

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293479** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.03.24

(51) Int. Cl. **G01N 33/50** (2006.01)
G01N 15/14 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.07.09

(54) **АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ ПЛАТФОРМА ПОДГОТОВКИ ПРОБ ДЛЯ КЛЕТОЧНОГО АНАЛИЗА**

(31) **63/050,637**

(72) Изобретатель:

(32) **2020.07.10**

Бувье Гаэль, Бемлер Андреас, Фэй Дэвид, Фуэнтес Эдуардо Флорес, Амундараин Хесус, Флэглер Дэниел Дж. (US)

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/041123**

(87) **WO 2022/011285 2022.01.13**

(71) Заявитель:

(74) Представитель:

БЕКМАН КАУЛТЕР, ИНК. (US)

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится, в числе прочего, к автоматизированному проточно-цитометрическому способу и системе для анализа и пересчета, по меньшей мере одного из гематopoэтических стволовых клеток, гематopoэтических клеток-предшественников и Т-клеток.

- ✓ Аппаратные средства, программное обеспечение и реагенты должны представлять собой IVD и придерживаться руководящих ISHAGE-принципов
- ✓ Автоматическая подготовка и последующий анализ проб на одной платформе
- ✓ Автоматизированное программное обеспечение, но с возможностью адаптировать панели к типам проб и потребностям лабораторий, без потери IVD-состояния
- ✓ Обязательное добавление CD3 для анализа остаточных Т-клеток при поддержании IVD-состояния
- ✓ QC-понятие с отслеживанием реагентов и идентификацией по штрих-коду образцов, идентификатора пациента и реагентов
- ✓ Средства многоуровневого контроля процессов, которые охватывают уровень принятия клинических решений
- ✓ Платформа, которая может управляться операторами с минимальным уровнем подготовки

202293479

A1

A1

202293479

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576874EA/061

АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ ПЛАТФОРМА ПОДГОТОВКИ ПРОБ ДЛЯ КЛЕТОЧНОГО АНАЛИЗА

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[0001] Данная заявка притязает на приоритет предварительной заявки (США) номер 63/050637, поданной 10 июля 2020 года, которая содержится по ссылке как полностью изложенная в данном документе.

Уровень техники

[0002] Инструменты для проведения клеточного анализа с использованием проточных цитометров известны в данной области техники. См., например, опубликованную заявку на патент (США) номер 2008/0010019, содержащуюся по ссылке как полностью изложенная в данном документе. Проточный цитометр направляет поток частиц через зону считывания, в которой частицы могут возбуждаться посредством пучка света. Пучок света заставляет частицы люминесцировать и/или рассеивать свет, и излучаемый свет разделяется посредством фильтров на части электромагнитного (ЕМ) спектра. Посредством изучения фильтрованного ЕМ-спектра, может выполняться анализ клеточного содержимого, и могут формироваться отчеты с определенными характеристиками и значениями.

Сущность изобретения

[0003] Тем не менее, к настоящему времени, не существуют проточные цитометры, которые предоставляют возможность (i) автоматизированной подготовки проб крови (например, проб пуповинной крови), содержащих пробы гематопозитических стволовых клеток, клеток-предшественников или Т-клеток, при которой, например, детали оптимальной инкубации и объема предварительно программируются; и (ii) анализа и пересчета, по меньшей мере, одного из гематопозитических стволовых клеток, гематопозитических клеток-предшественников, Т-клеток и даже лейкоцитов, в идентичном инструменте, в котором пробы подготавливаются. Помимо этого, отсутствуют проточные цитометры, которые, в дополнение к (i) и (ii), предоставляют возможность осуществления анализа для одиночных проб с или без отрицательного контроля; либо для репликативных проб (например, дублированных проб) с или без отрицательного контроля. Настоящее раскрытие сущности описывает такой инструмент. Раскрытие сущности также предоставляет высокопроизводительный инструмент, при этом производительность инструмента повышается, по меньшей мере, частично, посредством способности перемещать различные жидкости (например, типы образцов) со взвешенными твердыми веществами (например, клетками) аккуратно и точно, с тем чтобы корректно пересчитывать частицы.

[0004] Пересчет стволовых CD34⁺-клеток и CD34⁺-клеток-предшественников представляет собой один из наиболее жестко регулируемых тестов в клинической проточно-цитометрической лаборатории. Предусмотрено четыре основных фактора,

которые способствуют критичности этого теста:

[0005] (1) Перед трансплантацией доноры обычно подвергаются химиотерапии и/или радиотерапии, которая выводит из строя кроветворную систему пациента, так что восстановление пациента зависит от трансплантации достаточно большого числа стволовых клеток для того, чтобы воссоздавать гематопозз. Корректный пересчет CD34+-клеток в силу этого является обязательным.

[0006] (2) Нормативно-регулирующая база для CD34+-пересчета отличается в зависимости от географии; тем не менее, текущие доступные способы количественного определения, санкционированные для использования в IVD, не предоставляют необходимую гибкость в том, чтобы приспосабливаться к этим отличиям, вынуждая лаборатории самостоятельно проверять достоверность лабораторно разработанных тестов на редких и ценных типах проб, чтобы удовлетворять требованиям своих местных правительственных органов.

[0007] (3) Аллогенные (чужеродные) трансплантаты содержат остаточные иммунные компетентные CD3+-Т-клетки, которые имеют потенциал для того, чтобы вызывать заболевание "трансплантат против хозяина" (GvHD), потенциально опасное для жизни осложнение в режимах трансплантации стволовых клеток. В силу этого обязательно пересчитывать число CD3+-Т-клеток в этих пробах; тем не менее, в настоящее время на рынке отсутствует IVD-набор, который предоставляет возможность параллельного пересчета стволовых CD34+-клеток и CD3+-Т-клеток в пробе, снова вынуждая лаборатории работать с определяемыми пользователем тестами.

[0008] (4) Текущие доступные процедуры CD34+-исчисления выполняются в значительной степени вручную, обуславливая потенциал для человеческих ошибок и в силу этого необходимость повторных проведенных единичного отбора проб, что приводит к формированию отчетов с результатами с задержкой или дискомфорту пациента/донора в случае, если должны забираться дополнительные пробы. Помимо этого, эти пробы зачастую поступают в качестве экстренных (STAT) проб в лабораторию, нарушая поток обработки в лаборатории и вынуждая лабораторный персонал деприоритизировать анализ других проб. Оба фактора приводят к необходимости автоматизированного решения для CD34+-пересчета.

[0009] Новая разработанная система AQUIOS STEM и способы, описанные в данном документе, представляют собой первое решение для проведения диагностики в пробирке (IVD) для CD34+-пересчета, которое рассматривает эти критические аспекты. На основе автоматизированной проточно-цитометрической системы AQUIOS и способов, описанных в данном документе, оно обеспечивает полное решение для автоматизированного CD34+-пересчета и необязательного CD3+-пересчета в пробе, приводя к потоку обработки, который минимизирует необходимость вмешательства человека. Пробы загружаются в систему оператором, и подготовка проб и анализ данных выполняются автоматически посредством анализатора. Это уменьшение времени обработки с участием оператора предоставляет прозрачный поток обработки в

лаборатории и минимизирует число ручных и в силу этого потенциально подверженных ошибкам этапов. Это также означает то, что CD34+-пересчет может выполняться экспертами в области непроточной цитометрии, позволяя лабораториям обеспечивать CD34+-пересчет вне рабочего дня регулирующей лаборатории, к примеру, в ночные смены или за выходные. Оба аспекта повышают уровень ухода за пациентами и уменьшают время до получения результата для этого критичного по времени варианта применения.

[0010] Помимо этого, система AQUIOS STEM и способы, описанные в данном документе, предоставляют варианты анализа, которые адаптируются к отдельным регулирующим требованиям, к примеру, к руководящим принципам Международного общества гематотерапии и трансплантационной инженерии (ISHAGE) для CD34+-пересчета и Европейской фармакопеи, которые отличаются в отношении своего запроса на дублированные проведения единичного отбора и использования отрицательного контроля. Эта гибкость также рассматривает параллельный пересчет CD3+-Т-клеток вместе с популяцией стволовых CD34+-клеток и CD34+-клеток-предшественников в том, что система AQUIOS STEM предоставляет в сумме шесть (6) вариантов анализа, из которых можно выбирать, в качестве части IVD-решения. Это является уникальным для рынка и исключает необходимость во времязатратной самостоятельной проверке достоверности разработанных лабораторией тестов.

[0011] Уровень автоматизации, предоставляемый посредством системы AQUIOS STEM, достигается посредством использования предварительно смешанных и готовых к использованию комбинаций реагентов, адаптированных для автоматизации, при одновременном обеспечении наивысшего уровня трассируемости данных. Текущие доступные ручные тестовые наборы используют решения для лизиса красных кровяных клеток (важного этапа в подготовке проб), которые требуют ежедневной подготовки вручную из концентрата и которые отрицательно влияют на жизнеспособность клеток, так что пробы должны храниться во льду до фактического анализа. В отличие от этого, система AQUIOS STEM использует более мягкий лизирующий реагент красных кровяных клеток, который готов к использованию и может использоваться при комнатной температуре, что обеспечивает возможность автоматизации подсчета количеств CD34+ и CD3+ способом, известным для других вариантов применения на основе автоматизированной проточной цитометрии, но для не пересчета стволовых клеток. Все флаконы для реагентов, критически важные для теста, штрих-кодируются с помощью отдельных идентификаторов и существенных параметров контроля качества, таких как тип реагента, партия реагента, день первого применения, дата истечения срока годности и т.д., и сохраняются в одной базе данных вместе с информацией проб, что обеспечивает уровень трассируемости данных, предписанный посредством сегодняшних аккредитирующих органов.

[0012] Система AQUIOS STEM проходит проверку достоверности в клинических исследованиях относительно своего утвержденного способа, STEM-набора для

проточного цитометра FC500, который воспринимается как "золотой стандарт" на рынке для клинического CD34+-пересчета и который также использован в качестве опорного способа для решений для CD34+-пересчета вручную других изготовителей. При использовании системы AQUIOS STEM, "золотой стандарт" переходит на следующий уровень посредством предоставления уникального нового решения для пересчета стволовых CD34+-клеток и CD34+-клеток-предшественников, который снимает нагрузку пересчета стволовых клеток с клинических лабораторий.

Краткое описание чертежей

[0013] Эти и другие признаки, аспекты и преимущества настоящей технологии должны становиться более понятными относительно нижеприведенных чертежей:

[0014] Фиг. 1А является контрольным списком характеристик решения для идентификации и количественного определения гематопоэтических CD34+-клеток-предшественников, которое удовлетворяет требованиям клинических лабораторий.

[0015] Фиг. 1В является блок-схемой последовательности операций способа, описанного в данном документе для анализа и пересчета, по меньшей мере, одного из гематопоэтических стволовых клеток, гематопоэтических клеток-предшественников и Т-клеток.

[0016] Фиг. 2 является видом в перспективе одного примера диагностического инструмента, в котором инструмент показывается вместе с автозагрузчиком образцов и включает в себя проточный цитометр.

[0017] Фиг. 3 является укрупненным видом в перспективе части диагностического инструмента, показанного на фиг. 2.

[0018] Фиг. 4 является видом спереди в перспективе диагностического инструмента по фиг. 2-3, показывающим инструмент в ходе работы.

[0019] Фиг. 5 является укрупненным видом части диагностического инструмента, которая допускает забор проб в одной трубке для образцов за один раз.

[0020] Фиг. 6 является видом спереди в перспективе внешнего кожуха предложенного диагностического инструмента, показанного на фиг. 2-5.

[0021] Фиг. 7 является видом спереди в перспективе внешнего кожуха другого примера, в котором автозагрузчик образцов исключается, и трубки для образцов вставляются через переднюю дверцу.

[0022] Фиг. 8 представляет собой пример программной компонентной системы, которая может использоваться в способах и системах, описанных в данном документе.

[0023] Фиг. 9 является таблицей, показывающей варианты панели для клинического количественного определения CD34+-НПС, с или без анализа остаточных Т-клеток.

[0024] Фиг. 10А-10С являются графиками, показывающими эквивалентность трех вариантов CD34+-анализа: STEM-панель (тесты с дублированием плюс отрицательный контроль), STEM-тест с дублированием (тесты с дублированием, без отрицательного контроля) и одиночный STEM-тест (одиночный тест) для абсолютных количеств CD34+

(клеток/мкл). Эти три варианта анализа служат для тестов, которые не включают в себя CD3.

[0025] Фиг. 11А-11С являются графиками, показывающими эквивалентность трех вариантов CD34+-плюс CD3+-анализа: STEM ALLO-панель (тесты с дублированием плюс отрицательный контроль), STEM ALLO-тест с дублированием (тесты с дублированием, без отрицательного контроля) и одиночный STEM ALLO-тест (одиночный тест) для абсолютных количеств CD34+ (клеток/мкл). Эти три варианта анализа служат для тестов, которые включают в себя CD3.

[0026] Фиг. 12А-12С являются графиками, показывающими эквивалентность трех вариантов CD34+-плюс CD3+-анализа: STEM ALLO-панель (тесты с дублированием плюс отрицательный контроль), STEM ALLO-тест с дублированием (тесты с дублированием, без отрицательного контроля) и одиночный STEM ALLO-тест (одиночный тест) для абсолютных количеств CD3+ (клеток/мкл). Эти три варианта анализа служат для тестов, которые включают в себя CD3.

[0027] Фиг. 13 является характерным потоком обработки при проточной цитометрии вручную, как описано в примере 2.

[0028] Фиг. 14 является характерным потоком обработки в проточно-цитометрической системе AQUIOS CL, как описано в примере 2.

[0029] Фиг. 15А-15В являются графиками времени полного рабочего цикла и времени обработки с участием оператора при обработке проб для одной CD34+-пробы или партии из 10 CD34+-проб в FC500 с STEM-набором (альтернативный способ, пустые столбики) и в системе AQUIOS STEM (AQUIOS, заштрихованные столбики).

[0030] Фиг. 16А-16В являются графиками времени процесса и времени обработки с участием оператора для процедур контроля качества (QC) в FC500 с STEM-набором (альтернативный способ, серые столбики) и в системе AQUIOS STEM (AQUIOS, красные столбики) за один рабочий день (фиг. 16А) и 5-дневную рабочую неделю (фиг. 16В).

Описание

[0031] Далее следует обратиться к подробной информации в конкретных вариантах осуществления раскрытого предмета изобретения. Хотя раскрытый предмет изобретения описывается в сочетании с приведенной формулой изобретения, следует понимать, что примерно проиллюстрированный предмет изобретения не имеет намерение ограничивать формулу изобретения раскрытым предметом изобретения.

[0032] В связи с растущим использованием мобилизованных, периферийных стволовых клеток и клеток-предшественников (PBSC) для целей трансплантации, исследователи, совместно с Международным обществом гематотерапии и трансплантационной инженерии (ISHAGE), описали в 1996 году набор стандартов для CD34+-пересчета с намерением предоставлять простой чувствительный способ, который обеспечивает высокую степень точности и межлабораторной воспроизводимости. Полученные в результате "руководящие ISHAGE-принципы" вскоре стали золотым стандартом для пересчета гематопозитических CD34+-клеток-предшественников

посредством проточной цитометрии. В 1998 году, исследовательская группа опубликовала модифицированную версию руководящих принципов от 1996 года, посредством введения гранул для подсчета абсолютного количества, добавления 7-аминоактиномицина D (7-AAD) в качестве красителя для демонстрации жизнеспособности, чтобы исключить мертвые клетки, и лизирующего реагента, не имеющего фиксаторов, таких как формальдегид. Эти модификации преобразовали базовый протокол в одноплатформенный способ, и полученные в результате "руководящие ISHAGE-принципы по единой платформе с красителем для демонстрации жизнеспособности", более чем через 20 лет, по-прежнему остаются по большей части неизменными.

[0033] Отличительная черта руководящих ISHAGE-принципов заключается в стратегии последовательного стробирования, которая извлекает число CD34⁺-клеток из жизнеспособных лейкоцитов. Руководящие принципы также требуют проведения тестов с дублированием вместе с отрицательным контролем, чтобы корректировать вариабильность тестирования и неспецифическое связывание клеток и флуорохрома.

[0034] Вследствие избирательности последовательного стробирования, руководящие ISHAGE-принципы задают необязательность использования отрицательного контроля. В отличие от этого, Европейская фармакопея (Ph. Eur.) предписывает использование контроля. В отличие от руководящих ISHAGE-принципов, стандарты, описанные в Ph. Eur., являются юридически обязательными, как изложено в Конвенции Совета Европы относительно разработки европейской фармакопеи и в фармацевтическом законодательстве ЕС и отдельных стран.

[0035] Текущие доступные программные решения, которые представляют собой часть системы диагностики в пробирке (IVD), не предоставляют гибкость в том, чтобы проводить отбор панелей для CD34⁺-пересчета с или без отрицательного контроля при поддержании IVD-состояния. Помимо этого, не все наборы реагентов для CD34⁺-пересчета содержат реагент отрицательного контроля.

[0036] Хотя начальная точка стратегии последовательного ISHAGE-стробирования чрезвычайно упрощает корректное количественное определение редких популяций CD34⁺-клеток, это приводит к такому факту, что в качестве конечной точки, все пересчитанные CD34⁺-клетки являются автоматически жизнеспособными, и может быть затруднительным непосредственно вычислять процентную долю жизнеспособных CD34⁺-клеток из всех CD34⁺-клеток. Помимо этого, может быть сложно извлекать общее число CD45⁺-лейкоцитов из применяемой стратегии стробирования, чтобы оценивать полную жизнеспособность образцов.

[0037] Для CD34⁺-клеток, извлекаемых из пуповинной крови, недавно выпущенная седьмая редакция документа "NetCord - FACT International Standards for Cord Blood Collection, Banking and Release for Administration" требует определения как общего количества CD34⁺, так и общего количества жизнеспособных CD34⁺ для постобработки проб пуповинной крови до криоконсервации и оценки жизнеспособности в процентах CD34 до выпуска дозы пуповинной крови в клиническую программу.

[0038] В случае если количественное CD34+-определение выполняется для целей контроля качества, лабораториям требуется возможность проводить отбор не "полной" ISHAGE-панели, состоящей из дублированных тестов плюс отрицательный контроль, а вместо этого одиночного теста, в частности, когда только небольшие объемы образцов доступны для анализа. Современное программное обеспечение для получения данных не предоставляет гибкость в том, чтобы адаптировать панель соответствующим образом, в качестве части IVD-решения. Хотя для целей QC IVD-система не обязательно требуется, большинство лабораторий, выполняющих эти тесты, являются жестко регулируемые и в силу этого отказываются от проверки достоверности отдельного определяемого пользователем теста только для этой цели.

[0039] В случаях гематологических заболеваний или доброкачественной дисфункции гематопоетической системы, CD34+-клетки собираются из периферической крови (PB), костного мозга (BM) или пуповинной крови (CB) чужеродных (аллогенных) доноров. Аналогично аутологичным окружениям, в которых донор и получатель представляют собой идентичного человека, мобилизованная PB сегодня представляет собой наиболее часто используемый источник для стволовых CD34+-клеток и CD34+-клеток-предшественников в схемах на основе аллогенных трансплантатов.

[0040] Успешность аллогенного трансплантата в форме гематопоетических клеток-предшественников (HPC) зависит от множества факторов, таких как доступность подходящего донора, совместимость человеческих лейкоцитарных антигенов (HLA), успешная балансировка иммунной реакции пациента при поддержании эффекта "трансплантат против лейкемии/опухоли" для трансплантата и т.п. Использование CD34+-клеток из мобилизованной периферической крови имеет преимущество относительно быстрого восстановления гематопоза после трансплантации, но сопровождается повышенным риском острого заболевания "трансплантат против хозяина" (aGvHD) вследствие более высокого числа циркулирующих Т-клеток. Поскольку острое и хроническое GvHD затрагивает приблизительно 30-40% пациентов, которые подвергаются аллогенной трансплантации, и донорные Т-клетки признаются играющими центральную роль в опосредовании aGvHD, пересчет CD3+-Т-клеток в трансплантате вместе с CD34+-клетками становится общепринятой практикой во многих лабораториях. Поскольку в настоящее время отсутствует предлагаемый на рынке набор, который предоставляет возможность IVD-анализа CD34 и CD3 в одном тесте, лаборатории снова должны основываться на проверке достоверности определяемых пользователем тестов для этого варианта применения.

[0041] Лаборатории, выполняющие CD34+-HPC-пересчет, являются жестко регулируемые с точки зрения трассируемости данных и должны устанавливать широкомасштабную QC-систему, в частности, при прохождении аккредитации. Некоторые ключевые аспекты этих управляющих механизмов включают в себя (а) недопущение некорректной идентификации проб в ходе процесса за счет надлежащей идентификации всех проб; (b) надлежащие условия для мониторинга надежности,

аккуратности, точности и производительности тестовых процедур и инструментов; (с) функциональные проверки для инструментов и реагентов; (d) использование надлежащего опорного материала и документации текущего сличительного тестирования; (е) процесс для того, чтобы предотвращать использование реагентов и запасов и материалов с истекшим сроком годности; и (f) механизм, который обеспечивает возможность связывать номер партии, дату истечения срока годности и изготовителя запасов и материалов и реагентов с каждым образцом.

[0042] В частности, аспекты (е) и (f) могут быть сложными, поскольку документирование реагентов и образцов зачастую не связано между собой и осуществляется "оффлайн", к примеру, не на платформе, используемой для получения и анализа данных.

[0043] В гематоонкологических лабораториях, НРС-пробы зачастую поступают в качестве экстренных (STAT) проб в лабораторию и требуют пристального внимания, нарушая рутинный поток обработки. Любые сложности с этими пробами дублируют усилия и в силу этого увеличивают потенциал для человеческой ошибки. Для этих лабораторий, должно быть желательным интегрировать НРС-пробы в нормальный поток обработки, в идеале таким способом, который минимизирует риск ошибок при заборе проб или других сложностей, поскольку анализ CD34+-НРС является критичным по времени. Для лабораторий, которые специализируются на CD34+-пересчете, таких как специализированные лаборатории для исследования пуповинной крови, более высокая степень автоматизации должна помогать в управлении растущим числом проб, которые должны анализироваться, при предоставлении высокого стандарта трассируемости, как указано в данном документе.

[0044] Текущие IVD-решения для CD34+-пересчета посредством проточной цитометрии не имеют возможностей автоматизации, главным образом вследствие использования лизирующих реагентов красных кровяных клеток, которые отрицательно влияют на жизнеспособность клеток, так что подготовленные пробы должны держаться во льду до анализа. Руководящие ISHAGE-принципы предлагали использование хлорида аммония, поскольку по существу он представлял собой единственный лизирующий реагент, доступный на тот момент, который подходит для подхода с лизированием/без промывки, без необходимости дополнительных фиксаторов и без изменения свойств рассеяния интересующей клеточной популяции. Хотя использование хлорида аммония является общепринятым по существу во всех коммерческих наборах для CD34+-пересчета для проточной цитометрии, оно предотвращает реализацию CD34+-тестов при автоматизированной подготовке проб и на проточно-цитометрических платформах вследствие своего эффекта в отношении жизнеспособности клеток, и поскольку рабочее разбавление должно подготавливаться свежим ежедневно.

[0045] Сегодня доступны готовые к использованию лизирующие реагенты красных кровяных клеток без фиксаторов, которые специфично лизируют красные кровяные клетки без явно выраженного влияния на жизнеспособность лейкоцитов во время

подготовки проб, позволяя выполнять CD34+-пересчет в автоматизированной проточно-цитометрической системе.

[0046] Идеальный набор для количественного CD34+-определения для проточной цитометрии комбинирует выгоды установленных стандартов и протоколов с достаточной гибкостью в том, чтобы адаптировать реагент и программные инструментальные средства к потребностям клинической лаборатории. Это включает в себя панели для получения и анализа данных для различных типов проб без необходимости настраивать определяемые пользователем тесты параллельно с IVD-решениями, механизмами контроля качества, которые удовлетворяют требованиям жестко регулируемой рабочей среды и высокой степени автоматизации. См. фиг. 1А.

[0047] Способы, описанные в данном документе, для анализа и пересчета, по меньшей мере, одного из гематопозитических стволовых клеток, гематопозитических клеток-предшественников и Т-клеток, проектируются с целью перехода так называемого золотого стандарта на "следующий уровень". Способы, описанные в данном документе, осуществляют модульный подход для автоматизированного анализа, в числе прочего, гематопозитических стволовых CD34+-клеток и CD34+-клеток-предшественников. В одном примере, способы, описанные в данном документе, включают в себя программное обеспечение и наборы реагентов для CD34+-пересчета; программное обеспечение и наборы реагентов для одновременного пересчета CD3+-Т-клеток и CD34+-клеток в материале проб от аллогенных доноров; и управляющие CD34-клетки (2 уровня), как описано в таблицах 1 и 2 в данном документе.

Табл. 1

STEM-набор	Вариант программной панели	Тестов в расчете на панель
CD45-FITC/CD34-PE		
CD45-FITC/CD34-Ctrl	Проведение тестов с дублированием плюс отрицательный контроль	1 CD45-FITC/CD34-PE/7-AAD 2 CD45-FITC/CD34-PE/7-AAD 3 CD45-FITC/CD34-CTRL/7-AAD
Лизирующий реагент		
Гранулы для подсчета абсолютного количества	Проведение тестов с дублированием	1 CD45-FITC/CD34-PE/7-AAD 2 CD45-FITC/CD34-PE/7-AAD
	Одиночный тест	1 CD45-FITC/CD34-PE/7-AAD

Табл. 2

STEM-набор+STEM ALLO-CD3-набор	Вариант программной панели	Тестов в расчете на панель
CD45-FITC/CD34-PE CD45-FITC/CD34-Ctrl 7-AAD Лизирующий реагент Гранулы для подсчета абсолютного количества CD3-PC7 CD3-CTRL	Проведение тестов с дублированием отрицательный контроль	1 CD45-FITC/CD34-PE/CD3-PC7/7-AAD 2 CD45-FITC/CD34-PE/CD3-PC7/7-AAD 3 CD45-FITC/CD34-CTRL/CD3-CTRL/7-AAD
	Проведение тестов с дублированием	1 CD45-FITC/CD34-PE/CD3-PC7/7-AAD 2 CD45-FITC/CD34-PE/CD3-PC7/7-AAD
	Одиночный тест	1 CD45-FITC/CD34-PE/CD3-PC7/7-AAD

при этом "CD45-FITC", в общем, означает конъюгированное с флуоресцеином антитело, обеспечивающее анализ и пересчет клеточных популяций, экспрессирующих CD45-антиген, присутствующий в биологических пробах человека, с использованием проточной цитометрии, изготовленное подразделением Immunotech SAS (компания Beckman Coulter), Марсель, Франция; "CD34-PE", в общем, означает конъюгированное с фикоэритрином антитело, обеспечивающее анализ и пересчет клеточных популяций, экспрессирующих CD34-антиген, присутствующий в биологических пробах человека, с использованием проточной цитометрии, изготовленное подразделением Immunotech SAS (компания Beckman Coulter), Марсель, Франция; "CD3-PC7", в общем, означает конъюгированное с фикоэритрином цианином 7 антитело, обеспечивающее анализ и пересчет клеточных популяций, экспрессирующих CD3-антиген, присутствующий в биологических пробах человека, с использованием проточной цитометрии. Хотя такие люминофоры, как FITC, PE и PC7, указаны в данном документе, можно использовать любые подходящие конъюгированные с люминофором антитела для этого обеспечения анализа и пересчета клеточных популяций, экспрессирующих CD45-, CD34-антиген и CD3-антиген, до тех пор, пока люминофор может обнаруживаться в пределах возможностей обнаружения инструмента.

[0048] Способы, описанные в данном документе, могут использовать управляющие CD34-клетки, которые представляют собой жидкие препараты стабилизированных человеческих лейкоцитов для верификации параметров CD34, CD45 и CD3 в качестве части систем, описанных в данном документе. В одном примере, наборы содержат два уровня CD34 приблизительно с десятью CD34+ клетками/мкл (уровень 1) и приблизительно с 30 CD34+ клетками/мкл (уровень 2). Результаты анализа могут

вводиться в систему посредством сканирования штрих-кода бланка анализа управляющих клеток.

[0049] При использовании в данном документе, термин "гематопозитические стволовые клетки" или "HSC", в общем, означает клетки, имеющие как плюрипотентность, которая позволяет им дифференцироваться на функциональные зрелые клетки, такие как гранулоциты (например, промиелоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), эритроциты (например, ретикулоциты, эритроциты), тромбоциты (например, мегакариобласты, мегакариоциты для формирования тромбоцитов, тромбоциты) и моноциты (например, моноциты, макрофаги), так и способность регенерироваться при поддержании своей плюрипотентности (самообновление).

[0050] При использовании в данном документе, термин "гематопозитические клетки-предшественники" или "HPC", в общем, означает клетки, имеющие потенциал для того, чтобы дифференцироваться на функциональные зрелые клетки, такие как гранулоциты (например, промиелоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), эритроциты (например, ретикулоциты, эритроциты), тромбоциты (например, мегакариобласты, мегакариоциты для формирования тромбоцитов, тромбоциты) и моноциты (например, моноциты, макрофаги).

[0051] HSC и/или HPC необязательно получают из тела или органа тела, содержащего клетки гематопозитического происхождения. Такие источники включают в себя нефракционированный костный мозг, пуповинную кровь и периферическую кровь. Все вышеуказанные продукты из сырой или нефракционированной крови могут обогащаться для клеток, имеющих характеристики гематопозитических стволовых клеток, способами, известными специалистам в данной области техники.

[0052] Во время гематопоза, HSC сначала отклоняются на стадию-предшественник в качестве миелоидного ростка и лимфоидного ростка, затем дифференцируются на миелоидные стволовые клетки (смешанные колониеформирующие клетки, CFU-GEMM) и на лимфоидные стволовые клетки, соответственно. Дополнительно, миелоидные стволовые клетки дифференцируются на эритроциты через эритроидные бурсоформирующие клетки (BFU-E) и эритроидные колониеформирующие клетки (CFU-E), на тромбоциты через мегакариоцитные колониеформирующие клетки (CFU-MEG), на моноциты, нейтрофилы и базофилы через гранулоцитарно-макрофагальные колониеформирующие клетки (CFU-GM) и на эозинофилы через эозинофильные колониеформирующие клетки (CFU-Eo), тогда как лимфоидные стволовые клетки дифференцируются на Т-клетки через лимфоидные Т-клетки-предшественники и на В-клетки через лимфоидные В-клетки-предшественники. Эти миелоидные стволовые клетки и различные гематопозитические клетки-предшественники, извлекаемые из них, идентифицируются посредством свойств колоний, которые они формируют на мягком агаре, в полутвердых метилцеллюлозных средах и т.п. в присутствии различных цитокинов.

[0053] В примере, показанном в таблице 2, для анализа остаточных CD3⁺-Т-клеток

в пробах аллогенного происхождения, необязательный аллогенный CD3-набор может комбинироваться с базовыми наборами, описанными в таблице 1. Комбинация обоих наборов предоставляет прошедшее проверку достоверности решение для комбинированного количественного определения CD34 и CD3 при проведении одного единичного отбора, с возможностью выбирать между тремя вариантами панели, описанными в данном документе.

[0054] Исходя из этой структуры, раскрытие сущности относится к автоматизированному проточно-цитометрическому способу, к примеру, к способу, показанному на фиг. 1B, для анализа и пересчета, по меньшей мере, одного из гематопозитических стволовых клеток, гематопозитических клеток-предшественников и Т-клеток, при этом способ содержит:

- помещение точных объемов одной или более проб крови (например, аликвот крови из идентичной пробы крови пациента) в одну или более емкостей планшета для проб, расположенного в зоне подготовки проб проточного цитометра;

- технологическую обработку одной или более емкостей, по меньшей мере, с помощью одного реагента для того, чтобы получать, по меньшей мере, одну первую композицию, причем, по меньшей мере, один, по меньшей мере, из одного реагента представляет собой, по меньшей мере, один визуализирующий реагент, содержащий распознающие элементы, конкретные для маркеров, по меньшей мере, для одного из гематопозитических стволовых клеток, гематопозитических клеток-предшественников и Т-клеток;

- инкубацию, по меньшей мере, одной первой композиции в течение периода времени, достаточного для связывания, по меньшей мере, одного визуализирующего реагента, содержащего распознающие элементы, конкретные для маркеров, по меньшей мере, для одного из гематопозитических стволовых клеток, гематопозитических клеток-предшественников и Т-клеток для того, чтобы обеспечивать, по меньшей мере, одну вторую композицию;

- технологическую обработку, по меньшей мере, одной второй композиции с помощью лизирующего реагента для того, чтобы обеспечивать, по меньшей мере, одну третью композицию; и

- анализ, по меньшей мере, одной третьей композиции посредством проточной цитометрии, чтобы получать, по меньшей мере, одно из количества жизнеспособных гематопозитических стволовых клеток и общего количества гематопозитических стволовых клеток, количества жизнеспособных клеток-предшественников и общего количества клеток-предшественников и количества жизнеспособных Т-клеток и общего количества Т-клеток в одной или более проб крови. Способ дополнительно может содержать выполнение точного добавления гранул для подсчета количества, затем анализ, по меньшей мере, одной третьей композиции посредством проточной цитометрии, чтобы получать, по меньшей мере, одно из количества жизнеспособных гематопозитических стволовых клеток и общего количества гематопозитических стволовых клеток, количества

жизнеспособных клеток-предшественников и общего количества клеток-предшественников и количества жизнеспособных Т-клеток и общего количества Т-клеток в одной или более проб крови. Первая композиция дополнительно может содержать краситель для демонстрации жизнеспособности в качестве примера, по меньшей мере, одного реагента. Как пояснено в данном документе, один пример красителя для демонстрации жизнеспособности представляет собой 7-аминоактиномицин D (7-AAD).

[0055] Как пояснено в данном документе, способы, описанные в данном документе, могут осуществляться с дублированными аликвотами крови из различных источников, описанных в данном документе. Альтернативно или помимо этого, способы, описанные в данном документе, могут осуществляться с отрицательным контролем (или без). См., например, тестовые панели таблицы 1 и таблицы 2. Отрицательный контроль может быть предназначен для CD34. Альтернативно, отрицательный контроль предназначен для CD3. Кроме того, как описано в данном документе, маркеры представляют собой, по меньшей мере, одно из CD45 (например, CD45-антигена, экспрессированного в определенных клеточных популяциях, включающих в себя гематопозитические стволовые клетки), CD3 (например, CD3-антигена, экспрессированного в определенных клеточных популяциях, включающих в себя Т-клетки) и CD34 (например, CD34-антигена, экспрессированного в определенных клеточных популяциях, включающих в себя гематопозитические стволовые клетки). Отрицательный контроль может представлять собой изотипический контроль или изоклонический контроль. При изоклоническом контроле, клетки окрашиваются в присутствии избытка идентичного немеченого антитела. Немеченое антитело занимает все связывающие участки, предотвращая специфическое связывание меченого антитела. Таким образом, любой сигнал, который обнаруживается, должен исходить из неспецифического связывания.

[0056] По меньшей мере, один визуализирующий реагент может представлять собой любой подходящий визуализирующий агент, включающий в себя визуализирующие агенты, содержащие средство формирования отчетов на основе люминесценции. Таким образом, например, визуализирующие агенты, предполагаемые в данном документе, могут представлять собой антитела, конъюгированные со средством формирования отчетов на основе люминесценции, в том числе, но не только, с FITC, PE, PC7 и т.п.

[0057] Способы, описанные в данном документе, могут предоставлять, по меньшей мере, одно из количеств жизнеспособных гематопозитических стволовых клеток и общих количеств гематопозитических стволовых клеток, количеств жизнеспособных клеток-предшественников и общих количеств клеток-предшественников и количеств жизнеспособных Т-клеток и общих количеств Т-клеток.

[0058] Способы, описанные в данном документе, также включают в себя автоматизированный проточно-цитометрический способ для анализа и пересчета, по меньшей мере, одного из гематопозитических стволовых клеток, гематопозитических клеток-предшественников и Т-клеток, при этом способ содержит:

- помещение первой пробы крови в первую емкость планшета для проб;

- технологическую обработку первой емкости, по меньшей мере, с помощью одного реагента для того, чтобы получать первую композицию f1, и инкубацию первой композиции f1, чтобы обеспечивать вторую композицию s1, причем, по меньшей мере, один, по меньшей мере, из одного реагента представляет собой, по меньшей мере, один визуализирующий реагент, содержащий распознающие элементы, конкретные для маркеров, по меньшей мере, для одного из гематопозитических стволовых клеток, гематопозитических клеток-предшественников и Т-клеток;

- в то время, когда первая композиция f1 инкубируется, помещение второй пробы крови во вторую емкость планшета для проб и технологическую обработку второй емкости, по меньшей мере, с помощью одного реагента, причем по меньшей мере, один, по меньшей мере, из одного реагента представляет собой, по меньшей мере, один визуализирующий реагент, содержащий распознающие элементы, конкретные для маркеров, по меньшей мере, для одного из гематопозитических стволовых клеток, гематопозитических клеток-предшественников и Т-клеток для того, чтобы получать первую композицию f2, и инкубацию первой композиции f2, чтобы обеспечивать вторую композицию s2;

- технологическую обработку вторых композиций s1 и s2 с помощью лизирующего реагента для того, чтобы обеспечивать третьи композиции t1 и t2; и

- анализ третьих композиций t1 и t2 посредством проточной цитометрии, чтобы получать, по меньшей мере, одно из количества жизнеспособных гематопозитических стволовых клеток и общего количества гематопозитических стволовых клеток, количества жизнеспособных клеток-предшественников и общего количества клеток-предшественников и количества жизнеспособных Т-клеток и общего количества Т-клеток.

[0059] В некоторых случаях, как описано в данном документе, способы дополнительно могут содержать дополнительную подготовку отрицательного контроля. Отрицательный контроль может подготавливаться перед первой композицией f1; отрицательный контроль может подготавливаться после первой композиции f1; или отрицательный контроль может подготавливаться после первой композиции f2.

[0060] Системы и способы, описанные в данном документе, имеют различные преимущества. Например, системы и способы, описанные в данном документе, упрощают операции посредством включения автоматизированной загрузки, подготовки проб, управления реагентами и сканирования штрих-кодов и отслеживания пациентов, а также анализа данных и возможностей двунаправленного LIS-соединения в одну платформу. Дополнительно, системы и способы, описанные в данном документе, предоставляют возможность добавления CD34+-пересчета в существующее программное обеспечение, так что большинство этапов способов, описанных в данном документе, могут автоматизироваться. Это достигается посредством использования лизирующего реагента красных кровяных клеток, который удовлетворяет критериям руководящих ISHAGE-принципов (например, без промывки, без добавления фиксаторов, без изменения характеристик рассеяния целевой популяции), но может храниться и обрабатываться при

комнатной температуре, является готовым к использованию без необходимости для ежедневной подготовки рабочего разбавления из основных растворов и является мягким для интересующих популяций. Примеры подходящих лизирующих реагентов включают в себя, но не только, лизирующий раствор VersaLyse, изготовленный подразделением Immunotech SAS (компания Beckman Coulter), Марсель, Франция. См., например, патент (США) номер 730797, который широко описывает лизирующие реагенты и содержится по ссылке как полностью изложенный в данном документе.

[0061] Растворы с гранулами, используемые для подсчета абсолютного количества (см. таблицы 1 и 2), имеют тщательно сбалансированную плавучесть, которая не требует отдельного смешивания перед каждым этапом пипетирования. Кроме того, склянка, которая содержит гранулы, идет со специальным колпачком, который исключает испарение.

[0062] Пробы загружаются с использованием либо автозагрузчика кассет, либо однотрубчатого загрузчика для STAT-проб, которые в таком случае приоритизируются относительно других проб в очереди. Это обеспечивает прозрачный поток обработки без необходимости прерывать текущие процессы. Подготовка проб может осуществляться в глубоколоночных планшетах с 96 лунками либо в любом подходящем планшете для проб, в котором пробы не только подготавливаются, но в котором пробы также технологически обрабатываются на этапе технологической обработки, который выполняется посредством автоматизированного пипеттора, выполненного с возможностью доставлять предварительно определенные объемы, по меньшей мере, одного реагента. Подготовка проб может осуществляться с помощью отдельных зондов для подготовки и анализа проб, так что оба этапа происходят параллельно, и пробы анализируются сразу, как только подготовка проб закончена.

[0063] Реагенты, используемые в системах и способах, описанных в данном документе, содержат уникальные идентификационные данные в виде штрих-кода для отслеживания даты истечения срока годности, истечения срока годности в организме, номеров партий и контейнеров. Потребление реагента и использование планшета отслеживается посредством систем, описанных в данном документе, по мере того, как пробы обрабатываются. Считыватель штрих-кодов сканирует реагент или планшет после первого применения, обеспечивая то, что информация "потребления" является безошибочной или, по меньшей мере, практически безошибочной. Системы, описанные в данном документе, считают, что контейнеры с реагентами или планшеты имеют полную емкость в первый раз, когда они "наблюдаются" посредством системы. Системы, описанные в данном документе, могут содержать систему отслеживания реагентов, к примеру, систему отслеживания реагентов AQUIOS Smart Track, присутствующую в проточном цитометре AQUIOS CL (Beckman Coulter Life Sciences, штат Индианаполис, IN), которая предоставляет отслеживание потребления в реальном времени, чтобы обеспечивать то, что реагенты с надлежащим датированием используются, и то, что достаточно реагента для каждой пробы; это исключает риск необходимости повторно

проводить единичный отбор проб вследствие недостаточных уровней реагентов или недостающих реагентов. Например, системы, описанные в данном документе, не должны проводить тест, если только они не обнаруживают необходимые флаконы для антител.

[0064] Системы, описанные в данном документе, имеют дополнительные преимущества. Например, системы, описанные в данном документе, могут иметь считыватель штрих-кодов трубок, который может автоматически считывать штрих-коды образцов без использования карманного сканера штрих-кодов. Система сопоставляет штрих-код на трубке с LIS-запросом. Идентификатор образца записывается перед аспирацией образца, чтобы предотвращать некорректную идентификацию, и идентификатор образца автоматически отслеживается в ходе проведения отбора.

[0065] Пример системы, которая может осуществлять способы, описанные в данном документе, включает в себя систему, показанную на фиг. 2-7 в форме диагностического инструмента 10. В проиллюстрированном примере, можно видеть часть 12 автозагрузчика, имеющую определенное число кассет 14 с образцами, загруженных в нее. В таком примере, кассеты 14 могут загружаться множеством идентичных трубок для образцов или флаконов 16 (в дальнейшем называемых "трубками"), множеством трубок 16 для образцов или просто одной трубкой 16 для образцов. Кассеты затем загружаются сверху в часть 12 автозагрузчика и обрабатываются в порядке приема. В альтернативе, например, когда требуется более быстрая обработка одиночных проб, трубка для образцов может вставляться непосредственно в альтернативную точку входа образца, например, в дверцу 18 (показана на фиг. 5) и обрабатываются до всех ожидающих кассет 14, как показано на фиг. 4. Это предоставляет STAT-доступ к тестированию для врача, с возможностью проводить тесты немедленно, за счет этого прерывая (но не оказывая отрицательное влияние) тестирование других трубок для образцов, если есть необходимость у врача. Дополнительно, трубка для образцов, которая имеет скомпрометированное либо вообще не имеет штрих-кодирования (поясняется ниже), может вставляться вручную.

[0066] Как подробно описано в данном документе, диагностический инструмент 10 иллюстративно выполняет следующие этапы после того, как трубка 16 для образцов (или кассета 14 с трубкой для образцов) принимается. Предполагается, что такие этапы выполняются посредством инструмента 10 без вмешательства врача, и этапы могут модифицироваться, добавляться или исключаться в зависимости от конкретного теста(ов), которые должны выполняться. Следует понимать, что хотя трубки для крови поясняются во всем раскрытии сущности, предполагается, что другие типы жидкостей организма и проб находятся в пределах объема раскрытия сущности и допускают анализ в предложенном инструменте 10. Например, костный мозг, сыворотка, моча, синовиальные, спинальные, перитонеальные, плевральные и другие типы жидкостей или проб могут тестироваться и анализироваться фактически так, как описано ниже.

[0067] Этапы, которые могут выполняться посредством инструмента 10, включают в себя: смешивание (например, взбалтывание) проб при нахождении по-прежнему в

трубках 16 для образцов (например, при нахождении в автозагрузчике); протыкание колпачка трубок 16 для образцов и забор проб требуемого количества образца; считывание штрих-кодов (либо любой другой формы пометки/идентификации) для того, чтобы подтвердить идентификатор пробы/пациента, и/или для того, чтобы подтвердить тип/размер трубки; сопоставление идентификатора теста(ов), который должен выполняться, и требуемых реагентов, и присваивание порядкового номера для отслеживания посредством компьютера; помещение образца/пробы в выбранные пустые трубки или лунки в зоне 20 локализации (показанной, например, как микротитрационный планшет на фиг. 2-4), для последующей обработки; добавление надлежащих реагентов в надлежащей последовательности, включающей в себя смешивание реагентов после добавления и временное распределение таким образом, чтобы надлежащим образом подготавливать пробы для тестов, которые должны выполняться; предоставление возможности пробам реагировать с реагентами в течение предписанных времен инкубации (переменных на основе реагента); разбиение пробы на множество трубок/лунок в зоне 20 локализации (при желании или необходимости для тестирования); отслеживание всех проб, кассет, реагентов и релевантных позиций через штрих-коды или другой тип отслеживающего устройства (например, RFID); своевременную аспирацию подготовленной комбинации проб/реагентов из зоны локализации и ее анализ через проточный цитометр (при подготовке последующих проб; автоверификацию результатов или хранение результатов для анализа, в зависимости от иницируемых врачом правил принятия решения.

[0068] Инструмент 10 предоставляет, в числе прочего, автоматизированный и интегрированный забор проб с образцами, что означает то, что каждый из вышеприведенных этапов (при необходимости для конкретных тестов) может выполняться в/посредством инструмента 10, без использования дополнительного диагностического оборудования. Кроме того, при необходимости для врача, эти этапы могут осуществляться вообще без взаимодействия от врача. Тем не менее, следует понимать, что инструмент 10 может быть выполнен с возможностью предупреждать врача в случае отказа или другой проблемы.

[0069] В проиллюстрированном примере, инструмент 10 использует одноосный держатель 22 зонда, который обеспечивает выполнение различных функций в то время, когда держатель 22 зонда перемещается вдоль одноосной дорожки 24. Например, держатель 22 зонда (и в силу этого зонд 26) может позиционироваться с возможностью вытягивать пробы из трубок 16, когда держатель 22 зонда находится в позиции А, может осаждать пробы в зоне 20 локализации в позиции В и может забирать пробы реагентов в позиции С. Если проба помещается в поворотный лоток 36 в какой-либо момент (например, для STAT-обработки пробы), инструмент 10 может считывать присутствие пробы и вставлять ее до любых проб, ожидающих обработку в автозагрузчике 12. Держатель 22 зонда затем может перемещаться в позицию D таким образом, что зонд 26 может забирать пробы из трубок, помещенных в поворотный лоток 36. Реагенты

осаждаются в зоне 20 локализации до или после того, как проба осаждается (либо как до, так и после), для реакции с пробой, требуемой посредством конкретного теста(ов), который должен выполняться, и могут непосредственно отслеживаться, как поясняется в данном документе.

[0070] Этапы могут выполняться в следующем порядке. Тем не менее, предполагается, что определенные тесты могут пропускать один или более этапов либо могут модифицировать этап для того, чтобы достигать наилучших результатов тестирования для требуемого анализа(ов) крови.

[0071] Во-первых, трубки 16 для образцов могут загружаться в предварительно сконфигурированную кассету 14, которая является подходящей для конкретных трубок 16 для образцов, которые должны использоваться. Например, трубки 16 для образцов могут иметь обычно предусмотренный размер трубки для образцов в 13 мм x 75 мм, причем в этом случае может использоваться кассета 14 с пятью трубками, показанная на фиг. 2 и 4. Тем не менее, следует понимать, могут использоваться что множество размеров и типов трубок 16 для образцов, и кассеты 14 могут проектироваться соответствующим образом. Кассета 14 даже может быть выполнена с возможностью удерживать множество трубок 16 для образцов. Как указано в данном документе, различные размеры трубок 16 для образцов также могут вставляться отдельно через дверцу 18, показанную на фиг. 6.

[0072] Если трубки 16 для образцов имеют колпачок 32, трубки для образцов (удерживаемые посредством кассеты 14) могут взбалтываться таким образом, что кровь перемешивается в трубке и становится более гомогенной (для более точного забора проб). Такое взбалтывание может осуществляться в станции А, и кассет 14 показана во взболтанной позиции на фиг. 4.

[0073] Во время взбалтывания кассеты 14, держатель 22 зонда может быть направлен таким образом, что он перемещается в станцию С и начинает забор проб надлежащих частей реагентов 34 для тестов, которые должны выполняться. Тем не менее, если тест не предполагает помещение реагентов 34 в зону 20 локализации до пробы крови, то держатель 22 зонда может выполнять такой этап после забора проб крови из трубки 16.

[0074] Реагенты 34 (например, реагенты, описанные в таблицах 1 и 2) могут храниться во флаконах, как можно видеть в позиции С. Тем не менее, реагенты альтернативно или дополнительно могут храниться в резервуарах, позиционированных в другом месте, к примеру, на удерживателе 30 планшета (показан на фиг. 2 и 3) или в других зонах (не показаны), которые, например, могут вертикально проникать непосредственно в зонд 26.

[0075] Как изложено в данном документе, диагностический инструмент 10 также предполагает то, что врач может вставлять трубку 16 для образцов через внешнюю дверцу 18. Чтобы учитывать это, приемник 38 трубок предоставляется в проиллюстрированном инструменте 10, и такой приемник трубок может размещать множество типов трубок 16 для образцов, включающих в себя педиатрические трубки, как можно видеть на фиг. 3-5. В проиллюстрированном примере, трубки 16 для образцов могут удерживаться

посредством поворотного лотка 36, который обеспечивает простой доступ и извлечение трубок 16 для образцов. Альтернативно, как показано на фиг. 4, трубки 16 для образцов могут удерживаться посредством вращающейся кассеты 40.

[0076] В промежутках между и после забора проб образцов и/или реагентов 34, держатель 22 зонда может перемещаться в станцию 28 промывки зонда таким образом, что зонд 26 может промываться. Промывка зонда 26 предотвращает перекрестное загрязнение и в силу этого предотвращает неточные результаты тестирования.

[0077] После того, как выполняется достаточное смешивание образца в трубках (например, в станции А), пробы образца забираются посредством зонда 26 и осаждаются в предварительно определенных лунках или трубках в зоне 20 локализации. В зависимости от теста(ов), которые должны выполняться, таких как анализ и пересчет, по меньшей мере, одного из гематопоэтических стволовых клеток, гематопоэтических клеток-предшественников и Т-клеток с использованием способов, описанных в данном документе, пробы с образцами могут помещаться более чем в одну лунку или трубку, и соответствующее количество образца (к примеру, крови) может аспирировать заранее. Зонд 26 затем промывается в промывочной станции 28, как описано в данном документе.

[0078] В зависимости от того, добавляются или нет реагенты в пробы с образцами после их осаждения в зоне 20 локализации, держатель 22 зонда может перемещаться в станцию С для забора проб надлежащего реагента(ов) 34. С другой стороны, если требуется более одного реагента, зонд 26 может промываться в промывочной станции 28 между каждым забором проб реагентов 34 и после конечного забора проб реагентов 34.

[0079] Чтобы осадить пробы с образцами и реагенты в каждой лунке или трубке зоны 20 локализации, удерживатель 30 планшета может позиционироваться на оси вращения таким образом, что каждая лунка или трубка может представляться в зонд 26, в зависимости от точки вращения удерживателя 30 планшета. Такая конфигурация и вращательное перемещение удерживателя 30 планшета раскрыты в патенте (США) номер 7832292, который содержится в данном документе по ссылке.

[0080] Хотя многоосный держатель зонда также может достигать этих целей, имеются определенные преимущества для одноосного устройства. Например, одноосное устройство требует меньшего числа частей и меньшего программирования, приводит к меньшему занимаемому инструментом 10 месту, проще в совмещении, является более надежным и более стабильным и в конечном счете более быстрым при перемещении между станциями.

[0081] После помещения в лунки или трубки, пробы с образцами оставляются для того, чтобы реагировать с реагентами в течение конкретного количества времени (в зависимости от реагентов и тестов, которые должны выполняться), и затем обрабатываются через проточный цитометр для анализа. Предполагается, что также может быть включено другое тестовое оборудование, такое как оборудование, которое использует электронный объем для установления размеров и дифференцирования клеток или измерения гемоглобина с использованием поглощательной способности.

[0082] В целях удобства, зона 20 локализации служит в качестве общего сопрягающего участка между подготовкой и анализом проб. Кроме того, зона 20 локализации может включать в себя стационарные или съемные и/или одноразовые или многоразовые компоненты, позволяя врачу по своему выбору выбрасывать весь сопрягающий участок (например, микротитрационный планшет) после использования. За счет выступления в качестве общего сопрягающего участка между подготовительной ветвью и аналитической ветвью, зона 20 локализации предоставляет систему с меньшей подверженностью ошибкам и воздействиям внешней или окружающей среды.

[0083] Процессор и программный планировщик, выполненный с возможностью выполняться с помощью процессора (не показан), также включаются в раскрытую систему. Программный планировщик может программироваться, например, с возможностью повторно вычислять доступные окна для фиксированной реакционной кинетики (оптимизации пропускной способности при поддержании воспроизводимой реакционной кинетики) (например, инкубации с антителами, время RBC-лизирования, время гашения реакции и т.д.). Пример программной компонентной системы, которая может использоваться в способах и системах, описанных в данном документе, показывается на фиг. 8.

[0084] Кроме того, как пояснено в данном документе, множество элементов могут штрих-кодироваться и отслеживаться в ходе работы. Такое штрих-кодирование и отслеживание может регистрироваться посредством программного планировщика. Например, штрих-коды могут назначаться флаконам 34 для реагентов, трубкам 16 для образцов (с различными штрих-кодами для различных пациентов и/или размеров), проточным жидкостям, общим сопрягающим участкам (например, зонам 20 локализации), подготовительным реагентам, реагентам с гранулами, кассетам 14 и т.д. За счет штрих-кодирования этих различных элементов, множество значимой информации может отслеживаться, к примеру, использование/потребление реагентов, то, сколько тестов остается для каждой склянки для реагентов, истечение срока годности в открытом контейнере, истечение срока годности в закрытом контейнере, результаты анализа и т.д.

[0085] Программный планировщик может быть выполнен с возможностью выполнять этапы, описанные на фиг. 8, и/или следующие этапы: определять то, сейчас подходящий момент или нет для того, чтобы добавлять новую пробу в это время, и удерживать дверцу или мультизагрузчик (произвольный доступ), если другая активность должна иметь приоритет; минимизировать эффект недоступности дверцы 18 для доступа к пробам посредством регулирования некинетических реакций, если возникают, либо кинетических реакций, которые имеют более широкое приемлемое окно; минимизировать эффекты коллизии и оптимизировать пропускную способность посредством задания приемлемых окон для каждой кинетической реакции; принудительно активировать анализ в течение предварительно определенного количества времени (прекращать согласно времени/фиксированному объему пробы); использовать предварительно определенные времена для каждого цикла (получение крови, добавление реагентов, включающее в себя

смешивание, анализ), так что все активности могут надлежащим образом диспетчеризоваться; учитывать все диспетчеризованные окна времени забора проб при определении того, приемлемо или нет добавлять новую пробу в расписание, и диспетчеризовать такую новую пробу таким образом, что все ее активности осуществляются в предварительно определенные времена; и учитывать аппаратные ресурсы и коллизии физических аппаратных средств при определении того, можно или нет придерживаться расписания.

[0086] При использовании инструмента 10 в комбинации с программным планировщиком, раскрытым в данном документе, время до получения первого результата (TFR) может быть меньше часа, при этом отчеты с последующими результатами формируются приблизительно каждые 30 минут или меньше. Пропускная способность может составлять более 5, более 10, более 20, более 30, более 40, более 50, более 60, более 70, более 80, более 90 либо более 100 проб в день, и отчеты с результатами могут формироваться гораздо быстрее и раньше днем, так что пропускная способность лаборатории может значительно увеличиваться.

[0087] В проиллюстрированном примере, анализ данных для получения подлежащих формированию отчетов результатов автоматизируется (например, задание логических вентилях, областей и курсоров, а также пометка флагом или уведомление относительно подозрительных результатов). Аспект пометки флагом/уведомления может называться "признаком автоверификации" в системе.

[0088] Когда вся подготовка и анализ проб полностью интегрированы в одном инструменте 10, клиника не должна выполнять медленную и трудоемкую "обработку партиями", в которой пробы собираются, и обработка начинается после того, как достаточное число собирается, с прохождением через каждый этап обработки крови для всей группы проб. В отличие от этого, инструмент 10 выполнен с возможностью автоматически подготавливать пробы пациента в зоне 20 локализации, так что отсутствуют дочерние трубки для пометки и отслеживания, и требуется значительно меньшее количество крови и реагентов. Пробы могут загружаться в систему в любое время, и в одном примере, каждая из них должна автоматически обрабатываться и выходить из системы труб менее чем через час, к примеру, менее чем через 30 минут, менее чем через 20 минут либо менее чем через 15 минут. Последующие пробы могут выходить из системы труб в течение приблизительно 30-минутных или менее интервалов, хотя точные времена должны варьироваться в зависимости от тестов, которые должны выполняться, и требуемых времен подготовки проб.

[0089] Значительное преимущество представляет собой снижение затрат для лаборатории. Мало того, что большее количество проб может обрабатываться за один день, за счет использования одной системы предусмотрены более низкие системные затраты, более низкие затраты на реагенты и сниженные трудозатраты на обработку с участием оператора. Соответственно, общие затраты на то, чтобы владеть и обеспечивать работу инструмента 10, являются гораздо более низкими.

[0090] Помимо этого, процессы и системы предшествующего уровня техники, с несколькими модулями и экранами компьютера, занимают от 10 до 13 футов ценного пространства на лабораторном столе. В отличие от этого, диагностический инструмент 10 является компактным, с размером только 31 дюйм по ширине, вместе с частью 12 автозагрузчика. Пример, показанный на фиг. 6, без части автозагрузчика, требует еще меньшего занимаемого места. Компьютер с сенсорным экраном/экран (не показан) также может ставиться сверху на систему, поддерживая небольшим занимаемое место и освобождая ценное пространство для лаборатории.

[0091] Предполагается, что предложенная система также может использоваться для клинических исследований, проводящих отбор одной или более фиксированных панелей иммунологического надзора для исследований по контракту, разработки и исследований фармацевтических средств в университетских медицинских центрах и референтных лабораториях. Дополнительно предполагается, что в дополнение к описанным тестам для анализа и пересчета стволовых и Т-клеток, существующие стандартизированные панели иммунологического мониторинга могут использоваться для мониторинга иммунодефицита (ВИЧ/СПИДа), аутоимунных заболеваний, реакции на трансплантацию органов, инфекционных заболеваний, онкологии и т.п. Оба варианта применения могут выполняться в системе параллельно.

[0092] В общем, две характеристики способствуют производительности: разрешение (способность измерять две частицы с идентичной величиной люминесценции и назначать им идентичное значение); и чувствительность (способность дифференцироваться между тусклой частицей и немного более яркой частицей). Чтобы измерять эти характеристики, "микросферы" или "гранулы" могут использоваться в данном документе. Эти микросферы, например, могут изготавливаться из меченых люминофором материалов, которые имеют известные люминесценции. Когда такие микросферы проходят через проточный цитометр, выполняются определенные тесты, которые отражают значения разрешения и чувствительности, измеряемые посредством проточного цитометра.

[0093] После теста с использованием гранул может проводиться другой тест, чтобы обеспечивать то, что используемые реагенты работают надлежащим образом. Пользователи с подготовкой в области техники проточных цитометров выполняют определения, в основном на основе опыта или собственного (меняющегося) понимания, в отношении того, "оптимизирован" или нет проточный цитометр в достаточной степени таким образом, что он может выполнять требуемые диагностические тесты в этот день.

[0094] Диагностические тесты, которые должны выполняться посредством проточного цитометра, могут иметь отличающиеся минимальные потребности в отношении разрешения и чувствительности по сравнению с тестами с использованием гранул и реагентов, которые являются доминирующими в отрасли. Может иметь место то, что тесты с использованием гранул и реагентов должны указывать врачу то, что проточный цитометр не оптимизируется, тогда как в реальности, проточный цитометр

работает в достаточной степени для того, чтобы выполнять требуемые диагностические тесты: он просто не проходит гипотетические тесты с использованием гранул и реагентов.

[0095] Следовательно, может быть желательным использовать известную пробу пациента, например, контроль обработки крови, так что любой недостаток в разрешении или чувствительности может сужаться до производительности реагентов и инструмента. Когда используется известная проба пациента, например, контроль крови, только производительность реагентов и инструмента может затрагивать результаты теста по разрешению и чувствительности.

[0096] В некоторых случаях, известная проба пациента может использоваться в качестве контрольной пробы/начальной тестовой пробы. Известная проба пациента характеризуется как имеющая отличимые популяции, например, по меньшей мере, два типа клеток, которые являются аналогичными или идентичными популяциям, которые должны диагностироваться посредством этого конкретного инструмента. В примере диагностического устройства, которое должно выполнять стандартизированные панели иммунологического мониторинга, к примеру, панели, показанные на фиг. 2-7, известная проба должна иметь содержимое клеток, которое включает в себя типы клеток (например, гематопозитические стволовые CD34+-клетки), которые должны анализироваться посредством инструмента 10.

[0097] Согласно этому примеру, после того как единичный отбор известной пробы пациента проводится через инструмент 10, подвергаемый оценке, результаты должны указывать то, может или нет инструмент 10 обнаруживать множество популяций клеток. Если разрешение и чувствительность инструмента оптимизируется, различные популяции клеток должны указываться в результатах. Программное обеспечение может использоваться для того, чтобы вычислять рассеяние света выключения, ECV и/или данные люминесценции способами, описанными в данном документе.

[0098] Раскрытый пример также может использоваться для того, чтобы извлекать статистику, с тем чтобы измерять разрешение и чувствительность инструмента 10 для конкретного параметра в конкретном тесте и количественно определять его с точки зрения достаточности для проведения теста. Такая статистика затем может использоваться для того, чтобы определять то, являются ли материалы, используемые в тесте. Например, статистика может использоваться для того, чтобы задавать минимальные потребности в отношении разрешения и чувствительности из комплекта из цитометра/реагента и затем анализировать то, работает ли комплект из цитометра/реагента надлежащим образом для того, чтобы проводить тест для любого пациента. Статистика также может использоваться для того, чтобы определять то, должны ли или нет данные из предыдущей пробы пациента приемлемо считаться точными. Конечный результат также может представлять собой числовое средство категоризации производительности для теста.

Примеры

Пример 1. Пересчет гематопозитических CD34+-клеток-предшественников и

остаточных CD3+-Т-клеток с помощью системы, описанной в данном документе:
Верификация эквивалентности протокола тестирования

Справочная информация

[0099] В связи с растущим использованием мобилизованных, периферийных стволовых клеток и клеток-предшественников (PBSC) для целей трансплантации, авторы Sutherland и др., совместно с Международным обществом гематотерапии и трансплантационной инженерии (ISHAGE), описали в 1996 году набор стандартов для CD34+-пересчета с намерением предоставлять простой чувствительный способ, который обеспечивает высокую степень точности и межлабораторной воспроизводимости. Полученные в результате "руководящие ISHAGE-принципы" вскоре стали золотым стандартом для пересчета гематопозитических CD34+-клеток-предшественников посредством проточной цитометрии.

[00100] Отличительная черта руководящих ISHAGE-принципов заключается в стратегии последовательного стробирования, которая извлекает число CD34+-клеток из жизнеспособных лейкоцитов. Руководящие принципы также требуют проведения тестов с дублированием вместе с отрицательным контролем, чтобы корректировать вариабильность тестирования и неспецифическое связывание клеток и флуорохрома. Вследствие избирательности последовательного стробирования, использование отрицательного контроля задано необязательным авторами руководящих ISHAGE-принципов в последующие годы; тем не менее, Европейская фармакопея (Ph. Eur.) предписывает его использование. В отличие от руководящих ISHAGE-принципов, стандарты, описанные в Ph. Eur., являются юридически обязательными, как изложено в Конвенции Совета Европы относительно разработки европейской фармакопеи и в фармацевтическом законодательстве ЕС и отдельных стран.

[00101] Текущие доступные программные решения, которые представляют собой часть IVD-системы, не предоставляют гибкость в том, чтобы проводить отбор панелей для CD34+-пересчета с или без отрицательного контроля при поддержании IVD-состояния. Помимо этого, не все наборы реагентов для CD34+-пересчета содержат реагент отрицательного контроля. Лаборатории в силу этого обязаны проверять достоверность собственных определяемых пользователем тестов.

[00102] В случае если стволовые клетки и клетки-предшественники пересаживаются в аллогенном (чужеродном) окружении, рекомендуется количественно определять не только число CD34+-клеток-предшественников, но также и число иммунных компетентных остаточных CD3+-Т-клеток в трансплантате, чтобы прогнозировать и управлять потенциальным заболеванием "трансплантат против хозяина". На сегодняшний день отсутствует доступный коммерческий IVD-набор, который предоставляет возможность одновременного анализа CD34+-клеток-предшественников и остаточных CD3+-Т-клеток, так что лаборатории снова должны основываться на проверке достоверности определяемых пользователем тестов для этого варианта применения.

Система AQUIOS STEM

[00103] Система, описанная в данном документе, предназначена, в числе прочего, для того, чтобы преодолевать эти ограничения за счет предоставления в сумме шести (6) различных панелей для получения данных для клинического CD34+-пересчета (фиг. 9). Все протоколы придерживаются стратегии последовательного стробирования из руководящих ISHAGE-принципов, и панели предоставляют вариант проводить отбор либо "полной" панели из трех тестов (с дублированием плюс отрицательный контроль), как предложено посредством ISHAGE и предписано посредством Ph. Eur., либо необязательной ISHAGE-панели без использования отрицательного контроля, либо одиночный тест, который может использоваться для целей QC для редких типов образцов. Все комбинации панелей представляют собой часть IVD-решения без необходимости создавать определяемые пользователем тесты.

[00104] Для анализа остаточных CD3+-Т-клеток в пробах аллогенного происхождения, необязательный AQUIOS STEM ALLO-CD3-набор может комбинироваться с базовым AQUIOS STEM-набором. Комбинация обоих наборов предоставляет прошедшее проверку достоверности решение для комбинированного количественного определения CD34 и CD3 при проведении одного единичного отбора, снова с возможностью выбирать между тремя вариантами панели, описанными в данном документе на фиг. 9.

Способ тестирования

[00105] Проточный цитометр AQUIOS CL представляет собой одну систему, которая может использоваться для того, чтобы реализовывать способы, описанные в данном документе, и количественный автоматизированный анализатор, который выполняет диагностические STEM-варианты применения в процессе подготовки проб "без промывки". Поскольку эта система имеет намерение представлять собой автоматизированный анализатор с обработкой проб без участия оператора от введения образца до отчетов с результатами, она называется "проточным цитометром типа "загрузи и работай"". Программное обеспечение системы AQUIOS и AQUIOS STEM-тесты и реагенты для контроля качества не требуют пользовательской верификации для стандартизации интенсивностей рассеяния света и люминесценции либо верификации настроек компенсации цвета.

[00106] Автоматический режим работы инициируется посредством создания запросов и загрузки кассеты, содержащей трубки для образцов, в автозагрузчик или трубку для образцов в однотрубчатом загрузчике. Пробы автоматически обрабатываются согласно этим запросам. Проба окрашивается и инкубируется, красные кровяные клетки лизируются с использованием лизирующего AQUIOS STEM-раствора. Белые кровяные клетки анализируются в проточно-цитометрической системе AQUIOS CL с помощью AQUIOS STEM-тестов. Подготовка STEM-проб оптимизируется, чтобы работать с использованием штрих-кодированных глубоколоночных планшетов с 96 лунками с коническими глубокими лунками. Каждая лунка удерживает вплоть до 600 мкл.

[00107] Система AQUIOS STEM может использовать вплоть до двух наборов: AQUIOS STEM-набор отдельно или в комбинации с AQUIOS STEM ALLO-CD3-набором. Реагенты из AQUIOS STEM-набора состоят из мышинового реагента с моноклональными антителами CD45-FITC/CD34-PE, соответствующего отрицательного контроля (CD45-FITC/CD34-CTRL), реагента для подсчета абсолютного количества (флуоросфер для подсчета количества в системе AQUIOS STEM), реагента для демонстрации жизнеспособности клеток (7-AAD) и готового к использованию лизирующего реагента. AQUIOS STEM ALLO-CD3-набор представляет собой необязательный набор реагентов для одновременного пересчета CD3+-Т-клеток и CD34+-клеток в материале проб от аллогенных доноров. Набор содержит CD3-PC7, а также надлежащий отрицательный контроль.

[00108] AQUIOS STEM-тесты используют реагенты из AQUIOS STEM-набора, содержащие моноклональные антитела, для одновременной идентификации и пересчета абсолютного количества жизнеспособных CD34+-НПС/мкл, абсолютного количества жизнеспособных CD45+/мкл и процентной доли жизнеспособных CD34+-НПС. Три AQUIOS STEM-теста доступны в качестве части AQUIOS STEM-меню (фиг. 9): STEM-панель: проведение тестов с дублированием плюс отрицательный контроль (3 лунки); STEM-тест с дублированием: проведение тестов с дублированием (без отрицательного контроля; 2 лунки); одиночный STEM-тест: одиночный тест (1 лунка).

[00109] AQUIOS STEM ALLO-тесты используют реагент из AQUIOS STEM-набора в комбинации с реагентами из AQUIOS STEM ALLO-CD3-набора. Комбинация двух наборов содержит моноклональные антитела и обеспечивает возможность одновременной идентификации и пересчета абсолютного количества жизнеспособных CD34+-НПС/мкл, абсолютного количества жизнеспособных CD45+/мкл, абсолютного количества жизнеспособных CD3+/мкл и процентной доли жизнеспособных CD34+-НПС. Три AQUIOS STEM ALLO-теста доступны (фиг. 9): STEM ALLO-панель: проведение тестов с дублированием плюс отрицательный контроль (3 лунки); STEM ALLO-тест с дублированием: проведение тестов с дублированием (без отрицательного контроля; 2 лунки); одиночный STEM ALLO-тест: одиночный тест (1 лунка).

[00110] Все тесты используют 43 мкл пробы, окрашенной с 13 мкл каждого реагента (моноклональных антител и красителя для демонстрации жизнеспособности). После 15 минут инкубации, проба лизируется с использованием 430 мкл лизирующего реагента, затем подсчет количества в системе AQUIOS-STEM добавляется после лизирующей инкубации приблизительно в течение 15 минут. Проба затем смешивается и аспирирует для анализа. Для AQUIOS STEM/STEM ALLO-теста с дублированием или AQUIOS STEM/STEM ALLO-панели, 2 или 3 лунки используются, соответственно.

Цель и объем исследования

[00111] В качестве части характеристики продукта, это исследование проведено для того, чтобы сравнивать эквивалентную производительность абсолютных количеств жизнеспособных CD34+ и абсолютных количеств CD3+-Т-клеток для вариантов анализа,

обобщенных на фиг. 9.

[00112] 40 свежих проб аферезиса собраны и проанализированы. Чтобы оценивать эквивалентность между вариантами тестирования для CD34+-пересчета, вариант анализа "STEM-панель" (CD34 с дублированием плюс отрицательный контроль) использован в качестве опорного варианта для двух дополнительных вариантов анализа "STEM-тест с дублированием" (CD34 с дублированием без отрицательного контроля) и "одиночный STEM-тест" (одиночный тест).

[00113] Идентичная схема тестирования выполнена для CD34+- и CD3+-пересчета с вариантами анализа, которые могут включать в себя CD3 в качестве дополнительного маркера, посредством использования протоколов анализа "STEM ALLO-панель" (CD34 и CD3 с дублированием плюс отрицательный контроль) в качестве опорных протоколов для двух дополнительных вариантов анализа "STEM ALLO-тест с дублированием" (CD34 и CD3 с дублированием без отрицательного контроля) и "одиночный STEM ALLO-тест" (одиночный тест для CD34 и CD3).

[00114] Исследование выполнено согласно документу "CLSI EP09c: Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guidelines - Third Edition". Пробы проанализированы с использованием проточного цитометра AQUIOS CL, оснащенного программным обеспечением AQUIOS STEM и реагентами системы AQUIOS STEM.

Тестовая конструкция

[00115] Ежедневный запуск и выключение инструмента AQUIOS CL, используемого в исследовании, выполняется согласно инструкциям по применению изготовителя. Работы по техобслуживанию записываются в журнал технического обслуживания.

[00116] Ежедневное проведение контроля качества (QC) и контроля процессов осуществляется с помощью флуоросфер для контроля расхода и управляющих CD34-клеток AQUIOS STEM, чтобы подтверждать совмещение инструмента и обеспечивать производительность в рамках назначенных результатов анализа.

[00117] Пробы аферезиса, используемые для исследования, собираются с ACD-A в качестве антикоагулянта и хранятся при 2-8°C до использования. Пробы либо используются неразбавленными, если количество белых кровяных клеток ниже 30000 клеток/мкл, либо в противном случае разбавляются в PBS/6%-ом бычьим сывороточном альбумине (BSA) до концентрации белых кровяных клеток, не превышающей 30000 клеток/мкл. Отдельные аликвоты каждой пробы аферезиса используются в сумме для 12 проведений согласно вариантам тестирования, обобщенным на фиг. 1. Гемолизированные образцы и образцы, содержащие видимые сгустки, исключаются.

[00118] Анализ данных выполняется согласно документу "CLSI EP09c" посредством использования взвешенной регрессии Деминга. Верхние и нижние 95%-ые доверительные пределы оцененного смещения вычисляются на основе стандартной ошибки смещения и сравниваются с приемлемыми пределами (техническими

требованиями) изготовителя.

Результаты

Эквивалентность тестовых вариантов системы AQUIOS STEM для абсолютных количеств CD34+

[00119] Результат трансплантации гематopoэтических клеток-предшественников зависит от успешной инфузии достаточного числа живых CD34+-клеток для того, чтобы воссоздавать гематopoэз в получателе, так что точное определение CD34+-клеток посредством проточной цитометрии представляет собой ключевой компонент в процедуре трансплантации.

[00120] В отличие от другого решения для CD34+-пересчета, система AQUIOS STEM предлагает в сумме 6 различных протоколов для CD34+-пересчета, с или без необязательного анализа CD3+-Т-клеток (фиг. 9). Чтобы демонстрировать эквивалентность между этими различными вариантами тестирования, единичный отбор аликвот из идентичных проб проводится с различными вариантами и анализируется на предмет корреляции.

[00121] В первом наборе экспериментов, абсолютное число CD34+ клеток/мкл оценено посредством проведения отбора проб аферезиса с тремя вариантами протокола анализа, которые не включают в себя CD3 (STEM-панель, STEM-тест с дублированием, одиночный STEM-тест), чтобы демонстрировать эквивалентность для пересчета CD34 между этими тремя вариантами (фиг. 10A-10C). Для сравнения вариантов анализа, в которых тесты выполняются с дублированием (STEM-панель по сравнению с STEM-тестом с дублированием, фиг. 10A), среднее значение обоих проведений единичного отбора использовано для анализа. При сравнении тестовых вариантов, которые включают в себя дублированные проведения единичного отбора, с тестовым вариантом с одним проведением единичного отбора (STEM-панель по сравнению с одиночным STEM-тестом (фиг. 10B) и STEM-тест с дублированием по сравнению с одиночным STEM-тестом (фиг. 10C)), результат первого проведения единичного отбора использован в качестве опорного результата. Для всех проанализированных регрессионных пар, продемонстрировано, что эквивалентная производительность абсолютных количеств жизнеспособных CD34+-клеток для вариантов анализа находится в пределах заданных критериев приемлемости.

[00122] Во втором наборе экспериментов, число CD34+-клеток проанализировано посредством использования трех протоколов анализа, которые предназначены для параллельного пересчета CD34+- и CD3+-клеток; все другие критерии поддерживаются идентичными (фиг. 11A-11C). С другой стороны, для всех проанализированных регрессионных пар, продемонстрировано, что эквивалентная производительность абсолютных количеств жизнеспособных CD34+-клеток для вариантов анализа находится в пределах заданных критериев приемлемости также для протоколов анализа с CD3.

[00123] В общих словах, все шесть вариантов анализа для CD34+-пересчета, с или без CD3, предоставляют эквивалентные результаты для проанализированных пар корреляции.

Эквивалентность тестовых вариантов системы AQUIOS STEM для пересчета остаточных CD3+-Т-клеток

[00124] В случаях гематологических заболеваний или доброкачественной дисфункции гематопозитической системы, CD34+-клетки собираются из периферической крови (PB), костного мозга (BM) или пуповинной крови (CB) чужеродных (аллогенных) доноров. Аналогично аутологичным окружениям, в которых донор и получатель представляют собой идентичного человека, мобилизованная PB сегодня представляет собой наиболее часто используемый источник для стволовых CD34+-клеток и CD34+-клеток-предшественников в схемах на основе аллогенных трансплантатов.

[00125] Использование CD34+-клеток из мобилизованной периферической крови имеет преимущество относительно быстрого восстановления гематопоза после трансплантации, но сопровождается повышенным риском острого заболевания "трансплантат против хозяина" (aGvHD) вследствие более высокого числа циркулирующих Т-клеток. Поскольку острое и хроническое GvHD затрагивает приблизительно 30-40% пациентов, которые подвергаются аллогенной трансплантации, и донорные Т-клетки признаются играющими центральную роль в опосредовании aGvHD, пересчет CD3+-Т-клеток в трансплантате вместе с CD34+-клетками становится общепринятой практикой во многих лабораториях.

[00126] В дополнение к стандартным протоколам тестирования для CD34+-пересчета, система AQUIOS STEM предоставляет возможность анализировать CD3+-Т-клетки вместе с CD34+-клетками при проведении одного единичного отбора. Чтобы обеспечивать эквивалентность тестовых вариантов не только для CD34+-анализа, но также и для CD3+-пересчета, выполнен третий набор экспериментов, который сравнивает результат CD3+-пересчета для этих 3 вариантов анализа, описанных в данном документе (фиг. 12A-12C). Что касается CD34+, продемонстрировано, что эквивалентная производительность жизнеспособных абсолютных количеств CD3+-клеток для вариантов анализа находится в пределах заданных критериев приемлемости для всех проанализированных регрессионных пар.

Заключение

[00127] Система AQUIOS STEM представляет собой модульный подход для автоматизированного анализа гематопозитических стволовых CD34+-клеток и CD34+-клеток-предшественников на проточном цитометре AQUIOS CL и имеет намерение преодолеть ограничения текущих доступных решений с точки зрения гибкости панелей и анализов.

[00128] Данное исследование рассматривает вопрос в отношении того, в какой мере тестовые варианты, предлагаемые посредством системы, приводят к эквивалентным данным для абсолютных количеств CD34+ и CD3+, чтобы исключить потенциальное смещение посредством выбора одного варианта, а не другого.

[00129] В общих словах, можно продемонстрировать эквивалентность данных для всех проанализированных регрессионных пар, и продемонстрировано, что эквивалентная

производительность абсолютных количеств жизнеспособных CD34⁺-клеток и абсолютных количеств жизнеспособных CD3⁺ для вариантов анализа находится в пределах заданных критериев приемлемости.

Пример 2. Сравнение потоков обработки между системой AQUIOS STEM и ее утвержденным способом, STEM-набором для FC500.

Справочная информация

[00130] Сегодня более 50000 трансплантаций гематопозитических стволовых клеток и клеток-предшественников (НРС) ежегодно выполняются во всем мире для лечения нескольких гематологических злокачественных образований, а также для негематологических индикаторов.

[00131] Клинические лаборатории основываются на предлагаемых на рынке IVD-решениях для CD34⁺-НРС-пересчета во избежание времязатратной и ресурсоемкой проверки достоверности определяемых пользователем тестов. Большинство наборов реагентов и программных пакетов разработаны в качестве ответа на руководящие ISHAGE-принципы от 1996 и 1998 года, но с этого момента не обновляются, чтобы удовлетворять совершенствующимся требованиям диагностических лабораторий, в частности, с точки зрения возможностей автоматизации. В гематоонкологических лабораториях, НРС-пробы зачастую поступают в качестве экстренных (STAT) проб в лабораторию и требуют пристального внимания, нарушая рутинный поток обработки. Любые сложности с этими пробами дублируют усилия и в силу этого увеличивают потенциал для человеческой ошибки. Для этих лабораторий, должно быть желательным интегрировать НРС-пробы в нормальный поток обработки, в идеале таким способом, который минимизирует риск ошибок при заборе проб или других сложностей, поскольку анализ CD34⁺-НРС является критичным по времени.

[00132] Этот пример сравнивает поток обработки новой разработанной системы AQUIOS STEM для автоматизированного CD34⁺-пересчета с утвержденным способом, STEM-набором для проточного цитометра FC500 (оба из означенного предоставлены компанией Beckman Coulter, Inc.), с точки зрения времени полного рабочего цикла и времени обработки с участием оператора.

Общее представление традиционного потока обработки при проточной цитометрии

[00133] Многие традиционные решения на основе проточной цитометрии для CD34⁺-пересчета, такие как STEM-набор компании Beckman Coulter для FC500, требуют подготовки проб вручную, создания рабочих списков вручную, анализа данных вручную и табулирования числовых данных вручную. Этот поток обработки может приводить к большему времени проведения единичных отборов, большему времени обработки с участием оператора и требует более опытных операторов.

[00134] Чтобы выполнять тест для CD34⁺-пересчета с помощью утвержденного способа (STEM-набора для FC500), оператор обязан вручную проверять совмещение инструмента, подготавливать контроли для того, чтобы верифицировать и регулировать

избыток флуорохрома (для компенсации), подготавливать и выполнять контроли процессами и в завершение подготавливать и проводить единичный отбор фактических проб пациента/донора. Результирующие данные должны верифицироваться и переноситься вручную в лабораторную информационную систему (LIS). Журналы учета реагентов и показателей контроля качества (QC) типично ведутся вручную. См. фиг. 13 на предмет характерного потока обработки при проточной цитометрии вручную.

Общее представление потока обработки в проточном цитометре AQUIOS CL

[00135] AQUIOS CL представляет собой автоматизированную систему, которая выполняет большинство подготовительных этапов, приводящих к результату тестирования, так что большинство этапов подготовки вручную исключаются.

[00136] Для системы AQUIOS STEM для CD34+-пересчета на AQUIOS, оператор должен загружать реагенты в систему однократно, запускать инструмент, проводить единичный отбор QC-проб и затем быть готовым загружать и анализировать пробы пациента в течение всего оставшегося рабочего дня (фиг. 14).

Сравнительный протокол

[00137] Цель этого практического исследования, в числе прочего, заключается в том, чтобы оценивать конструкцию проточного цитометра AQUIOS CL для CD34+-пересчета и моделировать его результирующий поток обработки через сравнение с STEM-набором компании Beckman Coulter для FC500 (с утвержденным способом). Это практическое исследование оценивает следующие параметры потока обработки:

[00138] Время полного рабочего цикла - Для альтернативных систем, временная длительность начинается с первого этапа подготовки проб и заканчивается заполненными результатами тестирования. Для системы AQUIOS CL, временная длительность начинается с пробы, помещенной в автозагрузчик, и завершается заполненным результатом тестирования для последней отображаемой пробы. Для обеих систем, время не включает в себя QC.

[00139] Время обработки с участием оператора - Время, требуемое пользователем для того, чтобы физически выполнять этапы, перечисленные в предоставленных тестовых процедурах, согласно инструкциям по применению изготовителя.

[00140] Моменты времени фиксируются посредством видеосъемки процессов подготовки и анализа проб и моделируются с использованием внутрифирменного программного обеспечения для анализа потоков обработки.

Результаты

[00141] Время полного рабочего цикла и время обработки с участием оператора при обработке проб - Этот тестовый случай состоит из сценариев с 1 пробой либо с партией из 10 проб мобилизованной периферической крови, подготовленной с дублированием плюс отрицательный контроль. Система AQUIOS STEM сравнивается непосредственно со своим утвержденным способом, STEM-набором для FC500. Данные показаны для тестов, которые состоят из дублированных проведений единичного отбора плюс отрицательный контроль.

[00142] Для 1 пробы с образцом, время до получения результата от подготовки проб до формирования результатов не демонстрирует существенного отличия (56:19 минут для утвержденного способа по сравнению с 53:54 минутами для AQUIOS; фиг. 15A), поскольку этапы процесса главным образом определяются посредством времен инкубации с антителами и с лизирующим реагентом красных кровяных клеток.

[00143] Тем не менее, время обработки с участием оператора может уменьшаться на 95%, с 6:23 минут для утвержденного способа по сравнению с 0:20 минут на AQUIOS (фиг. 15A).

[00144] Для партии из 10 проб с образцами (среднесуточная рабочая нагрузка в центре трансплантации стволовых клеток среднего размера), эти различия становятся более заметными. Время до получения результата от подготовки образцов до формирования результатов снижено с 2:40:29 часов для утвержденного способа до 2:03:54 часов для AQUIOS (фиг. 15B), при этом время обработки с участием оператора уменьшено с 1:01:13 часа для утвержденного способа до 3:20 минут для системы AQUIOS STEM (фиг. 15B).

[00145] Поскольку для ручного процесса, определенные этапы также могут выполняться параллельно (пипетирование следующей пробы в течение времени инкубации первой пробы и т.д.), полное время для 10 проб меньше суммы 10 раз одной пробы.

[00146] При условии 10 проб за один рабочий день в течение периода в один год, система AQUIOS STEM экономит для лаборатории сотни часов ценного рабочего времени специалистов каждый год. Помимо этого, меньшее время до получения результата при средней рабочей нагрузке для проведения единичного отбора в 10 проб в день поддерживает критичные по времени анализы, к примеру, CD34+-пересчет.

Время процесса и время обработки с участием оператора для процедур контроля качества (QC)

[00147] В регулируемой среде, производительность системы должна управляться с помощью надлежащих средств контроля качества и процессами как для настроек инструментов, так и для теста, который должен проводиться. Как для STEM-набора для FC500, так и для AQUIOS, ежедневная верификация оптической совмещающей и струйной системы проточного цитометра выполняется с флуоросферами для контроля расхода, проанализированной суспензией флуоросфер (люминесцентными микросферами). В качестве контроля процессов для верификации интересующих аналитических параметров, утвержденный способ использует лиофилизированные CD34+-клетки, которые добавляются в нормальную пробу крови (STEM TROL-клетки), тогда как система AQUIOS STEM использует жидкие препараты из стабилизированных человеческих лейкоцитов (лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов) и эритроцитов, которые имеют свойства лизирования, рассеяния света, экспрессии антигенов и окрашивания антителами, представляющие свойства, имеющиеся в образцах цельной крови человека (управляющих CD34-клетках AQUIOS STEM).

[00148] Полное время, необходимое для QC-процедур, связанных с CD34+-пересчетом, уменьшено с 2:02:22 часов для утвержденного способа до 1:09:44 часов на AQUIOS. Стоит отметить, что QC должно завершаться до того, как может проводиться единичный отбор проб пациента/донора, что приводит к экономии времени в 52:38 минуты в день (фиг. 16А). Для 5-дневной рабочей недели, это суммируется вплоть до приблизительно 4,5 часов только для QC-процедур (фиг. 16В).

[00149] Время обработки с участием оператора для QC-процедур уменьшается с 12:22 минут (утвержденный способ) до 1:51 минуты (AQUIOS) в день (фиг. 16А), приводя к общей экономии времени обработки с участием оператора для QC-процессов в 52 минуты в неделю (фиг. 16В).

Заключение

[00150] Во всех сценариях обработки тестовых случаев, система AQUIOS STEM требует существенно меньшего времени обработки с участием оператора, чем утвержденный способ. Для типичной 5-дневной рабочей недели с 10 пробами с образцами в день, система AQUIOS STEM уменьшает ручную рабочую нагрузку приблизительно на 6 часов, позволяя лаборатории более эффективно выделять ресурсы. Помимо этого, AQUIOS STEM уменьшает полное время полного рабочего цикла от подготовки проб до результата по пациенту, что является важным для критичного по времени теста, такого как CD34+-пересчет.

[00151] Система AQUIOS STEM представляет собой количественное автоматизированное решение, которое выполняет пересчет гематопозитических стволовых CD34+-клеток и CD34+-клеток-предшественников в процессе подготовки проб "без промывки". Поскольку эта система имеет намерение представлять собой автоматизированный анализатор с обработкой проб без участия оператора от введения образца до отчетов с результатами, она называется "проточным цитометром типа "загрузи и работай"". Признаки автоматизации дифференцируют систему AQUIOS STEM относительно альтернативных способов (включающих в себя утвержденный способ, т.е. FC500 с STEM-набором), в которых множество этапов процесса должны выполняться вручную. Подход "все в одном" системы AQUIOS STEM имеет намерение способствовать экономии времени и помогать повышать эффективность потоков обработки современной лаборатории.

[00152] Значения, выраженные в формате определения диапазона, должны интерпретироваться гибким способом таким образом, что они включают в себя не только числовые значения, явно изложенные в качестве пределов диапазона, но также и включают в себя все отдельные числовые значения или поддиапазоны, попадающие в предел этого диапазона, как если каждое числовое значение и поддиапазон явно изложены. Например, диапазон "приблизительно от 0,1% приблизительно до 5%" или "приблизительно в 0,1%-5%" должен интерпретироваться как включающий в себя не только приблизительно от 0,1% приблизительно до 5%, но также и отдельные значения (например, 1%, 2%, 3% и 4%) и поддиапазоны (например, 0,1%-0,5%, 1,1%-2,2%, 3,3%-

4,4%) в пределах указываемого диапазона. Выражение "приблизительно от X до Y" имеет смысловое значение, идентичное смысловому значению "приблизительно от X приблизительно до Y", если не указано иное. Аналогично, выражение "приблизительно X, Y или приблизительно Z" имеет смысловое значение, идентичное смысловому значению "приблизительно X, приблизительно Y или приблизительно Z", если не указано иное.

[00153] В этом документе, термины "a", "an" или "the" используются для того, чтобы включать в себя одно или более одного, если контекст явно не предписывает иное. Термин "или" используется для того, чтобы означать неисключительное "или", если не указано иное. Помимо этого, следует понимать, что фразеология или терминология, используемая в данном документе и не заданная иными способами, служит только для целей описания, а не для ограничения. Любое использование заголовков разделов имеет намерение упрощать прочтение документа и не должно интерпретироваться в качестве ограничения. Дополнительно, информация, которая является релевантной для заголовка раздела, может находиться в рамках или вне рамок этого конкретного раздела. Кроме того, все публикации, патенты и патентные документы, упоминаемые в этом документе, полностью содержатся по ссылке в данном документе, как если отдельно содержится по ссылке. В случае несогласованных использований между этим документом и такими документами, содержащимися по ссылке, использование в содержащемся справочном документе должно считаться вспомогательным по отношению к использованию для этого документа; для неразрешимых несогласованностей, использование в этом документе превагирует.

[00154] В способах, описанных в данном документе, этапы могут выполняться в любом порядке без отступления от принципов раскрытия сущности, кроме тех случаев, когда временная последовательность или последовательность операций явно излагается. Кроме того, указанные этапы могут выполняться параллельно, если явный текст формулы изобретения не излагает то, что они выполняются по отдельности. Например, заявленный этап выполнения X и заявленный этап выполнения Y могут проводиться одновременно в рамках одной операции, и результирующий процесс должен попадать в пределы буквального объема заявленного процесса.

[00155] Термин "приблизительно", при использовании в данном документе, может предоставлять возможность степени вариабильности в значении или диапазоне, например, в пределах 10%, в пределах 5% или в пределах 1% относительно заявленного значения или заявленного предела диапазона.

[00156] Термин "практически", при использовании в данном документе, означает "большинство из" или "по большей части", к примеру, по меньшей мере, в приблизительно 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, 99,99% или, по меньшей мере, приблизительно в 99,999% или больше.

[00157] Термин "практически не", при использовании в данном документе, означает меньше, чем приблизительно 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,001% либо меньше, чем приблизительно 0,0005%, либо меньше или

приблизительно 0%, либо 0%.

[00158] Специалисты в данной области техники должны принимать во внимание, что множество модификаций вариантов осуществления, описанных в данном документе, являются возможными без отступления от сущности и объема настоящего раскрытия сущности. Таким образом, описание не имеет намерение и не должно истолковываться как ограниченное приведенными примерами, но ему должен обеспечиваться полный объем охраны, предоставленный посредством прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов. Помимо этого, можно использовать некоторые признаки настоящего раскрытия сущности без соответствующего использования других признаков. Соответственно, вышеприведенное описание или иллюстративные варианты осуществления предоставляются для целей иллюстрации принципов настоящего раскрытия сущности, а не для его ограничения, и могут включать в себя их модификацию и их перестановки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Автоматизированный проточно-цитометрический способ для анализа и пересчета, по меньшей мере, одного из гематопозитических стволовых клеток, гематопозитических клеток-предшественников и Т-клеток, при этом способ содержит этапы, на которых:

- помещают одну или более проб крови в одну или более емкостей планшета для проб, расположенного в зоне подготовки проб проточного цитометра;

- технологически обрабатывают одну или более емкостей, по меньшей мере, с помощью одного реагента для того, чтобы получать, по меньшей мере, одну первую композицию, причем, по меньшей мере, один, по меньшей мере, из одного реагента представляет собой, по меньшей мере, один визуализирующий реагент, содержащий распознающие элементы, конкретные для маркеров, по меньшей мере, для одного из гематопозитических стволовых клеток, гематопозитических клеток-предшественников и Т-клеток;

- инкубируют, по меньшей мере, одну первую композицию в течение периода времени, достаточного для связывания, по меньшей мере, одного визуализирующего реагента, содержащего распознающие элементы, конкретные для маркеров, по меньшей мере, для одного из гематопозитических стволовых клеток, гематопозитических клеток-предшественников и Т-клеток для того, чтобы обеспечивать, по меньшей мере, одну вторую композицию;

- технологически обрабатывают, по меньшей мере, одну вторую композицию с помощью лизирующего реагента для того, чтобы обеспечивать, по меньшей мере, одну третью композицию; и

- анализируют, по меньшей мере, одну третью композицию посредством проточной цитометрии, чтобы получать, по меньшей мере, одно из количества жизнеспособных гематопозитических стволовых клеток и общего количества гематопозитических стволовых клеток, количества жизнеспособных клеток-предшественников и общего количества клеток-предшественников и количества жизнеспособных Т-клеток и общего количества Т-клеток в одной или более проб крови.

2. Способ по п. 1, где способ осуществляется с дублированными пробами крови.

3. Способ по п. 2, где способ осуществляется с отрицательным контролем.

4. Способ по п. 3, где отрицательный контроль предназначен для CD34.

5. Способ по п. 3, где отрицательный контроль предназначен для CD3.

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, где маркеры представляют собой, по меньшей мере, одно из CD45, CD3 и CD34.

7. Способ по любому из предшествующих пунктов, где, по меньшей мере, один визуализирующий реагент содержит средство формирования отчетов на основе люминесценции.

8. Способ по пп. 1-7, где, по меньшей мере, один визуализирующий реагент содержит средство формирования отчетов на основе люминесценции FITC, PE или PC7.

9. Способ по любому из предшествующих пунктов, где первая композиция дополнительно содержит краситель для демонстрации жизнеспособности.

10. Способ по п. 9, где краситель для демонстрации жизнеспособности представляет собой 7-аминоактиномицин D (7-AAD).

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, где количества жизнеспособных гематопозитических стволовых клеток и общие количества гематопозитических стволовых клеток, количества жизнеспособных клеток-предшественников и общие количества клеток-предшественников и количества жизнеспособных Т-клеток и общие количества Т-клеток получаются.

12. Способ по любому из предшествующих пунктов, где планшет для проб представляет собой 96-луночный микротитрационный планшет.

13. Способ по любому из предшествующих пунктов, где технологическая обработка одной или более емкостей, по меньшей мере, с помощью одного реагента для того, чтобы получать, по меньшей мере, одну первую композицию, выполняется посредством автоматизированного пипеттора, выполненного с возможностью доставлять предварительно определенные объемы, по меньшей мере, для одного реагента.

14. Способ по любому из предшествующих пунктов, где инкубация автоматизируется, чтобы инкубировать, по меньшей мере, одну первую композицию в течение предварительно определенного периода времени, достаточного для связывания, по меньшей мере, одного визуализирующего реагента, содержащего распознающие элементы, конкретные, по меньшей мере, для одного из гематопозитических стволовых клеток, гематопозитических клеток-предшественников и Т-клеток для того, чтобы обеспечивать, по меньшей мере, одну вторую композицию.

15. Автоматизированный проточно-цитометрический способ для анализа и пересчета, по меньшей мере, одного из гематопозитических стволовых клеток, гематопозитических клеток-предшественников и Т-клеток, при этом способ содержит этапы, на которых:

- помещают первую пробу крови в первую емкость планшета для проб;
- технологически обрабатывают первую емкость, по меньшей мере, с помощью одного реагента для того, чтобы получать первую композицию f1, и инкубируют первую композицию f1, чтобы обеспечивать вторую композицию s1, причем, по меньшей мере, один, по меньшей мере, из одного реагента представляет собой, по меньшей мере, один визуализирующий реагент, содержащий распознающие элементы, конкретные для маркеров, по меньшей мере, для одного из гематопозитических стволовых клеток, гематопозитических клеток-предшественников и Т-клеток;

- в то время, когда первая композиция f1 инкубируется, помещают вторую пробу крови во вторую емкость планшета для проб и технологически обрабатывают вторую емкость, по меньшей мере, с помощью одного реагента, причем по меньшей мере, один, по меньшей мере, из одного реагента представляет собой, по меньшей мере, один визуализирующий реагент, содержащий распознающие элементы, конкретные для

маркеров, по меньшей мере, для одного из гематопозитических стволовых клеток, гематопозитических клеток-предшественников и Т-клеток для того, чтобы получить первую композицию f2, и инкубируют первую композицию f2, чтобы обеспечивать вторую композицию s2;

- технологически обрабатывают вторые композиции s1 и s2 с помощью лизирующего реагента для того, чтобы обеспечивать третьи композиции t1 и t2; и

- анализируют третьи композиции t1 и t2 посредством проточной цитометрии, чтобы получать, по меньшей мере, одно из количества жизнеспособных гематопозитических стволовых клеток и общего количества гематопозитических стволовых клеток, количества жизнеспособных клеток-предшественников и общего количества клеток-предшественников и количества жизнеспособных Т-клеток и общего количества Т-клеток.

16. Способ по п. 14, дополнительно включающий подготовку отрицательного контроля.

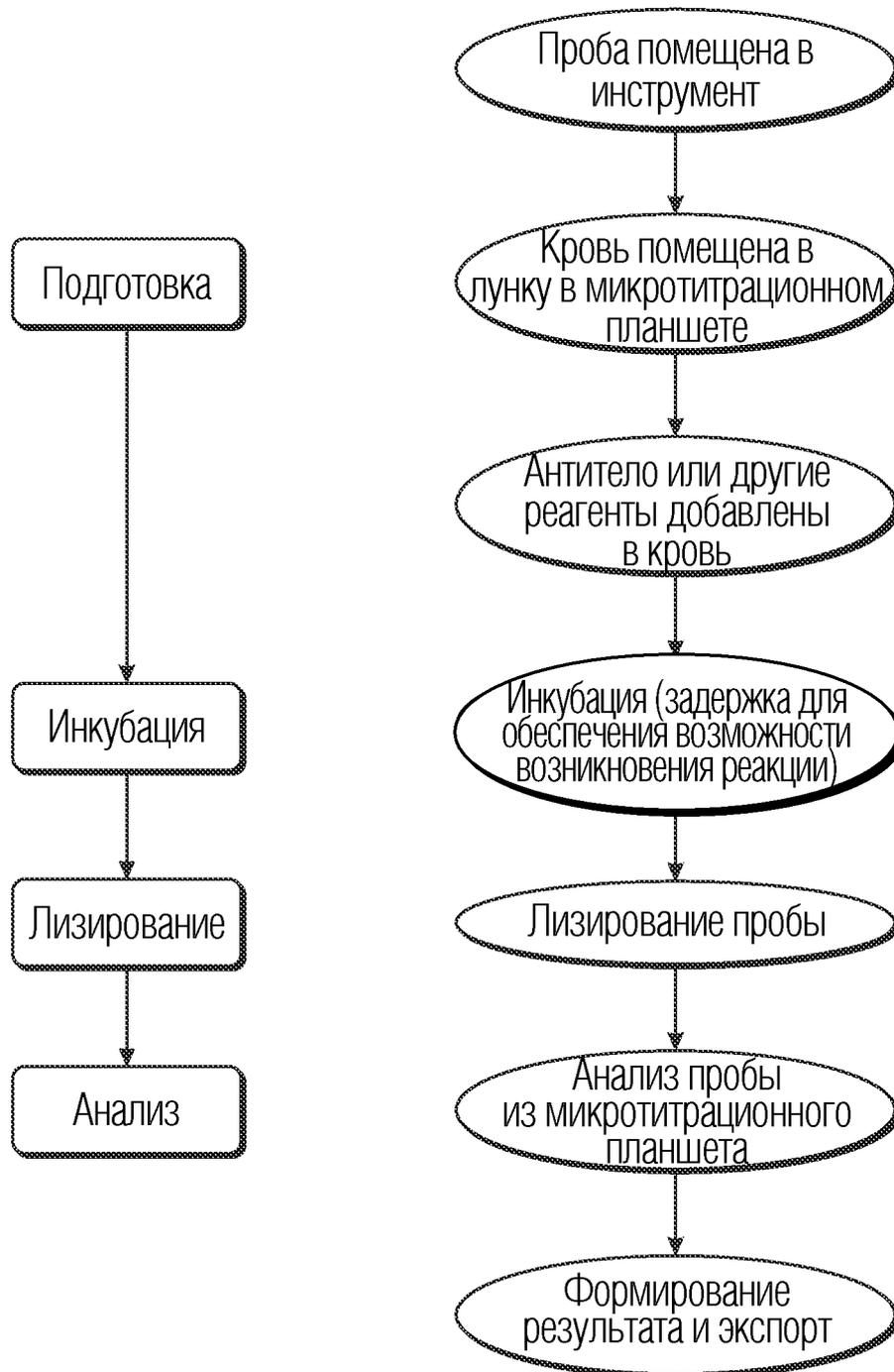
17. Способ по п. 15, где отрицательный контроль подготавливают перед первой композицией f1.

18. Способ по п. 15, где отрицательный контроль подготавливают после первой композиции f1.

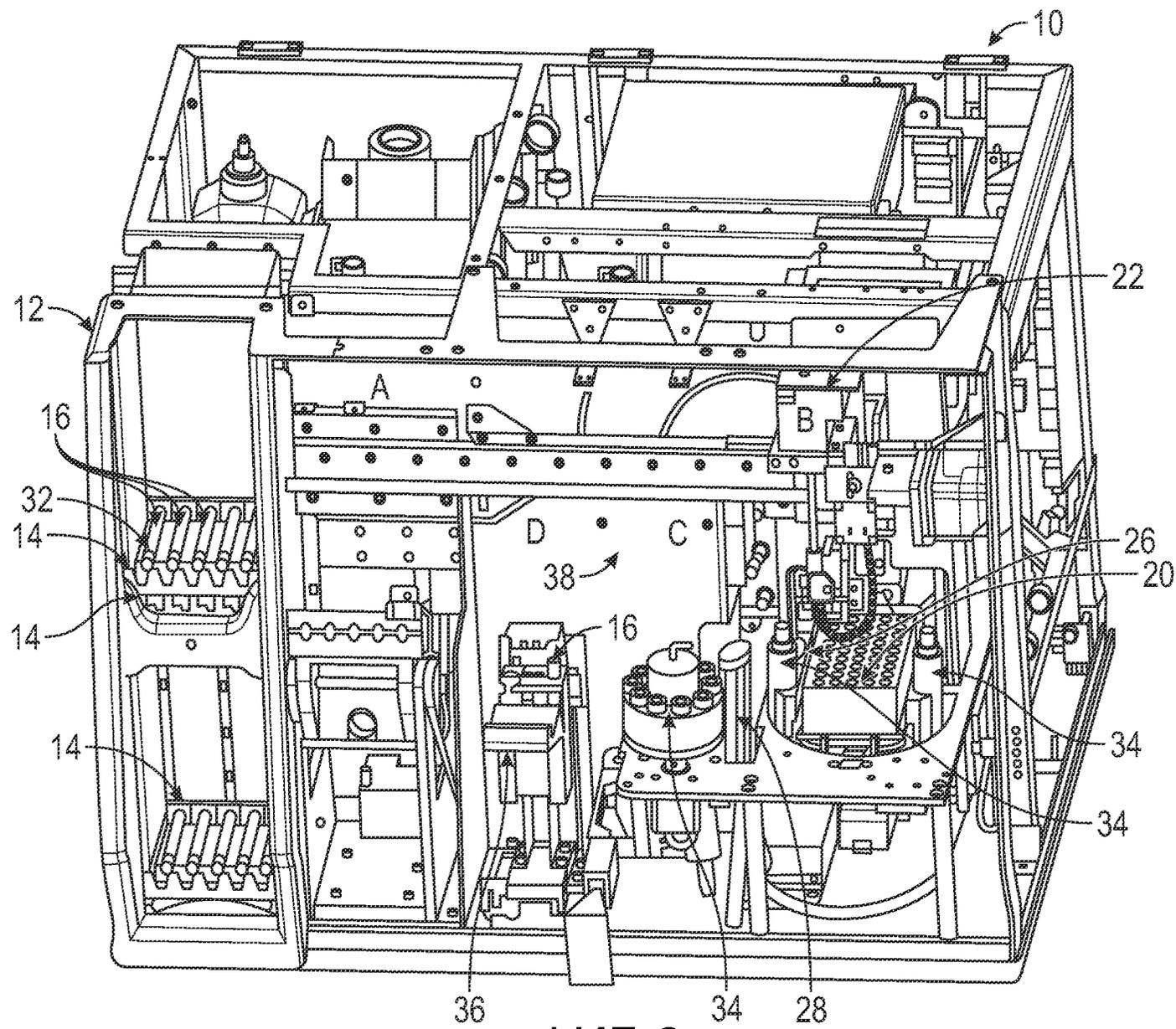
19. Способ по п. 15, где отрицательный контроль подготавливают после первой композиции f2.

- ✓ Аппаратные средства, программное обеспечение и реагенты должны представлять собой IVD и придерживаться руководящих ISHAGE-принципов
- ✓ Автоматическая подготовка и последующий анализ проб на одной платформе
- ✓ Автоматизированное программное обеспечение, но с возможностью адаптировать панели к типам проб и потребностям лабораторий, без потери IVD-состояния
- ✓ Необязательное добавление CD3 для анализа остаточных Т-клеток при поддержании IVD-состояния
- ✓ QC-понятие с отслеживанием реагентов и идентификацией по штрих-коду образца, идентификатора пациента и реагентов
- ✓ Средства многоуровневого контроля процессов, которые охватывают уровень принятия клинических решений
- ✓ Платформа, которая может управляться операторами с минимальным уровнем подготовки

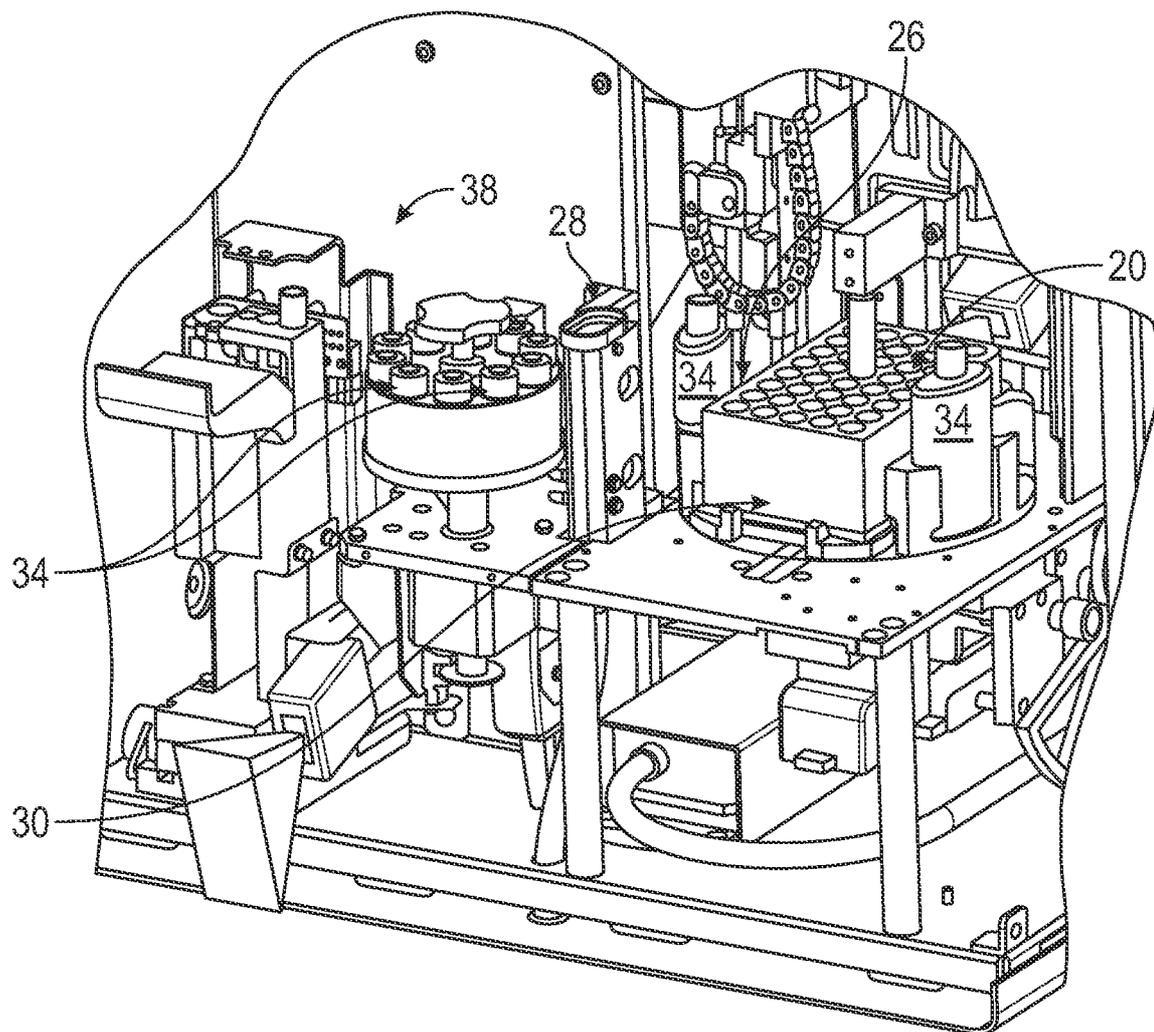
ФИГ. 1А



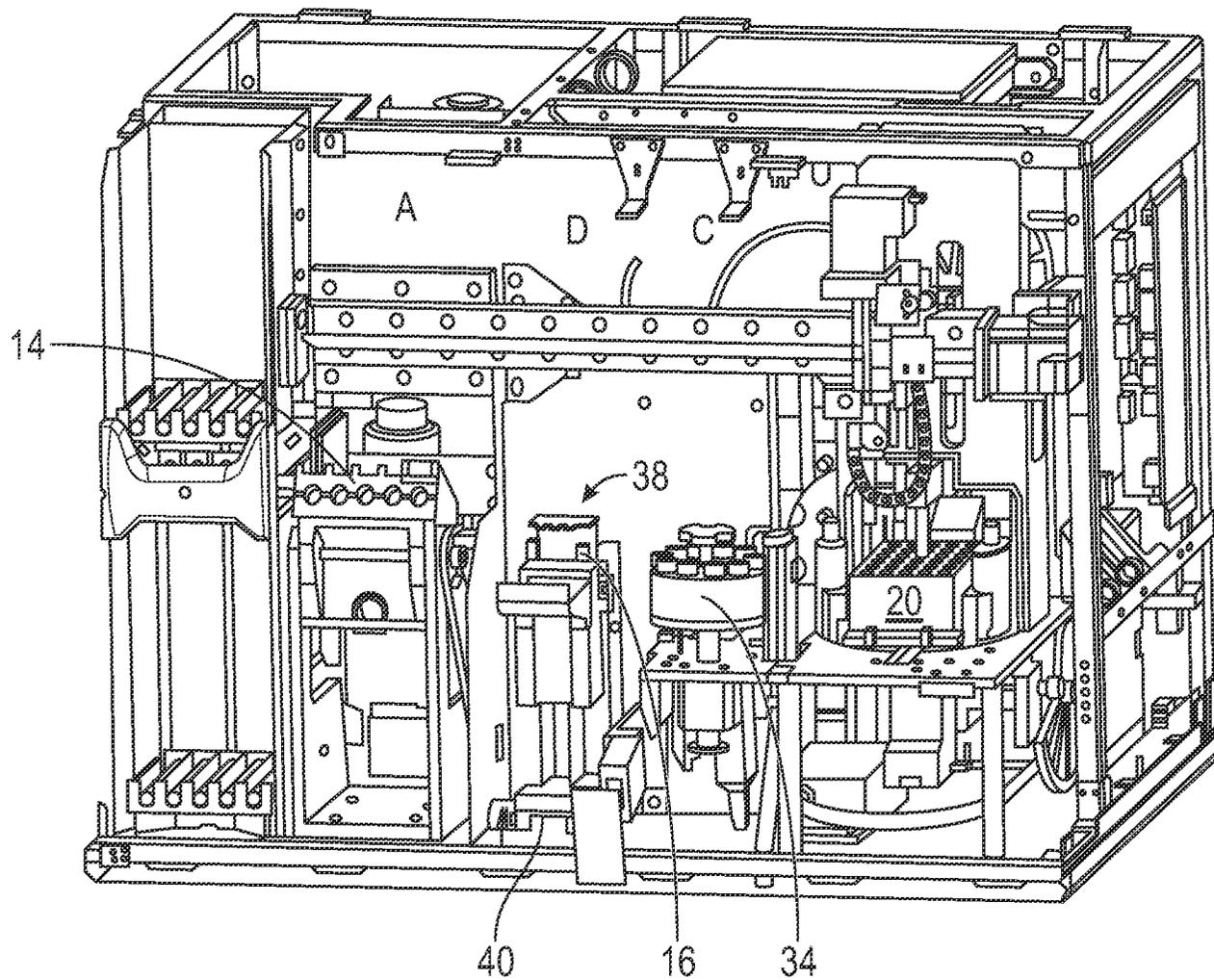
ФИГ. 1В



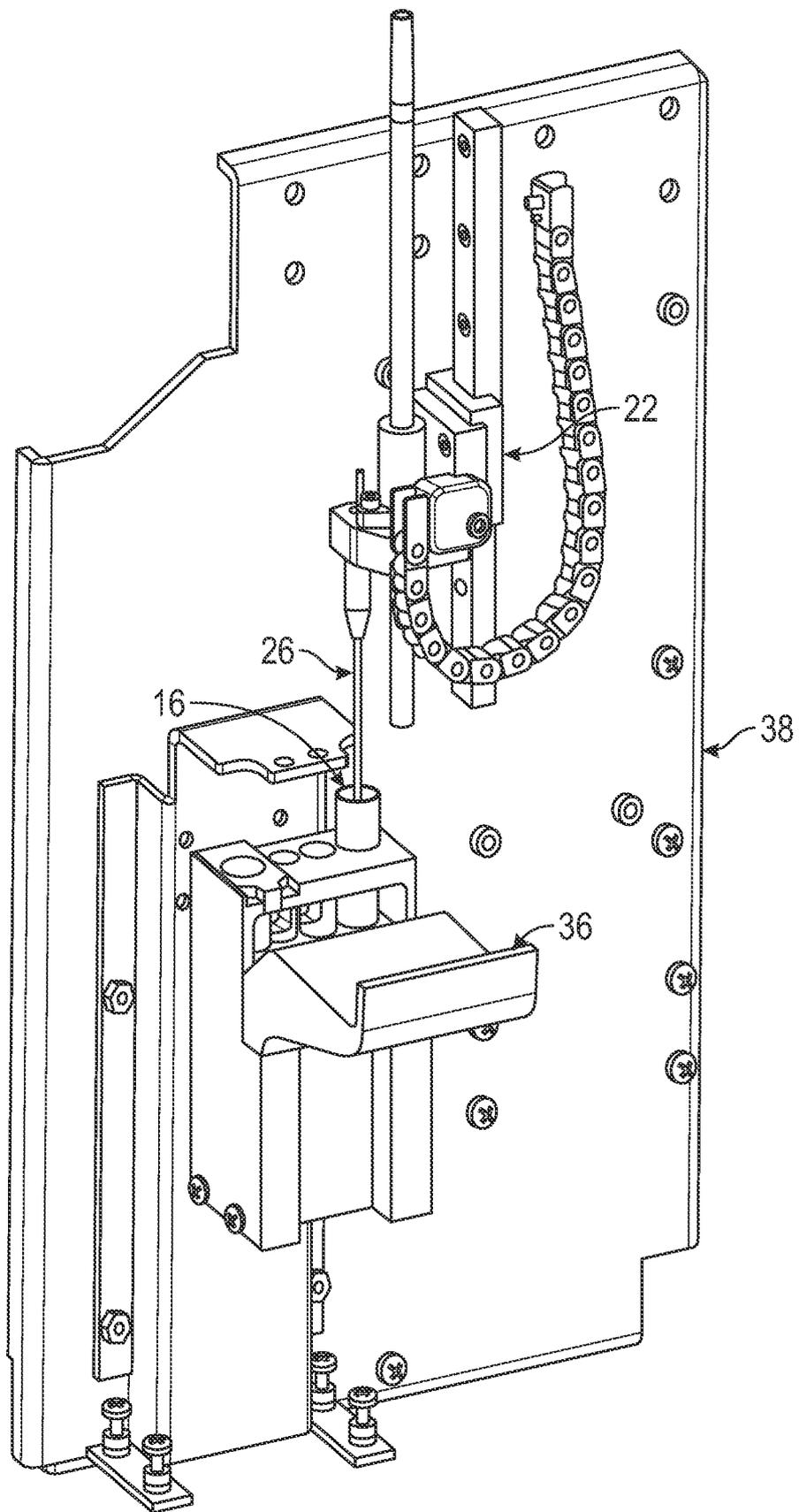
ФИГ. 2



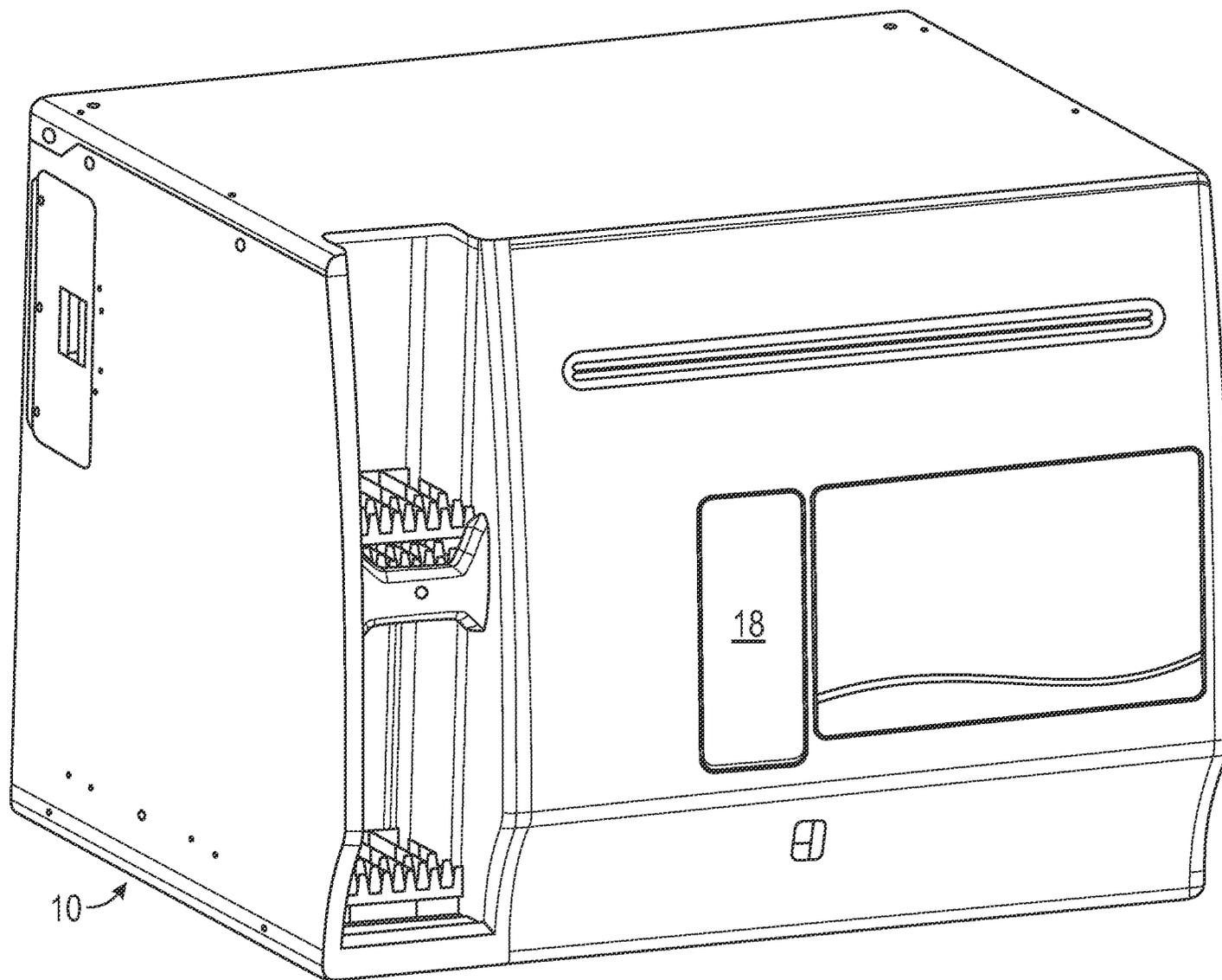
ФИГ. 3



ФИГ. 4

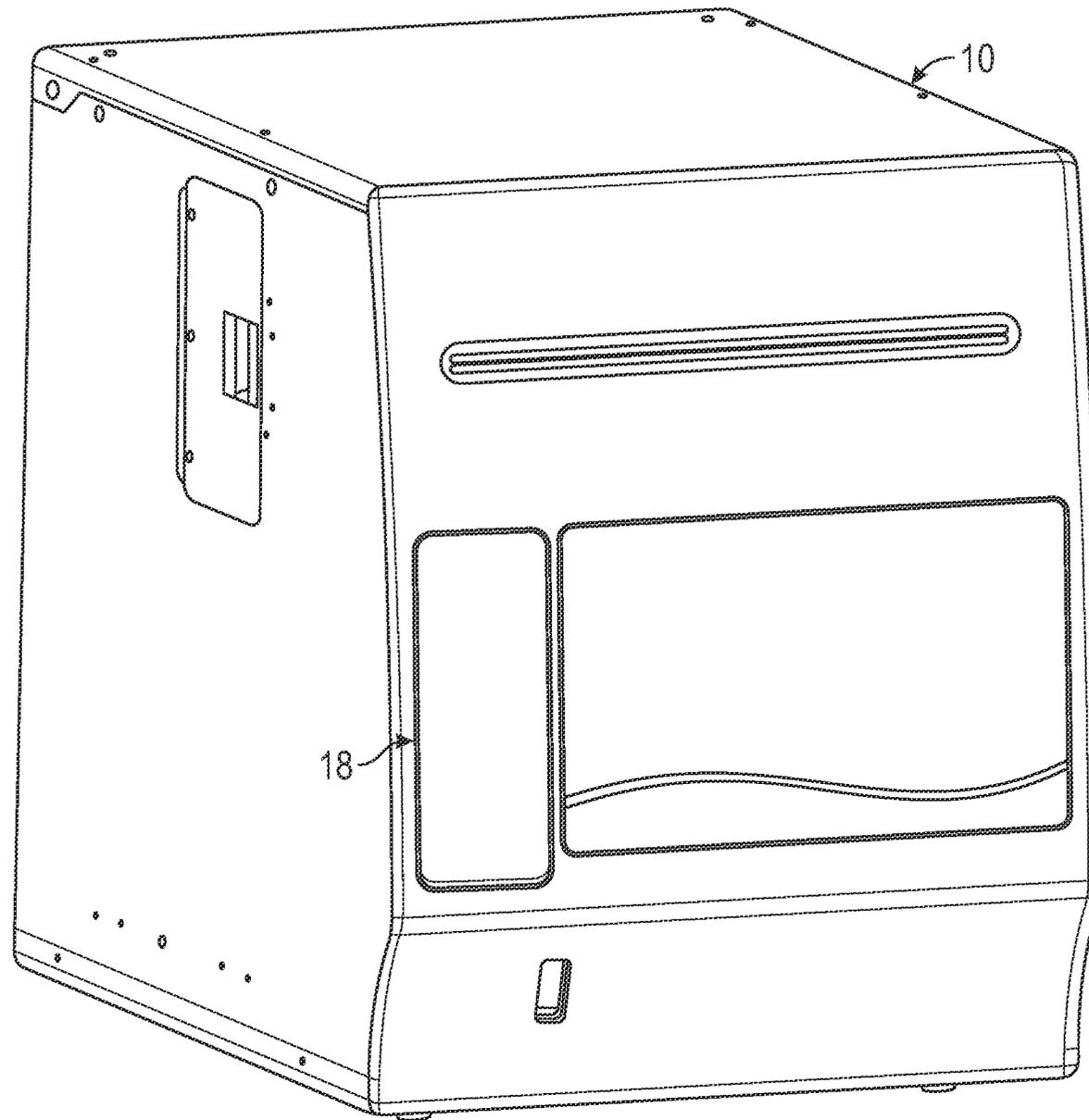


ФИГ. 5

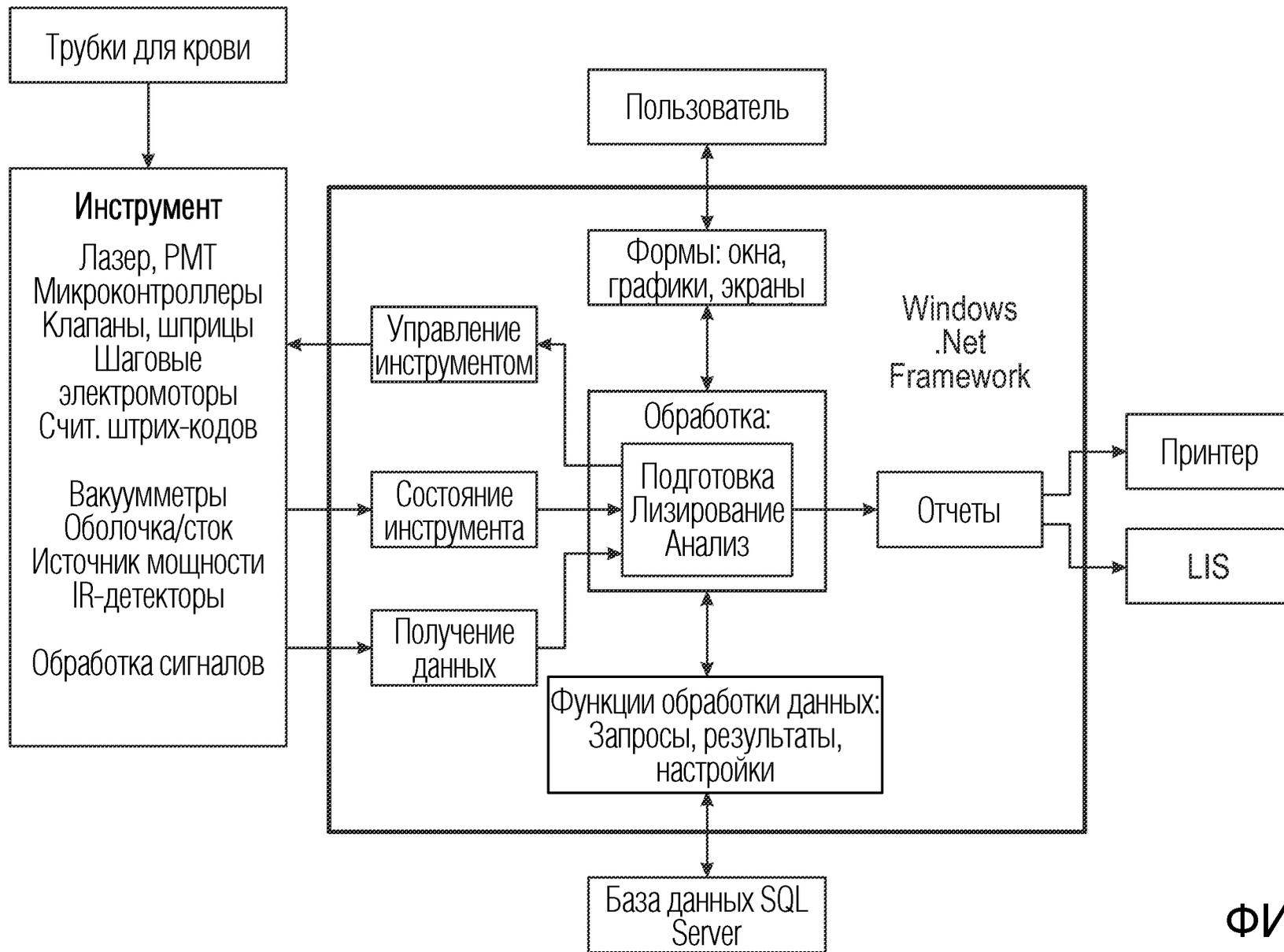


7/16

ФИГ. 6



ФИГ. 7



ФИГ. 8

AQUIOS STEM-набор
CD45-FITC / CD34-PE CD45-FITC / CD34-Ctrl 7-AAD
Лизирующий реагент Гранулы для подсчета абсолютного количества

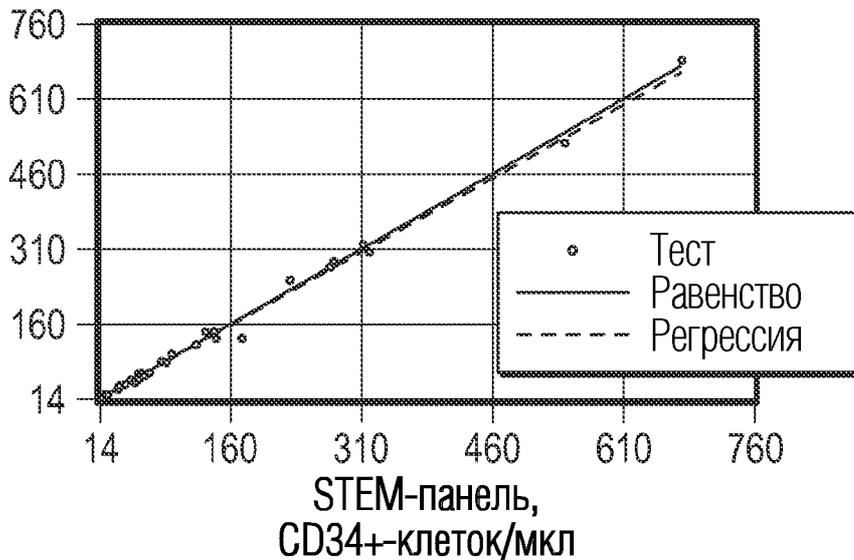
AQUIOS STEM-набор + AQUIOS STEM ALLO-CD3-набор
CD45-FITC/CD34-PE CD45-FITC/CD34-Ctrl 7-AAD
Лизирующий реагент Гранулы для подсчета абсолютного количества CD3-PC7 CD3-CTRL

Вариант программной AQUIOS STEM-панели	Тестов в расчете на панель
Проведение тестов с дублированием плюс отрицательный контроль	1 CD45-FITC / CD34-PE / 7-AAD 2 CD45-FITC / CD34-PE / 7-AAD 3 CD45-FITC / CD34-CTRL / 7-AAD
Проведение тестов с дублированием	1 CD45-FITC / CD34-PE / 7-AAD 2 CD45-FITC / CD34-PE / 7-AAD
Одиночный тест	1 CD45-FITC / CD34-PE / 7-AAD

Вариант программной AQUIOS STEM-панели	Тестов в расчете на панель
Проведение тестов с дублированием плюс отрицательный контроль	1 CD45-FITC / CD34-PE / CD3-PC7 / 7-AAD 2 CD45-FITC / CD34-PE / CD3-PC7 / 7-AAD 3 CD45-FITC / CD34-CTRL / CD3-CTRL / 7-AAD
Проведение тестов с дублированием	1 CD45-FITC / CD34-PE / CD3-PC7 / 7-AAD 2 CD45-FITC / CD34-PE / CD3-PC7 / 7-AAD
Одиночный тест	1 CD45-FITC / CD34-PE / CD3-PC7 / 7-AAD

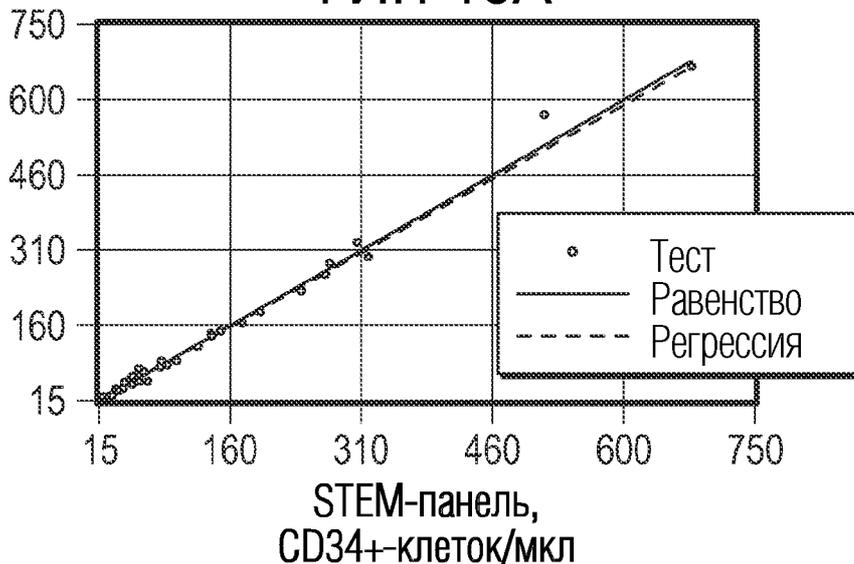
ФИГ. 9

STEM-тест с дублированием,
CD34+клеток/мкл



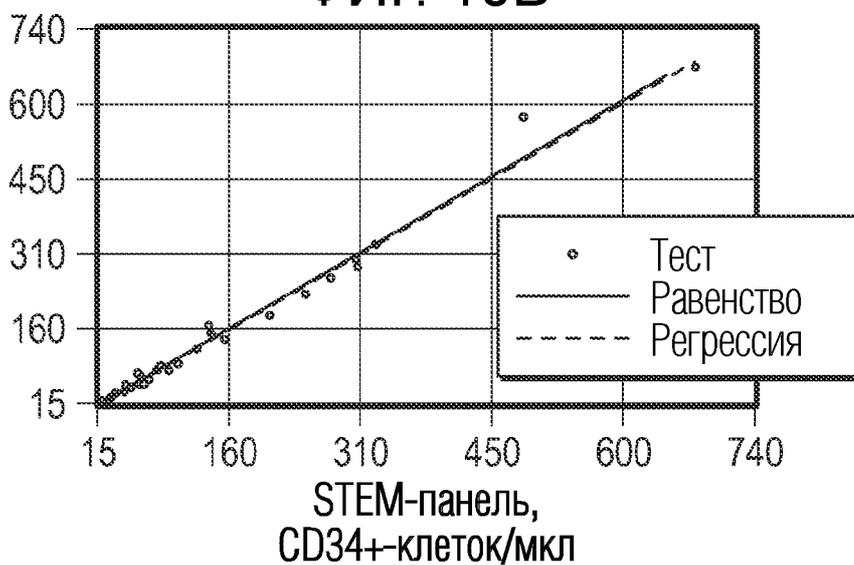
ФИГ. 10А

STEM-тест с дублированием,
CD34+клеток/мкл



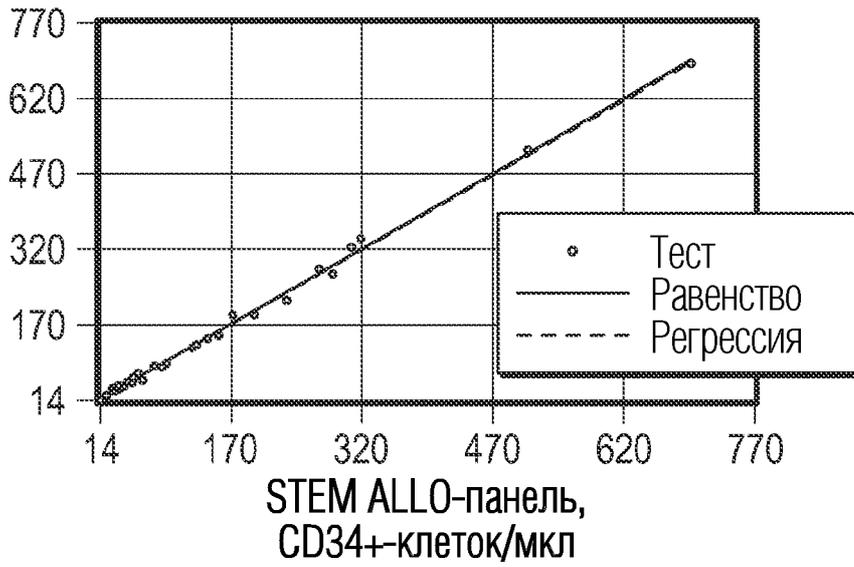
ФИГ. 10В

STEM-тест с дублированием,
CD34+клеток/мкл



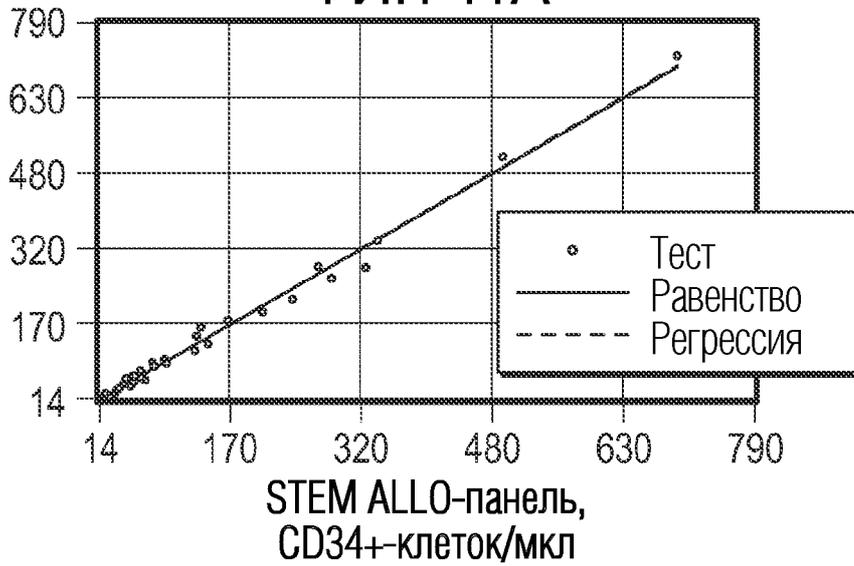
ФИГ. 10С

STEM ALLO-тест с дублированием,
CD34+клеток/мкл



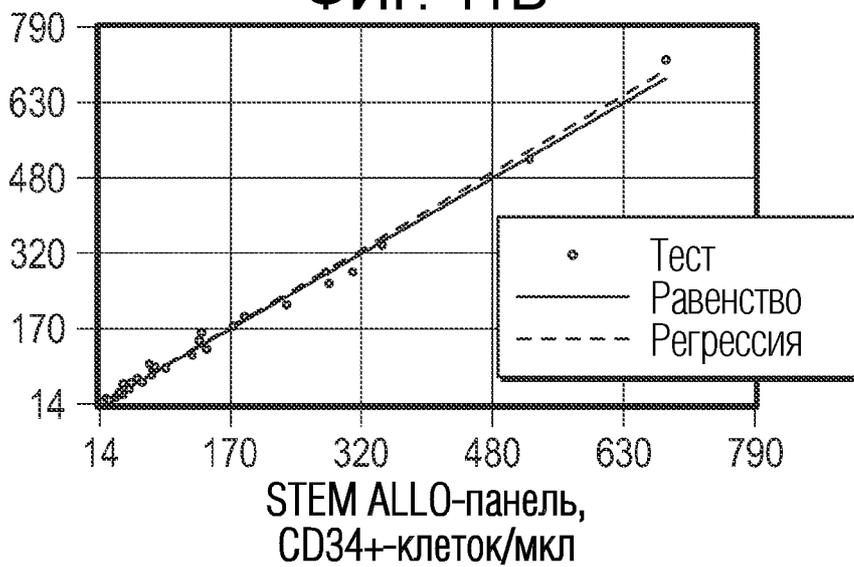
ФИГ. 11А

STEM ALLO-тест с дублированием,
CD34+клеток/мкл



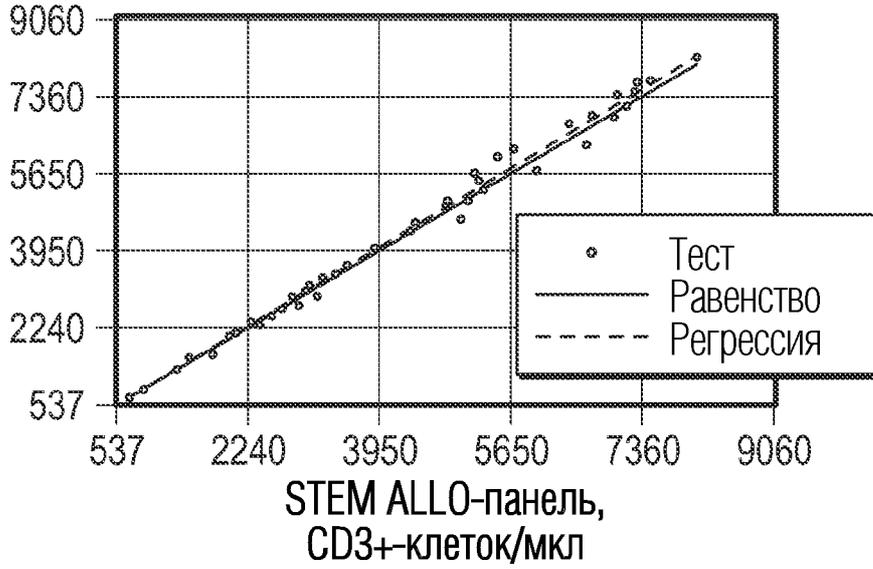
ФИГ. 11В

STEM ALLO-тест с дублированием,
CD34+клеток/мкл



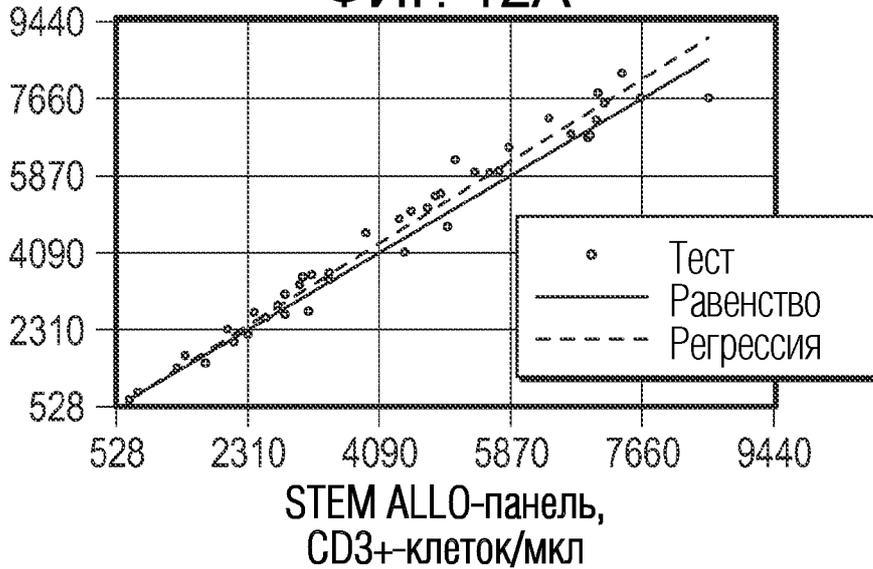
ФИГ. 11С

STEM ALLO-тест с дублированием,
CD3+-клеток/мкл



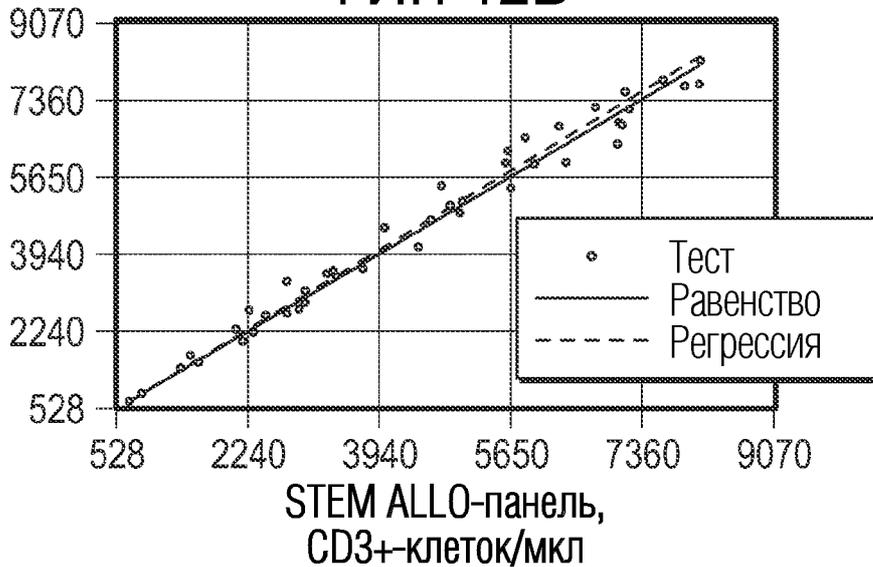
ФИГ. 12А

STEM ALLO-тест с дублированием,
CD3+-клеток/мкл

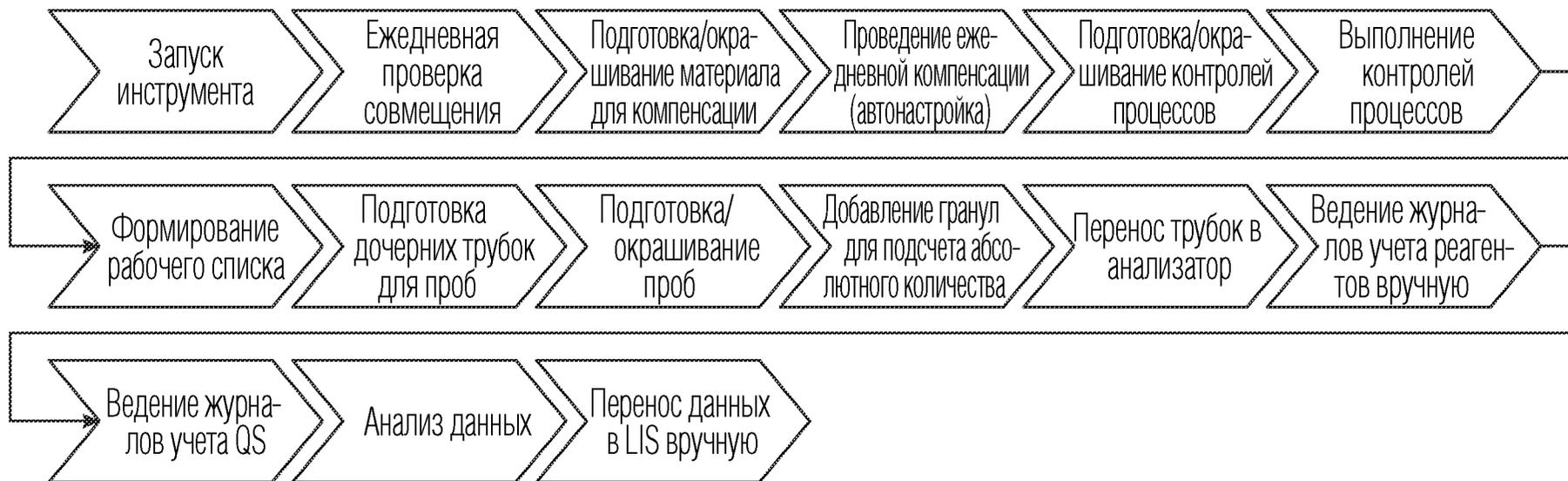


ФИГ. 12В

STEM ALLO-тест с дублированием,
CD3+-клеток/мкл



ФИГ. 12С



ФИГ. 13



ФИГ. 14

15/16

Время, требуемое в расчете на пробу



ФИГ. 15А

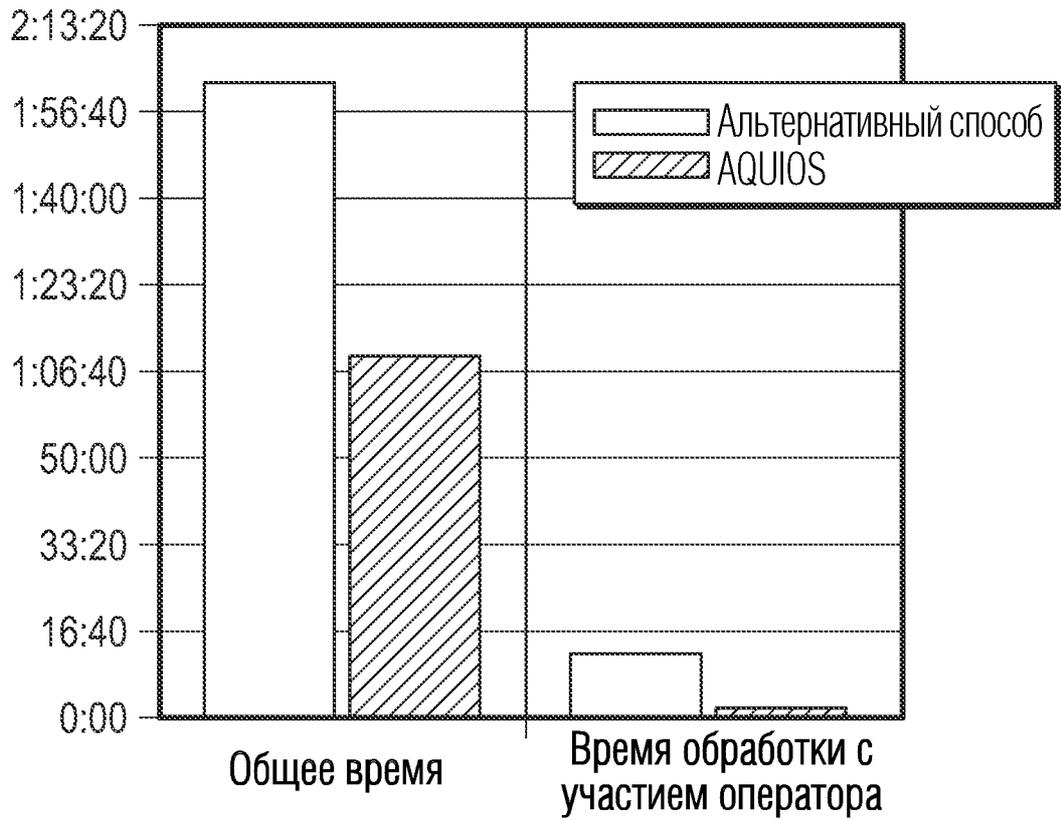
Время, требуемое в расчете на 10 проб



ФИГ. 15В

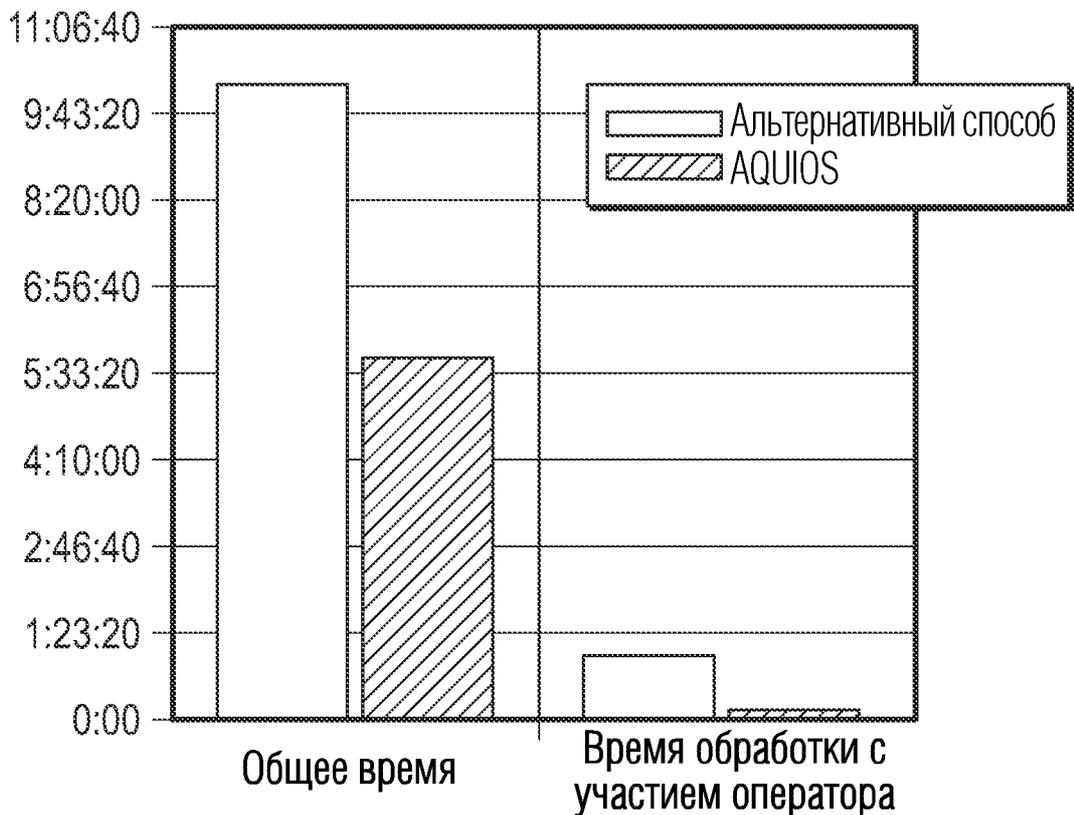
16/16

Время, требуемое для QC



ФИГ. 16А

Время, требуемое для QC за неделю



ФИГ. 16В