



УКРАЇНА

(19) UA (11) 96597 (13) C2
(51) МПК
G01N 33/558 (2006.01)
G01N 33/76 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ПРИСТРІЙ ТА СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ГОРМОНУ, АСОЦІЙОВАНОГО З ВАГІТНІСТЮ

1

(21) а200813273
(22) 20.04.2007
(24) 25.11.2011
(86) PCT/GB2007/001454, 20.04.2007
(31) 0607964.4
(32) 21.04.2006
(33) GB
(31) 0609798.4
(32) 17.05.2006
(33) GB
(46) 25.11.2011, Бюл.№ 22, 2011 р.
(72) ПЛАММЕР КРИСТОФЕР, GB, БАУЕР ДЖЕФФ-PI, US
(73) БРІТІШ ПРЕГНЕНСІ ЕДВАЙЗЕРІ СЕРВІС, GB, ХЕЛСІ БІЗНЕС ЛІМІТЕД, GB
(56) WO 9415215 A1, 07.07.1994
WO 9634287 A1, 31.10.1996
WO 9822824 A1, 28.05.1998
US 5240844 A, 31.08.1993
WO 03052379 A2, 26.06.2003
US 2003175991 A1, 18.09.2003
EP 1571451 A1, 07.09.2005
US 5786220 A, 28.07.1998
RU 2062473 C1, 20.06.1996
(57) 1. Пристрій для визначення і забезпечення вказування концентрації гормону, зв'язаного з одноплодовою вагітністю (зокрема, hCG), що включає матрицю, яка визначає траєкторію аксіального потоку, де матриця включає:
(i) зону приймання проби, що розташована на входному патрубку траєкторії потоку, для отримання рідкої проби; і
(ii) множину випробувальних зон, що розміщено в межах траєкторії потоку нижче від зони приймання проби, де кожна випробувальна зона здатна до детекції різних концентрацій гормону, порівняно з сусідньою випробувальною зоною; що додатково включає:
(iii) індикатор для реєстрації попередньої концентрації гормону, що реєструють таким самим або іншим пристроєм.
2. Пристрій за п. 1, який відрізняється тим, що індикатор знаходиться на пристрої або на упаковці для пристрою.
3. Пристрій за п. 1 або 2, який відрізняється тим, що є одноразовим.

2

4. Пристрій згідно з будь-яким із попередніх пунктів, який відрізняється тим, що виконаний з можливістю адаптації для детекції зменшення гормону, пов'язаного із вагітністю, що пов'язано з невиношуванням або штучним перериванням вагітності.
5. Пристрій згідно з будь-яким із попередніх пунктів, який відрізняється тим, що є випробувальною смугою.
6. Пристрій згідно з будь-яким із попередніх пунктів, який відрізняється тим, що зону мітки розміщено в межах траєкторії потоку і між зоною приймання проби і множиною випробувальних зон, де зона мітки включає мічений реагент, який здатний зв'язувати гормон, пов'язаний із вагітністю, що є рухомим у присутності рідкої проби, і де кожна зазначена випробувальна зона містить утримувальні елементи, в яких відбувається зв'язування міченого гормону, зв'язаного із вагітністю.
7. Пристрій за п. 6, який відрізняється тим, що утримувальні елементи є антитілами або їх фрагментами, специфічними до гормону, пов'язаного із вагітністю.
8. Пристрій за п. 6, який відрізняється тим, що утримувальний елемент включає першу половину пари зв'язування авідин/біотин, та пристрій додатково включає антитіло до антигормону вагітності, що зв'язане з другою половиною пари зв'язування авідин/біотин.
9. Пристрій згідно з будь-яким із попередніх пунктів, який відрізняється тим, що концентрація гормону, пов'язаного із вагітністю, який можна детектувати, зростає між випробувальною зоною, найближчою до зони приймання проби, та випробувальною зоною, що знаходиться нижче і є найвіддаленішою від зони приймання проби.
10. Пристрій згідно з будь-яким із попередніх пунктів, який відрізняється тим, що включає від 6 до 30 випробувальних зон.
11. Пристрій згідно з будь-яким із попередніх пунктів, який відрізняється тим, що концентрація hCG може бути визначена за допомогою пристрою у діапазоні від 10 до 260,000 mIU/мл проби.
12. Пристрій за п. 11, який відрізняється тим, що концентрація hCG може бути визначена у діапазоні від 150 до 165,000 mIU/мл.

(19) UA (11) 96597 (13) C2

13. Пристрій згідно з будь-яким із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що у зоні детекції визначають, приблизно, наступні концентрації hCG:

400, 2500, 7000, 15000, 27500, 40000, 55000, 75000, 100000 mIU/мл.

14. Пристрій згідно з будь-яким із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що включає зони детекції, щоб визначати концентрацію hCG у одному з або двох інтервалах 1500-2500 mIU/мл та 4000-7000 mIU/мл.

15. Пристрій згідно з будь-яким із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що додатково включає контрольну зону, що розташована в межах траєкторії потоку під контрольними засобами, і включає засоби, що дозволяють сигналізувати про завершення аналізу.

16. Пристрій згідно з будь-яким із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що зона приймання проби включає ґніт.

17. Пристрій за п. 16, який **відрізняється** тим, що ґніт здатний змінювати колір під дією проби.

18. Пристрій згідно з будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що додатково включає кришку для ізолювання зони приймання проби.

19. Набір для контролю розвитку вагітності, що включає множину пристроїв згідно з будь-яким із попередніх пунктів.

20. Спосіб контролю вагітності, що включає:

(i) забезпечення першої проби і визначення першої концентрації гормону, пов'язаного із вагітністю, у пробі пристроєм згідно з будь-яким із пунктів 1-18;

(ii) забезпечення другої проби на більш пізньому терміні, ніж перша проба, і визначення концентрації гормону, пов'язаного із вагітністю, у другій пробі пристроєм згідно з будь-яким із пунктів 1-18; і

(iii) порівняння першої концентрації з другою концентрацією, з одержанням індикації розвитку вагітності.

21. Спосіб контролю неприродного переривання вагітності, що включає:

(i) забезпечення першої проби і визначення першої концентрації гормону, пов'язаного із вагітністю, у пробі;

(ii) викликання переривання вагітності;

(iii) забезпечення другої проби на більш пізньому терміні, ніж перша проба, і визначення концентрації гормону, пов'язаного із вагітністю, у другій пробі, з використанням пристрою згідно з будь-яким із пунктів 1-18; і

(iv) порівняння першої концентрації з другою концентрацією, з одержанням індикації розвитку вагітності.

22. Спосіб контролю того, чи мало місце неприродне переривання вагітності, що включає аналіз проби пацієнтки, у якій викликали переривання вагітності, вимірювання концентрації гормону, пов'язаного із вагітністю, пристроєм для детекції і забезпечення індикації концентрації гормону, пов'язаного із одноплодною вагітністю (зокрема hCG), що включає матричне визначення траєкторії аксіального потоку, де матриця включає:

(i) зону приймання проби, що розташована на входному патрубку траєкторії потоку, для приймання рідкої проби; і

(ii) множину випробувальних зон, що розміщено в межах траєкторії потоку нижче від зони приймання проби, де кожна випробувальна зона здатна виявляти різну концентрацію гормону, порівняно з сусідньою випробувальною зоною; та

(iii) порівняння концентрації гормону з концентрацією у пробі перед або негайно після переривання вагітності.

23. Спосіб згідно з пп. 20-22, де першу концентрацію реєструють на пристрої, який використовують, щоб визначити концентрацію у другій пробі, або на його упаковці.

24. Спосіб згідно з пп. 20-23, де зменшення концентрації гормону, пов'язаного із вагітністю, вказує на те, що відбулося замирання.

Даний винахід відноситься до наборів для аналізу для моніторингу концентрації гормонів, пов'язаних із вагітністю, таких, як хоріонічний гонадотропін, особливо людський хоріонічний гонадотропін (hCG), у пробах, одержаних від вагітних ссавців жіночої статі, таких, як людські істоти. Аналізи використовують для моніторингу ранніх стадій вагітності, для забезпечення ранніх ознак ненормальних вагітностей та нормальних замирань, та вони можуть також забезпечити ознаку того, чи було успішним переривання, викликане хімічно.

Людський хоріонічний гонадотропін (hCG) є білковим гормоном, що стимулює секрецію прогестерону. Більш, ніж 25 років дослідники вивчали молекулярні форми hCG при вагітності для ряду різних психопатологічних станів, таких, як трофобластичні хвороби, рак яєчок та ряд пухлин. hCG знайдено у ряді форм, включаючи інтактний hCG, вільну- α субодиницю, вільну- β субодиницю та різні фрагменти та ізоформи гормону.

hCG має дві нековалентно зв'язані субодиниці (α та β), послідовності яких ідентичні на, приблизно, 10% та мають аналогічні конформації. Субодиниці α та β мають 5 та 6 дисульфідних містків, відповідно.

Субодиниця α має 92 амінокислоти та експресується як тканинами гіпофізу, так і тканинами плаценти. Субодиниця β (145 амінокислот) визначає біологічну та імунореактивну унікальність інтактної молекули hCG. Було доведено, що антитіла, утворені до С-кінцевого пептиду, є особливо корисними для детекції hCG. Такі антитіла демонструють мінімальну перехресну реактивність, чи її відсутність, по відношенню до лютотропіну (LH). Такі С-кінцеві антитіла, як доведено, є особливо корисними для вимірювання низьких концентрацій hCG протягом ранніх стадій вагітності.

Детекція hCG, та, безперечно, іншого гормону, прогестерону, для детекції вагітності, відома багато років. Такі випробувальні прилади включають такі випробувальні смуги, як у EP0125118, такі

мембранні аналізи, як у US4,818,677, та системи проточного аналізу, такі, як у GB2,204,398 та EP0306772. Більшість з цих пристроїв забезпечує кількісний аналіз. Тобто, вони визначають, чи досяг hCG певної концентрації та забезпечують просту відповідь "так/ні" на питання, чи вагітна жінка.

Типово, жінка має чекати 10-12 тижнів для того, щоб провести успішне вивчення для визначення нормальної вагітності.

Винахідники розуміли, що існує потреба у забезпеченні простого, легкого у використанні та економного способу, що дозволить жінкам підтвердити наявність вагітності. Такий аналіз також дозволяє ранню детекцію проблем, пов'язаних із вагітністю та замираннями, що зустрічаються у природі. Часто такі замирання пропускають на ранніх стадіях вагітності, що призводить до значного розчарування та дистресу на більш пізніх стадіях вагітності при проведенні першого дослідження. Більш того, винахідники розуміли, що такі випробувальні набори можна збільшити простим способом моніторингу викликаних хімічно замирань.

В US5,786,220 описано спосіб розрізнення нормальної та патологічної вагітності. Спосіб засновано на визначенні концентрації прогестерону чи прогестеронового метаболіту. Концентрація, вища за попередньо визначену граничну концентрацію, є ознакою нормальної вагітності. Концентрація hCG може бути виміряна у зв'язку із концентрацією прогестерону. Видима мітка накопичується, коли hCG перевищує граничний рівень, проте відсутня нижче за значення. Показано використання hCG для уникнення помилкового прогнозу нормальної вагітності, коли фактично людина не була вагітна під час проведення тесту. Описано переважний аналіз, що забезпечує два сигнали, де наявність одного сигналу та відсутність іншого сигналу вказує на нормальну вагітність. Обговорені порогові величини у 5 нг/мл - 50 нг/мл прогестерону у крові, плазми та сироватці. 25 mIU/мл - 100 mIU/мл є граничними рівнями hCG.

У патенті відмічено, що послідовне зростання hCG кожного дня може бути використане як ознака життєздатної вагітності, де рівні прогестерону залишаються вищими за 25 нг/мл. Рівень hCG нижче за 1000 mIU/мл через вісім тижнів після запліднення, у сполученні із 25 нг/мл прогестерону, заявлено як ознаку загрози вагітності. Описано напівкількісний аналіз вимірювання hCG та прогестерону у сироватці. Запропоновано п'ять концентрацій hCG: 500, 1000, 1500, 2000 та 2500 mIU. Фінальна пряма проявляє колір, тільки коли 2500 mIU hCG вищі за 2500 mIU. Прогестерон вимірюють в аналогічному аналізі.

В US2005/0130120 описано аналізи для детекції та диференціації різних аналітів у одній рідкій пробі. Метою є вимірювання множини аналітів у пробі, таких, як гормони, метаболіти та антигени інфекційних агентів, таких, як бактерії та віруси.

В US2003/1075991A описано оптичну матрицю потоків для кількісного визначення hCG від 0-150 000 mIU/мл у пробі. Метод використовує зону захоплення, імобілізовану анти-hCG зондами. Концентрацію захоплених hCG визначають з викорис-

танням комплексної системи оптичних променів. Її використовують для сприяння прогнозуванню ранніх стадій вагітності.

У US2003/0003597 описано альтернативний аналіз для визначення результату вагітності. Аналіз визначає конкретну ізоформу дуже ранньої стадії вагітності hCG у пробі. Її порівнюють з нормалізованою кількістю у суб'єктів з нормальною вагітністю чи невагітних суб'єктів.

У EP 1571451A описано взяття проби у суб'єкта жіночої статі та вимірювання рівню hCG у пробі. З проби можна здійснити екстраполяцію для визначення оціненого спрогнозованого часу. Одна з ознак описаного способу полягає у взятті ряду проб для оцінки очікуваної дати пологів чи дати запліднення. У способі розглядається підвищення рівнів hCG та їх відповідність попередньо визначеній кривій концентрації hCG для визначення дати. Запропоновано складний прилад, що включає мікропроцесор, що дозволяє проведення аналізів на hCG протягом ряду днів та реєстрацію даних. Мікропроцесор, зазвичай, розташовано в окремому пристрої зчитування аналітичного пристрою, що використовують для детекції аналіту.

Навпаки, Заявники пропонують простий недорогий пристрій, що дозволяє легку детекцію зниження рівнів hCG у вже вагітних жінок.

Barnhart K., et al, *Obstetrics and Gynaecology* (2004), Vol. 104, pages 50-54 and 975-981, обговорює зростання рівнів hCG у вагітних жінок та зниження hCG у сироватці після спонтанних замирань. Це вказувало на швидкість зниження hCG при спонтанних замираннях та описується як квадратичний профіль з більшим зниженням hCG з більш високим рівнем представлення. Швидкість зниження знаходилася у діапазоні від 21% до 35% через 2 дні та 60% - 84% через 7 днів. Швидкість зниження менша за 21% через 2 дні чи 60% а через 7 днів передбачала збереження трофобластів чи ектопічну вагітність. Тому падіння рівнів hCG могло бути використане як ознака замирань плоду чи інших проблем, пов'язаних із вагітністю.

У "Improving Medical Abortion", Christian Fiala, Dept. of Woman and Child Health, Karolinska Inst., Stockholm, Sweden, 2005, ISBN 91-7140-458-9, передбачається, що додатковою метою дослідження групи є ідентифікація способів, що дозволяють жінкам перевіряти успішні замирання з використанням аналізів сечі на hCG. Це вказує на те, що ці тести на той час були відсутні. Це також є підтвердженням того, що рівні hCG знижуються до 20% рівнів, що були до замирання, через тиждень після замирання.

Винахідники розуміли, що це може бути використано для моніторингу хімічно викликаних замирань. Такі переривання, часто відомі як "пігулки викиднів" застосовують у багатьох країнах у перші тижні вагітності (перші 9 тижнів у Великобританії). В одному традиційному способі використовують ліки під назвою міфепрістон (також відомі як Міфегін чи RU486). Їх зазвичай дають у лікарнях. Потім пацієнтів зазвичай відправляють додому. Через період до двох днів дають другі ліки, простагландин. Одна з проблем, пов'язаних із цим способом, полягає у тому, що невелика частка

ліків може бути неефективна. Тому існує необхідність у ранніх ознаках того, що лікування не було ефективним, щоб лікар мав змогу у подальшому прогнозувати лікування та діагноз та здійснювати їх у припустимі періоди часу, встановлені для такого лікування. Можливість здійснювати це вдома, пацієнтом, без відвідування клініки, дозволяє проводити лікування пацієнтом окремо, зменшуючи період травмування, що часто трапляється.

Вимірювання рівнів hCG до лікування також забезпечує фонові вимірювання. Очікується, що концентрація hCG забезпечує ранню ознаку часу настання штучного переривання.

Винахідники зрозуміли, що існує потреба у простому та легкому у використанні випробувальному наборі, що може бути використаний в домашніх умовах. Він, переважно, використовує та адаптує традиційні та добре відпрацьовані технології для одержання рентабельного набору для аналізів. Він може бути використаний як комфортний, для моніторингу поступового зростання hCG при нормальній вагітності, чи, більш переважно, для моніторингу природних чи неприродних завмирань.

Відповідно, перший аспект винаходу забезпечує пристрій для детекції та забезпечення вказування кількості гормону, пов'язаного з одноплодовою вагітністю, що включає матрицю, що визначає аксіальний потік, де матриця включає:

(i) зону прийому проби, що розташована на входному патрубку траєкторії потоку, для отримання рідкої проби

(ii) множину випробувальних зон, що розміщено в межах траєкторії потоку нижче від зони прийому зразку, де кожна випробувальна зона здатна виявляти різну концентрацію гормону, порівняно з сусідньою випробувальною зоною; що додатково включає:

(iii) Індикатор, наприклад, на пристрої, чи упаковці пристрою, для реєстрації концентрації гормону, що реєструють пристроєм того ж самого чи іншого типу.

Винахідники розуміли, що, коли пристрій використовують у домашніх умовах, то користувачі часто втрачають будь-які шматки паперу, на яких вони записують концентрації, вказані пристроєм, що вони використовували спочатку. Отже, вони розуміли, що може бути корисним пристрій, що має індикатор для реєстрації попередньої концентрації гормону, для негайного порівняння за допомогою пристрою, що використовують пізніше. Перевагою такого пристрою є зниження ймовірності втрати результатів попереднього аналізу.

Відповідно, пристрій включає індикатор для реєстрації концентрації гормонів, що реєструють цим чи іншим пристроєм. Цей індикатор може просто бути розташований у положенні, в якому може бути поміщена мітка відповідної концентрації на пристрої. Ця мітка може бути поміщена на пристрій за допомогою ручки. Альтернативно, наприклад, пристрій може включати ряд виступів, вмонтованих у корпус пристрою. Виступи можуть бути деформовані таким чином, щоб відповідна концентрація могла бути безпосередньо знижена, викликаючи зниження порівняно із відповідною кон-

центрацією. Індикатор може бути закріплений чи знімний, з можливістю переносу на інший прилад. Він може також бути розташований на упаковці пристрою, надаючи можливість реєстрації попередньої концентрації. Він може включати помічену номером чи кольором смугу для зчитування та реєстрації рівнів. Індикатор може необов'язково містити індикатор, для того, щоб показувати досягнення рівню hCG, при якому можливо успішне проведення ультразвукового дослідження.

Упаковкою може бути ящик чи інший контейнер, чи обгортка, у яку пристрій пакують перед застосуванням.

Переважно пристрій є одноразовим. Термін „одноразовий” вказує на те, що пристрій є пристроєм для одноразового використання. Найбільш переважно, вказівки на кількість гормону може бути одержано користувачем пристрою безпосередньо шляхом візуального вивчення пристрою (наприклад, без використання окремого рідера)

Переважно, пристрій адаптовано таким чином, щоб детектувати зниження гормону при вагітності, яке пов'язане із невиношуванням чи неприродним перериванням вагітності. Як описано нижче, Заявники мали оптимізований пристрій для детекції таких станів.

Випробувальний набір, переважно, адаптовано для детекції природного підвищення рівнів hCG при розвитку вагітності (для забезпечення фактора комфорту матерям перед, наприклад, проведенням ультразвукового дослідження) та також для надання можливості детекції швидкого зниження концентрації hCG при завмиранні плоду.

Пристрій, переважно, знаходиться у формі випробувальної смуги. Проте, аналіз також може бути використаний у формі інших приладів проточного аналізу, що, взагалі, відомі з рівня техніки. Наприклад, прилад проточного аналізу може включати комірку, в яку поміщають пробу, наприклад, за допомогою піпетки чи шприця. Рідину проби після цього вводять у матрицю та пропускають через пристрій.

Переважно, детектують гормон одноплодової вагітності. Гормоном, пов'язаним із вагітністю, є, найбільш переважно, хоріонічний гонадотропін. Проте, також може бути застосований прогестерон. Переважно, гормоном, пов'язаним із вагітністю, є людський гормон. Проте, передбачається, що гормоном, що має бути визначений, може бути гормон будь-якого ссавця, наприклад, що дозволяє прогресію ранніх періодів вагітності у тварин, важливих з комерційної точки зору, таких, як свини, чи, альтернативно, що дозволяє розвиток ранніх періодів вагітності у рідких тварин.

Матрицею може бути будь-яка традиційна тверда фаза такого типу, що взагалі застосовують при проведенні імунологічних аналізів, включаючи випробувальні смуги, мембрани, поглинальні прокладки, носії, комірки для мікротитрування, випробувальні пробірки та інш. Як вказано раніше, такі прилади, взагалі, відомі з рівня техніки. Типові матеріали матриці включають поліетиленові листові матеріали високої щільності, папір, мікроцелюлозу, дериватизований нейлон, целюлозу та інші матеріали, відомі у цій галузі. Вони можуть, необо-

в'язково, бути блоковані, наприклад, цільним чи дериватизованим альбуміном бичачої сироватки, сироватку інтактною тварини, казеїн чи нежирне сухе молоко.

Зона приймання проби являє собою частину матриці, на яку наносять окрему пробу. Пробою можуть бути, наприклад, кров, сироватки чи сеча. Зона приймання проби може видаляти з проби кров'яні клітини, такі, як червоні кров'яні клітини, білі кров'яні клітини та/або різні гормони, наприклад, шляхом застосування іммобілізованих антитіл до клітин чи гормонів, що мають бути видалені. Такі системи, взагалі, відомі у цій галузі. Переважно, пробою є сеча.

Множина випробувальних зон, розташована у межах траєкторії потоку нижче за зону приймання проби детектує різні концентрації гормону порівняно із сусідньою випробувальною зоною. Переважно, це забезпечує візуальне визначення концентрації. У найпростішій формі, це може проявлятися як забарвлення у вікні на пристрою порівняно із репрезентативною, зображувальною чи чисельною індикацією конкретної концентрації чи рівню гормону. Альтернативно, можуть бути використані більш складні дисплеї, такі, як рідкокристалічний дисплей, для візуального визначення рівню гормону. Пристрої для перетворення зв'язування hCG у електронне чи LCD представлення відомі *per se*. Проте, такі електронні системи підвищують вартість пристрою. У переважній формі дисплеєм може бути просто ряд забарвлених випробувальних зон. Зі збільшенням концентрації гормону зростає кількість забарвлених випробувальних зон. Випробувальні зони, що стають забарвленими, можуть бути зареєстровані індикатором для порівняння з більш пізнім аналізом.

Переважно, кожна випробувальна зона утримувальні елементи, що дозволяють обмеження міченого гормону, пов'язаного із вагітністю. Утримувальні елементи є, зазвичай, антитілами чи фрагментами антитіл. Переважно, ці антитіла є специфічними до гормону, пов'язаного із вагітністю. Тобто, вони зв'язують гормон, що має бути проаналізований, та не істотно зв'язують інші гормони чи інші сполуки у пробі.

Типово, утримувальні елементи іммобілізовані у випробувальній зоні.

Однією з можливих проблем, визначених винахідником, є неспецифічне зв'язування міченого реагенту у при більш низьких концентраціях гормону. Вони зрозуміли, що це зв'язування можна зменшити за допомогою системи авідін-біотин.

Авідін (та стрептавідін) є відомим протеїном, що спочатку одержували шляхом виділення з яєчного білка, який зв'язує біотин з константою афінності 10^{-15} . Винахідник зрозумів, що чутливість аналізу може бути підвищена шляхом використання зв'язування авідін/біотин.

Переважно, утримувальний елемент включає першу половину пари зв'язування авідін/біотин (тобто, біотин чи авідін), а пристрій включає антитіло до анти-гормону вагітності, (таке, як анти-hCG антитіло), зв'язане із другою половиною пари зв'язування авідін/біотин (тобто, біотин чи авідін.) Антитіло може зв'язувати гормон та, у свою чергу,

утримується та зв'язано утримувальним елементом у випробувальній зоні шляхом зв'язування пари авідін/біотин. Антитіло може бути забезпечено у випробувальній зоні чи у зоні мітки проби (що описані вище) та зв'язує гормон у розчині до того, як потрапити до випробувальної зони шляхом взаємодії між парою зв'язування авідін/біотин.

Термін "авідін" призначений для охоплення як авідину, так і стрептавідину (спочатку виділеного з бактерії). Способи іммобілізації авідину та біотину на матрицях, загалом, відомі з рівня техніки, такі, як способи приєднання авідину чи біотину до протеїнів, таких, як антитіла. Авідинільоване чи біотинільоване антитіло є, переважно, моноклональним анти-hCG антитілом.

Переважно, мічений реагент забезпечують як мічене поліклональне антитіло до антигормону вагітності (такий, як анти-hCG). Воно, переважно, додатково до антитіла приєднано до другої половини пари авідін/біотин.

Антитілами є поліпептиди, істотно кодовані геном імуноглобуліну чи генами імуноглобуліну чи їх фрагментами. Антитіло може належати до будь-якого з класів імуноглобуліну, IgG, IgM, IgA, IgD чи IgE. Антитіло може бути поліклональним чи моноклональним. Антитіла можуть включати повний імуноглобулін чи його фрагменти. Його фрагменти включають Fab, Fv та F(ab')₂, Fab', та подібні. Антитіла можуть також включати химерні антитіла та їх фрагменти, одержані рекомбінантними способами. Придатні антитіла добре відомі з рівня техніки.

Переважно, детектована концентрація гормону, пов'язаного із вагітністю, зростає між випробувальною зоною, найближчою до зони приймання проби, та найбільш віддаленою випробувальною зоною, під зоною приймання проби. Тобто, найнижчу концентрацію гормону детектують найближче до зони приймання проби, тоді як найвищі концентрації гормону, пов'язаного із вагітністю, детектують під зоною приймання проби та у найбільшому віддаленні від неї.

Переважно, матриця є, зазвичай, лінійною, а випробувальні зони можуть бути забезпечені у частинах матриці, виходячи з площини матриці. Потік проби через матрицю може бути направлений, наприклад, шляхом дії капілярів на частину матриці, що виходить із загальної площини матриці, у випробувальну зону, де він потрапляє, наприклад, в утримувальні елементи. Це допомагає попереджати потрапляння, наприклад, барвників для детекції hCG, між випробувальними зонами. Може бути забезпечений молекулярний клапан для застосування для направлення проби в один бік у випробувальну зону.

Проба, переважно, надходить від зони приймання проби, необов'язково, через зону мітки, та через випробувальні зони нижчої концентрації та у випробувальні зони вищої концентрації.

Кожна окрема випробувальна зона детектує різні концентрації гормонів. Це може бути досягнуто простим забезпеченням різних концентрацій антитіл, наприклад, шляхом серійних розведень антитіл у кожній випробувальній зоні. Альтернативно, різні концентрації можуть бути детектовані,

через здатність, наприклад, hCG проходити через зону у напрямку від зони приймання проби.

Кожна випробувальна зона залучатиме мічений hCG. Поступово зростаючі кількості міченого hCG будуть здатні проходити до прилеглих випробувальних зон.

Антитіла, переважно, іммобілізовані у кожній випробувальній зоні.

Наприклад, випробувальні зони можуть включати зони детекції для 400, 15000 та 40000 mIU/мл гормону. Якщо проба містить лише, приблизно, 400 mIU/мл гормону, то істотно тільки випробувальна зона з 400 mIU/мл стає міченою. Проте, якщо проба містить, приблизно, 40000 mIU/мл гормону, то випробувальні зони для 400, 15000 та 40000 mIU/мл можуть стати міченими.

Переважно, забезпечується зона мітки у межах траєкторії потоку між зоною приймання проби та множиною випробувальних зон, вказана зона мітки містить мічений реагент, здатний зв'язувати гормон, зв'язаний із вагітністю, та є рухомою у присутності проби рідини, де кожна зі вказаних випробувальних зон містить утримувальні елементи, що дозволяють утримувати мічений гормон, пов'язаний із вагітністю. Зоною мітки може бути така частина пристрою, як зона приймання проби.

Міченим реагентом є, переважно, детектовна мітка, приєднана до учасника специфічного зв'язування, такого, як антитіло, здатне до зв'язування гормону, пов'язаного із вагітністю. Мічений реагент вивільнюють з рідини проби, що проходить через зону мітки. Потім мічений реагент зв'язує гормон, пов'язаний із вагітністю. Приєднання може бути ковалентним чи нековалентним зв'язуванням. Такі мітки самі по собі відомі у цій галузі. Не потребується, щоб мітка була специфічна тільки до гормону, пов'язаного із вагітністю, оскільки інші речовини, мічені міченим реагентом, можуть просто вимиватися із випробувальних зон, а мічений гормон, пов'язаний із вагітністю, іммобілізовано утримувальним елементом, що, переважно, забезпечується у кожній випробувальній зоні. Проте, переважно, мічений реагент, переважно, включає учасника зв'язування, такого, як антитіло чи фрагмент антитіла, що є специфічним до гормону, пов'язаного із вагітністю. Антитіло чи його фрагмент,

чи навіть альтернативний учасник зв'язування, є міченими. Антитіло дозволяє міченому реагенту виробляти детектовний сигнал, що відноситься до присутності гормон у, що пов'язаний із вагітністю, у пробі. Мітка сама по собі може утворювати мічений реагент.

Міткою може бути будь-яка речовина, здатна до продукування візуально детектовного сигналу, або, дійсно, сигналу, детектовного за допомогою. Мітки включають ферменти та субстрати, хромогени, флуоресцентні сполуки та радіоактивні мітки. Інші придатні мітки включають латексні частинки чи носії, колоїдні металеві частинки, такі, ж золоті, колоїдні неметалеві частинки, такі, як селен чи телур чи інші такі мітки, відомі у цій галузі. Переважно, мітка утворює забарвлений сигнал, що є візуально детектовним оком, без необхідності у додатковому обладнанні.

Переважно, пристрій включає від 6 до 30 окремих випробувальних зон, найбільш переважно, від 6 до 20, особливо 8-15, чи 10-15, найбільш переважно 9 чи 12 окремих випробувальних зон. Кожна з цих випробувальних зон, переважно, має різну концентрацію гормону, що може бути визначена.

Переважно, гормоном, що має бути детектований, є hCG. Переважно, пристрій може детектувати діапазон hCG між 10-260 000 mIU/мл проби. Найбільш переважно, детектовна концентрація hCG становить 40-165 000 mIU/мл.

Детектовним hCG є, переважно, загальний hCG, що, переважно не обмежується окремою конкретною ізоформою hCG.

Винахідниками було вивчено результати емпіричних досліджень, наведених на наступних вебсайтах: americanpregnancy.org, ivfer.com, greenjournal.org, spals.com, birth.com.au, sydpath.stvincents.com.au, Human Reproduction, <http://humrep.oxfordjournals.org/cgi/reprint/14/9/2375>, ivfer.com/hcg_survey.htm та fertilityplus.org/faq/hpt.html. Вони порівняли та усеředнили дані щодо hCG, що спостерігалися у ході ранніх стадій вагітності та використали їх для моделювання найбільш переважних схем концентрацій гормону, що має бути детектований. Визначені ними результати наведено нижче.

Дані	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	36	42	69	99
Середній показник	3		10	25	44	189	734.6	2833.7	43923	8062.5	21193.33	76375	114883.3	154987.5	114983.3
Ступінь змін					1.8	4.3	3.7	3.9	1.5	1.8	2.6	3.6	1.5	1.3	

На малюнках представлено мЛОд/мл hCG.

Виходячи з даної таблиці варто відмітити, що між 15 і 18 днями винахідники відмітили ріст, який був істотно вищий, ніж можна було б очікувати. Такий ріст рівню hCG спостерігався у фазі, за якої зазвичай проходила овуляція, і тривав протягом близько 10 днів. Це узгоджувалося з відповідними фізіологічними симптомами у вагітних жінок.

Встановлено, що рівень гормонів збільшувався від приблизно 189 мЛОд/мл до приблизно 735

мЛОд/мл з 15 по 18 день, а потім продовжував підвищуватися до понад 2000 на 21 день. Це означає, що концентрації між 500-1500, переважніше 600-1400, 700-1300, 800-1200, 900-1100 мЛОд/мл hCG, не потребують вимірювання пристроєм. Це скорочує число окремих потрібних випробувальних зон, або означає, що додаткові випробувальні зони можуть використовуватися, щоб підтвердити та уточнити визначений рівень hCG.

Переважно набором для аналізу можна визна-

чити концентрації hCG приблизно 1500-2500 mIU/ml. Це типові концентрації, при яких вагітність достатньо розвинулася, щоб її можна було підтвердити, використовуючи ультразвукову сканограму шляхом вагінального дослідження. Концентрація близько 4000-7000 мОд/мл також може бути виявленою і є типовим показником того, що можна використовувати ультразвукове черевне дослідженням для підтвердження вагітності.

Додатковий чинник, що треба взяти до уваги для визначення концентрації hCG, виявляє типову стадію на якій здійснюють ранні медичні аборти, наприклад клінічне припинення вагітності. Зазвичай це проводиться на 35 дні вагітності, коли рівень hCG становить приблизно 120,000 mIU/ml. Останній строк раннього медичного аборту в UK - 63 день вагітності. Ультразвук може використовуватися для визначення вагітності на близько 5 тижні, коли рівень hCG може становити, наприклад 150,000 mIU/ml. Якщо плід абортовано, або природно, або штучно, спостерігається швидке зменшення кількості hCG.

Тому тест-набір повинен бути здатний визначити природне збільшення рівню hCG, оскільки вагітність розвивається (таким чином надаючи інформацію вагітним жінкам, які хочуть мати підтвердження, що вагітність проходить добре) а також бути здатним визначити швидке зменшення концентрації hCG, коли плід абортовано.

Переважно, концентрації гормону, які визначаються в кожній з випробувальних зон, становить: 40, 100, 400, 1600, 4000, 8000, 16000, 32000, 64000, 96000, 132000, 164000 mIU/ml, або частіше за все 2500, 7000, 15000, 27500, 40000, 55000, 75000, 100000 mIU/ml. Останній ряд концентрації є особливо вигідним для пристрою, що використовує менші концентрації.

На фігурі 1 показано підвищення і зменшення рівню hCG при нормальній вагітності, спонтанному викидні або припиненні вагітності. Ці данні також представлені на Фігурі 2 у логарифмічному масштабі. Представлені типові концентрації hCG, які визначені пристроєм ("випробувальні рівні"). Це ілюструє здатність випробувального пристрою визначати як підвищення рівню гормонів, пов'язаного з нормальною вагітністю, так і зниження hCG через викидень/аборт. Концентрація hCG була визначена, використовуючи дані представлені у відомій спеціальній літературі цієї галузі знань, як зазначено вище.

"Зразкові дані" - найбільш наближенні до доступних емпіричних даних.

Щоб визначити вимушене припинення вагітності, аналіз зазвичай проводять перед припиненням, щоб мати вихідні данні. Аналіз проводять повторно, зазвичай використовуючи окремі пристрої, на 4 день і, якщо є потреба то й на 8 день, для того, щоб слідувати за зменшенням концентрації hCG.

Переважно, пристрої винаходу додатково включають контрольну зону в межах шляху потоку і після засобу контролю і включають засоби, що сигналізують про завершення аналізу. Такі контрольні зони добре відомі в пристроях описаних у науці та техніці. Наприклад, це можуть бути хімічні

речовини, які стають видимими, коли досягається необхідна вологість, яка вказана на пристрої.

Переважно, пристрій є випробувальною смугою. У цьому випадку він може включати тампон у зоні приймання проби для підняття проби, наприклад від рівня зразка сечі. Тампон може бути вироблений з будь-якого відповідного всмоктувального матеріалу, наприклад гідрофільного поліетиленового матеріалу, акрилового волокна, фільтрувального паперу, або інших відомих у науці та техніці. Тампон має функцію переміщення зразка в наступну частину матриці для аналізу. Зона приймання проби або частина цієї зони може включати частину, яка здатна до зміни кольору при контакті із зразком. Наприклад, це, можуть бути хімічні речовини, які змінюють колір при зволоженні. Цей прийом можна використовувати, щоб гарантувати, що той самий пристрій не використовується для послідовних випробувань. Кришка також може застосовуватися для забезпечення покриття зони приймання проби під час або після використання, щоб запобігти капанню з зони приймання проби.

Пристрої, представлені у винаході переважно мають відповідну упаковку, щоб запобігти випадковому контакту з компонентами, що можуть контактувати з пристроєм. Упаковка може включати один або більше вікон для спостереження випробувальних зон і/або керування зоною. Де б не використовувався тампон, пристрій для аналізу може включати отвір або камеру для отримання зразка. Упаковка може також включати одну або декілька зубчастих або штампованих частини, задля того щоб пристроєм можна було легко управляти. Упаковка може бути виготовлена з відповідних у науці та техніці пластмас.

Переважно, пристрої винаходу мають форму наборів, що включають множини пристроїв. Це дозволяє використовувати пристрій у різні дні протягом вагітності, таким чином, можна спостерігати концентрації на різних днях вагітності. Набір переважно включає 2, 3 або більше пристроїв.

Пристрої також використовуються разом з наборами визначення вагітності, які зазвичай детектують 25-40 mIU hCG.

Подальше втілення винаходу представляє спосіб контролю вагітності:

(i) забезпечення першої проби і визначення першої концентрації гормону, пов'язаного із вагітністю, у пробі, пристроєм згідно будь-якого з пунктів 1-18;

(ii) забезпечення другої проби на більш пізньому терміні, ніж перша проба, і визначення концентрації гормону, пов'язаного із вагітністю, у другій пробі пристроєм згідно будь-якого з пунктів 1 - 18; і

(iii) порівняння першої концентрації з другою концентрацією, з одержанням індикації розвитку вагітності.

Інше втілення винаходу представляє спосіб контролю не природного переривання вагітності:

(i) забезпечення першої проби і визначення першої концентрації пов'язаного із вагітністю, у пробі;

(ii) викликання переривання вагітності;

(iii) забезпечення другої проби на більш пізньому терміні, ніж перша проба, і визначення концентрації гормону, пов'язаного із вагітністю, у другій пробі, з використанням пристрою згідно будь-якого з пунктів 1-18; і

(iv) порівняння першої концентрації з другою концентрацією, з одержанням індикації розвитку вагітності.

Проба зазвичай перевіряється *in vitro* з використанням, наприклад, крові, слини або бажаніше проби сечі.

Переважає, в способах винаходу, перша концентрація реєструється на пристрої, або упаковці пристрою, щоб порівняти з концентрацією другої проби.

Винахід також представляє спосіб контролю того, чи мало місце не природне переривання вагітності, що включає аналіз проби пацієнта, у якого викликали переривання вагітності, вимірювання концентрації гормону, пов'язаного із вагітністю, пристроєм для детекції і забезпечення індикації концентрації гормону, пов'язаного із одноплодною вагітністю (зокрема hCG), що включає матричне визначення траєкторії аксіального потоку, де матриця включає:

(i) зону приймання проби, що розташована на вхідному патрубку траєкторії потоку, для приймання рідкої проби; і

(ii) множину випробувальних зон, що розміщено в межах траєкторії потоку нижче від зони приймання проби, де кожна випробувальна зона здатна виявляти різну концентрацію гормону, порівняно з сусідньою випробувальною зоною; та

(iii) порівняння концентрації гормону з концентрацією у пробі перед, або негайно після переривання вагітності.

Переважає пристрій, або його упаковка, включає індикатор для реєстрації попередньої концентрації гормону, яка зареєстрована тим самим або іншим пристроєм.

Пристрій може включати одну або більше особливостей, властивих для пристрою згідно винаходу.

Концентрацію, наявну перед тим як або негайно після припинення вагітності можна отримати, використовуючи той самий або інший тип пристрою для аналізу.

Переважає, зменшення концентрації гормону пов'язаного з вагітністю вказує на те, що аборт або замирання мають місце. Таке зменшення вказує на те, що аборт або замирання має місце, таким чином, щоб користувач мав цю інформацію і пішов до лікаря для підтвердження цього факту.

Переважає пристрої представлені у винаході є кишеньковими і надають візуальну детекцію концентрації.

Переважає, послідовні аналіз здійснюються з 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 або 14 денним інтервалом.

Авідин/біотинова система описана вище може також бути пристосована для підвищення чутливості набору для аналізу вагітності.

Наступне втілення винаходу представляє пристрій для визначення гормону пов'язаного з вагітністю (особливо hCG), що включає матрицю, яка

визначає траєкторію аксіального потоку, де матриця включає:

(i) зону приймання проби, що розташована на вхідному патрубку траєкторії потоку, для отримання рідкої проби; і

(ii) одну або більше випробувальних зон, що розміщено в межах траєкторії потоку нижче від зони приймання проби, де зона приймання проби включає утримувальний елемент, який включає першу половину пари зв'язування авідин/біотин, та пристрій додатково включає

(iii) антитіло до анти-гормону вагітності, що зв'язане з другою половиною пари зв'язування авідин/біотин.

Елементи пристрою можуть бути індивідуальними або пов'язані згідно будь-якого втілення винаходу.

Пристрій може просто визначати концентрацію гормону, яка зазвичай становить 25-40 mIU/ml.

Нижче винахід описується за допомогою наступних малюнків:

Фігура 1 представляє типовий рівень hCG протягом нормальної вагітності, припинення вагітності або замирання вагітності. Концентрації hCG, ("випробувальні рівні"), що вважаються бажаними, також представлені на фігурі.

Фігура 2 представляє дані з Фігури 1, у логарифмічній системі.

Фігура 3 схематично представляє поперечний розріз пристрою згідно винаходу.

Фігура 4 представляє вид зверху набору для аналізу.

Фігура 5 представляє вид зверху другого набору для аналізу.

Фігура 6 представляє вид збоку альтернативного пристрою з випробувальними зонами, що знаходяться за межами матриці.

Фігура 7 представляє схему бажаної випробувальної зони

Фігура 8 представляє визначення різних концентрацій hCG зразковим пристроєм.

Концентрації A 0, B 500, C 2500, D 7000, E 15000, F 27500, G 40000, H 55000, I 75000, J 100000 mIU hCG/ml.

Почнемо з фігури 3. На ній представлено набір для аналізу, 10, що включає упаковку, 12. Упаковка включає множину вікон, 14, що надають візуальний доступ до матриці, 16. Матриця включає зону приймання проби, 18. Зона приймання проби, 18, включає тампон для поглинання рідкого зразка, наприклад проби сечі. Проба сечі витікає через тампон і через матрицю, 16. Тампон може бути з будь-якого відповідного всмоктувального матеріалу, наприклад паперу, і переважно включає речовину, яка змінює колір при контакті з рідиною. Матриця безпосередньо може бути з будь-якого відповідного матеріалу, як представлено вище. Бажаніше її виготовляти з поліетилену високої щільності. Рідкий зразок протікає зону прийому проби, 18, і зону мітки, 20. Зона мітки містить мічений реагент, який здатний зв'язувати гормон, пов'язаний із вагітністю, що є рухомим у присутності рідкої проби. Мічений реагент переважно здатний зв'язувати hCG. Зазвичай, мічений реагент є анти-hCG антитілом мічений візуальним мітками, на-

приклад, розчином золота або іншими кольоровими мітками. Це приводить до мічення гормону пов'язаного з вагітністю, як наприклад hCG, оскільки він проходить через матрицю, 16. Мічений гормон потім проходить через серії випробувальних зон, 22. Випробувальні зони включають антитіла в різних концентраціях. Антитіла є специфічними до гормону, пов'язаного із вагітністю. Зазвичай, це анти хоріонічні гонадотропні гормони кози або вівці. Вони зв'язують і утримують кольоровий гормон. Нижчі концентрації гормону виявляють випробувальні зони, найближчі до зони приймання проби, 18. Вищі концентрації виявляються у випробувальних зонах, 22, периферичних до зони приймання проби, 18. Коли достатня концентрація мічених гормонів проходить через матрицю, 16, до індивідуальних випробувальних зон, це призводить до виникнення забарвлення на стороні випробувальної зони, 22. Забарвлення буде видно через вікна, 14. Низька концентрація гормону фіксувалася б тільки однією з випробувальних зон, 22, забарвлення у випадку вищих концентрацій не буде спостерігатися, оскільки більшість мічених гормонів буде у випробувальних зонах найближчих до зони приймання проби, 18. При підвищенні концентрації, більше випробувальних зон, 22, будуть активізовано.

Після матриці, 16, проба надходить до контрольної зони, 24. Контрольна зона, 24, містить відповідні хімічні речовини, які набувають кольору при підвищенні вологості, що спостерігається через одне з вікон, 14.

На фігурі 4 представлено втілення винаходу, що вважається бажанішим. Воно включає 12 випробувальних зон, які видимі через вікна, 14. Випробувальні зони мають розміри: 40, 100, 400, 1600, 4000, 8000, 16000, 32000, 64000, 96000, 132000, 164000 mIU/ml. Випробувальна зона, 24, видима через вікно. Також видимим є тампон, який є зоною приймання проби, 18, і кришка, 27, для покриття тампону до і після використання. Фігура також показує індикатор або записуючу зону, 26, необхідну для реєстрації концентрації гормону, виявленого в пробі. У цьому окремому випадку, гормон детектується у 11 з 12 вікон. Це корелюється з концентрацією приблизно від 132000 до 164000 mIU/ml. Це випробування 1, як визначено мітками, 28. Відтепер індикатор не буде використаний.

На фігурі також представлено серію ребер, 30, які створюють рельєф упаковки 12, і дають змогу легше управляти пристроєм.

На фігурі 5 показано другий набір для аналізу представленого на фігурі 4, результат якого вказаний на смугі індикатора, 26, в точці, 32. Другий аналіз вказує на зменшення hCG. Тобто, колір з'являється у вікнах 1-8 (концентрації приблизно від 32000 до 64000 mIU/ml). Таке зменшення концентрації гормону вказує, що, можливо, є проблема з вагітністю, аборт або замирання. Це вказує користувачеві на те, що він повинен звернутися за медичною допомогою.

Другий аналізи проводиться через 1-4 день.

На фігурі 6 показано альтернативне втілення, в якому випробувальні зони, 40, знаходяться поза

площиною матриці, 16. Як зазначено вище, випробувальні зони переважно містять антитіла специфічні до гормону, пов'язаного із вагітністю. Випробувальні зони, 40, переважно включають той самий матричний матеріал, як і велика частина матриці, 16. Частина проби переважно рухається до зони під дією капілярних сил. Молекулярний клапан, відомий у науці та техніці, можна використовувати, щоб гарантувати рух проби тільки в одному напрямку від площини матриці, 16. Проба, що залишилася, рухається вздовж площини матриці до наступних випробувальних зон, 40, або до контрольної зони, 24.

Перевага цього втілення в тому, що таким чином ми запобігаємо вилугуванню зв'язаної мітки сусідніх випробувальних зон.

На фігурі 7 показано використання авідин/біотин зв'язаної пари, що є бажаним і переважним. Випробувальна зона (22) включає авідин (32) зв'язаний з його поверхнею. На фігурі hCG (38) зв'язується з авідином (33) через моноклональне анти-hCG антитіло (36), яке приєднується до молекули біотину (34). Біотин (34) зв'язується з авідином (33), щоб утримати гормон (38) у випробувальній зоні (22) за допомогою антитіла (36). Гормон (38), може бути виявлений за допомогою зв'язування міченого поліклонального антитіла (46), наприклад, латексною міткою (42). Альтернативно, біотин може приєднуватися до випробувальної зони і моноклонального анти-hCG антитіла пов'язаного з авідином. Мічене поліклональне антитіло (40, 42) і антитіло зв'язане з біотином (34, 36), можуть знаходитися у зоні приймання проби або зоні мітки пристрою, які можуть містити гормон проби, розміщений у зоні до руху по матриці до випробувальної зони.

На фігурі 8 показано визначення різних концентрацій hCG випробувальними смугами.

Матеріали та реагенти:

- S&S FF60 нітроцелюлоза, pt# 10534315, lot# DH0348-1

- Тампон: ватман 470 lot# F015

- Складений тампон: ватман Standard 17 оброблений 10 мМ розчином натрію тетраборату, 4% сироваткою кози, 3% BSA, 1% PVP, 0.25% трітоном X-100 та обпилений OD50 анти - hCG-золото миші + 1 мг/мл IgG, (lot# 2/26/07MA)

- об'єднаний анти hCG - золото миші попередньо обпилений блокованим Standard 17, lot: 031907MA

- блокуючий буфер для мембрани: 10 мМ фосфат, 0.1% BSA, 0.2% PVP, 4% сахароза, 0.1% азид, lot: 032107MA)

- G&L 60 mm laminate backing

- 75 x 100 мм скляні трубки для випробувальних смуг

- Випробувальні смуги: Покриті анти hCG (Fitzgerald, lot# X0610190)

- Контрольні смуги: Покриті анти мишачим IgG (Quad Five lot # 41-4222)

- HCG стандарт (Fitzgerald lot# 015K1453)

- Проба сечі жінки: 022807 (для ділюції hHCG стандартів)

- Фронтальний біодотний пристрій

Способи

25 мм на FF60 нанесено шаром товщиною 16 мм на підтримуючу основу. Контрольне антитіло, goat anti-mouse, було розбавлене до 0.5 мг/мл у PBS (фосфатно - буферний сольовий розчин). Потім контрольне антитіло вводять до BioJet Quanti line No.2 і розподіляли використовуючи BioJet диспергатор зі швидкістю 1 $\mu\text{л}/\text{см}$ = 50 мм/с. Контрольна смуга була обпилена нітроцелюлозою на 5 мм від верхньої точки.

Антитіло випробувальної смуги потім розбавляли, анти-hCG кози до 3,2 і 1 мг/мл у PBS. 1 мг/мл розчину вводили до BioJet Quanti line No.1 і розподіляли використовуючи BioJet диспергатор зі швидкістю 1 $\mu\text{л}/\text{см}$ = 50 мм/с. Випробувальні смуги були окроплені на 1.8 мм окремо.

Потім смугу сушили і обробляли 2 мг/мл розчином антитіла мг/мл у BioJet Quanti line No.1 розподіляли використовуючи Frontline диспергатор зі швидкістю 1 $\mu\text{л}/\text{см}$ = 50 мм/с. Випробувальні смуги були окроплені як описано нижче.

Цю процедуру повторювали для 3 мг/мл розчину антитіла і основу сушили при 37°C протягом 30 хв. Мембрану блокували, використовуючи 10

мл мембранного блоку шляхом повільного драпірування мембрани через блокуючий буфер і направляючи це до тампону через матеріал. Потім основу розміщували на паперовому рушнику, щоб звільнитися від будь-якої зайвої рідини і сушили при 37°C протягом 30 хвилин.

Суха об'єднана подушка зі смугами потім розрізалася на 20 ml і її розшаровували на тонкі мембрани з 2 ml накладанням. Тампон розрізали на 19 мм і розшаровували на тонкі мембрани з 2 мм накладанням. Випробувальна основа розрізалася на смуги 4 мм, використавши відповідний різак.

Щоб перевірити роботу смуги, 100 $\mu\text{л}$ hCG вносили до скляних пробірок. Смуги опускали разом із сполученою подушкою так, щоб вони поглинули випробувальний матеріал через смугу. Через 20 хвилин смуги виймали з пробірок і фотографували.

Номери у таблиці означають мг/мл goat anti hCG, який наносили на смуги.

Випробувальна смуга	1	2	3	4	5	6	7	8	9	загалом
	1	3	2	2	2	2	2	2	2	18

Результати:

Концентрації (mIU hCG/ml)

A - 0

B - 500

C - 2500

D - 7000

E - 15000

F - 27,500

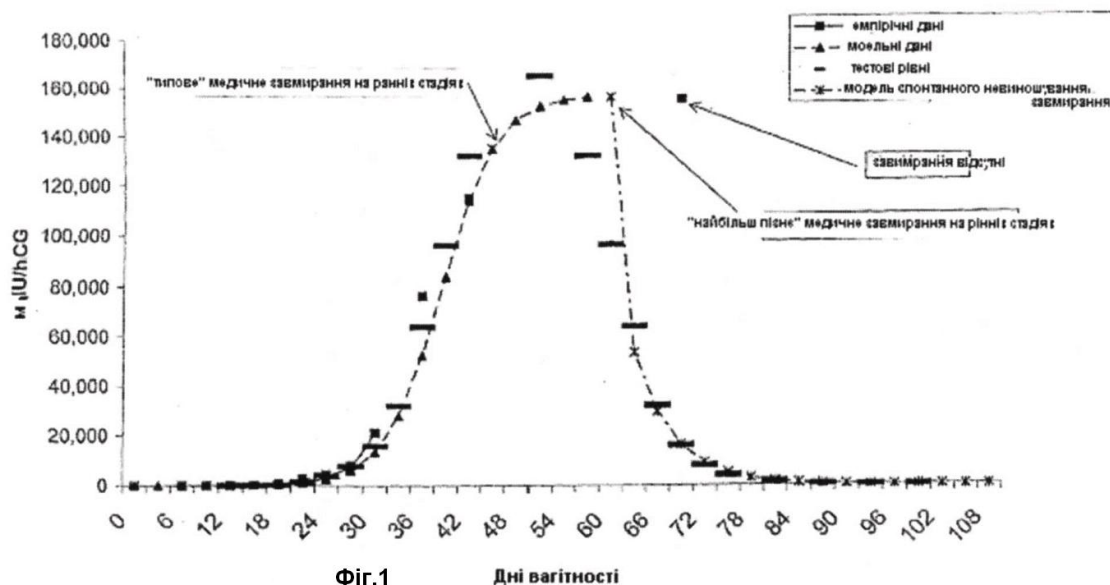
G - 40,000

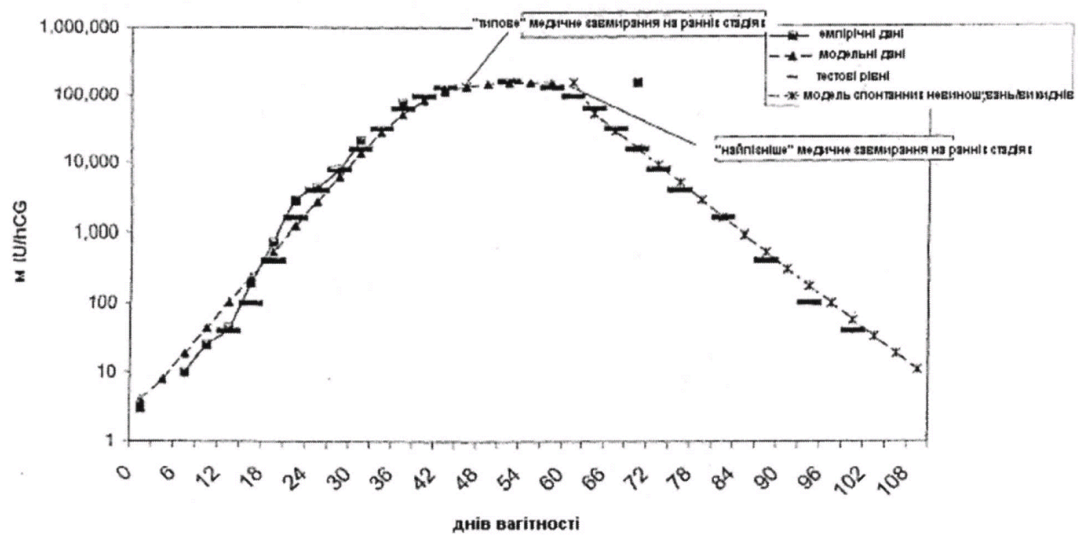
H - 55,000

I - 75,000

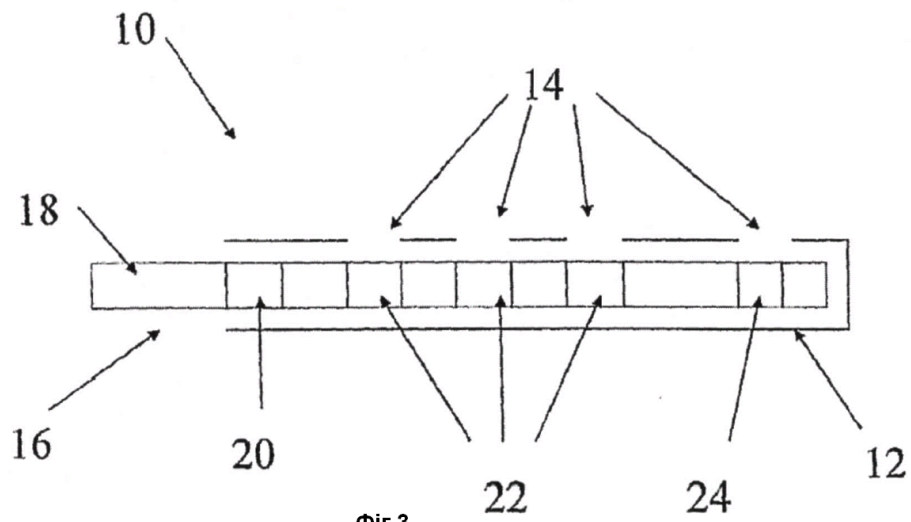
J - 100,000

Результати наведені у фігурі 8.

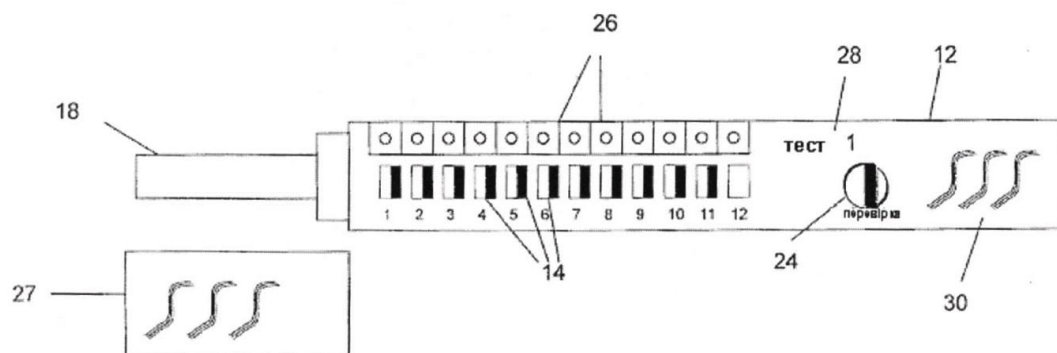




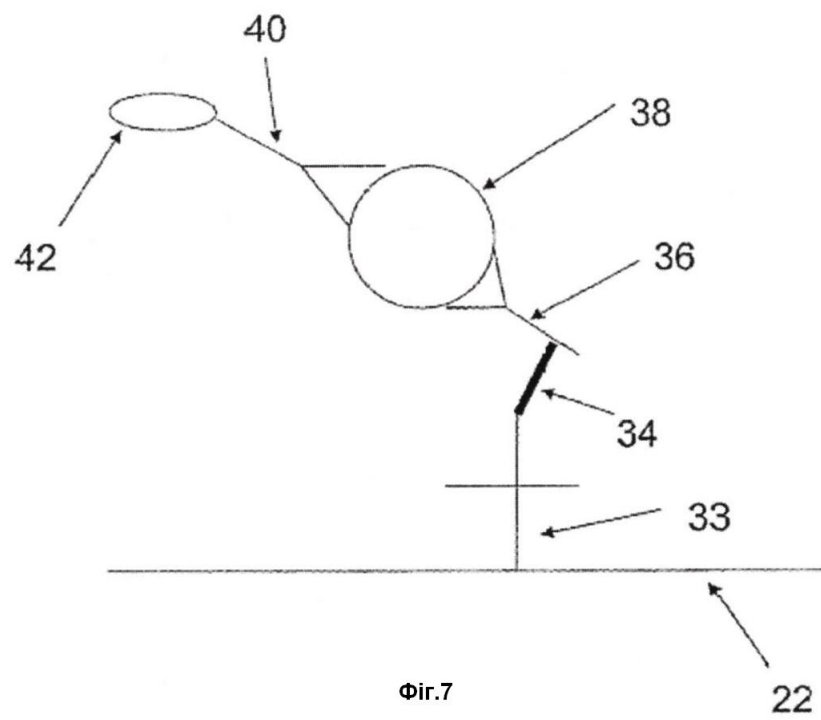
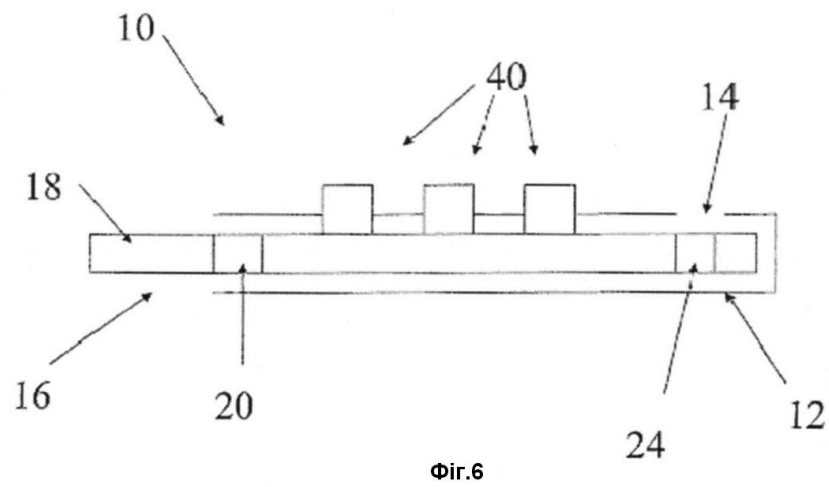
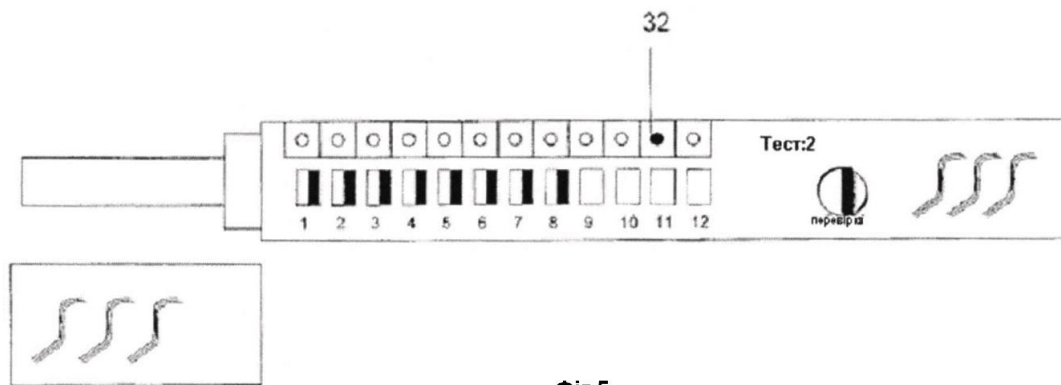
Фіг.2



Фіг.3



Фіг.4



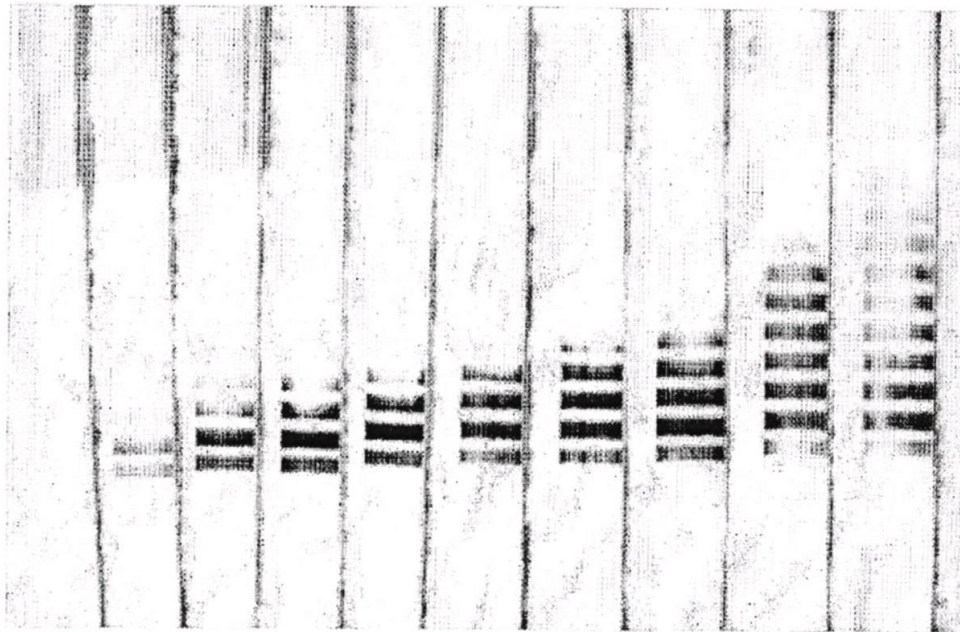


Fig.8