



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0031623

(51)⁷ G01N 33/569; C12N 15/02; G01N
33/577; G01N 33/543; C07K 16/12;
C12P 21/08

(13) B

(21) 1-2017-05277

(22) 27/05/2016

(86) PCT/JP2016/065683 27/05/2016

(87) WO 2016/194797 08/12/2016

(30) 2015-110585 29/05/2015 JP

(45) 25/04/2022 409

(43) 26/03/2018 360A

(73) Denka Company Limited (JP)

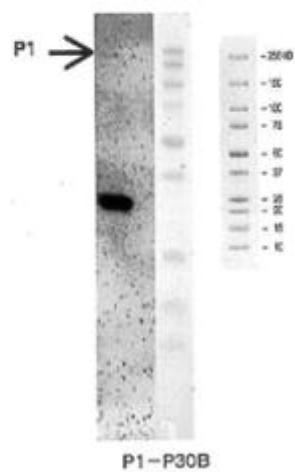
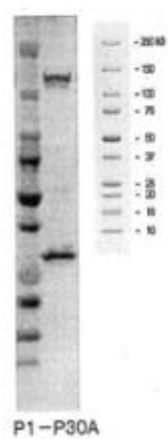
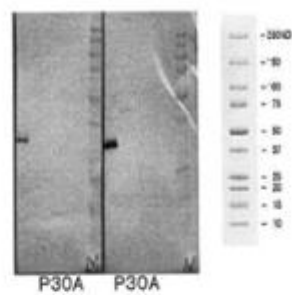
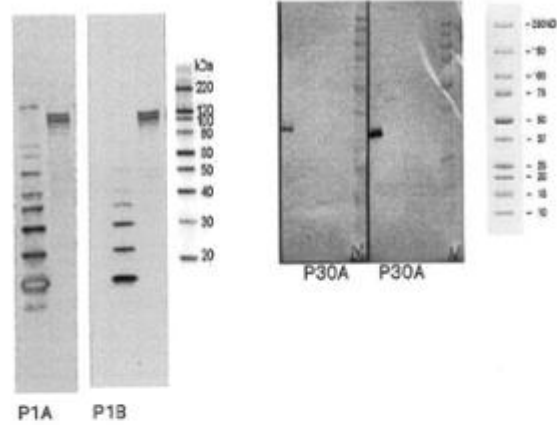
1-1, Nihonbashi-Muromachi 2-chome, Chuo-ku, Tokyo 1038338, Japan

(72) KOHIYAMA, Risa (JP); MIYAZAWA, Takashi (JP).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN MYCOPLASMA PNEUMONIAE, THIẾT BỊ THỬ
NGHIỆM MIỄN DỊCH VÀ KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG ĐỂ SỬ DỤNG CHO
PHƯƠNG PHÁP VÀ THIẾT BỊ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện đối tượng thử nghiệm bằng thử nghiệm miễn dịch, trong đó độ nhạy thấp do sử dụng kháng thể đơn dòng được cải thiện cho dù sử dụng kháng thể đơn dòng trong thử nghiệm miễn dịch. Phương pháp phát hiện đối tượng thử nghiệm là phương pháp phát hiện đối tượng thử nghiệm có hai hoặc nhiều loại kháng nguyên cho phép phát hiện đối tượng thử nghiệm này, phương pháp được tiến hành bằng phương pháp thử nghiệm miễn dịch, như phương pháp kiểu bánh kẹp (sandwich), bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó nhận diện hai hoặc nhiều loại kháng nguyên.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện đối tượng thử nghiệm như tác nhân gây bệnh bằng thử nghiệm miễn dịch, thiết bị thử nghiệm miễn dịch và kháng thể đơn dòng để sử dụng cho phương pháp và thiết bị này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Do các kháng thể đơn dòng chỉ nhận diện kháng nguyên đặc hiệu, nên chúng được sử dụng rộng rãi để phát hiện kháng nguyên đặc hiệu này. Ví dụ, thử nghiệm miễn dịch để phát hiện *Mycoplasma pneumoniae*, thử nghiệm miễn dịch này sử dụng phương pháp kiểu bánh kẹp (sandwich), trong đó kháng thể đơn dòng nhận diện protein P30 của *Mycoplasma pneumoniae* được cố định trên pha rắn, được mô tả trong tài liệu sáng chế 1.

Các tài liệu tham khảo trong tình trạng kỹ thuật

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: WO 2015/025968

Kháng thể đa dòng là hỗn hợp gồm các kháng thể khác nhau nhận diện nhiều kháng nguyên hoặc vùng quyết định tính kháng nguyên khác nhau, trong khi kháng thể đơn dòng chỉ nhận diện một vùng nhất định của một kháng nguyên nhất định. Do đặc tính này, kháng thể đơn dòng thường có tính đặc hiệu cao hơn kháng thể đa

dòng. Mặt khác, dễ dàng nhận thấy rằng so với kháng thể đa dòng thì kháng thể đơn dòng ít hơn về chủng loại và tổng số kháng nguyên có thể gắn kết với kháng thể đó. Điều này dẫn đến độ nhạy thấp của kháng thể đơn dòng cũng như thử nghiệm miễn dịch và thiết bị thử nghiệm miễn dịch sử dụng kháng thể này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp phát hiện đối tượng thử nghiệm bằng thử nghiệm miễn dịch, trong đó độ nhạy thấp do sử dụng kháng thể đơn dòng được cải thiện mặc dù sử dụng kháng thể đơn dòng trong thử nghiệm miễn dịch. Mục đích khác của sáng chế là đề xuất thiết bị thử nghiệm miễn dịch để thực hiện phương pháp phát hiện theo sáng chế. Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất kháng thể đơn dòng có thể được sử dụng để phát hiện *Mycoplasma pneumoniae* bằng phương pháp phát hiện theo sáng chế.

Cách thức để giải quyết vấn đề

Để khắc phục nhược điểm về độ nhạy thấp của kháng thể đơn dòng, có thể tính đến việc sử dụng thử nghiệm miễn dịch bằng cách sử dụng nhiều kháng thể đơn dòng. Trong thử nghiệm miễn dịch phổ biến như ELISA hoặc thử nghiệm sắc ký miễn dịch, lượng kháng thể có thể được sử dụng phụ thuộc vào diện tích của đĩa ELISA hoặc bộ thử nghiệm sắc ký miễn dịch hoặc diện tích của chất được đánh dấu. Trong trường hợp này, so với việc sử dụng chỉ một kháng thể đơn dòng, việc sử dụng nhiều kháng thể đơn dòng vượt trội hơn về chủng loại và tổng số kháng nguyên

có thể gắn kết với kháng thể. Mặc dù không có khác biệt đáng kể khi lượng kháng nguyên vượt quá lượng kháng thể được sử dụng, nhưng độ nhạy trong thử nghiệm miễn dịch được cải thiện khi lượng kháng nguyên không đủ cho lượng kháng thể được sử dụng.

Tuy nhiên, số lượng của mỗi kháng thể đơn dòng được sử dụng ít hơn số lượng của một kháng thể đơn dòng được sử dụng trong các trường hợp, trong đó chỉ một kháng thể đơn dòng. Kết quả là, xác suất gặp phải kháng thể trên một kháng nguyên nhất định giảm xuống, do đó khả năng phản ứng trên một đơn vị thời gian cũng giảm xuống. Đây là một trong các yếu tố làm cho việc cải thiện độ nhạy trong thử nghiệm miễn dịch gặp khó khăn và yếu tố này cũng gây khó khăn để đạt được độ nhạy thỏa mãn.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng phương pháp sử dụng kháng thể đơn dòng nhận diện hai hoặc nhiều loại kháng nguyên đồng thời có tính đặc hiệu vượt trội hơn về độ nhạy so với phương pháp sử dụng chỉ một kháng thể đơn dòng hoặc nhiều kháng thể đơn dòng thông thường, do đó hoàn thiện sáng chế. Hơn nữa, các tác giả phát hiện ra rằng thử nghiệm miễn dịch sử dụng kháng thể đơn dòng này vượt trội hơn về độ nhạy so với thử nghiệm miễn dịch sử dụng kháng thể đơn dòng thông thường, do đó hoàn thiện sáng chế.

Nghĩa là, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện đối tượng thử nghiệm có hai hoặc nhiều loại kháng nguyên mà có thể phát hiện đối tượng thử nghiệm này,

phương pháp này bao gồm bước phát hiện đối tượng thử nghiệm này bằng thử nghiệm miễn dịch sử dụng kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó nhận diện hai hoặc nhiều loại kháng nguyên. Sáng chế cũng đề xuất thiết bị thử nghiệm miễn dịch để thực hiện phương pháp theo sáng chế, bao gồm pha rắn mà kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên được cố định trên đó. Sáng chế còn đề xuất kháng thể đơn dòng phản ứng đặc hiệu với protein P1 và protein P30 có nguồn gốc từ *Mycoplasma pneumoniae*.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là biểu đồ thể hiện kết quả đánh giá tính phản ứng của các kháng thể đơn dòng theo sáng chế được tạo ra trong các ví dụ dưới đây bằng phương pháp phân tích thâm tách Western.

Fig. 2 là sơ đồ thể hiện một phương án được ưu tiên về thiết bị thử nghiệm sắc ký miễn dịch theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Cách thức thực hiện sáng chế

Đối tượng thử nghiệm được phát hiện bằng phương pháp theo sáng chế là đối tượng thử nghiệm có hai hoặc nhiều loại kháng nguyên mà cho phép phát hiện đối tượng thử nghiệm này. Ví dụ về đối tượng thử nghiệm này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tác nhân gây bệnh khác nhau như vi khuẩn, virus, nấm và rickettsia. Trong các ví dụ dưới đây, đối tượng thử nghiệm là *Mycoplasma pneumoniae* và hai

hoặc nhiều loại kháng nguyên là protein P1 và protein P30. Lưu ý rằng ngay cả khi đối tượng thử nghiệm được định lượng hoặc nửa định lượng, việc định lượng hoặc nửa định lượng được bao gồm trong phương pháp “phát hiện” như được sử dụng trong sáng chế do việc định lượng và nửa định lượng đương nhiên là được thực hiện cùng với phương pháp “phát hiện”.

Theo phương pháp theo sáng chế, tiến hành thử nghiệm miễn dịch bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà nhận diện hai hoặc nhiều loại kháng nguyên nêu trên. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “nhận diện” dùng để chỉ kháng thể phản ứng đặc hiệu, nghĩa là, trải qua phản ứng kháng nguyên-kháng thể. “Đặc hiệu” nghĩa là trong một hệ chất lỏng, trong đó protein và kháng thể của nó được trộn với nhau, kháng thể không gây ra phản ứng kháng nguyên-kháng thể với thành phần protein là kháng nguyên ở mức có thể phát hiện, hoặc chỉ gây ra phản ứng yếu hơn rõ rệt so với phản ứng kháng nguyên-kháng thể của kháng thể với kháng nguyên tương ứng của nó ngay cả khi nó gây ra phản ứng gắn kết hoặc phản ứng kết hợp nhất định.

Mảnh gắn kết kháng nguyên thu được bằng cách chỉ tách vị trí gắn kết kháng nguyên từ kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế. Nghĩa là, các trường hợp, trong đó mảnh có đặc tính gắn kết kháng nguyên đặc hiệu (mảnh gắn kết kháng nguyên) như Fab, Fab', F(ab')₂ hoặc kháng thể một chuỗi (scFv) được sản xuất bằng phương pháp đã biết được sử dụng trong

phạm vi của sáng chế. Hơn nữa, nhóm kháng thể đơn dòng không chỉ giới hạn ở IgG, và có thể là IgM hoặc IgY.

Kháng thể đơn dòng được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế có thể thu được bằng cách gây miễn dịch cho động vật được gây miễn dịch bằng phức hợp hoặc chất chiết có hai hoặc nhiều loại kháng nguyên quan tâm, hoặc một kháng nguyên trong số hai hoặc nhiều loại kháng nguyên hoặc một phần peptit của nó bằng phương pháp gây miễn dịch đã biết và tạo ra tế bào lai bằng cách sử dụng các tế bào của động vật đã được gây miễn dịch. Mặc dù độ dài của peptit được sử dụng để gây miễn dịch không bị giới hạn cụ thể, peptit tốt hơn là có 5 axit amin hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là có 10 axit amin hoặc nhiều hơn có thể được sử dụng làm chất gây miễn dịch. Chất gây miễn dịch có thể thu được từ dung dịch nuôi cấy, hoặc thu được bằng cách kết hợp ADN mã hoá kháng nguyên tùy ý vào vector plasmit và đưa vector này vào tế bào vật chủ để biểu hiện. Kháng nguyên tùy ý hoặc một phần peptit của nó được sử dụng làm chất gây miễn dịch có thể được biểu hiện dưới dạng protein dung hợp với protein được nêu làm ví dụ dưới đây và được sử dụng làm chất gây miễn dịch sau khi tinh chế hoặc không cần tinh chế. Glutathion S-transferaza (GST), protein gắn kết maltoza (MBP), thioredoxin (TRX), thẻ Nus, thẻ S, thẻ HSV, thẻ FRAG, thẻ polyhistidin và chất tương tự thường được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực liên quan sử dụng làm “thẻ biểu hiện/tinh chế protein” có thể được sử dụng trong việc tạo ra protein dung hợp. Tốt hơn là, protein dung hợp với thẻ được

sử dụng làm chất gây miễn dịch sau khi được phân cắt thành kháng nguyên tùy ý hoặc một phần peptit của nó và phần thể khác bằng enzym tiêu hóa, và sau khi tách và tinh chế.

Việc tạo ra kháng thể đơn dòng từ động vật đã được gây miễn dịch có thể dễ dàng được tiến hành bằng các phương pháp đã biết bởi Kohller et al. (Kohller et al., Nature, vol, 256, p495-497(1975)). Nghĩa là, các tế bào sản xuất kháng thể như các tế bào lách và các tế bào lympho được thu gom từ động vật đã được gây miễn dịch và được dung hợp với các tế bào u tuỷ của chuột để tạo ra các tế bào lai theo cách thông thường. Các tế bào lai tạo thành được tách dòng bằng phương pháp pha loãng giới hạn hoặc phương pháp tương tự. Tiếp đó, các kháng thể đơn dòng trải qua phản ứng kháng nguyên-kháng thể với kháng nguyên được sử dụng để gây miễn dịch cho động vật, được chọn từ các kháng thể đơn dòng được tạo ra từ mỗi tế bào lai đã được tách dòng.

Do kháng thể đơn dòng được sử dụng theo phương pháp của sáng chế nhận diện hai hoặc nhiều loại kháng nguyên, nên các kháng thể đơn dòng được chọn lọc theo cách này, nhận diện một trong số hai hoặc nhiều loại kháng nguyên, được sàng lọc về kháng thể đơn dòng nhận diện một kháng nguyên khác. Trong các trường hợp, khi kháng thể đơn dòng nhận diện ba hoặc nhiều loại kháng nguyên được sử dụng, việc sàng lọc tương tự còn được lặp lại để chọn một kháng thể đơn dòng nhận diện mỗi kháng nguyên. Phương pháp theo sáng chế sử dụng kháng thể đơn dòng hoặc

mảnh gắn kết kháng nguyên của nó nhận diện cả hai trong số hai hoặc nhiều loại kháng nguyên thu được theo cách này. Để một kháng thể đơn dòng nhận diện hai loại kháng nguyên có thể tồn tại, có các trường hợp khác nhau có thể được xem xét, như trường hợp trong đó kháng thể đơn dòng nhận diện các vùng có mức độ tương đồng cao trong mỗi hai kháng nguyên khác nhau, trường hợp trong đó kháng thể đơn dòng nhận diện các vùng có cấu hình tương tự trong mỗi kháng nguyên khác nhau, trường hợp trong đó kháng thể đơn dòng nhận diện vùng trải dài các vùng lân cận của phức hợp gồm các kháng nguyên khác nhau, và trường hợp trong đó kháng thể đơn dòng nhận diện cấu hình trải dài các vùng lân cận của phức hợp gồm các kháng nguyên khác nhau. Do đó, “phương pháp phát hiện đối tượng thử nghiệm có hai hoặc nhiều loại kháng nguyên mà cho phép phát hiện đối tượng thử nghiệm” như được sử dụng trong bản mô tả này giới hạn ở các trường hợp trong đó thu được kháng thể đơn dòng nhận diện hai hoặc nhiều loại kháng nguyên. Hơn nữa, kháng thể đơn dòng tốt hơn là nhận diện hai loại kháng nguyên. Nói chung, điều này là do khi số lượng các loại kháng nguyên được nhận diện tăng lên, thì sẽ khó thu được kháng thể đơn dòng nhận diện các kháng nguyên này. Trong các ví dụ sau đây, thu được kháng thể đơn dòng nhận diện protein P1 và protein P30 của *Mycoplasma pneumoniae* bằng cách sàng lọc như vậy.

Để tinh chế kháng thể đơn dòng từ dịch cổ trướng hoặc dịch nổi nuôi cấy, có thể sử dụng phương pháp tinh chế globulin miễn dịch đã biết. Ví dụ về phương pháp

này bao gồm, các phương pháp phân đoạn bằng cách tách muối sử dụng amoni sulfat hoặc natrisulfat, phương pháp phân đoạn PEG, phương pháp phân đoạn etanol, phương pháp sắc ký trao đổi ion DEAE và phương pháp lọc gel. Cũng có thể tiến hành tinh chế bằng phương pháp sắc ký ái lực bằng cách sử dụng chất mang mà protein bất kỳ trong số các Protein A, Protein G và Protein L được gắn kết phụ thuộc vào loài động vật đã được gây miễn dịch và nhóm kháng thể đơn dòng.

Trong thử nghiệm miễn dịch theo sáng chế, tiến hành thử nghiệm bằng thử nghiệm miễn dịch có sử dụng phản ứng kháng nguyên-kháng thể của kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó nhận diện hai hoặc nhiều loại kháng nguyên được tạo ra như được mô tả ở trên (trong phần mô tả dưới đây, trước các ví dụ, thuật ngữ “kháng thể” dùng để chỉ “kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó” trừ khi được chỉ ra rõ ràng trong ngữ cảnh khác) với kháng nguyên trong mẫu. Phương pháp bất kỳ đã được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực liên quan như phương pháp cạnh tranh, phương pháp gây ngưng kết, phương pháp phân tích thâm tách Western, phương pháp miễn dịch nhuộm màu hoặc phương pháp kiểu bánh kẹp (sandwich) có thể được sử dụng làm thử nghiệm miễn dịch cho phương pháp này. Theo sáng chế, “thử nghiệm” bao gồm tất cả các phương pháp định lượng, nửa định lượng và phát hiện.

Phương pháp kiểu bánh kẹp (sandwich) tốt hơn là thử nghiệm miễn dịch. Chính phương pháp kiểu bánh kẹp (sandwich) đã được biết rõ trong lĩnh vực thử

thử nghiệm miễn dịch và có thể được tiến hành bằng thử nghiệm sắc ký miễn dịch hoặc ELISA. Mỗi trong số các phương pháp kiểu bánh kẹp (sandwich) này đã được biết rõ và phương pháp theo sáng chế có thể được tiến hành theo phương pháp kiểu bánh kẹp (sandwich) đã biết, ngoại trừ kháng thể đơn dòng theo sáng chế như được mô tả ở trên, nhận diện hai hoặc nhiều loại kháng nguyên được sử dụng.

Trong phương pháp kiểu bánh kẹp (sandwich), hai loại kháng thể nhận diện các kháng nguyên (một kháng thể được cố định trên pha rắn và kháng thể được đánh dấu) được sử dụng, và trong phương pháp theo sáng chế, ít nhất một trong số hai loại kháng thể là kháng thể đơn dòng nhận diện hai hoặc nhiều loại các kháng nguyên như được mô tả ở trên. Như được mô tả dưới đây, kháng thể đơn dòng nhận diện hai hoặc nhiều loại kháng nguyên như được mô tả ở trên tốt hơn là được sử dụng ít nhất làm kháng thể được cố định để có cải thiện độ nhạy tốt hơn, là mục đích của sáng chế, do kháng thể được cố định trên pha rắn bị hạn chế ở lượng kháng thể có thể được cố định trên một đơn vị diện tích. Trong các trường hợp, trong đó ít nhất hai loại kháng nguyên được nhận diện bởi kháng thể đơn dòng có mặt trong một phân tử hoặc một phức hợp, phương pháp kiểu bánh kẹp (sandwich) có thể được thực hiện bằng cách sử dụng một loại kháng thể đơn dòng làm kháng thể được cố định và kháng thể được đánh dấu (xem các ví dụ dưới đây).

Trong thử nghiệm miễn dịch mà nguyên tắc phát hiện của nó là phương pháp kiểu bánh kẹp (sandwich), bất kỳ tác nhân nào mà trên đó kháng thể có thể được cố

định bằng phương pháp đã biết có thể được sử dụng làm pha rắn mà trên đó kháng thể được cố định. Ví dụ, có thể lựa chọn tùy ý một loại chất đã biết, như phim (màng) mỏng rỗng xốp có tác dụng mao quản, một chất dạng hạt, một ống thử nghiệm, và tấm phẳng bằng nhựa. Có thể sử dụng enzym, đồng vị phóng xạ, chất huỳnh quang, chất phát quang, hạt tạo màu, hạt keo hoặc dạng tương tự làm chất đánh dấu kháng thể. Trong số các thử nghiệm miễn dịch sử dụng các vật liệu khác nhau nêu trên, đặc biệt ưu tiên thử nghiệm miễn dịch dòng chảy theo hướng ngang sử dụng màng để thử nghiệm lâm sàng nhanh và đơn giản.

Sáng chế cũng đề xuất thiết bị thử nghiệm miễn dịch có thể thực hiện thử nghiệm miễn dịch theo kiểu dòng chảy theo hướng ngang bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng nhận diện hai hoặc nhiều loại kháng nguyên. Thiết bị thử nghiệm miễn dịch theo sáng chế bao gồm nền đỡ có vùng phát hiện trong đó cố định kháng thể (kháng thể 1) bắt giữ tác nhân đích được xác định (kháng nguyên), vùng chất được đánh dấu có kháng thể được đánh dấu có khả năng di động (kháng thể 2), đệm mẫu mà mẫu thử được nhỏ giọt vào, băng thấm mà thấm hút chất lỏng hiện mẫu, và tấm đỡ để gắn các bộ phận này với nhau, trong đó ít nhất một trong số kháng thể 1 và kháng thể 2 là kháng thể đơn dòng theo sáng chế mà nhận diện hai hoặc nhiều loại kháng nguyên.

Số lượng các vùng phát hiện và tuýp kháng thể được đánh dấu được bao gồm trong vùng chất được đánh dấu không giới hạn ở 1. Bằng cách sử dụng các kháng

thể tương ứng với nhiều loại tác nhân đích được xác định, hai hoặc nhiều loại kháng nguyên có thể được phát hiện bằng cùng một thiết bị thử nghiệm miễn dịch.

Fig. 2 thể hiện phương án được ưu tiên về thiết bị thử nghiệm miễn dịch cho thử nghiệm sắc ký miễn dịch theo sáng chế. Số viện dẫn 1 dùng để chỉ nền đỡ, số viện dẫn 2 dùng để chỉ vùng chất được đánh dấu, số viện dẫn 3 dùng để chỉ vùng phát hiện, số viện dẫn 4 dùng để chỉ đệm mẫu, số viện dẫn 5 dùng để chỉ băng thấm và số viện dẫn 6 dùng để chỉ tấm đỡ.

Hình phía trên của Fig. 2 là hình chiếu từ trên và hình phía dưới là mặt cắt ngang. Trong ví dụ thể hiện trên các hình vẽ này, nền đỡ trong đó hai vùng phát hiện được tạo thành, băng thấm, vùng chất được đánh dấu và đệm mẫu lần lượt được dát lớp mỏng trên tấm đỡ. Như thể hiện trên các hình vẽ, một đầu của băng thấm và một đầu của nền đỡ, đầu kia của nền đỡ và một đầu của vùng chất được đánh dấu và đầu còn lại của vùng chất được đánh dấu và một đầu của đệm mẫu là chồng lên nhau để tạo thành dòng chảy theo hướng ngang.

Nền đỡ là vật liệu có khả năng cố định kháng thể để bắt giữ kháng nguyên và có tính năng không ngăn cản chất lỏng chảy qua theo hướng ngang. Tốt hơn là, nền đỡ là một màng mỏng xốp có tác dụng mao quản, và là vật liệu có khả năng vận chuyển chất lỏng và các thành phần được phân tán trong đó bằng cách thấm hút. Vật liệu tạo thành nền đỡ này không bị giới hạn cụ thể, và các ví dụ về vật liệu này bao gồm xenluloza, nitroxenluloza, xenluloza axetat, polyvinyliden diflorua (PVDF), sợi

thủy tinh, ni-lông, polyketon và vật liệu tương tự. Trong số các vật liệu này, màng mỏng được làm bằng nitroxenluloza được ưu tiên hơn.

Vùng chất được đánh dấu được làm bằng vật liệu nền xốp chứa kháng thể được đánh dấu, và sợi thủy tinh, vải không dệt hoặc vật liệu tương tự thường được sử dụng làm vật liệu của vật liệu nền. Để tẩm một lượng lớn kháng thể được đánh dấu, vật liệu nền tốt hơn là có dạng đệm có độ dày nằm trong khoảng từ 0,3mm đến 0,6mm.

Vùng phát hiện dùng để chỉ một phần của nền đỡ, mà trên đó kháng thể bắt giữ kháng nguyên được cố định. Được ưu tiên theo sáng chế là việc tạo ra vùng phát hiện bao gồm ít nhất một vùng, trên đó kháng thể đơn dòng nhận diện hai hoặc nhiều loại kháng nguyên được cố định và còn tạo ra vùng phát hiện để phát hiện kháng thể được đánh dấu để hỗ trợ việc chẩn đoán trên thực tế.

Đệm mẫu là vị trí để nhỏ mẫu thử nghiệm hoặc mẫu được chuẩn bị bằng cách sử dụng mẫu thử nghiệm, và là vật liệu xốp có tính thấm nước. Xenluloza, sợi thủy tinh, vải không dệt hoặc vật liệu tương tự thường có thể được sử dụng làm vật liệu. Để sử dụng một lượng lớn mẫu trong thử nghiệm miễn dịch, vật liệu này tốt hơn là có dạng đệm có độ dày nằm trong khoảng từ 0,3 mm đến 1mm. Đệm mẫu và vùng chất được đánh dấu nêu trên chỉ đơn thuần có chức năng khác nhau, không nhất thiết phải làm bằng các vật liệu riêng. Nghĩa là, cũng có thể rằng diện tích một phần của tập hợp vật liệu này là đệm mẫu có chức năng của vùng chất được đánh dấu.

Băng thấm là một bộ phận để thấm hút các thành phần được cung cấp cho nền đỡ và không tham gia vào phản ứng ở các vùng phát hiện. Giấy lọc, bọt biển hoặc vật liệu tương tự có tính giữ nước cao được làm bằng hợp chất polyme tự nhiên, polyme tổng hợp hoặc polyme tương tự có thể được sử dụng làm vật liệu, nhưng để thúc đẩy sự hiện mẫu, ưu tiên vật liệu có độ thấm hút nước cao.

Tấm đỡ là bộ phận để gắn và cố định tất cả các vật liệu nêu trên, nghĩa là, nền đỡ, đệm mẫu, vùng chất được đánh dấu, và băng thấm với sự chồng một phần. Tấm đỡ không phải lúc nào cũng cần thiết miễn là các vật liệu này có thể được bố trí và cố định ở khoảng cách tối ưu, nhưng thường ưu tiên sử dụng tấm đỡ để thuận tiện cho việc sản xuất và sử dụng.

Trong thiết bị thử nghiệm miễn dịch theo phương án được mô tả trên Fig. 2, mẫu đi qua dòng chảy của lỗ xốp được tạo thành bởi một loạt điểm nổi của đệm mẫu, vùng chất được đánh dấu, nền đỡ, các vùng phát hiện, và băng thấm. Do đó, theo phương án này, tất cả đều là các vùng di chuyển mẫu. Tùy thuộc vào chất lượng và dạng từng vật liệu cấu thành, có thể có chế độ, trong đó mẫu không thấm vào bên trong các vật liệu này và đi qua mặt phân cách. Tuy nhiên, không nhất thiết là vùng di chuyển mẫu được xác định trong bản mô tả này phải là bên trong hay mặt phân cắt của vật liệu, thiết bị thử nghiệm miễn dịch theo chế độ này được bao gồm trong phạm vi của bản mô tả.

Dựa trên phương án trên Fig. 2, phương pháp sử dụng thiết bị thử nghiệm

miễn dịch theo sáng chế sẽ được mô tả. Bắt đầu xác định bằng cách nhỏ mẫu thử nghiệm hoặc mẫu được pha bằng cách sử dụng mẫu thử nghiệm lên đệm mẫu. Tốt hơn là, mẫu được nhỏ giọt đã được pha loãng trước đó khoảng từ 2 đến 20 lần bằng dịch đệm có chứa chất hoạt động bề mặt.

Mẫu được nhỏ lên đệm mẫu được làm hiện theo hướng ngang lần lượt với vùng chất được đánh dấu, nền đỡ và băng thấm do tác dụng mao quản. Trong vùng chất được đánh dấu, kháng thể được đánh dấu được giải phóng vào dung dịch và được làm hiện với nền đỡ cùng với sự hiện mẫu. Trong các trường hợp, trong đó kháng nguyên có mặt trong mẫu, kháng nguyên được bắt giữ đặc hiệu bằng kháng thể bắt giữ trong các vùng phát hiện của nền đỡ, và kháng nguyên cũng tạo thành phức hợp bằng phản ứng đặc hiệu với kháng thể được đánh dấu. Theo cách này, phương pháp kiểu bánh kẹp (sandwich) các kháng thể thông qua kháng nguyên được thiết lập trong các vùng phát hiện, và phức hợp kháng thể-kháng nguyên được đánh dấu có thể được phát hiện trong các vùng phát hiện.

Là kháng thể đơn dòng nhận diện hai hoặc nhiều loại kháng nguyên trong khi có tính đặc hiệu, có các kháng thể khác nhau, có thể được xem như kháng thể đơn dòng nhận diện vùng có mức độ tương đồng cao trong mỗi trong số các kháng nguyên khác nhau, kháng thể đơn dòng nhận diện vùng có cấu hình tương tự trong mỗi trong số các kháng nguyên khác nhau, kháng thể đơn dòng nhận diện vùng quanh các vùng liên kề của phức hợp gồm các kháng nguyên khác nhau và kháng

thể đơn dòng nhận diện cấu hình quanh các vùng liên kề của phức chất gồm các kháng nguyên khác nhau, nhưng tốt hơn là, hai hoặc nhiều loại kháng nguyên được nhận diện bởi một kháng thể đơn dòng được bao gồm trong cùng phức chất. Nên được lưu ý rằng trong bản mô tả này, thuật ngữ "phức hợp" dùng để chỉ một chất trong đó nhiều phân tử được kết tụ do tác động nhất định trong mẫu thử nghiệm. Ví dụ, trong các trường hợp, trong đó đối tượng thử nghiệm là tế bào vi khuẩn, mỗi kháng nguyên trên tế bào vi khuẩn có thể được xem xét để tạo thành phức hợp. Trong các ví dụ dưới đây, được xem là protein P1 và protein P30 của *Mycoplasma pneumoniae* tạo thành "phức hợp" như được sử dụng trong bản mô tả này.

Nhờ có các kháng nguyên được bao gồm trong cùng phức hợp, khả năng tiếp nhận sự cản trở không gian giữa các kháng thể giảm đi và có khả năng thiết lập phương pháp kiểu bánh kẹp (sandwich) trong thử nghiệm miễn dịch nêu trên tăng lên so với trường hợp trong đó các kháng nguyên có mặt trong một chất.

Nguyên tắc cải thiện độ nhạy của thử nghiệm miễn dịch bằng phương pháp theo sáng chế như sau. Trong phương pháp kiểu bánh kẹp (sandwich), kháng thể được cố định trên pha rắn được sử dụng, nhưng lượng kháng thể có thể được cố định trên mỗi đơn vị diện tích của pha rắn bị giới hạn. Ngoài ra, thời gian của phản ứng kháng nguyên-kháng thể cũng bị giới hạn. Cụ thể, trong phương pháp thử nghiệm sắc ký miễn dịch, do phản ứng kháng nguyên-kháng thể xuất hiện chỉ khi mẫu thử nghiệm hoặc mẫu được pha bằng cách sử dụng mẫu thử nghiệm (pha loãng mẫu thử

nghiệm hoặc dịch tương tự) chảy từ phía trên xuống và đi qua các vùng phát hiện, kháng nguyên không thể gắn kết với kháng thể trong khoảng thời gian này sẽ chảy xuống bên dưới các vùng phát hiện và không được phát hiện. Khi lượng kháng nguyên trong mẫu là nhỏ, việc sử dụng kháng thể đơn dòng nhận diện hai hoặc nhiều loại kháng nguyên làm kháng thể được cố định cải thiện độ nhạy nhiều hơn là khi sử dụng một loại kháng thể đơn dòng nhận diện một kháng nguyên làm kháng thể được cố định (phương pháp kiểu bánh kẹp (sandwich) thông thường), do lượng kháng nguyên được gắn kết với kháng thể tăng lên. Ngoài ra, khi sử dụng kết hợp hai loại kháng thể đơn dòng, mỗi loại nhận diện một loại kháng nguyên làm các kháng thể được cố định, lượng của mỗi kháng thể đơn dòng được cố định bằng một nửa tổng lượng của các kháng thể được cố định. Do đó, khi thời gian của phản ứng kháng nguyên-kháng thể là ngắn, xác suất để kháng nguyên va phải và gắn kết với kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết kháng nguyên này theo hướng quy định là $1/2$ so với trường hợp, trong đó toàn bộ kháng thể được cố định là kháng thể đơn dòng nhận diện kháng nguyên này. Mặt khác, khi kháng thể đơn dòng nhận diện hai hoặc nhiều loại kháng nguyên được sử dụng, kháng nguyên bất kỳ trong số hai hoặc nhiều loại kháng nguyên sẽ gắn kết với kháng thể nếu nó va phải kháng thể được cố định theo hướng quy định. Do đó, lượng các kháng nguyên bị bắt giữ bởi kháng thể được cố định là lớn hơn so với trong các trường hợp, trong đó sử dụng kết hợp hai loại kháng thể đơn dòng, mỗi loại nhận diện một loại kháng nguyên, và do đó độ

nhạy của thử nghiệm miễn dịch này được cải thiện.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, bản mô tả sẽ được mô tả cụ thể hơn bằng các ví dụ thực hiện sáng chế. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1. Tạo ra kháng thể đơn dòng kháng *Mycoplasma pneumoniae*

1. Tạo ra kháng nguyên *Mycoplasma pneumoniae*

Mycoplasma pneumoniae được nuôi cấy và sử dụng dung dịch nuôi cấy đã được làm bất hoạt bằng cách xử lý nhiệt ở 60°C trong 30 phút.

2. Tạo ra kháng thể đơn dòng kháng *Mycoplasma pneumoniae*

Chuột BALB/c được gây miễn dịch bằng kháng nguyên đã được làm bất hoạt *mycoplasma* như được mô tả trong mục 1, và cắt lấy lá lách của chuột được nuôi trong một khoảng thời gian nhất định và dung hợp với các tế bào u tủy của chuột của (P3 × 63) bằng phương pháp của Kohler et al. (Nature, vol 256, p 495-497 (1975) của Kohler et al.). Các tế bào đã dung hợp thu được (các tế bào lai) được bảo quản trong tủ ấm ở 37°C, và tiến hành tinh chế tế bào (tách một dòng tế bào) đồng thời xác nhận hoạt tính kháng thể của dịch nổi bằng kỹ thuật ELISA bằng cách sử dụng đĩa trong đó cố định kháng nguyên P1 của *Mycoplasma pneumoniae* và đĩa trong đó cố định kháng nguyên P30 của *Mycoplasma pneumoniae*.

Do đó, như thể hiện trong bảng 1, thu được nhiều dòng tế bào lai sinh ra các kháng thể kháng P1 của *Mycoplasma pneumoniae* và các kháng thể kháng P30 của

Mycoplasma pneumoniae và các kháng thể kháng P1-P30 của *Mycoplasma pneumoniae*.

Bảng 1

Tên dòng tế bào	Kháng nguyên phản ứng
P1A	P1
P1B	P1
P30A	P30
P30B	P30
P1-P30A	P1, P30
P1-P30B	P1, P30

P1 và P30 được sử dụng trong kỹ thuật ELISA này được tạo ra bằng cách lọc gel và sắc ký trao đổi ion.

Các dòng tế bào thu được được tiêm trong màng bụng cho chuột BALB/c đã được điều trị bằng pristan, và khoảng 2 tuần sau, thu dịch cổ trướng chứa kháng thể. Tinh chế IgG từ dịch cổ trướng thu được bằng phương pháp sắc ký ái lực sử dụng cột protein A, và thu được nhiều kháng thể đơn dòng kháng *Mycoplasma pneumoniae* đã tinh chế.

Trong các ví dụ dưới đây, trong số nhiều kháng thể đơn dòng kháng *Mycoplasma pneumoniae* thu được, sử dụng các kháng thể được lựa chọn theo khả năng phản ứng và epitop.

Ví dụ 2. Phản ứng của kháng thể đơn dòng kháng *Mycoplasma pneumoniae*

Phản ứng giữa mỗi kháng thể đơn dòng thu được trong ví dụ 1 và *Mycoplasma pneumoniae* được xác nhận bằng phương pháp phân tích thẩm tách Western.

Mycoplasma pneumoniae được nuôi cấy trong dung dịch PPLO Broth và dịch nuôi cấy này được sử dụng làm mẫu.

Dịch nuôi cấy chứa *Mycoplasma pneumoniae* và các chất đánh dấu trọng lượng phân tử được điện di bằng SDS-PAGE thông thường. Sau khi điện di, mẫu tạo thành được chuyển vào màng PVDF. Sau khi phong bế bằng sữa gầy, mẫu tạo thành được rửa kỹ bằng PBS-Tween. Kháng thể kháng P30 được điều chỉnh đến nồng độ 1µg/mL bằng PBS-Tween được phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau khi rửa kỹ bằng PBS-Tween, kháng thể kháng chuột được đánh dấu HRP được pha loãng 3000 lần được phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau khi rửa kỹ bằng PBS-Tween, tín hiệu được phát hiện bằng cách sử dụng thuốc thử ECL (GE Healthcare) hoặc bộ kit nhuộm miễn dịch POD (Wako).

Kết quả của phân tích thẩm tách Western được thể hiện trên Fig. 1. Như thể hiện trên Fig. 1, xác nhận được rằng các kháng thể đơn dòng thu được trong Ví dụ 1 phản ứng đặc hiệu với từng kháng nguyên, tương tự như kết quả của ELISA. Hình bên trái phía trên của Fig. 1 (phát hiện huỳnh quang trong ECL) thể hiện kết quả đối với P1A và P1B, và mỗi vạch bên phải thể hiện kết quả đối với các tế bào vi khuẩn và vạch bên trái thể hiện các chất đánh dấu trọng lượng phân tử (tương tự cho các hình khác trên FIG. 1). Băng protein P1 là rõ ràng trong mỗi vạch bên phải. Hình bên phải phía trên của Fig. 1 (được thu bằng mật độ kế sau khi nhuộm POD) thể hiện kết quả đối với P30A và P30B. Băng protein P30 là rõ ràng trong mỗi vạch bên

trái. Hình bên trái phía dưới của Fig. 1 (được thu bằng mật độ kế sau khi nhuộm POD) thể hiện kết quả đối với P1-P30A. Trong vạch bên trái, băng protein P1 và băng protein P30 là rõ ràng. Hình bên phải phía dưới của Fig. 1 (phát hiện huỳnh quang bằng thuốc thử ECL) thể hiện kết quả đối với P1-P30B. Băng protein P30 là rõ ràng, và băng protein P1 có thể được xác định cho dù không rõ ràng.

Ví dụ 3. Thiết bị thử nghiệm miễn dịch để xác định *Mycoplasma pneumoniae*

1. Cố định kháng thể kháng *Mycoplasma pneumoniae* trên màng Nitroxenluloza

Dung dịch trong đó kháng thể được tạo ra trong ví dụ 1 được pha loãng bằng nước tinh khiết đến nồng độ 1,0 mg/mL, và tạo ra kháng thể kháng IgG ở chuột. Kháng thể và kháng thể kháng IgG ở chuột được phết lên mặt của đệm mẫu và mặt thân thấm hút của màng nitroxenluloza được lót bằng màng PET, một cách tương ứng. Sau đó, màng nitroxenluloza được làm khô ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 30 phút để thu được màng đã cố định kháng thể kháng *Mycoplasma pneumoniae*. Trong ví dụ này, màng này được dùng để chỉ màng đã được cố định kháng thể.

2. Cố định kháng thể kháng *Mycoplasma pneumoniae* trên các hạt polystyren được tạo màu

Kháng thể được tạo ra trong ví dụ 1 được pha loãng bằng nước tinh khiết đến nồng độ 1,0 mg/mL, và hạt polystyren đã được tạo màu được bổ sung vào đến nồng độ bằng 0,1%. Sau khi khuấy, carbodiimide được bổ sung vào đến nồng độ 1%, và dịch thu được còn được khuấy. Loại bỏ dịch nổi bằng cách ly tâm và tạo hỗn dịch

lại trong 50 mM Tris (độ pH=9,0), 3% BSA để thu được hạt polystyren được tạo màu đã gắn kết kháng thể kháng *Mycoplasma pneumoniae*. Trong ví dụ này, hạt này được gọi là hạt đã cố định kháng thể.

3. Tạo ra các bộ thử nghiệm để xác định P1, P30 và P1 + P30 của *Mycoplasma pneumoniae*

Màng đã cố định kháng thể được tạo ra trong mục 1 được gắn với các bộ phận khác (tấm đỡ, băng thấm, đệm mẫu) và cắt theo chiều rộng 5 mm để tạo ra bộ thử nghiệm *Mycoplasma pneumoniae* (xem FIG. 2). Các băng này được gọi là các bộ thử nghiệm trong ví dụ này.

Ví dụ 4, ví dụ so sánh 1 và ví dụ so sánh 2

So sánh độ nhạy của các thiết bị thử nghiệm miễn dịch để xác định P1, P30 và P1 + P30

Ba loại bộ thử nghiệm P1 (Ví dụ so sánh 1), bộ thử nghiệm P30 (Ví dụ so sánh 2) và bộ thử nghiệm P1-P30 (Ví dụ 4) được tạo ra theo quy trình trong ví dụ 3 từ tổ hợp các kháng thể đơn dòng được thể hiện trong bảng 2, các kháng thể đơn dòng này thu được trong ví dụ 1.

Bảng 2

Bộ thử nghiệm	Kháng thể được sử dụng	
	Màng đã cố định kháng thể	Hạt đã cố định kháng thể
Bộ thử nghiệm P1 (Ví dụ so sánh 1)	P1A	P1B
Bộ thử nghiệm P30 (Ví dụ so sánh 2)	P30A	P30B

Bộ thử nghiệm P1-P30 (Ví dụ 4)	P1-P30A	P1-P30A
--------------------------------	---------	---------

50 μ L hỗn dịch mẫu chứa kháng nguyên *Mycoplasma pneumoniae* được pha loãng tùy ý và các hạt đã cố định kháng thể được tạo ra ở mục 2 được bổ sung từng giọt vào mỗi bộ thử nghiệm, và để yên dịch thu được trong thời gian 15 phút.

Mỗi mẫu thử được đánh giá là "+" khi việc hiện màu có thể được xác định bằng mắt thường ở vị trí nhỏ mẫu của cả kháng thể kháng IgG ở chuột và kháng thể kháng *Mycoplasma pneumoniae*. Mỗi mẫu thử được đánh giá là "-" khi việc hiện màu có thể xác định bằng mắt thường chỉ ở vị trí nhỏ mẫu kháng thể kháng IgG ở chuột và không thể xác định có hiện màu ở vị trí nhỏ mẫu kháng thể kháng *Mycoplasma pneumoniae*. Mỗi mẫu thử được đánh giá là không có giá trị khi không thể xác định có hiện màu bằng mắt thường ở vị trí nhỏ mẫu kháng thể kháng IgG ở chuột.

Các kết quả của mỗi bộ thử nghiệm được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3

	Mẫu trống	Gấp 32 lần	Gấp 64 lần	Gấp 128 lần	Gấp 256 lần	Gấp 512 lần	Gấp 1024 lần
Bộ thử nghiệm P1 (Ví dụ so sánh 1)	-	+	-	-	-	-	-
Bộ thử nghiệm P30 (Ví dụ so sánh 2)	-	+	+	$\pm$	-	-	-
Bộ thử nghiệm P1- P30 (Ví dụ 4)	-	+	+	+	+	+	$\pm$

Như thể hiện trong bảng 3, thiết bị thử nghiệm miễn dịch theo sáng chế xác định cả P1 và P30 của *Mycoplasma pneumoniae* thể hiện độ nhạy gấp 16 lần so với

thiết bị thử nghiệm miễn dịch chỉ xác định P1 và độ nhạy gấp 8 so với thiết bị thử nghiệm miễn dịch chỉ xác định P30.

Ví dụ 5

Các kháng thể được sử dụng trong bộ thử nghiệm P1-P30 được thử nghiệm khi kết hợp P1-P30A và P1-P30B theo cách tương tự như trong ví dụ 4. Do đó, các thử nghiệm này cho độ nhạy gấp từ 2 đến 4 lần so với khi chỉ kết hợp P1-P30A (Ví dụ 4).

Mô tả các số chỉ dẫn trên hình vẽ:

- 1 nền đỡ
- 2 vùng chất được đánh dấu
- 3 vùng phát hiện
- 4 đệm mẫu
- 5 băng thấm
- 6 tấm đỡ

Hiệu quả của sáng chế

Theo phương pháp của sáng chế, kháng thể đơn dòng được sử dụng trong thử nghiệm miễn dịch để có độ nhạy cao, trong khi độ nhạy thấp do sử dụng kháng thể đơn dòng được cải thiện. Sáng chế cũng đề xuất thiết bị thử nghiệm miễn dịch và kháng thể đơn dòng được sử dụng trong phương pháp phát hiện của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp phát hiện *Mycoplasma pneumoniae* có hai hoặc nhiều loại kháng nguyên cho phép phát hiện *Mycoplasma pneumoniae* này, trong đó phương pháp nêu trên bao gồm bước phát hiện *Mycoplasma pneumoniae* này bằng thử nghiệm miễn dịch sử dụng kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó nhận diện hai hoặc nhiều loại kháng nguyên nêu trên, trong đó hai hoặc nhiều loại kháng nguyên nêu trên là protein P1 và protein P30.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó thử nghiệm miễn dịch là phương pháp kiểu bánh kẹp (sandwich), trong đó kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được sử dụng trong ít nhất một trong số chất đánh dấu và pha rắn.
3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó thử nghiệm miễn dịch là phương pháp thử nghiệm sắc ký miễn dịch.
4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó hai hoặc nhiều loại kháng nguyên được nhận diện bởi kháng thể đơn dòng tạo thành phức hợp.
5. Thiết bị thử nghiệm miễn dịch để thực hiện phương pháp theo điểm 1 để phát hiện *Mycoplasma pneumoniae*, trong đó kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó nhận diện hai hoặc nhiều loại kháng nguyên là protein P1 và protein P30 được sử dụng trong ít nhất một trong số chất đánh dấu và pha rắn.
6. Thiết bị thử nghiệm miễn dịch theo điểm 5, trong đó thiết bị thử nghiệm miễn

dịch này là bộ thử nghiệm sắc ký miễn dịch.

7. Kháng thể đơn dòng phản ứng đặc hiệu với protein P1 và protein P30 có nguồn gốc từ *Mycoplasma pneumoniae*.

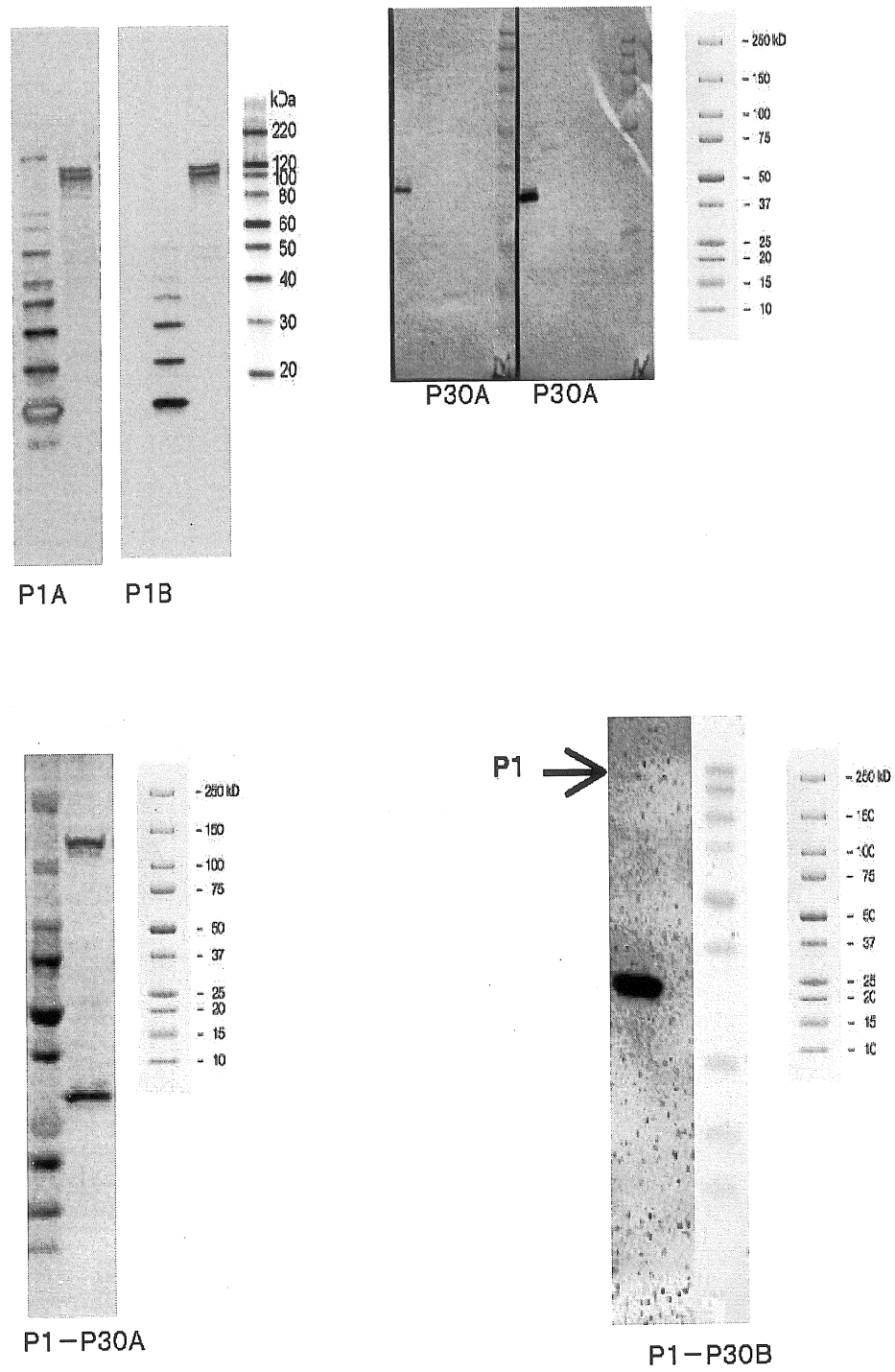
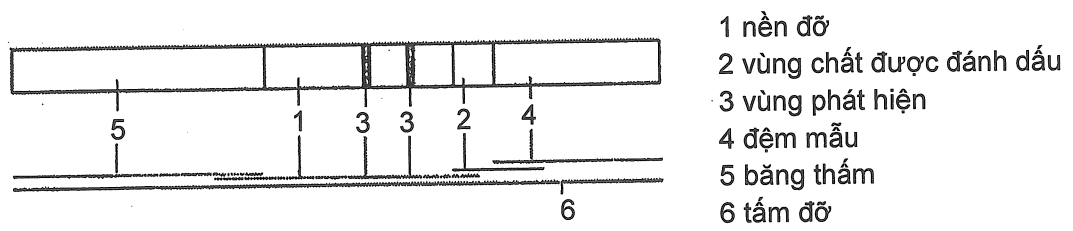


Fig.1

**Fig.2**