



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00227

(22) Data de depozit: 04/05/2022

(41) Data publicării cererii:
30/09/2022 BOPI nr. 9/2022

(71) Solicitant:
• DDS DIAGNOSTIC S.R.L., STR.SEGOVIA
NR.1, BL.C8, SC.3, AP.39, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• STAN DANA, STR. SEGOVIA NR. 1,
BL. C8, SC. 3, AP. 39, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• BOCANCIA-MATEESCU LORENA-
ANDREEA, STR.RĂUL VEDEA, NR.13C,
CASA 2, BRAGADIRU, IF, RO;
• MIRICĂ ANDREEA-CRISTINA,
STR.ANTIAERIANĂ, NR.6A-26, BL.C2, ET.1,
AP.6, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE TEST IMUNOCROMATOGRIFIC
RAPID PENTRU DETECȚIA COMPLEXULUI DE TROPONINE
(cTnI-cTnT-TnC) ȘI H-FABP DIN SÂNGE/SER**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui test rapid imunocromatografic în flux lateral pentru detecția simultană a doi markeri cardiaci: complex de troponine (cTn complex: cTnI-cTnT- cTnC) și proteina de legare a acizilor grași (H-FABP). Procedeu, conform invenției, constă în etapele: tratarea membranelor de probă și membranelor conjugat prin imersare în soluții obținute în house, prepararea soluțiilor de anticorpi de captură de concentrații 1 mg/ml în buffer de imobilizare, printarea acestora pe membrana de test, uscarea și ambalarea acestora în pungi sigilate de desicant, obținerea bioconjugatelor prin incubarea nanoparticulelor de aur cu anticorpii de detecție specifici Ctn complex și

H-FABP, blocarea site-urilor nespecifice, centrifugarea și depunerea conjugatelor pe membrana de conjugat și uscarea membranei la 37°C timp de 45 min, urmată de asamblarea master sheet-ului și tăierea strip-urilor la 4mm pentru testarea testului rapid imunocromatografic, cu probe de sânge îmbogățite cu antigene specifice cTn complex și H-FABP cu concentrații cuprinse între 0,78 și 12,5 ng/ml, rezultând o limită de detecție la aproximativ 1 ng/ml.

Revendicări: 1
Figuri: 2

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



PROCEDEU DE OBȚINERE TEST IMUNOCROMATOGRAFIC RAPID PENTRU DETECȚIA COMPLEXULUI DE TROPONINE (cTnI-cTnT-TnC) ȘI H-FABP DIN SÂNGE/SER

DESCRIERE INVENȚIE

Invenția se referă la procedeul de obținere a testului imunocromatografic rapid pentru detecția markerilor cardiaci: complex de troponine (cTn complex: cTnI-cTnT-TnC) și proteina de legare a acizilor grași (H-FABP).

Infarctul miocardic acut (IMA) este o problemă majoră a sistemului de sănătate public și principala cauză a morbidității și mortalității (Smolina et al., 2012). Conform raportului OMS (2019) se estimează că 17,8 milioane de persoane au murit în 2017 de boli cardiovasculare (care includ boli coronariene și accident vascular cerebral). Dintre aceste decese, se estimează că 7,3 milioane au fost cauzate de boala coronariană și 6,2 milioane au fost datorate infarctului miocardic. Boala coronariană a fost cotate pe primul loc, iar IMA ca având cel mai mare procent de decese datorate bolii coronariene (OMS). Posibilitatea determinării timpurii și rapide a diagnosticului IMA este extrem de importantă pentru stabilirea terapiei ce urmează a fi aplicată, cu scopul de a salva viața pacienților.

Recomandările diagnosticului inițial sunt monitorizarea ECG și obligatoriu (conform protocoalelor OMS), efectuarea analizelor sanguine de rutină pentru markerii cardiaci. Aceștia sunt: troponinele cardiace (T și I), CK-MB (CreatinKinază MB), mioglobina, Heart Fatty Acid Binding Protein (H-FABP). IMA este o urgență medicală; dacă nu se intervine rapid (în câteva ore) cu tratament, pacientul își pierde viața. Determinarea markerilor se face cât mai repede posibil și în timpul fazei acute (Ibanez et al., 2017). S-a demonstrat că determinarea complexului de troponine cTnI-cTnT-TnC (ITC) crește specificitatea în stabilirea diagnosticului IMA. Realizarea unor teste rapide imunocromatografice care să determine complexul (ITC) prezent în sângele/serul pacienților cu infarct, va aduce un real beneficiu. În prezent, nu exista un test rapid care să detecteze simultan complexul de troponine (cTnI-cTnT-TnC) și H-FABP în IMA.

În unitățile de îngrijiri intensive cardiovasculare, dozarea troponinei la internare și, eventual, repetarea la 3-12 ore reprezintă o măsură necesară și obligatorie. În raport cu tipul de pacienți internați în urgență, valorile crescute ale cTn pot fi prezente și la pacienții cu patologii non-coronariene. Diagnosticarea și aplicarea promptă a tratamentului cresc șansele de supraviețuire, iar excluderea infarctului miocardic poate reduce numărul de internări în unitățile de terapie intensivă.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția de față constă în detecția simultană a doi markeri cardiaci importanți: cTn complex (cTnI-cTnT-TnC) și H-FABP pe aceeași membrană de test cu sensibilitate și specificitate ridicate în diagnosticul infarctului miocardic. Pentru a atinge performanțele dorite, este necesar ca în timpul fiecărei etape ale procesului tehnologic să existe control de verificare și de minimizare a apariției eventualelor riscuri.

Testele LFIA constau din segmente individuale, respectiv membrane, realizate din diverse materiale. Proba este plasată pe o membrană de probă pre-tratată. Conjugatul este aplicat pe membrana de conjugare, care este de obicei din fibră de sticlă sau poliester, și interacționează cu analitul prezent în probă, migrând în zona de reacție formată dintr-o membrană poroasă de nitroceluloză (van Amerongen și colab., 2018). Membrana analitică conține anticorpi, proteine sau antigene imobilizați prin procesul de printare. Acestea servesc la captarea analitului și la

conjugare prin interacțiuni specifice procesului cromatografic. La capătul benzii se află membrana absorbantă care colectează excesul (O'farrell, 2013)

Obținerea **testului rapid imunocromatografic în flux lateral - LFIA**, presupune în general parcurgerea următoarelor etape:

- Tratarea membranelor cu soluții preparate "in house" care conțin detergenți, agenți de blocare și conservanți;
- Uscarea și ambalarea membranelor tratate;
- Prepararea soluțiilor de anticorpi și printarea acestora pe membrana de test (din nitroceluloză);
- Uscarea și ambalarea membranelor de test;
- Conjugarea nanoparticulelor de aur (materiale de detecție) cu anticorpii și pulverizarea acestora pe membrana conjugat, urmată de etapa de uscare a membranei conjugat;
- Asamblare master sheet și tăierea acestuia în stripuri de 4 mm;
- Testare propriu-zisă.

Ca principiu, testul rapid pentru detecția complexului de troponine (cTnI-cTnT-TnC) și H-FABP este dezvoltat după cum urmează:

- Linia de control (C) care conține anticorpi IgG anti-șoarece
- Liniile de testare (T1 și T2) formate din anticorpi cTn complex și H-FABP.

Bioconjugatele sunt obținute prin adsorbția fizică a anticorpilor de nanoparticulele de aur (AuNPs). De obicei, optimizarea acestui tip de proces de conjugare se poate face prin testarea diferitelor valori ale pH-ului în apropierea punctului izoelectric al moleculei de legare. Orientarea anticorpilor poate fi controlată prin ajustarea cu atenție a pH-ului între 5-8,5, ceea ce modifică sarcina de suprafață a glicoproteinei și determină o bună legare la AuNPs stabilizate cu citrat. S-au testat conjugate obținute la pH 5, pH 6 și pH 8,5 și s-au observat rezultate mai bune pentru conjugatele preparate la pH 5.

S-au preparat probe de sânge îmbogățite cu următoarele concentrații de antigene cTn complex și H-FABP:

- 12,5 ng/mL
- 6,25 ng/mL
- 3,12 ng/mL
- 1,56 ng/mL
- 0,78 ng/mL

Fiecare concentrație a fost testată stabilind limita de detecție a testului rapid LFIA la aproximativ 1 ng/mL.

Figurile reprezentative realizării testului rapid imunocromatografic în flux lateral pentru detecția cTn complex și H-FABP conform invenției sunt următoarele:

Fig. 1. Stabilirea valorii optime a pH-ului în procesul de bioconjugare, prin testarea conjugatelor cu pH 5, pH 6 și pH 8,5.

Fig. 2. Determinarea limitei de detecție din probe de sânge îmbogățite cu antigene specifice cTn complex și H-FABP cu concentrații cuprinse între 12,5-0,78 ng/mL.

Exemplu:**1. Tratarea membranelor cu soluții preparate “in house”**

Tratarea membranelor de probă și membranelor conjugat s-a efectuat prin imersarea acestora în soluții obținute din următoarele:

- agent tensioactiv: Polisorbat
- agent de blocare: Albumină serică bovină
- conservant: Azidă de sodiu.

După imersarea membranelor în soluțiile de tratare, acestea sunt uscate la etuvă și ambulate în pungi sigilate cu desicant.

2. Prepararea soluțiilor de anticorpi și printarea acestora pe membrana de test

Soluțiile de anticorpi au fost preparate în bufferul de imobilizare care conține: tampon fosfat salin, sucroză și etanol.

S-au preparat două soluții de anticorpi:

- o soluție 1 mg/mL anticorp de captură anti-cTn complex
- o soluție 1 mg/mL anticorp de captură anti-H-FABP

Soluțiile de anticorpi au fost depuse pe membrana de test, după care aceasta a fost uscată la etuvă și ambalată în pungă sigilată cu desicant.

3. Obținerea conjugatelor și depunerea pe membrana conjugat

Pentru obținerea conjugatelor s-au folosit nanoparticule de aur cu dimensiuni de 40 nm (OD 1). Protocolul de conjugare constă în următoarele etape:

- Câte 1 mL AuNPs este incubat cu o cantitate optimă de anticorp de detecție din fiecare marker cardiac (cTn complex și H-FABP).
- După o oră se adaugă 1% de soluție de BSA și se incubează timp de 30 minute la temperatura camerei.
- După perioada de incubare, amestecul a fost centrifugat la 10.000 rpm timp de 20 de minute la 4 °C pentru a se asigura că anticorpii nelegați au fost îndepărtați.
- Precipitatul de anticorp-AuNPs a fost resuspendat într-o soluție de tampon conjugat care conține detergent, agent de blocare și conservant.
- Conjugatele se depun pe membrana de conjugare și se usucă la 37°C timp de 45 de minute în etuvă.
- Membrana de conjugare uscată se depozitează în pungă sigilată cu desicant.

4. Etapa de asamblare master sheet și tăierea acestuia în stripuri de 4 mm

Master sheet-ul este alcătuit din membrana de probă, membrana conjugat, membrana de test și membrana de absorbție lipite pe cardul de suport. Fiecare componentă se suprapune cu 2-3

mm astfel încât proba de analizat să migreze de-a lungul stripului. Master sheet-ul este tăiat în stripuri de 4 mm.

5. Etapa de testare

Limita de detecție s-a determinat prin prepararea unor probe de sânge îmbogățite cu antigene specifice cTn complex (cTnI-cTnT-TnC) și H-FABP cu următoarele concentrații: 12,5 ng/mL, 6,25 ng/mL, 3,12 ng/mL, 1,56 ng/mL, 0,78 ng/mL. S-au inoculat 5 teste rapide cu 80 μ L din fiecare concentrație. Rezultate au fost citite după 15 minute. Din analiza comparativă a celor 5 rezultate reiese că limita de detecție este de aproximativ 1 ng/mL.

**PROCEDEU DE OBȚINERE TEST IMUNOCROMATOGRAFIC RAPID PENTRU
DETECȚIA COMPLEXULUI DE TROPONINE (cTnI-cTnT-TnC) ȘI H-FABP DIN
SÂNGE/SER**

REVENDICĂRI

1. Revendicarea se referă la procedeul prin care se realizează testul rapid imunocromatografic în flux lateral pentru detecția simultană a doi markeri cardiaci: complex de troponine (cTn complex: cTnI-cTnT-TnC) și proteina de legare a acizilor grași (H-FABP), **test rapid care se realizează astfel:** tratarea membranelor de probă și membranelor conjugat prin imersarea acestora în soluții obținute “in house”, **urmată de** prepararea soluțiilor de anticorpi de captură de concentrații 1 mg/mL în bufferul de imobilizare și printarea acestora pe membrana de test, uscarea și ambalarea acestora în pungi sigilate cu desicant, **în continuare** are loc etapa de obținere a bioconjugatelor utilizând nanoparticule de aur cu dimensiuni de 40 nm (OD 1) prin incubarea acestora cu anticorpii de detecție specifici cTn complex (cTnI-cTnT-TnC) și H-FABP la pH optim, **urmând** blocarea situsurilor nespecifice cu soluție de BSA 1%, **apoi** centrifugarea și reluarea bioconjugatului în soluție de reluare conjugat **urmată de** depunerea conjugatelor de membrana de conjugat și uscarea membranei la 37°C timp de 45 de minute în etuvă și **apoi** asamblarea master sheet-ului și tăierea stripurilor la 4 mm, **urmând** testarea testului rapid imunocromatografic cu probe de sânge îmbogățite cu antigene specifice cTn complex și H-FABP cu următoarele concentrații: 12,5 ng/mL, 6,25 ng/mL, 3,12 ng/mL, 1,56 ng/mL, 0,78 ng/mL și **apoi** determinând limita de detecție la aproximativ 1 ng/mL.

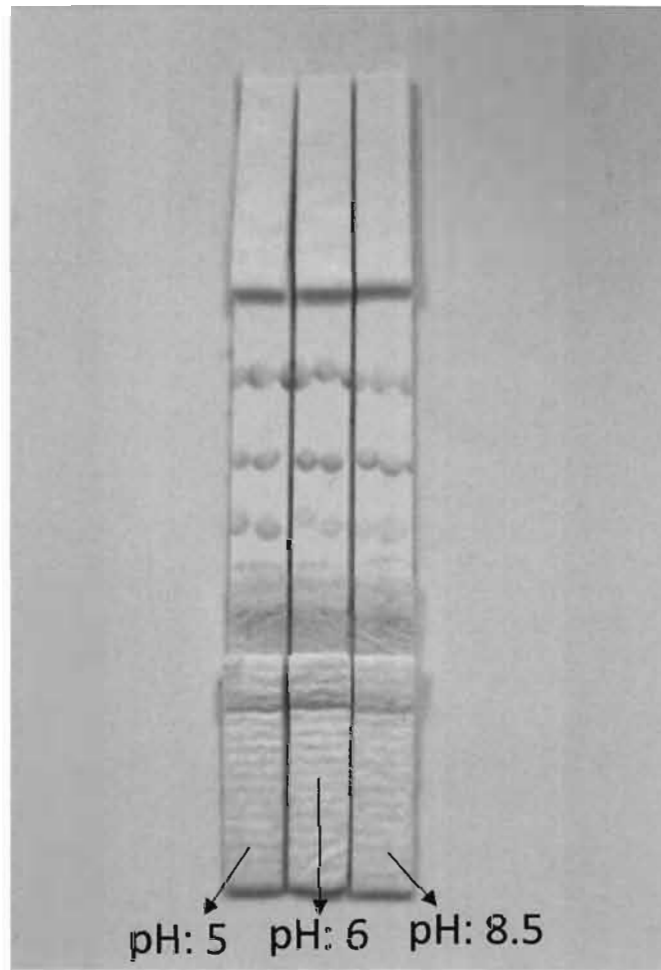


Fig. 1

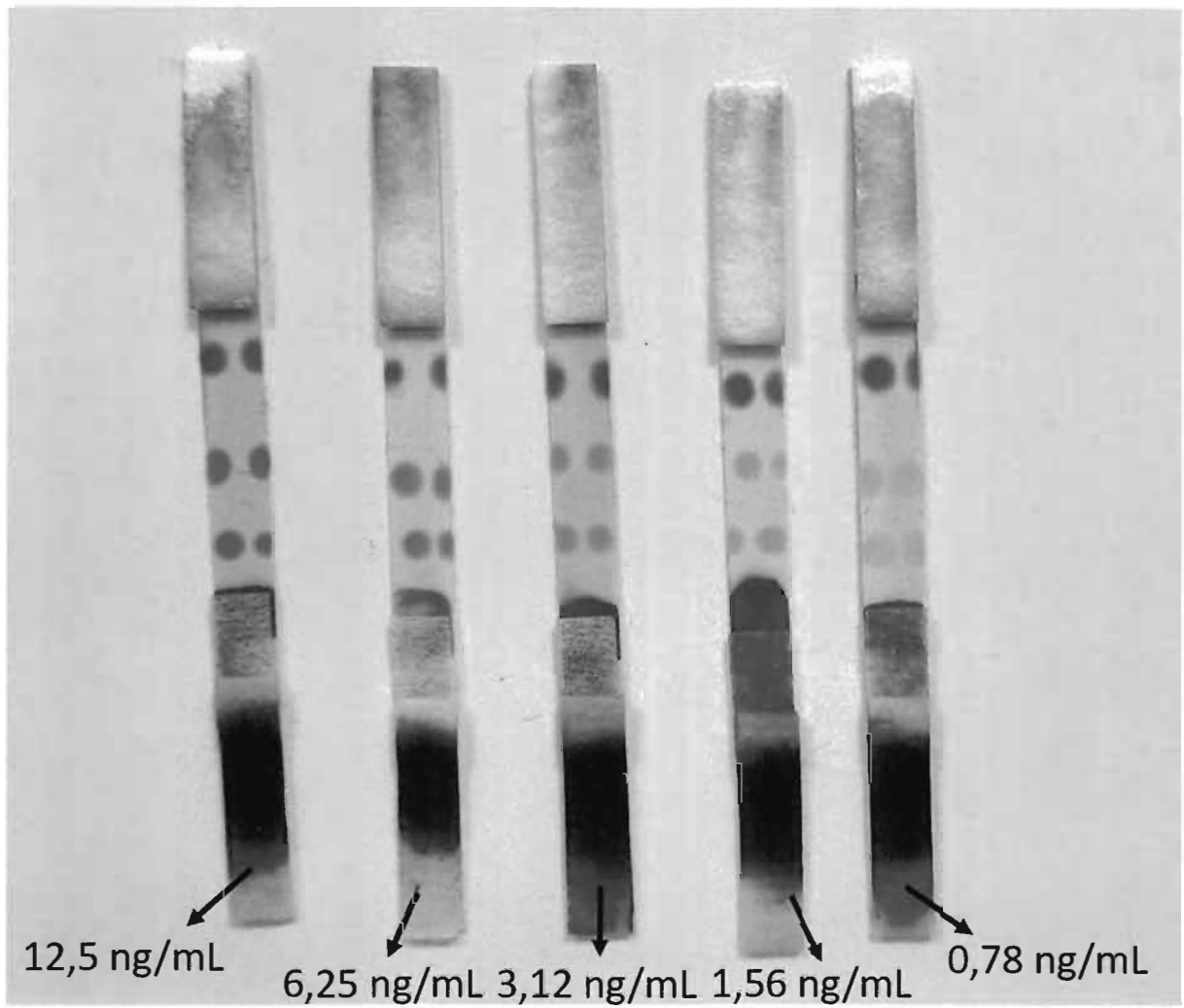


Fig. 2