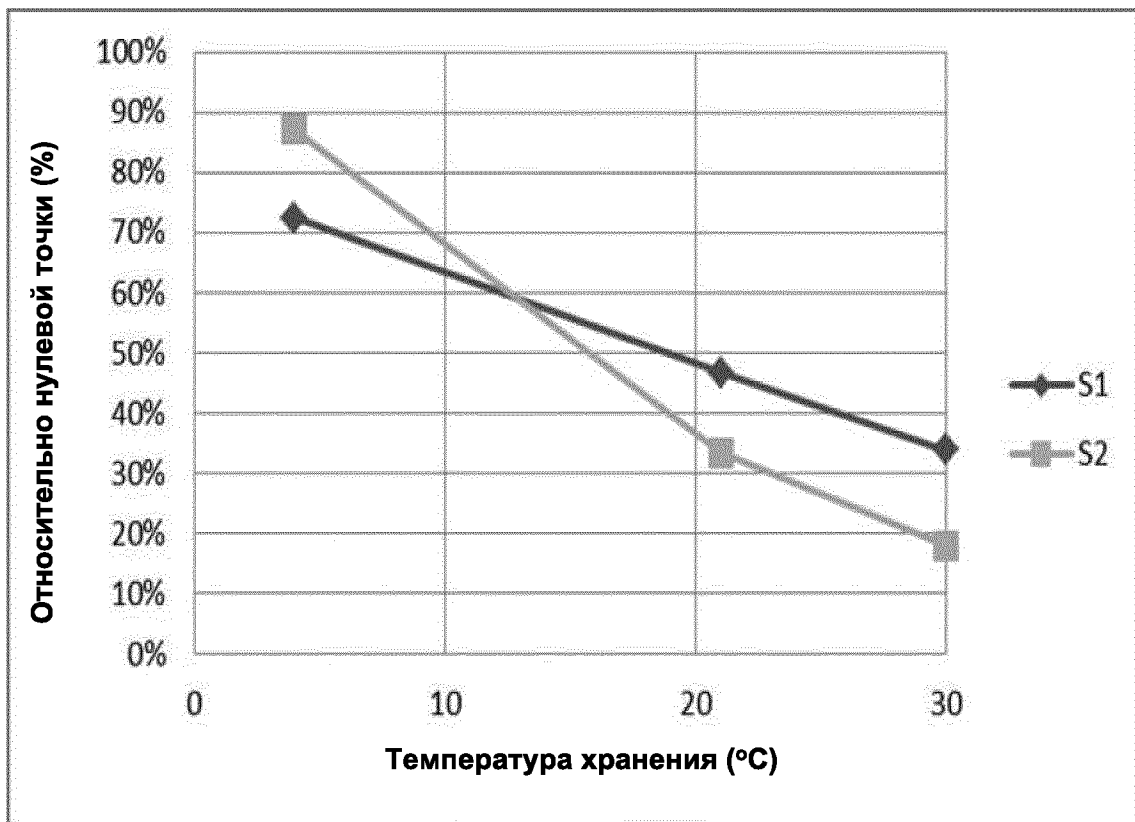
Фиг. 3б



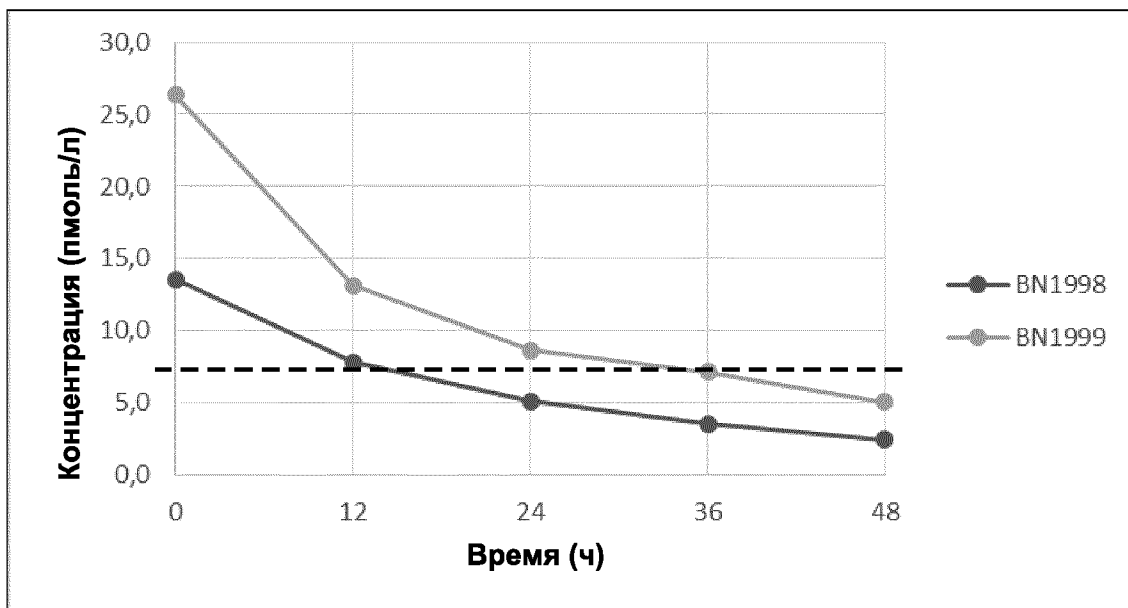
Фиг. 4а



Фиг. 4b



Фиг. 5



Фиг. 6