

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА , ОПУБЛИКОВАННАЯ В
СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРОМ О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности

Международное бюро

(43) Дата международной публикации
04 апреля 2019 (04.04.2019)



WIPO IPCT



(10) Номер международной публикации
WO 2019/066685 A1

- (51) Международная патентная классификация :
G01N 33/86 (2006.01)
- (21) Номер международной заявки : PCT/RU20 18/000601
- (22) Дата международной подачи :
13 сентября 2018 (13.09.2018)
- (25) Язык подачи : Русский
- (26) Язык публикации : Русский
- (30) Данные о приоритете :
2017133476 26 сентября 2017 (26.09.2017) RU
- (71) Заявитель : ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ "НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ" МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (**FEDERALNOYE GOSUDARSTVENNOYE BYUDZHETNOYE UCHREZHDENIYE "NATSIONALNYY MEDITSINSKIY ISSLEDOVATELSKIY TSENTR PROFILAKTICHESKOY MEDITSINY" MINISTERS TVA ZDRAVOOKHRANENIYA ROSSIYSKOY FEDERATSII**) [RU/RU]; Петроверигский переулок , 10, стр. 3 Москва , 101000, Moscow (RU).
- (72) Изобретатели : ДРАПКИНА , Оксана Михайловна (**DRAPKINA, Oksana Mikhailovna**); Севастопольский проспект , 42, к1, кв. 59 Москва , 117246, Moscow (RU). ШОЙБОНОВ , Батожаб Батожагарло -

вич (**SHOIBONOV, Batozhab Batozhargalovich**); ул. Набережная , 35, кв. 21, г. Долгопрудный , Московская обл. , 141703, g. Dolgoprudnyi, Moskovskaya Obi. (RU). ЕЛИАШЕВИЧ , Софья Олеговна (**ELIASHEVICH, Sofia Olegovna**); ул. Генерала Белова , 51, к. 1, кв. 6, Москва , 115583, Moscow (RU). ЛЕБЕДЕВА , Ольга Алексеевна (**LEBEDEVA, Olga Alekseevna**); ул. Дуб - равная , 36, кв. 285, Москва , 125368, Moscow (RU). ЛИТИНСКАЯ , Ольга Анатольевна (**LITINSKAYA, Olga Anatolevna**); ул. Мичурина , 21, кв. 450, г. Королев , 141076, g. Korolev (RU).

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), европейский патент (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,

(54) Title: SCREENING TEST FOR DETERMINING CONTACT COAGULATION PATHWAY

(54) Название изобретения : СКРИНИНГ -ТЕСТ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНТАКТНОГО ПУТИ КООГУЛЯЦИИ (СТОКПК)

(57) Abstract: The invention relates to laboratory diagnostics, particularly to methods of determining a contact coagulation pathway for human blood plasma. A screening test for determining a contact coagulation pathway includes mixing citrated blood plasma with calcium chloride and then photometrically registering coagulation, wherein 96-well flat-bottom plates are used as an activator for the contact coagulation pathway, a reaction is started by adding 25 µl of a 0.25 M calcium chloride solution to 75 µl of citrated plasma that is diluted 1:2 with a tris imidazole buffer, and, after incubation at 37°C for 30 min, a photometric determination of plasma coagulation is conducted according to a change in the turbidity of samples at a wavelength of 450 nm with measurement intervals of 0, 10, 15, 20, 25, and 30 min. The invention provides for increasing the sensitivity of the test when diagnosing hypercoagulation, increasing the productivity of hemostasis research, and quickly adapting a method for routine research in clinical-diagnostic laboratory settings.

(57) Реферат : Изобретение относится к лабораторной диагностике , в частности к способам определения контактного пути коагуляции плазмы крови человека .Скрининг -тест определения контактного пути коагуляции включает смешивание цитратной плазмы крови с хлоридом кальция и последующую фотометрическую регистрацию свертывания .При этом в качестве активатора контактного пути коагуляции используют 96-луночные плоскодонные планшеты , запускают реакцию добавлением 25 мкл 0,25 М раствора хлорида кальция к 75 мкл цитратной плазмы , разведенной 1:2 трис -имидазоловым буфером , и после инкубации при 37°С в течение 30 мин проводят фотометрическое определение коагуляции плазмы по изменению мутности проб при длине волны 450 нм с интервалами измерения 0, 10, 15, 20, 25 и 30 мин .Изобретение обеспечивает повышение чувствительности теста при диагностике гиперкоагуляции , увеличение производительности исследования гемостаза и быструю адаптацию метода для рутинных исследований в условиях клинико -диагностических лабораторий .



WO 2019/066685 A1

SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Декларации в соответствии с правилом 4.17:
— о б авторстве изобретения (правило 4.17 (iv))

Опубликована :
— с отчётом о международном поиске (статья 21.3)

Скрининг -тест определения контактного пути коагуляции (СТОКПК)

Изобретение относится к лабораторной диагностике , в частности к способам определения контактного пути коагуляции (КПК) плазмы крови человека , основанным на рекальцификации цитратной плазмы крови , и может применяться в клинических лабораториях лечебных учреждений для скрининг -исследований активности контактного пути активации гемостаза .

В настоящее время среди заболеваний , приводящих к смерти , по данным Всемирной организации здравоохранения , лидируют сердечно -сосудистые заболевания . При всем разнообразии нозологических форм в данной группе непосредственной причиной смерти больных чаще всего является тромбоз . Именно тромбоз является основным патогенетическим механизмом инфарктов , инсультов и тромбозэмболии легочных артерий .

В последние годы интенсивно разрабатывается и внедряется множество разнообразных программ , направленных на улучшение лечебного процесса при сердечно -сосудистых заболеваниях : высокотехнологическое хирургическое пособие (стентирование , шунтирование) , разработка ранних и активных реабилитационных мероприятий , создание новых фармацевтических препаратов . В ближайшей перспективе стоит задача развития профилактического направления - скрининг групп риска с целью выявления больных , которым требуется раннее начало терапии .

Несмотря на многолетние исследования , многие аспекты работы системы гемостаза до сих пор остаются до конца неизученными . Известно , что в работе системы участвуют более 300 реакций . Уже выделены и охарактеризованы все факторы плазменного гемостаза , созданы реагенты , позволяющие измерить концентрацию /активность этих факторов , и опубликовано множество научных работ о том , как те или иные факторы изменяют свою активность при различных патологиях . Однако весь этот

гигантский массив накопленных данных очень сложно использовать практическому врачу .

Одной из основных причин , определяющих сложность интерпретации результатов лабораторных коагулологических тестов , является отсутствие четкой взаимосвязи данных большинства тестов с регистрируемыми врачом клиническими симптомами (за исключением таких простых для интерпретации осложнений /заболеваний как массивная кровопотеря или гемофилии типа А и В).

Большинство случаев неверной трактовки результатов лабораторных исследований системы гемостаза обусловлены отсутствием понимания роли наблюдаемых изменений в патологических процессах организма . И дело часто не в том , что врач недостаточно информирован о принципах работы свертывающей системы крови , а в том , что данные , получаемые в результате исследования , не могут быть интерпретированы как те или иные патологические изменения в силу чисто технических особенностей теста . Классическим примером могут служить тесты АЧТВ (активированное частично тромбиновое время) и протромбиновое время , которые разработаны для диагностики гипокоагулянтных состояний и склонности к кровоточивости . Для выполнения этих задач , а также для укорочения времени проведения теста и лучшей воспроизводимости в ходе исследования к образцу плазмы добавляют активатор в концентрации , существенно превышающей физиологические . Такой подход не мешает диагностике геморрагических состояний , но делает эти тесты практически полностью нечувствительными к гиперкоагулянтным состояниям , т.к. на фоне такой сильной активации образца плазмы тонкие прокоагулянтные изменения нивелируются [Серебрянский И.И. «Глобальные » и «локальные тесты системы гемостаза в диагностике гиперкоагуляционного синдрома // Справочник заведующего КДЛ . - 2012 . - №12. - С. 27-34].

Несколько особое положение занимает такой тест как измерение уровня Д-димера . Его трактовка часто бывает не совсем однозначной . Причиной тому служит полиэтиологичность происхождения этого маркера . Д-димер является продуктом одновременной работы трех систем : прокоагулянтной и антикоагулянтной при образовании фибринового сгустка - с одной стороны , и фибринолитической при разрушении этого сгустка - с другой . Повышенный уровень Д-димера свидетельствует постфактум о том , что отложение фибриновых нитей уже случилось и в данный момент идет процесс их фибринолиза , но этот тест не может ничего сказать о повышенной предрасположенной TM к тромбообразованию на момент выполнения анализа .

Тест системы гемостаза , которые используются в лаборатории в настоящее время , можно разделить на два вида . Первый - «локальные » тесты , результаты которых позволяют охарактеризовать состояние отдельных факторов или звеньев каскадной реакции . В их число входят рутинные тесты , такие как АЧТВ , протромбиновое время (ПВ) , протромбиновый индекс (ПТИ) , международное нормализованное отношение (МНО), фибриноген , Д-димер , антитромбин III, протеин С, фактор VIII, концентрация и активность некоторых других факторов . Второй - «глобальные » коагулогические тесты , результаты которых позволяют оценивать систему гемостаза в целом - тромбоэластография /метрия , тест генерации тромбина и тромбодинамика .

«Локальные » тесты фиксируют изменения активности /концентрации отдельных факторов свертывания , но при этом не могут охарактеризовать , насколько эти локальные изменения повлияли (или не повлияли) на общую способность плазмы больного к образованию сгустка . «Глобальные » тесты могут дать в руки врача интегральную картину совокупных изменений , произошедших со свертывающей системой крови больного , но не способны охарактеризовать отдельные факторы коагуляционного каскада .

Тест генерации тромбина является одним из «глобальных» тестов, разработанных в 2001 г. [Hemker H.C., Giesen P., Al Dieri R., Regnault V., de Smedt E., Wagenvoord R., Lecompte T., Beguin S. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma //Pathophysiol. Haemost. Thromb.-2003.-V.33.-P.4-15.] Принцип метода заключается в использовании специфического к тромбину флуорогенного субстрата. После предварительной инкубации тромбоцит-богатой плазмы крови в нее вносят буфер, содержащий ионизированный кальций и флуорогенный субстрат. Образующийся тромбин расщепляет субстрат, в результате высвобождается молекула флуорофора, излучение которого автоматически регистрируется флуориметром через равные промежутки времени. Интенсивность свечения пропорциональна концентрации образовавшегося тромбина. На основании измерений с помощью программного обеспечения выстраивается кривая генерации тромбина. В ходе исследования оцениваются: время задержки образования тромбина (лаг-период), максимальная скорость образования тромбина (пик), время достижения максимальной скорости (время пик), количество образовавшегося тромбина (площадь под кривой, эндогенный тромбиновый потенциал) и некоторые другие параметры.

Недостатком данного теста является использование избыточного количества тканевого фактора в качестве активатора гемостаза, а также дорогостоящего научного оборудования и реагентов (флуориметра и флуорогенного субстрата). Данный тест также не отражает концентрацию и активность природного субстрата тромбина - фибриногена. Учитывая данные недостатки, тест генерации тромбина до сих пор не нашел широкого применения в рутинной практике.

Итоговое гиперкоагуляционное состояние гемостаза является следствием процессов, одновременно происходящих в двух подсистемах: прокоагулянтных изменений любой этиологии в работе свертывающей системы и неудовлетворительной работы антикоагулянтных систем

(антитромбин III, протеина C, TFPI) в попытке нивелировать первые. В силу необходимости одновременной оценки суммы вклада всех участников этого процесса «локальные» тесты слабо применимы для решения данной задачи. Напротив, «глобальные» коагулологические тесты по той же самой причине не могут справиться с этим вопросом. Именно поэтому оптимальным представляется комбинированное использование «глобальных» и локальных тестов. «Глобальные» тесты позволяют зафиксировать сам феномен гиперкоагуляции, а «локальные» - разобраться в некоторых составляющих его этиологии.

Каждый из методов исследования гемостаза обладает своими выраженными специфическими особенностями в силу различных причин, в том числе технических особенностей реализации того или иного теста, чистоты и специфических свойств реагентов и, конечно, что не менее важно, модели свертывания крови, на основании которой создавался тот или иной тест. Этот список далеко не полон, но он дает представление о значительном количестве причин, обуславливающих уникальную чувствительность и специфичность каждого из тестов в диагностике того или иного нарушения в работе свертывающей системы крови.

У каждого из тестов, относящихся как к классу «глобальных», так и к классу «локальных», есть свои преимущества и недостатки, знание которых позволяет врачу правильно интерпретировать данные о больном, более точно устанавливать диагноз и подобрать максимально адекватное лечение.

В донорской плазме *in vitro* после рекальцификации, даже при отсутствии активаторов, процесс свертывания начинается через 10-20 мин спонтанно в отдельных центрах. Далее спонтанные сгустки увеличиваются в размере, постепенно заполняют весь объем плазмы. Показано также, что количество спонтанных центров с уменьшением числа тромбоцитов в плазме снижается. После ультрацентрифугирования плазмы для удаления всех тромбоцитов и крупных фосфолипидных везикул спонтанные центры

практически не образуются . Ингибитор контактной фазы (ингибитор , полученный из зерен кукурузы) значительно снижает число спонтанных сгустков , но не редуцирует их полностью [Каротина Н.Г., Ованесов М.В., Плющ О.П., Копылов К.Г., Лопатина Е.Г., Саенко Е.Л., Бутылин А.А., Атауллаханов Ф.И. Исследование спонтанных сгустков в нормально плазме и плазме больных гемофилией // Гематол . и трансфузиол . - 2002. - Т. 47. - С. 26-30].

Известны лабораторные способы исследования свертывания крови в условиях низкоконтактной активации , основанные на принципе рекальцификации цитратной крови [Исследование системы гемостаза в клинике . Под ред . Баркагана З. С , Барнаул , 1975, с. 21, 72-73; Иванов Е.П. Диагностика нарушений гемостаза . Минск , 1983, с. 120-124; Лабораторные методы исследования системы гемостаза . Под ред . Балуды В.П. и соавт . Томск , 1980, с. 55-56]. Указанные способы считаются одними из основных в гемостазиологии . Однако накопившийся опыт и расширение знаний в области механизмов свертывания крови показали , что эти способы по своей чувствительности перестали удовлетворять все возрастающим требованиям к выявлению гиперкоагуляции [Rohrer M.J. et al. Annls of Surgery.- 1988. -V. 208, N 5.-P. 554-557].

Наиболее близким техническим решением является тест тромбодинамики . Тромбодинамика как метод исследования плазменного гемостаза был предложен в 1994 г. группой исследователей под руководством Атауллаханова Ф.И. [Атауллаханов Ф.И., Гурия Г.Т., Сафрошкина А.Ю. Пространственные аспекты динамики свертывания крови . II. Феноменологическая модель // Биофизика . - 1994. - Т. 39, № 1. - С. 97-106]. В основу метода положена модель распространения сгустка начиная от повреждения сосудистой стенки вглубь сосуда . Имитация поврежденной сосудистой стенки достигнута путем нанесения тонкого (30-50 нм) слоя тканевого фактора на поверхность вставки -активатора , которая и запускает

процесс образования сгустка в плазме. В ходе исследования оцениваются параметры пространственного роста сгустка (лаг-период, T_{lag}), начальную скорость сгустка (V_0), стационарную скорость сгустка (V_{st}), размер сгустка (CS), оптическую плотность сгустка (CD). Таким образом, врач получает возможность характеризовать процессы активации свертывания с участием тканевого фактора. Также этот метод позволяет регистрировать феномен спонтанного образования сгустка.

Недостатком метода тромбодинамики является низкая производительность (2 анализа в течение 45 мин), необходимость дополнительной подготовки пробы (плазмы) путем высокоскоростного центрифугирования, необходимость специального прибора для регистрации тромбодинамики (или нескольких - для увеличения производительности теста), набора реагентов и расходных материалов и, соответственно, высокая стоимость одного анализа для рутинных исследований. Также недостатком метода тромбодинамики является использование ингибитора контактного пути активации коагуляции, ингибитора трипсина из кукурузы, который снижает информативность теста и оценивает только активацию свертывания через тканевой фактор.

Задачей настоящего изобретения является разработка теста для оценки контактного пути активации плазменного гемостаза. Это позволит многократно увеличить производительность теста, удешевить его за счет использования доступного для клиническо-диагностических лабораторий фотометра для иммуноферментного анализа (ИФА), широко доступных 96-ти луночных плоскодонных планшет в качестве микрокувет и единственного реактива для запуска контактного пути активации плазменного гемостаза, раствора хлорида кальция.

Техническим результатом предлагаемого способа является повышение чувствительности теста при диагностике гиперкоагуляций за счет запуска контактного пути активации коагуляции плазмы, 48-кратное увеличение

производительности исследования гемостаза по сравнению с прототипом, а также быстрая адаптация метода для рутинных исследований в условиях клинико-диагностических лабораторий.

Указанный результат достигается тем, что проводят рекальцификацию цитратной плазме крови путем добавления раствора хлорида кальция в лунки 96-ти луночных плоскодонных планшет для иммуноферментного анализа в качестве кювет, инкубируют пробы в течение 30 мин при 37°C, а определение коагуляции плазмы проводят фотометрически по изменению мутности проб при длине волны 450 нм с интервалами измерения 0, 10, 15, 20, 25 и 30 мин. Коагуляцию плазмы в течение 10 мин характеризуют как гиперкоагуляцию, 15 мин - повышенную коагуляцию, 20 мин - как нормальную коагуляцию плазмы крови и 25 и более мин как гипокоагуляцию.

Способ осуществляют следующим образом: проводят стандартный забор крови в раствор 3,8% цитрата натрия в соотношении 9:1, готовят тромбоцит-обедненную плазму путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 мин. Затем для запуска контактного пути активации плазменного гемостаза добавляют оптимальную концентрацию раствора хлорида кальция к цитратной плазме, разведенной 1:2 трис-имидазовым буфером, pH 7,4. Тщательно перемешивают на шейкере пробы, приготовленные в плоскодонных 96-ти луночных планшетах и измеряют поглощение в пробах при 450 нм на фотометре для иммуноферментного анализа (1 измерение - 0 мин), пробы инкубируют в течение 30 мин при 37°C. Измерение поглощения проб для контроля коагуляции проводят через 10 мин (2 измерение) и в последующем каждые 5 мин (последнее измерение на 30 минуте инкубации).

Определение оптимальной концентрации хлорида кальция для запуска контактного пути коагуляции. С этой целью предварительно в 96-ти луночных плоскодонных планшетах 50 мкл 0,25 М раствор хлорида кальция был прогрессивно раститрован начиная со второй лунки по седьмую лунку.

После добавляли по 25 мкл трис-имидазолового буфера, pH 7,4 и пулированной нитратной плазмы относительно здоровых доноров. Тщательно перемешивали и измеряли поглощение в пробах при 450 нм на фотометре для ИФА анализа (0 мин), ставили на 30-минутную инкубацию при 37°C. Измерение поглощения проб для контроля коагуляции проводили каждые 10 мин (10, 20 и 30 мин). Полученные данные представлены в таблице 1.

Как видно из данных, представленных в таблице 1, максимальная коагуляция цитратной плазмы наблюдается при добавлении 50 мкл 0,125 М CaCl₂ к 50% пулированной цитратной плазме крови здоровых доноров. После этого осуществляют рекальцификацию 25% плазмы 0,25 М раствором хлорида кальция в 96-ти луночных плоскодонных планшетах для ИФА. Затем проводят инкубацию при 37°C в течение 30 мин. Определение коагуляции плазмы проводят фотометрически по изменению мутности проб при длине волны 450 нм с интервалами измерения 0, 10, 15, 20, 25 и 30 мин.

Для подтверждения избирательной активации контактного пути плазменного гемостаза использован соевый ингибитор трипсина (СИТ) в качестве ингибитора контактного пути коагуляции. Предварительно определяют оптимальную концентрацию СИТ.

Определение оптимальной концентрации соевого ингибитора трипсина (СИТ) для ингибирования контактного пути активации гемостаза. В 96-ти луночной плоскодонной планшете прогрессивно разводят соевый ингибитор трипсина (1 мг/мл) по 25 мкл, затем добавляют в лунки по 25 мкл буфера и 25 мкл пулированной цитратной плазмы крови здоровых доноров. Активацию контактного пути коагуляции запускают добавлением 25 мкл 0,25 М хлорида кальция, тщательно перемешивают, измеряют поглощение проб при 450 нм на фотометре для иммуноферментного анализа. Инкубируют в течение 20 мин при 37°C, измеряют изменению мутности проб каждые 10 мин для контроля коагуляции плазмы. В качестве контроля ставят:

контроль плазмы (без СИТ) и контроль бланка плазмы (без хлорида кальция и СИТ). Полученные результаты представлены в таблице 2.

Как видно из данных , представленных в таблице 2, СИТ дозо -зависимо ингибирует контактный путь активации плазменного гемостаза . При концентрации 0,25 мг/мл СИТ полностью подавляет контактный путь активации плазменного гемостаза .

Определение активаций плазменного гемостаза через тканевый фактор и контактный путь в присутствии соевого ингибитора трипсина (СИТ) и без СИТ

Для исследования влияния СИТ на контактную коагуляцию индивидуальных цитратных плазм были проведены сравнительные исследования :

1. Определяли коагуляцию предлагаемым способом (СТОКПК) в 14 пробах цитратных плазм как описано выше ;

2. Тест СТОКПК проводили в этих же пробах в присутствии 0,25 мг/мл СИТ ;

3. Для оценки влияния СИТ на активацию коагуляции с помощью тканевого фактора предварительно адаптировали тест АЧТВ для ИФА плашек с таким же количеством плазмы и хлорида кальция . Данный тест АЧТВ нами принят за модифицированный АЧТВ -тест ;

4. Тест АЧТВ (м) в присутствии 0,25 мг/мл СИТ . Полученные результаты представлены в таблице 3.

Как видно из данных , представленных в таблице 3, скрининг -тест определения контактного пути коагуляции (СТОКПК) оказался более чувствительным как к гипер -, так и к гипокоагуляции по сравнению с модифицированным АЧТВ -тестом (АЧТВ (м)). Суть модификации заключается в лимитировании активатора в тесте АЧТВ при тех же концентрациях хлорида кальция и цитратной плазмы , что в тесте СТОКПК . Как видно из данных теста АЧТВ (м), при ингибировании контактного пути

коагуляции с помощью соевого ингибитора трипсина (СИТ) гиперкоагуляция в 5 пробах была обусловлена высокой активностью контактного пути коагуляции. В то время как, СИТ полностью подавлял контактный путь коагуляции.

Таким образом, эксперименты с использованием ингибитора контактного пути коагуляции плазмы позволяют утверждать, что при данных условиях в предлагаемом тесте идет специфическая активация контактной фазы коагуляции через фактор XII.

Пример 1.

Исследование плазменного гемостаза с использованием предлагаемого теста (скрининг -тест определения контактного пути коагуляции (СТОКПК), прототипа, теста тромбодинамики, и рутинных методов оценки гемостаза (АЧТВ, протромбиновое время, МНО и фибриногена). Для оценки информативности СТОКПК для диагностики гиперкоагуляции были проведены сравнительные исследования. Были предварительно отобраны пробы цитратных плазм с гиперкоагуляцией (10 и 15 мин коагуляцией в предлагаемом тесте СТОКПК). Эти же пробы были исследованы в тесте тромбодинамики и в рутинных тестах оценки гемостаза (АЧТВ, протромбиновое время, МНО и фибриноген). Полученные результаты представлены в таблице 4. Как видно из данных, представленных в таблице 4, плазмы крови (n=14) с гиперкоагуляцией в тесте СТОКПК в 93% случаев совпали с гиперкоагуляцией, выявленной в тесте тромбодинамики и только в одном случае из 14, показатели тромбодинамики оказались в пределах нормальных величин. Гиперкоагуляция в тесте тромбодинамики в 93% случаев обусловлена высокой скоростью генерации фибринового сгустка на поверхности пластины-активатора, что свидетельствует о высокой скорости генерации тромбина. Только в 57% проб выявлено образование спонтанных сгустков и в 42% случаев гиперкоагуляций в тесте тромбодинамики были обусловлены большим размером фибринового сгустка ($CS > 1200$ мкм).

Интересные данные получены при исследовании гемостаза рутинными методами. Так в 3 случаях наблюдается уменьшение показателя АЧТВ, что свидетельствует о гиперкоагуляции (21%), в 4 случаях увеличение ПВ (гипокоагуляция, 29%). Показатели МНО оказались во всех пробах в пределах нормальных величин и только в 3 случаях был определен повышенный уровень фибриногена.

Таким образом, данные СТОКПК и тромбодинамики в 93% однонаправленно выявляют гиперкоагуляцию, в то время как данные рутинных методов исследования гемостаза в 29% определяют гипокоагуляцию и только в 21% - гиперкоагуляцию.

Пример 2.

Исследование плазменного гемостаза с использованием предлагаемого теста СТОКПК, прототипа, теста тромбодинамики, и рутинных методов оценки гемостаза (АЧТВ, протромбиновое время, МНО и фибриноген). Были предварительно отобраны пробы цитратных плазм с гипокоагуляцией (25 и 30 мин коагуляцией в предлагаемом тесте СТОКПК). Эти же пробы были исследованы в тесте тромбодинамики и в рутинных тестах оценки гемостаза (АЧТВ, протромбиновое время, МНО и фибриноген). Полученные результаты представлены в таблице 4. Как видно из данных, представленных в таблице 5, данные всех проведенных тестов в 100% совпали. Таким образом, чувствительность тестов СТОКПК, тромбодинамики и рутинных методов исследования гемостаза оказались одинаковыми для оценки состояний гипокоагуляции плазмы крови.

Пример 3.

Сравнительные исследования активности контактного пути коагуляции и показателей коагулограммы (АЧТВ, ПВ, МНО, ФГ). Проведены исследования 96 проб предлагаемым тестом СТОКПК и показатели коагулограммы. Полученные результаты представлены в таблице 6. Как видно из данных, представленных в таблице 6, предлагаемый тест в 62,5%

случаев выявляет гиперкоагуляцию , 25% нормо -, и 12,5% гипокоагуляцию . В то время как тесты рутинного гемостаза (АЧТВ , ПВ и МНО) не выявляют гиперкоагуляцию в исследованных пробах цитратной плазмы . Рутинные методы коагуляции суммарно в 51% случаев констатировали нормокоагуляцию и в 49% - гипокоагуляцию . В каждой пятой пробе выявляется гиперкоагуляция в тесте СТОКПК, в то время как по данным коагулограммы регистрируются признаки гипокоагуляции . Обнаруженный факт может иметь прямое отношение к проблеме рестенозов после стентирования артерий , когда на фоне антикоагулянтной терапии у больных наблюдается образование тромбов .

Таким образом , тест СТОКПК является новым тестом для оценки контактного пути активации гемостаза . Сравнительные исследования предлагаемого теста с тромбодинамикой по диагностике гиперкоагуляции показали высокую степень совпадения (93%) и 100% - совпадение при диагностике гипокоагуляции . Полученные новые данные при сравнительных исследованиях предлагаемого теста СТОКПК и рутинных тестов гемостаза (АЧТВ , ПФ и МНО) могут быть полезны для профилактики тромбозов на фоне анти -коагулянтной терапии при оперативных вмешательствах .

Предлагаемый способ отличается простотой , реагенты и расходные материалы являются доступными для диагностических лабораторий . Для регистрации коагуляции плазмы требуется термостат для 96-ти луночных плоскодонных планшетов и фотометр для иммуноферментного анализа . Использование простого и информативного теста определения активации контактного пути коагуляции позволяет проводить скрининг и выявлять людей склонных к тромбозу как на фоне анти -коагулянтной терапии , так и у практически здоровых людей , что позволит начать раннюю профилактику тромбозов , инсультов и инфарктов на этапе до сердечно -сосудистых катастроф .

Таблица 1

Влияние концентрации 0,25 М раствора хлорида кальция на коагуляцию 25% пулированной цитратной плазмы доноров

0,25 М CaCl ₂ , мкл в 100 мкл 25% цитратной плазмы		50	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78	0
A ₄₅₀	0 мин	0,269	0,239	0,213	0,244	0,214	0,236	0,211	0,201
	10 мин	0,261	0,23	0,201	0,233	0,203	0,225	0,198	0,192
	20 мин	0,26	<u>0,387</u>	<u>0,299</u>	0,239	0,191	0,218	0,21	0,173
	30 мин	0,283	<u>0,391</u>	<u>0,299</u>	0,227	0,19	0,218	0,187	0,167

Таблица 2

Ингибирование контактного пути активации плазменного гемостаза соевым ингибитором трипсина (СИТ)

		1	2	3	4	Контрольная пулированная плазма			К(бл)
СИТ (1 мг/мл)		25	12,5	6,25	3,125	0	0	0	0
A ₄₅₀	0 мин	0,091	0,085	0,078	0,100	0,1	0,09	0,093	0,093
	5 мин	0,092	0,222	0,306	0,352	0,397	0,383	0,386	0,092
	10 мин	0,091	0,223	0,307	0,354	0,41	0,395	0,392	0,092
	20 мин	0,092	0,235	0,307	0,367	0,405	0,388	0,387	0,092

Таблица 3

Данные определения активаций плазменного гемостаза через тканевой фактор (АЧТВ (м) и контактный путь (СТОКПК) в присутствии соевого ингибитора трипсина (СИТ) и без СИТ.

№ плазмы	СТОКПК, мин	СТОКПК + СИТ, мин	АЧТВ(м), мин	АЧТВ(м)+ СИТ, мин
1	10	Отсутствие коагуляции в течение 120 мин и более	10	<u>5</u>
2	10		10	10
3	15		10	10
4	15		10	10
5	15		10	10
6	10		5	10
7	20		10	10
8	10		5	10
9	5		5	5
10	10		5	10
11	10		5	10
12	30		10	10
13	25		30	10
14	15		10	10

Таблица 4

Сравнительные данные показателей гемостаза, полученные с использованием предлагаемого теста (СТОКПК), теста тромбодинамики и коагулограммы

№ пробы	СТОКПК, мин (Гиперкоагуляция)	Тромбодинамика					Коагулограмма			
		T _{lag} , мин	V, (мкм/мин)	D, (усл.ед)	T _{сп} , (мин)	CS, (мкм)	АЧТВ, (с)	ПВ, (с)	МНО	ФГ, (г/л)
Норма	20 мин	0,6-1,5	20-29	15000-32000	отс	800-1200	24,3-35,0	9,1-12,1	0,8-1,2	2-4
8	10	N	37.4	N	17	N	23.4	11.0	1.02	3.0
9	15	N	41.6	N	25.3	N	25.5	11.1	1.03	4.2
11	15	N	40.6	N	25.2	N	24.7	11.2	1.04	4.3
13	10	N	46.2	N	отс	1488	24.1	11.3	1.05	3.3
15	10	N	51.3	N	17.7	1653	26.3	12.0	1.11	3.1
16	15	N	33.5	N	отс	1300	н/т	н/т	н/т	н/т
17	15	N	33.5	N	отс	1282	28.8	12.5	1.16	3.3
18	15	N	40.7	N	21.1	1487	24.5	12.6	1.17	3.5
20	10	N	32.9	N	отс	1245	26.5	11.8	1.09	3.5
21	10	N	52.9	N	12.8	N	30.8	14.2	1.31	5.1
25	10	N	31.7	N	отс	N	23.7	12.0	1.11	3.7
26	10	N	38.8	N	28.9	N	26.4	11.8	1.09	3.3
27	10	N	51.7	N	10.1	N	22.2	11.6	1.07	3.4
28	15	N	N	N	N	N	41.7	13.7	1.27	3.6

N - норма ; н/т - не тестировали

Таблица 5

Сравнительные данные показателей гемостаза, полученные с использованием предлагаемого теста (СТОКПК), теста тромбодинамики и коагулограммы

№ пробы	СТОКПК, мин, (Гипокоагуляция)	Тромбодинамика					Коагулограмма			
		T _{lag} , мин	V, (мкм/мин)	D, (усл.ед)	T _{сп} , (мин)	CS, (мкм)	АЧТВ, В, (с)	ПВ, (с)	МНО	ФГ, (г/л)
Норма	20 мин	0,6-1,5	20-29	15000-32000	отс	800-1200	24,3-35,0	9,1-12,1	0,8-1,2	2-4
1	30	N	18,6	N	отс	N	29,9	11,3	1,05	4,4
3	30	N	15,2	N	отс	-	25,1	12,6	1,17	5,5
4	30	2,9	N	N	отс	N	23,6	н/т	2,22	2,9
7	30	3,7	13,0	N	отс	550	н/т	44,7	4,26	н/т
12	30	N	N	N	отс	N	29,9	13,1	1,22	2,6
22	30	1,9	8,4	N	отс	506	н/т	12,3	1,14	н/т
23	25	N	16,1	N	отс	N	29,5	13,1	1,21	4,4

N - норма ; отс - отсутствуют ; н/т - не тестировали

Таблица 6

Обобщенные данные теста СТОКПК и коагулограммы

Тест	Гипер-	Нормо-	Гипо-
	-коагуляция		
СТОКПК (n=96 проб)	60 пробы	24 пробы	12 проб
Коагулограмма(n=96 проб)	Не выявлено	49 проб	47 проб

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Скрининг -тест определения контактного пути коагуляции (СТОКПК), включающий смешивание нитратной плазмы крови с хлоридом кальция с последующей фотометрической регистрацией свертывания , отличающийся тем , что , в качестве активатора контактного пути коагуляции используют 96-ти луночные плоскодонные планшеты , запускают реакцию добавлением 25 мкл 0,25 М раствора хлорида кальция к 75 мкл цитратной плазмы , разведенной 1:2 трис -имидазоловым буфером , рН 7,4, затем инкубируют в течение 30 мин при 37°С, определение коагуляции плазмы проводят фотометрически по изменению мутности проб при длине волны 450 нм с интервалами измерения 0, 10, 15, 20, 25 и 30 мин , коагуляцию плазмы в течение 10 минут - оценивают как гиперкоагуляцию , 15 минут - как повышенную , 20 минут - нормальную коагуляцию плазмы крови и 25 и более минут как гипокоагуляцию

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 201 8/000601

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
G01 N 33/86 (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
G01 N 33/86, 33/48, 21/00, C 12Q 1/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
PatSearch (RUPTO internal), Esp@cenet, PAJ, USPTO, Information Retrieval System of FIPS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015/080629 A 1 (OBSCHESTVO S OGRANICHENNOI OTVETSTVENNOSTIU "GEMATOLOGICHESKAIA KORPORATSIIA") 04.06.201 5	1
A	EP 1337858 B 1 (CAMBRIDGE UNIVERSITY HOSPITALS NHS FOUNDATION TRUST) 16.03.201 1	1
A	TILLEY Derek et al. Development of a microplate coagulation assay for factor V in human plasma. Thrombosis Journal, 201 1, v. 9, pp. 1-6	1
A	CHANG Feng-Yu et al. Optical coherence tomography-guided laser microsurgery for blood coagulation with continuous-wave laser diode. Scientific Reports, 201 5, v. 5, pp. 1-9	1
II Further documents are listed in the continuation of Box C. D See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
04 December 201 8 (04.1 2.201 8)	13 December 201 8 (13.1 2.201 8)	
Name and mailing address of the ISA/ RU	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

<p>А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ</p> <p style="text-align: center;">G01N 33/86 (2006.01)</p> <p>Согласно Международной патентной классификации МПК</p>																			
<p>В. ОБЛАСТЬ ПОИСКА</p> <p>Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации)</p> <p style="text-align: center;">G01N 33/86, 33/48, 21/00, C12Q 1/00</p> <p>Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки</p> <p>Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)</p> <p style="text-align: center;">PatSearch (RUPTO internal), Esp@cenet, PAJ, USPTO, Information Retrieval System of FIPS</p>																			
<p>С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ :</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Категория *</th> <th style="width: 70%;">Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей</th> <th style="width: 20%;">Относится к пункту №</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>WO 2015/080629 А 1 (ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ГЕМАТОЛОГИЧЕСКАЯ КОРПОРАЦИЯ ") 04.06.2015</td> <td style="text-align: center;">1</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>EP 1337858 В 1 (CAMBRIDGE UNIVERSITY HOSPITALS NHS FOUNDATION TRUST) 16.03.2011</td> <td style="text-align: center;">1</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>TILLEY Derek et al. Development of a microplate coagulation assay for factor V in human plasma. Thrombosis Journal, 2011, v. 9, pp. 1-6</td> <td style="text-align: center;">1</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>CHANG Feng-Yu et al. Optical coherence tomography-guided laser microsurgery for blood coagulation with continuous -wave laser diode. Scientific Reports, 2015, v. 5, pp. 1-9</td> <td style="text-align: center;">1</td> </tr> </tbody> </table> <p><input type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы С. <input type="checkbox"/> данные о патентах -аналогах указаны в приложении</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>* Особые категории ссылочных документов :</p> <p>"А" документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным</p> <p>"Е" более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее</p> <p>"L" документ, подвергающий сомнению притязание (я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)</p> <p>"O" документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.</p> <p>"P" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>"Т" более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение</p> <p>"X" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности</p> <p>"Y" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста</p> <p>"&" документ, являющийся патенте м-аналогом</p> </td> </tr> </table>			Категория *	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №	A	WO 2015/080629 А 1 (ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ГЕМАТОЛОГИЧЕСКАЯ КОРПОРАЦИЯ ") 04.06.2015	1	A	EP 1337858 В 1 (CAMBRIDGE UNIVERSITY HOSPITALS NHS FOUNDATION TRUST) 16.03.2011	1	A	TILLEY Derek et al. Development of a microplate coagulation assay for factor V in human plasma. Thrombosis Journal, 2011, v. 9, pp. 1-6	1	A	CHANG Feng-Yu et al. Optical coherence tomography-guided laser microsurgery for blood coagulation with continuous -wave laser diode. Scientific Reports, 2015, v. 5, pp. 1-9	1	<p>* Особые категории ссылочных документов :</p> <p>"А" документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным</p> <p>"Е" более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее</p> <p>"L" документ, подвергающий сомнению притязание (я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)</p> <p>"O" документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.</p> <p>"P" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета</p>	<p>"Т" более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение</p> <p>"X" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности</p> <p>"Y" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста</p> <p>"&" документ, являющийся патенте м-аналогом</p>
Категория *	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №																	
A	WO 2015/080629 А 1 (ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ГЕМАТОЛОГИЧЕСКАЯ КОРПОРАЦИЯ ") 04.06.2015	1																	
A	EP 1337858 В 1 (CAMBRIDGE UNIVERSITY HOSPITALS NHS FOUNDATION TRUST) 16.03.2011	1																	
A	TILLEY Derek et al. Development of a microplate coagulation assay for factor V in human plasma. Thrombosis Journal, 2011, v. 9, pp. 1-6	1																	
A	CHANG Feng-Yu et al. Optical coherence tomography-guided laser microsurgery for blood coagulation with continuous -wave laser diode. Scientific Reports, 2015, v. 5, pp. 1-9	1																	
<p>* Особые категории ссылочных документов :</p> <p>"А" документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным</p> <p>"Е" более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее</p> <p>"L" документ, подвергающий сомнению притязание (я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)</p> <p>"O" документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.</p> <p>"P" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета</p>	<p>"Т" более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение</p> <p>"X" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности</p> <p>"Y" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста</p> <p>"&" документ, являющийся патенте м-аналогом</p>																		
<p>Дата действительного завершения международного поиска</p> <p style="text-align: center;">04 декабря 2018 (04.12.2018)</p>	<p>Дата отправки настоящего отчета о международном поиске</p> <p style="text-align: center;">13 декабря 2018 (13.12.2018)</p>																		
<p>Наименование и адрес ISA/RU: Федеральный институт промышленной собственности, Бережковская наб., 30-1, Москва, Г-59, ГСП -3, Россия, 125993 Факс : (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37</p>	<p>Уполномоченное лицо : <p style="text-align: right;">Н. Зарянов</p> Телефон № (495)53 1-64-8 1</p>																		