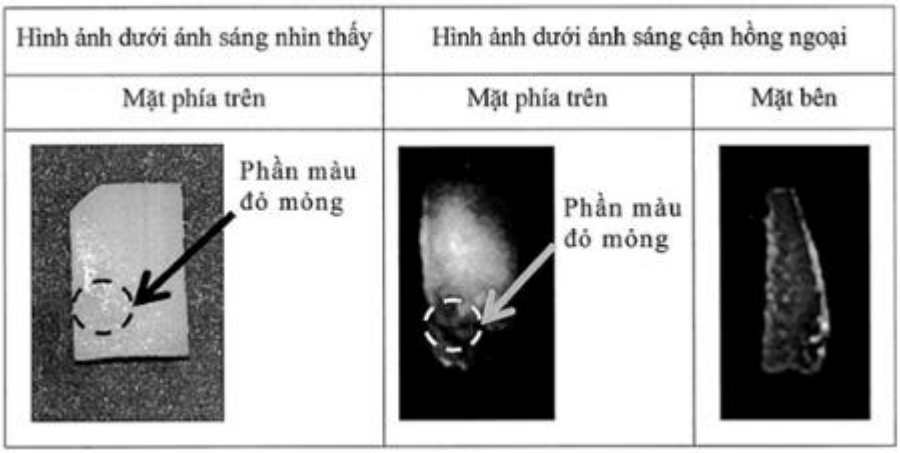
(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(11) **1-0031750**
(51)[7] **A61K 49/00**
(13) **B**

(21) 1-2016-02151
(22) 08/12/2014
(86) PCT/JP2014/082441 08/12/2014
(87) WO 2015/087839 A1 18/06/2015
(30) 2013-257892 13/12/2013 JP
(45) 25/05/2022 410
(43) 26/09/2016 342A
(73) 1. MERCURY ASSET MANAGEMENT CO., LTD. (JP)
11F Aqua Dojima NBF Tower, 4-16, Dojimahama 1-chome, Kita-ku Osaka-shi, Osaka 5300004, Japan
2. FUJIWARA, Yasunori (JP)
Central Higashiginza 713, 15-15, Tsukiji 2-chome, Chuo-ku, Tokyo 1040045, Japan
(72) MIZUNO, Shuichi (JP); KAWAGUCHI, Nobuaki (JP); TSUCHIYA, Akihiro (JP); MANOME, Yoshinobu (JP).
(74) Công ty TNHH Lê & Lê (LE & LE)

(54) CHẾ PHẨM THÍCH HỢP ĐỂ SỬ DỤNG TRONG VIỆC HIỂN THỊ VỊ TRÍ THOÁI HÓA TRONG SỤN KHỚP

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm ảnh hóa sụn khớp, cụ thể là chế phẩm để hiển thị vị trí thoái hóa trong sụn khớp mà có thể hiển thị nhằm phân biệt một cách rõ ràng vị trí bình thường và vị trí bất thường, tức là, vị trí thoái hóa, trong sụn khớp. Chế phẩm ảnh hóa sụn khớp chứa một phân tử tích điện dương, được đánh dấu bằng một phân tử đánh dấu.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm để ảnh hóa sụn khớp, đặc biệt là hấp thụ vào vị trí bị tổn thương của sụn khớp, do đó hiển thị vị trí bị tổn thương của sụn khớp.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh viêm xương khớp là một rối loạn khớp, bệnh này có lẽ được gây ra bởi sự thoái hóa sụn khớp như là nguyên nhân chính và thường quan sát thấy trong, ví dụ, đầu gối, hông và khớp xương đùi. Bệnh viêm xương khớp không chỉ bị gây ra bởi sự lão hóa và quá tải mà còn do các chấn thương trong thể thao và bệnh béo phì. Đặc biệt, số lượng bệnh nhân bị viêm khớp đầu gối được dự đoán là 25.300.000 bệnh nhân ở Nhật Bản (dự án ROAD, Trung tâm y học và nghiên cứu thế kỷ 33, Trường đại học bệnh viện Tokyo, 2009) và nhiều hơn hai hoặc nhiều lần ở Mỹ so với ở Nhật Bản. Ngoài ra, tại các vùng đông dân như Trung Quốc, Ấn Độ và các nước Châu Phi nơi mà các điều kiện làm việc và điều kiện môi trường được coi là khắc nghiệt hơn so với ở Nhật Bản, số lượng bệnh nhân bị viêm khớp sẽ tăng từ bây giờ. Hiện tại, ở Nhật Bản, 75.000 (Yano Research Institute Ltd., 2011) bệnh nhân được báo cáo là phải trải qua phẫu thuật thay khớp đầu gối nhân tạo như là liệu pháp điều trị cuối cùng. Việc thay khớp nhân tạo thực chất là một liệu pháp xâm lấn rất cao. Ngoài ra, tuổi thọ cơ học của khớp nhân tạo bị hạn chế và phụ thuộc vào hoàn cảnh, khớp nhân tạo phải được trao đổi lặp đi lặp lại.

Để ngăn chặn đợt cấp của viêm khớp đầu gối và tránh phải phẫu thuật thay thế khớp nhân tạo cuối cùng, điều quan trọng là phải sớm nhận

được sự điều trị thích hợp. Để điều trị sớm, đòi hỏi phải phát hiện sớm sự thoái hóa sụn; tuy nhiên, rất khó để phát hiện sự thoái hóa sụn giai đoạn sớm bằng kỹ thuật ảnh hóa tia X (ảnh Rơngen) thông thường và quét MRI. Sự hiện diện hay vắng mặt của thoái hóa sụn cũng có thể được kiểm tra bằng cách quan sát sụn sử dụng một kính soi khớp (một loại nội soi); tuy nhiên, trong phương pháp này, bác sĩ phụ trách chạm vào vị trí lớp bề mặt của sụn bằng cách sử dụng một dụng cụ chẳng hạn dụng cụ kẹp dưới một kính soi khớp và xác định sự có mặt hay vắng mặt sự thoái hóa khớp dựa trên cảm giác khi chạm. Bởi vì lý do này, việc phát hiện sớm chủ yếu dựa vào kinh nghiệm và kỹ năng của bác sĩ. Ngoài ra, có một vấn đề là các đường biên giới giữa sụn bình thường và sụn thoái hóa không thể được xác định rõ ràng.

Nếu có một phương pháp xét nghiệm không xâm lấn hoặc ít xâm lấn, cho phép phát hiện sớm sự thoái hóa sụn mà không phụ thuộc vào kinh nghiệm và kỹ năng của một mình bác sĩ, sự có mặt hoặc vắng mặt và sự tiến triển của thoái hóa sụn có thể được tìm ra và chiến lược điều trị có thể dễ dàng tạo ra. Phương pháp kiểm tra không xâm lấn hoặc ít xâm lấn, một phương pháp sử dụng kỹ thuật hình ảnh *in-vivo* để hiển thị mô sống đã được biết đến. Kỹ thuật hình ảnh *in-vivo*, các kỹ thuật khác đã được biết, bao gồm chụp cắt lớp phát xạ positron (PET), chụp cộng hưởng từ hạt nhân (MRI), siêu âm (US) và chụp quang-âm học (PAI). Ngoài các kỹ thuật này, kỹ thuật chụp ảnh huỳnh quang chẳng hạn chụp cắt lớp phân tử huỳnh quang (FMT) được biết đến, trong đó hợp chất huỳnh quang tập trung vào một vị trí quan tâm trong cơ thể sống và vị trí được chụp với độ nhạy rất cao. Kỹ thuật chụp ảnh huỳnh quang đã thu hút được sự chú ý vì nó có thể hiển thị một cách không xâm lấn vị trí quan tâm theo cách vị trí cụ thể.

Để áp dụng kỹ thuật chụp ảnh huỳnh quang *in-vivo* nêu trên đối với sụn khớp, một số kỹ thuật liên quan đến đầu dò ghi hình ảnh gắn đặc biệt với mô sụn khớp và tích lũy ở đó được đề xuất. Trong tài liệu Patent 1, chất đánh dấu sụn gắn đặc biệt vào khuôn sụn đã được mô tả, thu được bằng cách cho phép một phương tiện sinh ra tín hiệu, chẳng hạn hợp chất huỳnh quang, để liên kết với polyarginin peptit có từ 6 đến 20 phần arginin hoặc polylysin peptit có từ 6 đến 20 phần lysin. Hơn nữa trong tài liệu Patent 2, chất đánh dấu mô sụn được mô tả, chất này gồm có dẫn xuất oligome lysin thu được bằng cách cho phép một nhóm có khả năng tạo ra hoặc hấp thụ sóng điện từ để gắn vào oligome lysin trong đó nhóm ε-amino của lysin và nhóm carboxyl được kết nối nhờ liên kết peptit.

Danh sách tài liệu đối chứng

Tài liệu Patent 1

Công bố đơn sáng chế Nhật bản số 2009-023993

Tài liệu Patent 2

Công bố đơn quốc tế số WO 2013/137302

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Tài liệu Patent 1 và tài liệu Patent 2 chỉ ra rằng các chất đánh dấu sụn này gắn đặc biệt vào sụn khớp bình thường; tuy nhiên, các tài liệu này không nói gì về việc chúng hoạt động như thế nào trên các sụn bất thường, tức là, sụn thoái hóa, chẳng hạn bệnh viêm khớp. Để mô tả cụ thể hơn, hiện nay, có một vấn đề là không có chế phẩm ảnh hóa sụn khớp trong chẩn đoán mà có thể hiển thị phân biệt một cách rõ ràng vị trí bình thường và vị trí bất thường trên sụn khớp.

Ngoài ra, như đã mô tả ở trên, người ta mong muốn phát triển

phương pháp xét nghiệm có khả năng phát hiện sớm sự thoái hóa sụn mà không đòi hỏi nhiều kinh nghiệm và kỹ năng của bác sĩ.

Sáng chế được tạo ra trong việc xem xét các trường hợp nêu trên. Sáng chế đề cập đến chế phẩm thích hợp được sử dụng để hiển thị vị trí thoái hóa trong sụn khớp được đặc trưng bằng việc chứa một albumin tích điện dương được đánh dấu màu xanh lục indoxyanin. .

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm để hiển thị vị trí thoái hóa trong sụn khớp, trong đó vị trí thoái hóa của sụn khớp có lớp mô sụn bị tổn thương hoặc có một phần khiếm khuyết từ lớp bề mặt đến phần sâu của mô sụn. .

Giải quyết vấn đề

Để đạt được các mục đích nêu trên, chế phẩm ảnh hóa sụn khớp của sáng chế chứa phân tử tích điện dương, phân tử này được đánh dấu bằng phân tử đánh dấu. Sụn bình thường có một lớp bề mặt được tạo thành bởi nhiều lớp bao gồm các tế bào phẳng. Mặt khác, sụn thoái hóa có trạng thái mà lớp tế bào được loại bỏ và mô sụn giàu chất xơ và có cấu trúc mô bất thường bị lộ hoặc trạng thái mà một khiếm khuyết được hình thành từ lớp bề mặt hướng tới vị trí sâu. Chế phẩm ảnh hóa sụn khớp của sáng chế chứa phân tử tích điện dương được đánh dấu bằng phân tử đánh dấu. Phân tử tích điện dương thâm nhập sâu vào mô sụn bị lộ và hấp phụ thêm vào đó. Tương tự như vậy, kể từ khi chế phẩm ảnh hóa sụn khớp của sáng chế được hấp phụ sâu vào vị trí thoái hóa của sụn, vị trí bình thường và vị trí thoái hóa của sụn khớp có thể được nhìn thấy theo cách phân biệt được.

Phân tử tích điện dương của chế phẩm ảnh hóa sụn khớp theo sáng chế tốt hơn là một hợp chất protein hoặc peptit tích điện dương. Khi phân

tử tích điện dương đóng vai trò như một thành phần của chế phẩm ảnh hóa sụn khớp, hợp chất có mặt ở khắp nơi trong cơ thể sống, có độ an toàn cao, và được xử lý dễ dàng và được đánh dấu một cách đơn giản bằng phân tử đánh dấu được chọn.

Hợp chất protein hoặc peptit của chế phẩm ảnh hóa sụn khớp theo sáng chế tốt hơn là albumin, sản phẩm phân hủy albumin hoặc hợp chất albumin được biến đổi. Theo đó, hợp chất ưu tiên làm hợp chất protein hoặc peptit cấu tạo nên phân tử tích điện dương được lựa chọn.

Phân tử tích điện dương của chế phẩm ảnh hóa sụn khớp theo sáng chế tốt hơn nữa là hợp chất tích điện dương có mạch đường. Khi phân tử tích điện dương đóng vai trò như một thành phần của chế phẩm ảnh hóa sụn khớp, hợp chất có mặt ở khắp nơi trong cơ thể sống, có độ an toàn cao, và được xử lý dễ dàng và được đánh dấu một cách đơn giản bằng phân tử đánh dấu được chọn.

Hợp chất có mạch đường của chế phẩm ảnh hóa sụn khớp theo sáng chế tốt hơn là dextran, xyclodextrin hoặc dẫn xuất của nó. Theo đó, hợp chất được ưa thích làm hợp chất có mạch đường cấu thành phân tử tích điện dương được lựa chọn.

Phân tử đánh dấu của chế phẩm ảnh hóa sụn khớp theo sáng chế tốt hơn là ít nhất một hợp chất được lựa chọn từ nhóm gồm có hợp chất huỳnh quang, đồng vị phóng xạ, hợp chất hấp thụ tia X, phân tử kháng thể và phân tử có một vị trí ghi nhận được ghi nhận bằng một kháng thể đặc hiệu. Vì mỗi phân tử tích điện dương nêu trên được đánh dấu bằng một phân tử đánh dấu, vị trí của phân tử tích điện dương được hấp phụ vào vị trí sụn thoái hóa có thể được hiển thị bằng hợp chất huỳnh quang, đồng vị phóng xạ, hợp chất hấp thụ tia X, phân tử kháng thể hoặc phân tử có vị trí ghi nhận được ghi nhận bằng một kháng thể đặc hiệu.

Về các phân tử đánh dấu nêu trên, hợp chất huỳnh quang được ưu tiên là indoxyanin xanh. Theo đó, phân tử đánh dấu có độ an toàn cao, hiển thị hiệu quả và phát hiện vị trí thoái hóa có thể được lựa chọn.

Phân tử đánh dấu của chế phẩm ảnh hóa sụn khớp theo sáng chế tốt hơn là ít nhất một hợp chất được chọn từ nhóm gồm có hạt nam châm, hạt kim loại, hạt nano kim loại và hợp chất chứa nano kim loại khác. Theo đó, vị trí của phân tử tích điện dương được hấp phụ vào vị trí sụn thoái hóa có thể được phát hiện bởi phương pháp, ví dụ, chụp cắt lớp vi tính tia X, chụp cộng hưởng từ MRI, quang phổ Raman hoặc cộng hưởng plasmon.

Tác dụng có lợi của sáng chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm ảnh hóa sụn khớp có các tác dụng tuyệt vời sau.

(1) Vị trí bình thường và vị trí bất thường (vị trí thoái hóa) trong sụn khớp có thể được hiển thị theo cách phân biệt rõ ràng.

(2) Sự thoái hóa sụn có thể được phát hiện sớm và mức độ thoái hóa có thể được xác định sớm và chính xác.

(3) Việc chẩn đoán hoặc điều trị có thể được thực hiện bằng cách nhìn vị trí thoái hóa trong sụn khớp *in vivo* bằng cách sử dụng chế phẩm ảnh hóa sụn khớp trong việc điều trị hoặc phẫu thuật dưới một kính soi khớp.

(4) Tình trạng thoái hóa của sụn có thể được chẩn đoán theo cách không xâm lấn hoặc ít xâm lấn sử dụng kỹ thuật ảnh hóa *in-vivo*, ví dụ, bằng cách phun chế phẩm ảnh hóa sụn khớp trong khoảng nối.

(5) Chế phẩm ảnh hóa sụn khớp dễ dàng được xử lý vì nó được cấu thành từ các hợp chất có độ an toàn cao. Ngoài ra, sản phẩm phân hủy của nó cũng có độ an toàn cao.

(6) Sau khi xét nghiệm và phẫu thuật hoàn thành, chế phẩm ảnh hóa sụn khớp được loại bỏ một cách hiệu quả thông qua sự trao đổi chất, thủy phân hoặc pha loãng với dịch mô.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là hình ảnh cho thấy kết quả điện di điểm đẳng điện của albumin huyết thanh bò tích điện dương trong ví dụ 1.

Fig. 2 là hình ảnh cho thấy sự phát xạ huỳnh quang tạo ra từ việc liên kết albumin tích điện dương hoặc albumin với indoxyanin xanh trong ví dụ 2.

Fig. 3 là hình ảnh cho thấy kết quả ảnh hóa của một mô hình sụn bị tổn thương bởi chế phẩm ảnh hóa sụn khớp theo sáng chế của ví dụ 3.

Fig. 4 là hình ảnh cho thấy kết quả ảnh hóa của một mô hình sụn bị tổn thương và mô hình sụn còn nguyên vẹn bởi chế phẩm ảnh hóa sụn khớp theo sáng chế của ví dụ 4.

Fig. 5 là hình ảnh cho thấy kết quả ảnh hóa sụn bị tổn thương của người bởi chế phẩm ảnh hóa sụn khớp theo sáng chế của ví dụ 5.

Mô tả chi tiết sáng chế

Chế phẩm ảnh hóa sụn khớp theo sáng chế chứa phân tử tích điện dương được đánh dấu. Trong sáng chế, "phân tử tích điện dương" đề cập đến phân tử có điện tích dương (điện tích cation) và có khả năng hấp phụ chọn lọc vào sụn bị thoái hóa.

Sụn được phân loại vào các mô liên kết và được cấu tạo từ khuôn sụn như là khuôn ngoại bào, có mặt phần lớn và các tế bào sụn có mặt giống như các chấm. Khớp nối cấu tạo từ sụn được gọi là sụn trong suốt. Thành phần chủ yếu của khuôn sụn của sụn trong suốt là colagen và

proteoglycan. Proteoglycan chứa một mạch bên có điện tích dương chẳng hạn chondroitin sulfat, keratan sulfat và heparan sulfat và toàn bộ tích điện âm. Sụn bình thường có lớp bề mặt được tạo thành từ nhiều lớp chứa các tế bào phẳng. Mặt khác, sụn thoái hóa có trạng thái mà lớp tế bào được loại bỏ và khuôn sụn giàu chất xơ và có cấu trúc mô bất thường bị lộ hoặc trạng thái mà khiếm khuyết được hình thành từ lớp bề mặt hướng tới vị trí sâu. Phân tử tích điện dương chứa trong chế phẩm ảnh hóa sụn khớp theo sáng chế được cho là hấp phụ đặc biệt vào proteoglycan có mặt trong khuôn sụn bị lộ sau khi lớp bề mặt của mô sụn được loại bỏ.

Phân tử tích điện dương trong sáng chế không bị giới hạn đặc biệt miễn là phân tử này có thể hấp phụ chọn lọc vào sụn thoái hóa; tuy nhiên, xét về độ an toàn và dễ dàng xử lý, hợp chất protein hoặc peptit tích điện dương hoặc hợp chất tích điện dương có mạch đường được ưu tiên. Lưu ý rằng, "protein" ở đây bao gồm một loạt các protein chẳng hạn glycoprotein, lipoprotein và protein liên kết nucleotit.

Khi các hợp chất protein hoặc peptit tích điện dương được sử dụng làm phân tử tích điện dương trong sáng chế, các protein huyết thanh và các loại albumin khác được ưu tiên, và đặc biệt albumin huyết thanh được ưu tiên. Các protein huyết thanh và các loại albumin khác bao gồm sản phẩm phân hủy và các hợp chất được biến đổi của albumin. Albumin tích điện dương (albumin được cation hóa) được hấp phụ đặc biệt vào khuôn sụn; tuy nhiên, nó ít xâm lấn vào các tế bào trong mô sụn. Do đó, albumin được cation hóa không dễ dàng được hấp thụ bởi các tế bào từ bề mặt của mô sụn bình thường và hầu như không hấp thụ vào khuôn sụn có mặt trong bề mặt của mô sụn bình thường. Bởi vì lý do này, albumin được cation hóa được hấp phụ sâu bởi một vị trí thoái hóa (bất thường) của mô sụn khớp. Để được hấp phụ sâu bởi một vị trí sụn bị tổn thương,

albumin hoặc hợp chất bị phân hủy/biến đổi của albumin tốt hơn là được tích điện để thỏa mãn điểm đẳng điện (pI) bằng 8 hoặc lớn hơn và đặc biệt tốt hơn là bằng 10 hoặc lớn hơn. Sự an toàn của chế phẩm ảnh hóa sụn khớp để được áp dụng với cơ thể sống có thể được tăng cường thêm bằng cách chọn một albumin ít xâm lấn vào các tế bào trong mô sụn, như được mô tả ở trên. Hơn nữa, nếu phân tử albumin có trọng lượng phân tử lớn được lựa chọn, số lượng đánh dấu (các phân tử đánh dấu) có thể tăng lên. Đối với lý do này, nếu ví dụ, hợp chất huỳnh quang được sử dụng làm phân tử đánh dấu, độ sáng có thể được cải thiện. Khi sự kiểm soát này có thể được thực hiện, việc phát hiện dựa vào phân tử đánh dấu, nói cách khác, sự hiển thị, có thể được thực hiện dễ dàng.

Khi hợp chất có mạch đường được tích điện dương theo cách giống như albumin nêu ở trên và được sử dụng làm phân tử tích điện dương của sáng chế, hợp chất mạch thẳng hoặc mạch vòng có mạch đường được ưu tiên. Về hợp chất mạch thẳng có mạch đường, dextran hoặc dẫn xuất dextran đặc biệt được ưu tiên. Về hợp chất mạch vòng có mạch đường, xyclodextrin hoặc dẫn xuất xyclodextrin đặc biệt được ưu tiên. Các hợp chất được tích điện dương này, tức là, dextran, xyclodextrin và dẫn xuất của chúng, được hấp phụ đặc biệt vào mô sụn tương tự như albumin được đề cập ở trên; tuy nhiên, chúng ít xâm lấn vào các tế bào bên trong mô sụn. Do đó, dextran và xyclodextrin được cation hóa không dễ dàng bị hấp thụ bởi các tế bào từ bề mặt của mô sụn bình thường và hầu như không được hấp phụ với khuôn sụn có mặt trong lớp bề mặt của mô sụn bình thường. Vì lý do này, dextran hoặc xyclodextrin được cation hóa được hấp phụ vào vị trí thoái hóa (bất thường) của mô sụn khớp. Để không tạo nên sự xâm lấn vào các tế bào của mô sụn, dextran hoặc xyclodextrin tốt hơn là có trọng lượng phân tử bằng 3.000

hoặc lớn hơn và tốt hơn nữa bằng 10.000 hoặc lớn hơn. Độ an toàn của chế phẩm ảnh hóa sụn khớp để được áp dụng vào cơ thể sống có thể được cải thiện hơn nữa bằng cách chọn dextran hoặc xyclodextrin ít xâm lấn vào các tế bào trong mô sụn, như được mô tả ở trên. Nếu dextran hoặc xyclodextrin có trọng lượng phân tử lớn được lựa chọn, số phân tử đánh dấu có thể tăng lên. Đối với lý do này, nếu ví dụ, hợp chất huỳnh quang được sử dụng làm phân tử đánh dấu, độ sáng có thể được cải thiện. Khi sự kiểm soát này có thể được thực hiện, việc phát hiện dựa vào phân tử đánh dấu, nói cách khác, sự hiển thị, có thể được thực hiện dễ dàng. Ngoài ra, trong trường hợp xyclodextrin, vì phân tử đánh dấu có thể được bao bọc dễ dàng trong khoang bên trong của phân tử, chế phẩm ảnh hóa sụn khớp theo sáng chế có thể thu được một cách dễ dàng.

Lưu ý rằng, trong sáng chế, "ảnh hóa sụn khớp" nói đến sự hiển thị trạng thái của sụn khớp, nói cách khác, đưa ra trạng thái của sụn khớp được nhìn thấy bằng mắt thường hoặc thông qua ví dụ, thiết bị, với sự hỗ trợ của một phương tiện chẳng hạn như hình ảnh, giá trị bằng số của vec-tơ. Sự hiển thị bao gồm cả hiển thị (để phát hiện) mẫu được lấy từ mô sụn khớp và hiển thị (để phát hiện) *in-vivo* (*tại chỗ*) mô sụn khớp. Ví dụ về việc hiển thị *in-vivo* bao gồm hiển thị đối với phẫu thuật thông thường, hiển thị đối với xét nghiệm và phẫu thuật ít xâm lấn sử dụng một kính soi khớp và hiển thị đối với xét nghiệm ít xâm lấn được thực hiện bằng cách phun hợp chất của sáng chế vào trong khoảng nối bằng một phương tiện ví dụ, bơm tiêm.

Trong sáng chế, phân tử đánh dấu ám chỉ một phân tử mà liên kết trực tiếp hoặc gián tiếp với phân tử tích điện dương hoặc được bao bọc bởi phân tử tích điện dương, do đó đánh dấu phân tử tích điện dương và cho phép phát hiện sự có mặt của phân tử tích điện dương bằng mắt

thường hoặc thông qua một thiết bị. Phân tử đánh dấu, không bị giới hạn đặc biệt, ví dụ, hợp chất huỳnh quang, đồng vị phóng xạ, hợp chất phát quang, enzym, chất hấp thụ tia X, phân tử kháng thể, phân tử (phân tử ghi nhận kháng thể) có vị trí ghi nhận được ghi nhận bởi một kháng thể, hạt nam châm, hạt kim loại hoặc hạt nano kim loại được phủ bằng thủy tinh có thể được sử dụng một cách thích hợp.

Theo một phương án của sáng chế, hợp chất huỳnh quang được ưu tiên sử dụng làm phân tử đánh dấu bởi vì nó dễ dàng được hiển thị hoặc được phát hiện. Thuốc nhuộm huỳnh quang, ví dụ, indoxyanin xanh, Alexa Fluor (nhãn hiệu đã được đăng ký) 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 647, BODIPY (nhãn hiệu đã được đăng ký) FL, Texas Red (nhãn hiệu đã được đăng ký), Oregon Green (nhãn hiệu đã được đăng ký) 488, rhodamin B, rhodamin xanh, tetrametyl rhodamin, fluoretxein, fluoretxein isothioxyanat, phycoerythrin, phycoxyanin, Cy3, Cy5, Cy7, được ưu tiên sử dụng. Trong số các chất này, indoxyanin xanh đặc biệt được ưu tiên sử dụng, lý do là nó rất an toàn và được hiển thị hoặc phát hiện một cách dễ dàng. Indoxyanin xanh, được chiếu bức xạ bằng ánh sáng cận hồng ngoại trong các điều kiện được xác định trước, phát ra huỳnh quang thuộc vùng cận hồng ngoại và có bước sóng dài hơn ánh sáng cận hồng ngoại được áp dụng. Ánh sáng phát xạ hầu như không thể được ghi nhận trực tiếp bằng mắt thường. Để quan sát được, đòi hỏi có một thiết bị phát hiện ánh sáng hồng ngoại; tuy nhiên, vì việc quan sát có thể được thực hiện trong một trường tối, việc điều chỉnh độ tương phản có thể được thực hiện dễ dàng khi việc quan sát được thực hiện bởi kính soi khớp, tạo thuận lợi cho việc phát hiện. Các phân tử huỳnh quang này được sử dụng để đánh dấu phân tử tích điện dương bằng phương pháp liên kết avidin-biotin, bao gồm

hoặc các phương pháp khác được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật.

Khi phân tử ghi nhận kháng thể được sử dụng làm phân tử đánh dấu, huỳnh quang có thể được quan sát bằng cách sử dụng không chỉ phương pháp avidin-biotin mà còn các loại phản ứng kháng thể huỳnh quang khác. Khi luxiferin được sử dụng làm phân tử đánh dấu, sự phát xạ ánh sáng bằng cách sử dụng phản ứng luxiferin-luxiferaza có thể quan sát được. Về phân tử đánh dấu, ví dụ, chất hấp thụ tia X, hạt nano nam châm và hạt nano kim loại có thể được sử dụng. Nếu các thành phần này được sử dụng làm phân tử đánh dấu, việc quan sát có thể được thực hiện bởi phương pháp chụp cắt lớp vi tính tia X (X-ray CT), chụp hình cộng hưởng từ trường (MRI), quang phổ Raman hoặc cộng hưởng plasmon. Lưu ý rằng, ngoài việc phát hiện bằng phân tử đánh dấu nêu trên, sự hấp thụ ánh sáng hồng ngoại của hemoglobin có mặt dồi dào dưới mô sụn và hiện tượng tự phát sáng của sợi colagen có thể được đánh giá theo cách không xâm lấn. Ngoài ra, tính nhớt đàn so với ứng suất trượt bởi phương pháp đo độ đàn hồi cộng hưởng từ (MRE) có thể được đánh giá theo cách không xâm lấn.

Chế phẩm ảnh hóa sụn khớp theo sáng chế có thể còn chứa các thành phần khác ngoài các phân tử nêu trên. Ví dụ về các thành phần (chất phụ gia) gồm có chất đẳng trương, chất đệm, chất bảo quản và chất chống oxy hóa. Về chất đẳng trương, ví dụ, natri clorua, glyxerin, D-mannitol, D-sorbitol hoặc glucoza được ưu tiên sử dụng. Về chất đệm, ví dụ, chất đệm phosphat, chất đệm axetat, chất đệm carbonat và chất đệm xitrat được đề cập đến.

Chế phẩm ảnh hóa sụn khớp theo sáng chế có thể chứa, ngoài các chất phụ gia nêu trên, chất để ngăn ngừa thêm sự xâm lấn của phân tử tích điện dương vào mô sụn. Nguyên liệu này, ví dụ, colagen và albumin

không tích điện dương hoặc dẫn xuất hoặc sản phẩm phân hủy của chúng, được đề cập đến.

Lưu ý rằng chế phẩm ảnh hóa sụn khớp theo sáng chế có thể được sử dụng trong hệ thống cấp phát thuốc liên kết chọn lọc với một vị trí sụn bị tổn thương, bằng cách liên kết chất trị liệu có tác dụng chữa lại sụn bị tổn thương hoặc phân tử giàn giáo chẳng hạn colagen loại I dùng làm giàn giáo cho, ví dụ, mảng tế bào đối với y học tái tạo và liệu pháp tế bào ở vị trí của phân tử đánh dấu nêu trên, và cũng được sử dụng trong quản lý hậu phẫu sau khi cấy ghép giàn giáo.

Bây giờ, phương pháp sử dụng chế phẩm ảnh hóa sụn khớp theo sáng chế sẽ được mô tả. Chế phẩm ảnh hóa sụn khớp theo sáng chế tốt hơn là chế phẩm dạng lỏng vì dạng lỏng có thể được áp dụng dễ dàng. Khi hợp chất của sáng chế được áp dụng trong cơ thể sống, có thể được áp dụng vào lớp bề mặt sụn khớp bằng cách phun, nhỏ giọt hoặc phủ dưới một kính soi khớp hoặc bơm vào khoảng nối. Trong trường hợp áp dụng dưới kính soi khớp, tốt hơn là bề mặt sụn phải được rửa bằng, ví dụ, Ringer's lactat hoặc nước muối sinh lý để loại bỏ chất lỏng niêm mạc (chất lỏng hoạt dịch) trong khoảng nối, và sau đó, chế phẩm ảnh hóa sụn khớp theo sáng chế được áp dụng chẳng hạn bằng cách phun hoặc bao phủ. Sau khi chế phẩm ảnh hóa sụn khớp được áp dụng bằng cách, ví dụ, phun, chế phẩm ảnh hóa sụn khớp được phép đứng yên đến một thời gian định trước cho việc xâm nhập. Thời gian định trước ở đây là cụ thể, tốt hơn là khoảng 3 phút đến 30 phút, tốt hơn nữa là khoảng 5 phút đến 20 phút và tốt hơn nữa là khoảng 10 phút đến 15 phút, theo quan điểm về độ thẩm thấu tới mô đích. Sau đó, sụn khớp được tráng bằng, ví dụ, Ringer's lactat để loại bỏ sự hấp phụ không đặc hiệu và chế phẩm ảnh hóa sụn khớp quá mức. Sau khi đó, ví dụ, huỳnh quang của phân tử đánh dấu

được phát hiện.

Về phương pháp phát hiện sử dụng phân tử đánh dấu, không bị giới hạn đặc biệt, phương pháp trong đó phân tử đánh dấu được đo bằng cách chèn một kính soi khớp và sợi quang có một bộ lọc kiểm soát được ánh sáng kích thích để phù hợp với phân tử đánh dấu. Ví dụ, khi chất chỉ thị huỳnh quang, indoxyanin xanh, được sử dụng làm phân tử đánh dấu, huỳnh quang xanh (bước sóng đỉnh: 800 đến 850nm) của indoxyanin xanh có thể được quan sát dễ dàng bằng các hình ảnh của một camera CCD nhờ bộ lọc thích hợp. Trong việc ảnh hóa kết quả phát hiện, ví dụ, cường độ huỳnh quang có thể được chuyển hóa thành ví dụ, màu sắc và các giá trị bằng số mong muốn bởi người quan sát bằng cách sử dụng phần mềm thích hợp, và được hiển thị. Ngoài ra, hình ảnh nhìn thấy được của vị trí sụn thoái hóa được hiển thị bởi chế phẩm ảnh hóa sụn khớp, như được đề cập ở trên, nếu ví dụ, mật độ tương phản và sự thay đổi màu sắc được xác định hoặc phát hiện, độ gồ ghề của bề mặt mô sụn thoái hóa, cụ thể hơn, mức độ thoái hóa của sụn có thể được phát hiện. Vì thời gian đòi hỏi để chẩn đoán hoặc phẫu thuật khi sử dụng kính soi khớp thường ngắn từ 1 đến 3 giờ, nên là đủ khi thời gian làm việc của chế phẩm ảnh hóa sụn khớp tương tự khoảng từ 1 đến 3 giờ. Sau khi hoàn thành việc chẩn đoán hoặc phẫu thuật, việc rửa bằng, ví dụ, Ringer's lactat hoặc nước muối sinh lý được thực hiện nhiều lần. Trong cách này, hợp chất gần như được thải ra (loại bỏ). Dư lượng nếu còn có thể bị phân hủy bởi ví dụ, sự thủy phân và thải ra (loại bỏ).

Khi chế phẩm ảnh hóa sụn khớp theo sáng chế được áp dụng vào mô sụn bình thường, phân tử tích điện dương trong đó được loại ra bởi một cấu trúc tạo thành giống như vỏ của các tế bào dạng tấm và không thể thực hiện sự xâm lấn vào các tế bào sụn. Kết quả là, mô sụn bình

thường không được nhìn thấy. Ngược lại, trong trường hợp mô sụn thoái hóa không có lớp tế bào dạng tấm, chế phẩm ảnh hóa sụn khớp được hấp phụ vào khuôn sụn bị lộ theo cách được định hướng. Kết quả là, mô sụn thoái hóa được làm nổi bật. Trong phương pháp phát hiện thông thường, rất khó để phát hiện và xác định giai đoạn sớm của sự thoái hóa sụn, nói cách khác, "sự thoái hóa sụn cấp 1" lúc mà lớp tế bào dạng tấm vừa được loại bỏ. Tuy nhiên, chế phẩm ảnh hóa sụn khớp theo sáng chế cho phép phát hiện và xác định "sự thoái hóa sụn cấp 1" và cho phép điều trị kịp thời cho bệnh nhân.

Chế phẩm ảnh hóa sụn khớp theo sáng chế cho phép tìm ra trạng thái tổn thương trong mô (sụn, dây chằng hình chữ thập và sụn đĩa chêm) trong mối nối bằng cách sử dụng kính soi khớp và điều trị tổn thương, với kết quả là việc chẩn đoán và điều trị ít xâm lấn có thể được thực hiện. Cho đến nay, hình ảnh của sụn khớp được hiển thị trên một màn hình bởi một kính soi khớp dưới ánh sáng nhìn thấy trông như màu trắng và mức độ sáng cao. Vì lý do này, rất khó để xác định sự thoái hóa và tổn thương của lớp bề mặt sụn. Tuy nhiên, sự thoái hóa và các vị trí khiếm khuyết trên bề mặt sụn có thể được đánh dấu bằng cách sử dụng hợp chất của sáng chế, với kết quả là trạng thái tổn thương của sụn, mà hiếm khi quan sát được dưới ánh sáng nhìn thấy, có thể quan sát được bằng cách cho phép phân tử đánh dấu phát ra huỳnh quang hồng ngoại trong trường tối.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Bây giờ, các ví dụ của sáng chế sẽ được mô tả dưới đây; tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này.

Ví dụ 1

Điều chế albumin tích điện dương

Albumin huyết thanh bò (sản phẩm được sản xuất bởi Sigma-Aldrich Co. LLC.) (5g) được hòa tan trong nước tinh khiết (25mL). Một cách riêng biệt, etylendiamin khan (67mL) (sản phẩm được sản xuất bởi Sigma-Aldrich Co. LLC.) được bổ sung vào nước tinh khiết (500mL). Axit clohydric 6N (khoảng 350mL) được bổ sung từ từ vào dung dịch này để điều chỉnh độ pH đến 4,75 trong nước đá. Dung dịch etylendiamin tạo ra được bổ sung 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)carbodiimit hydroclorua (1,8g) (sản phẩm được sản xuất bởi Sigma-Aldrich Co. LLC.) và albumin huyết thanh bò chứa nước đã chuẩn bị ở trên được bổ sung vào. Hỗn hợp được khuấy trong 2 giờ trong khi bình điều chế được làm lạnh trong nước đá để kiểm soát nhiệt độ và pH của hỗn hợp. Phản ứng kết thúc bằng cách bổ sung dung dịch đệm axetat 4M (5mL). Dung dịch thu được được thẩm tách đối với nước tinh khiết ở nhiệt độ 4°C trong 72 giờ và sau đó được đông khô. Tinh thể thu được bằng cách đông khô có màu trắng và bóng và có dạng xuất hiện giống như màng mỏng.

Sản phẩm đông khô được điều chế như nêu ở trên và albumin huyết thanh bò được sử dụng làm nguyên liệu thô được đo các điểm đẳng điện để kiểm tra xem có thu được albumin tích điện dương hay không. Sản phẩm đông khô và albumin huyết thanh bò mỗi loại được hòa tan trong nước tinh khiết, và được áp dụng với gel IEF Novex (nhãn hiệu đã được đăng ký) (sản phẩm được sản xuất bởi Life Technologies Corporation) và được điện di điểm đẳng điện. Kết quả được chỉ ra trong Fig. 1. Khi được chỉ ra trong Fig. 1, pI của albumin huyết thanh bò thường bằng khoảng 4,9; tuy nhiên, pI của sản phẩm đông khô cao khoảng 11. Từ điều này, đã tìm ra rằng sản phẩm đông khô được cation hóa cao. Từ đó, khẳng định được rằng thu được albumin tích điện dương.

Ví dụ 2

Khảo sát nồng độ tối ưu của albumin tích điện dương và indoxyanin xanh

Thuốc nhuộm huỳnh quang, indoxyanin xanh (ICG), không phát xạ huỳnh quang ở trạng thái dung dịch nước (chứa một mình ICG); tuy nhiên, ICG phát xạ huỳnh quang trong vùng cận hồng ngoại khi nó liên kết với một protein. ICG được phép liên kết với albumin tích điện dương đã điều chế trong ví dụ 1 và cường độ huỳnh quang được phát xạ từ ICG được đo như sau. Lưu ý rằng, cường độ huỳnh quang được phát xạ từ ICG khi albumin không tích điện dương, dùng làm đối chứng, liên kết vào đó được đo.

Albumin tích điện dương được điều chế trong ví dụ 1 được hòa tan trong nước tinh khiết để chuẩn bị các dung dịch có nồng độ bằng 1,250mg/mL, 0,625mg/mL, 0,313mg/mL, 0,156mg/mL và 0,078mg/mL. Theo cách riêng biệt, indoxyanin xanh (sản phẩm được sản xuất bởi Sigma-Aldrich Co. LLC.) được hòa tan trong nước tinh khiết để chuẩn bị một dung dịch có nồng độ 0,025mg/mL. Một phần phân ước (50μL) được lấy từ mỗi dung dịch albumin tích điện dương khác nhau về nồng độ và dung dịch ICG, được bổ sung vào mỗi giếng của tấm ELISA 96-giếng và được trộn lẫn. Huỳnh quang hồng ngoại phát xạ từ dung dịch tạo thành được nhận bởi hệ thống camera quan sát hồng ngoại (pde-neo C10935-20, được sản xuất bởi Hamamatsu Photonics K. K.) (ánh sáng phát xạ: 760nm, huỳnh quang 830nm). Mẫu kiểm chứng được chuẩn bị theo cách tương tự như trên ngoại trừ albumin huyết thanh bò (sản phẩm được sản xuất bởi Sigma-Aldrich Co. LLC.) được sử dụng ở vị trí albumin tích điện dương, và trải qua thử nghiệm tương tự. Kết quả được chỉ ra trong Fig. 2.

Như được chỉ ra trong hình ảnh của Fig. 2, huỳnh quang từ

albumin không tích điện dương có thể được xác định trong các mẫu thực nghiệm có nồng độ albumin bằng 0,313mg/mL (nồng độ albumin; 0,156mg/mL, nồng độ ICG; 0,0125mg/mL) hoặc lớn hơn bằng mắt thường. Ngược lại, huỳnh quang từ albumin tích điện dương có thể được xác định trong các mẫu thí nghiệm có nồng độ albumin bằng 0,156mg/mL (nồng độ albumin tích điện dương; 0,078mg/mL, nồng độ ICG; 0,0125mg/mL) hoặc lớn hơn bằng mắt thường. Từ đó, đã tìm ra rằng huỳnh quang có thể được xác định trong albumin tích điện dương, có nồng độ thấp hơn albumin thường được sử dụng. Lưu ý rằng, khi thử nghiệm được thực hiện bằng cách bổ sung ICG ở nồng độ cao hơn nồng độ thứ nghiệm nêu trên (0,0125mg/mL), khẳng định được rằng độ sáng của huỳnh quang tăng lên.

Ví dụ 3

Hình ảnh (1) của mô hình sụn tổn thương bằng cách sử dụng sụn khớp bình thường của bò bởi chế phẩm ảnh hóa sụn khớp

Sụn khớp ở vai phía chân trước của gia súc (2 đến 3 tuần tuổi) được cắt bỏ và cắt thành các mảnh có kích thước khoảng 1,5cm × 2cm và xương dưới sụn được loại bỏ. Sau đó, như đã chỉ ra trong hình minh họa mô hình sụn tổn thương trong Fig. 3, bề mặt của các mảnh sụn khớp đã cắt bỏ được thái lát một phần bởi một dao cạo ở độ sâu khoảng 0,1 đến 0,2mm để tạo ra khiếm khuyết trên bề mặt sụn. Khi xem xét sử dụng trong các vị trí thực tế lâm sàng, mỗi miếng sụn khớp được rửa bằng cách phun nước muối (khoảng 5mL) bằng bơm tiêm. Sau đó, 200µl chế phẩm ảnh hóa sụn khớp (nồng độ albumin tích điện dương: 2,5mg/mL, nồng độ ICG: 0,125mg/mL) được chuẩn bị bằng cách hòa tan albumin tích điện dương và ICG trong nước tinh khiết, được bổ sung từng giọt lên bề mặt của tấm nhựa kỵ nước và mảnh sụn khớp được đặt úp mặt xuống trên bề

mặt của tấm nhựa kỵ nước để nhúng mảnh này vào trong chế phẩm ảnh hóa sụn khớp. Khoảng 10 đến 15 phút sau đó, chế phẩm ảnh hóa sụn khớp dư thừa được rửa sạch bằng nước muối. Hình ảnh của các mảnh sụn khớp riêng biệt được lấy bởi một camera hồng ngoại (sản phẩm được sản xuất bởi Hamamatsu Photonics K. K.) và được ghi lại.

Những hình ảnh quan sát được bởi camera hồng ngoại được chỉ ra trong Fig. 3. Trong mảnh sụn khớp (bề mặt không bị cắt bỏ) của mẫu đối chứng, sự xâm nhập và hấp phụ của chế phẩm ảnh hóa sụn khớp từ bề mặt của sụn không được xác định. Phát xạ giống như một đường màu trắng đã được quan sát thấy; tuy nhiên, nó được bắt nguồn từ việc gắn chế phẩm ảnh hóa sụn khớp dư thừa bởi hoạt động mao dẫn đến bề mặt bên ngoại vi bên ngoài của mảnh sụn khớp. Trái lại, trong mẫu thí nghiệm 1 (một phần nửa của một trong các bề mặt sụn được cắt bỏ bởi một dao cạo để tạo ra khiếm khuyết), sự phát xạ ánh sáng bắt nguồn từ chế phẩm ảnh hóa sụn khớp, được xâm nhập qua khiếm khuyết trong bề mặt và được hấp phụ, được xác nhận. Lưu ý rằng, phát xạ giống như một đường màu trắng được quan sát thấy; tuy nhiên, nó được bắt nguồn từ chế phẩm ảnh hóa sụn khớp dư thừa được hấp phụ bởi hoạt động mao dẫn đến bề mặt bên ngoại vi bên ngoài của mảnh sụn khớp. Trong mẫu thí nghiệm 2 (phần trung tâm của một trong các bề mặt sụn được cắt bỏ bởi một dao cạo), sự phát xạ ánh sáng bắt nguồn từ chế phẩm ảnh hóa sụn khớp, mà được xâm nhập từ phần khiếm khuyết của bề mặt trung tâm và được hấp phụ đã được xác nhận. Như đã mô tả ở trên, người ta chứng minh được rằng trong bề mặt bị cắt bỏ, chế phẩm ảnh hóa sụn khớp theo sáng chế xâm nhập vào chiều sâu, hấp phụ vào đó và phát xạ huỳnh quang có cường độ lớn.

Ví dụ 4

Ảnh hóa (2) mô hình sụn tổn thương sử dụng sụn khớp bình thường của

bò bằng chế phẩm ảnh hóa sụn khớp

Sụn khớp ở vai phía chân trước của gia súc (2 đến 3 tuần tuổi) được cắt bỏ vô trùng và cắt thành các mảnh có kích thước khoảng 1cm × 1,5cm và xương dưới sụn được loại bỏ nhiều nhất có thể. Mỗi sụn đã được cắt bỏ được nhúng vào trong một dung dịch đệm phosphat sinh lý. Tiếp theo, hầu hết một nửa (nửa bên phải khi được nhìn từ phía trên) bề mặt của mỗi miếng sụn khớp được cắt bởi dao mổ (Số 11) đến độ sâu khoảng 0,1 đến 0,2mm để tạo ra khiếm khuyết trong bề mặt sụn. Do điều trị, nửa bên trái (khi nhìn từ phía trên) của của miếng sụn khớp còn nguyên vẹn và được sử dụng làm mẫu đối chứng; trong khi nửa bên phải (khi được nhìn từ phía trên) được sử dụng làm mô hình sụn khớp tổn thương. Để khẳng định vị trí trong đo lường và quan sát, một trong các góc của bề mặt bị tổn thương đã được cắt theo đường chéo. Trước khi quan sát huỳnh quang, dung dịch đệm phosphat sinh lý (khoảng 2 đến 3mL) được phun vào mỗi miếng sụn khớp bằng một bơm tiêm và được rửa. Dung dịch đệm dư thừa được loại bỏ bằng Kimwipe (nhãn hiệu đã được đăng ký). Sau đó, các dung dịch mẫu từ 1 đến 4 sau đây (50µL đối với mỗi dung dịch) được bổ sung từng giọt vào các đĩa petri tương ứng và mảnh sụn khớp được đặt úp xuống trên dung dịch mẫu đã được bổ sung từng giọt trên bề mặt đĩa petri kỵ nước để thấm vào bề mặt của mảnh sụn khớp bằng dung dịch mẫu. Khoảng 10 phút sau đó, dung dịch mẫu còn dư được rửa sạch bằng dung dịch đệm phosphat sinh lý và dung dịch đệm còn dư được loại bỏ bằng Kimwipe. Mỗi mảnh sụn khớp được đặt trên một mảnh giấy màu đen và được chụp ảnh dưới ánh sáng cận hồng ngoại và ánh sáng nhìn thấy.

Các dung dịch mẫu từ 1 đến 4 sử dụng trong ví dụ này bằng cách hòa tan riêng rẽ các thành phần riêng biệt trong nước tinh khiết. Dung

dịch mẫu 1 chỉ chứa nước tinh khiết; Dung dịch mẫu 2 chứa ICG ở nồng độ 0,125mg/mL; Dung dịch mẫu 3 chứa albumin ở nồng độ 2,5mg/mL và ICG ở nồng độ 0,125mg/mL; và dung dịch mẫu 4 chứa albumin tích điện dương ở nồng độ 2,5mg/mL và ICG ở nồng độ 0,125mg/mL. Khi chụp ảnh dưới ánh sáng cận hồng ngoại, mỗi dung dịch mẫu của các mảnh sụn khớp được kích thích bởi một nguồn sáng (bước sóng kích thích: 770nm, 30mA đối với mỗi mẫu), nguồn sáng này được chuẩn bị bằng cách sắp xếp 16 điốt phát ánh sáng cận hồng ngoại trong một hình dạng tròn, và hình ảnh được lấy bằng camera CCD độ nhạy cao (ORCA-ER, được sản xuất bởi Hamamatsu Photonics K. K.) qua một bộ lọc đối với ICG (832nm) (BrightLine ICG-B, được sản xuất bởi Semrock) tất cả ở cùng điều kiện (100ms, ánh sáng yếu và 8 × chế độ kết hợp điểm ảnh). Sau khi chụp ảnh dưới ánh sáng cận hồng ngoại, chụp ảnh đơn sắc được thực hiện dưới ánh sáng nhìn thấy.

Kết quả được chỉ ra trong Fig. 4. Trong mỗi hình ảnh được thực hiện trong ánh sáng nhìn thấy và ánh sáng cận hồng ngoại, nửa bên trái chỉ ra đối chứng còn nguyên vẹn và nửa bên phải chỉ ra mô hình bị tổn thương. Trong trường hợp của dung dịch mẫu 1 (một mình nước tinh khiết), đã khẳng định được rằng ánh sáng không phát xạ ở cả hai bề mặt. Tuy nhiên, trong dung dịch mẫu 2 (một mình ICG), huỳnh quang được phát xạ từ mẫu đối chứng nguyên vẹn. Huỳnh quang có thể hình dung là được bắt nguồn từ ICG hấp phụ vào protein trong bề mặt sụn. Ngược lại, không quan sát thấy huỳnh quang trong mô hình bị tổn thương. Điều này được coi là khi bề mặt của sụn bị tổn thương, mạch đường chẳng hạn glycosaminoglycan được tiếp xúc trong bề mặt sụn với lượng lớn hơn protein và do đó ICG không hấp phụ vào các mạch đường này. Ngược lại, dung dịch mẫu 3 (albumin + ICG), huỳnh quang cực kỳ yếu được phát ra

từ cả hai bề mặt; tuy nhiên, không có sự khác nhau về cường độ phát xạ giữa chúng. Từ điều này, đã phát hiện ra rằng albumin hầu như không có đặc tính hấp phụ vào khuôn sụn và lớp tế bào, và cho rằng albumin chứa trong dung dịch mẫu liên kết với ICG và do đó ICG mất hoạt tính hấp phụ với protein trên bề mặt sụn. Trong trường hợp dung dịch mẫu 4 (albumin tích điện dương + ICG), đã quan sát được rằng huỳnh quang có cường độ mạnh được phát xạ từ bề mặt bị tổn thương. Điều này được coi như là albumin tích điện dương xâm nhập qua bề mặt bị tổn thương vào bên trong và hấp phụ vào lớp sụn trung gian chứa một lượng lớn điện tích âm. Trong bề mặt mẫu đối chứng nguyên vẹn, các lớp tế bào được sắp xếp dày đặc và số lượng điện tích âm thấp. Từ điều này, người ta coi rằng số lượng albumin tích điện dương được hấp thụ thấp. ICG đã được bão hòa với các protein do bao gồm bởi albumin tích điện dương và có thể hình dung là không được hấp phụ với các protein trong bề mặt sụn. Như được mô tả ở trên, đã chứng minh được rằng chế phẩm ảnh hóa sụn khớp theo sáng chế được cấu thành bởi albumin tích điện dương và ICG, xâm nhập vào phần sụn bị tổn thương, hấp phụ và phát ra huỳnh quang có cường độ lớn hơn phần bề mặt sụn bình thường để nhìn thấy được phần bị tổn thương.

Ví dụ 5

Ảnh hóa sụn bị tổn thương ở người bằng chế phẩm ảnh hóa sụn khớp

Ảnh hóa phần bị tổn thương sụn khớp ở người bằng chế phẩm ảnh hóa sụn khớp theo sáng chế được thực hiện. Như một nguyên liệu thí nghiệm, sụn thoái hóa của người bị bệnh viêm khớp, là chất thải y tế được cắt cho phẫu thuật khớp gối nhân tạo, được sử dụng. Sụn khớp được cắt bỏ vô trùng và được cắt thành các mảnh có kích thước khoảng 1cm × 1,5cm. Sụn đã cắt bỏ được nhúng trong dung dịch đệm phosphat sinh lý.

Trước khi quan sát huỳnh quang, dung dịch đệm phosphat sinh lý (khoảng 2 đến 3mL) được phun vào mảnh sụn khớp bằng một bơm tiêm và được rửa và sau đó chụp ảnh màu được thực hiện dưới ánh sáng nhìn thấy. Dung dịch đệm còn dư được loại bỏ bằng Kimwipe (nhãn hiệu đã được đăng ký). Sau đó, 100μL chế phẩm ảnh hóa sụn khớp (nồng độ albumin tích điện dương: 2,5mg/mL, nồng độ ICG: 0,125mg/mL) được chuẩn bị bằng cách hòa tan albumin tích điện dương và ICG trong nước tinh khiết được đặt trên một đĩa petri kỵ nước và mảnh sụn khớp được đặt úp mặt xuống trên đĩa petri để làm thấm bề mặt của mảnh sụn khớp bằng chế phẩm ảnh hóa sụn khớp. Khoảng 10 phút sau đó, hợp chất ảnh hóa còn dư được rửa sạch bằng dung dịch đệm phosphat sinh lý (2 đến 3mL) và dung dịch đệm còn dư được loại bỏ bằng Kimwipe. Mỗi mảnh sụn khớp được đặt trên một mảnh giấy màu đen, và bề mặt phía trên và bề mặt bên cạnh được chụp dưới ánh sáng cận hồng ngoại. Khi chụp ảnh dưới ánh sáng cận hồng ngoại, dung dịch mẫu trong mỗi mảnh sụn khớp được kích thích bằng một nguồn sáng (bước sóng kích thích: 770nm, 30mA đối với mỗi mẫu), nguồn sáng này được chuẩn bị bằng cách sắp xếp 16 điốt phát ánh sáng cận hồng ngoại trong một hình dạng tròn, và hình ảnh được lấy bằng camera CCD độ nhạy cao (ORCA-ER, được sản xuất bởi Hamamatsu Photonics K. K.) qua một bộ lọc đối với ICG (832nm) (BrightLine ICG-B, được sản xuất bởi Semrock) tất cả ở cùng điều kiện (100ms, ánh sáng yếu và 8 × chế độ kết hợp điểm ảnh, chế độ tương phản tự động).

Kết quả được chỉ ra trong Fig. 5. Vì sụn thoái hóa ở người được sử dụng trong ví dụ có bệnh viêm khớp nghiêm trọng, huỳnh quang có cường độ cao được phát ra từ hầu hết tất cả các mảnh sụn khớp. Từ đó, đã tìm ra rằng trong hợp chất chứa albumin tích điện dương và ICG,

albumin tích điện dương ngăn cản sự hấp phụ không đặc trưng của ICG với protein sinh học, ưu tiên hấp phụ vào điện tích âm có mặt dồi dào trong lớp sụn trung gian và phát xạ huỳnh quang. Lưu ý rằng, như chỉ ra trong Fig. 5, đã tìm thấy rằng huỳnh quang được phát xạ từ một phần màu đỏ mỏng của bề mặt mảnh sụn và khẳng định khi sự quan sát được thực hiện dưới ánh sáng nhìn thấy là thấp về cường độ so với phần ngoại vi của nó. Vì phần màu đỏ mỏng là một mô gần với các cạnh của sụn khớp, phần này được xem là một mô chứa mạch máu giống như mô hoạt dịch được tạo ra trên bề mặt sụn và mô hoạt dịch có lẽ là trì hoãn sự xâm nhập của hợp chất ảnh hóa của sáng chế.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Chế phẩm ảnh hóa sụn khớp theo sáng chế cho phép phát hiện sớm sự thoái hóa của sụn, là nguyên nhân khởi đầu gây ra bệnh viêm khớp đầu gối và nhận biết xác định biên giới giữa sụn bình thường và sụn thoái hóa. Chế phẩm ảnh hóa sụn khớp theo sáng chế không chỉ hiển thị một vị trí thoái hóa trong sụn khớp *in vivo* để, ví dụ, chẩn đoán hoặc phẫu thuật dưới kính soi khớp mà còn hiển thị không xâm lấn hoặc ít xâm lấn tình trạng thoái hóa của sụn bằng cách bơm chế phẩm ảnh hóa sụn khớp theo sáng chế vào khoảng nối và tình trạng thoái hóa có thể được quan sát bằng cách sử dụng một kỹ thuật hình ảnh *in-vivo*. Hơn nữa, chế phẩm ảnh hóa sụn khớp theo sáng chế hữu dụng trong việc đánh giá, mức độ tổn thương của sụn và mức độ cải thiện, và trong nghiên cứu khám phá thuốc và nghiên cứu bệnh lý trên các bệnh sụn khớp trong các mô sụn khớp đã cắt bỏ hoặc các mô sụn khớp được tái tạo.

Yêu cầu bảo hộ

1. Chế phẩm thích hợp để sử dụng trong việc hiển thị vị trí thoái hóa trong sụn khớp, khác biệt ở chỗ, chứa một albumin tích điện dương được đánh dấu bằng màu xanh lục indoxyanin.

2. Chế phẩm thích hợp để sử dụng trong việc hiển thị vị trí thoái hóa trong sụn khớp theo điểm 1, trong đó vị trí thoái hóa của sụn khớp có lớp mô sụn bị tổn thương hoặc có phần khiếm khuyết từ lớp bề mặt về phía sâu của mô sụn.

Fig. 1

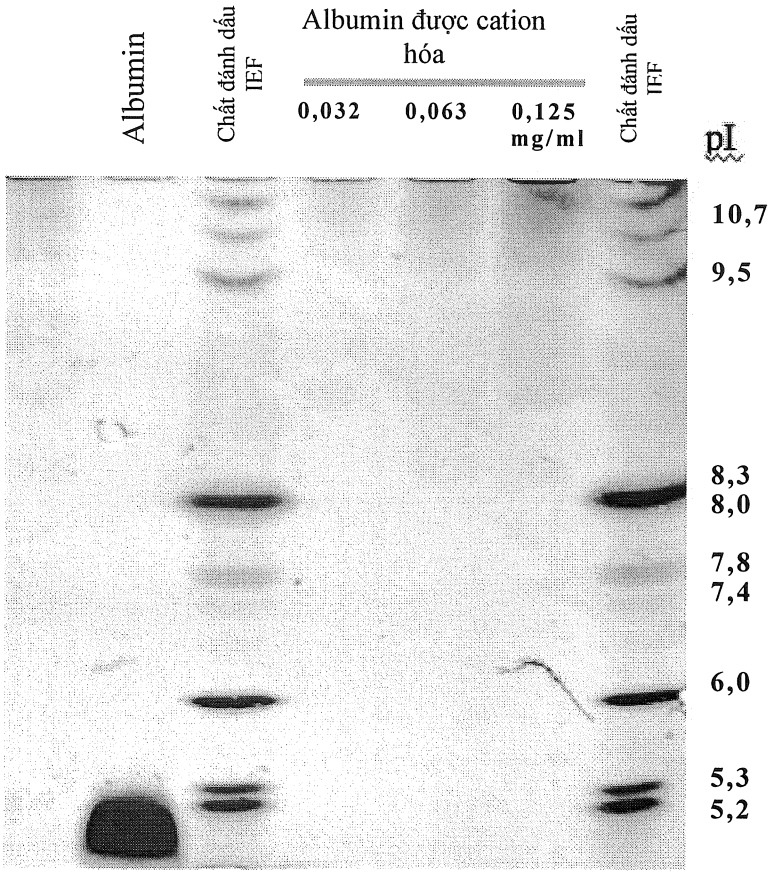

Albumin
Chất đánh dấu IEF
Albumin được cation hóa
0,032
0,063
0,125 mg/ml
Chất đánh dấu IEF
pI
10,7
9,5
8,3
8,0
7,8
7,4
6,0
5,3
5,2

Fig. 2

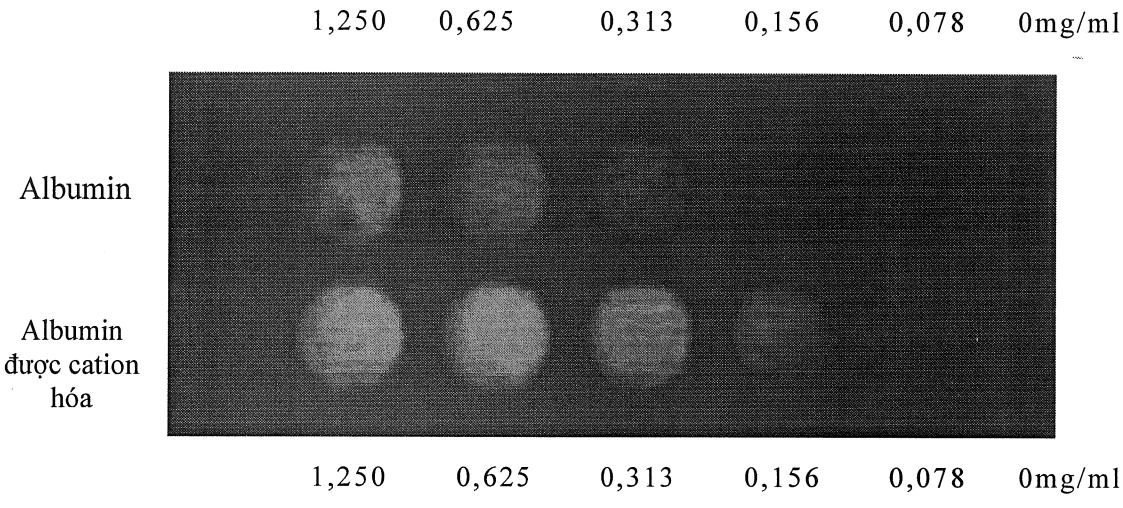

1,250 0,625 0,313 0,156 0,078 0mg/ml
Albumin
Albumin được cation hóa
1,250 0,625 0,313 0,156 0,078 0mg/ml
+ Indoxyanin xanh 0,025mg/ml

Fig. 3

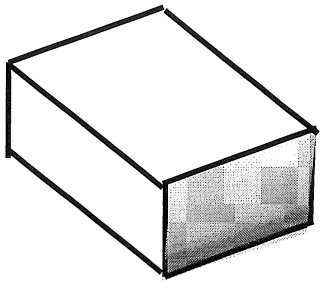
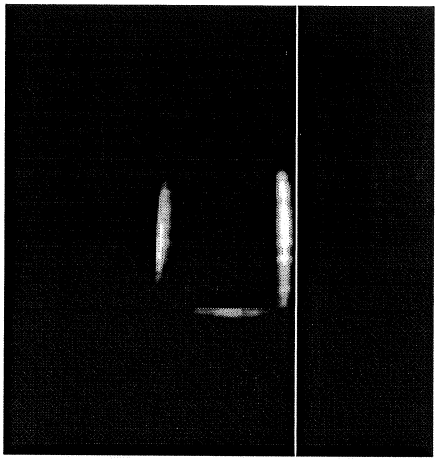
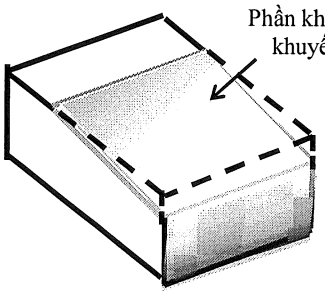
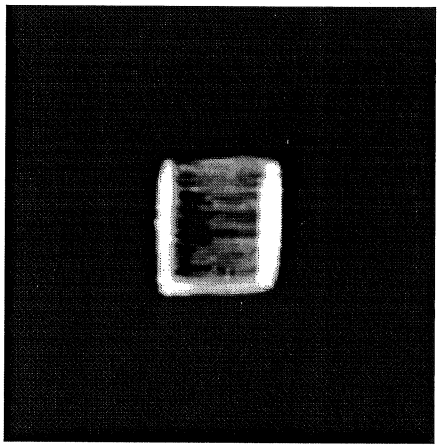
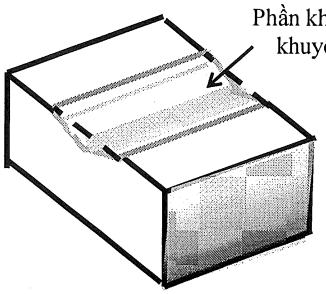
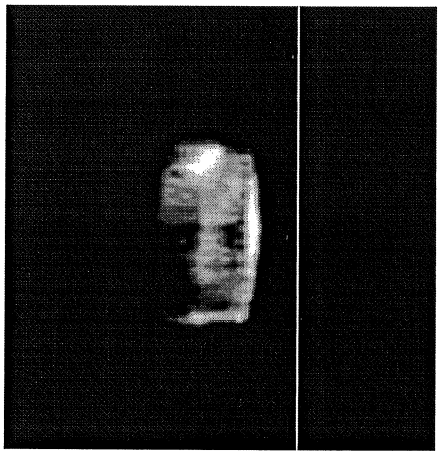
	Mô hình sụn tổn thương	Hình ảnh được chụp bởi camera hồng ngoại
Mẫu đối chứng (nguyên vẹn)		
Mẫu thử nghiệm 1(khiếm khuyết nửa bề mặt)		
Mẫu thử nghiệm 2 (khiếm khuyết phần trung tâm)		

Fig. 4

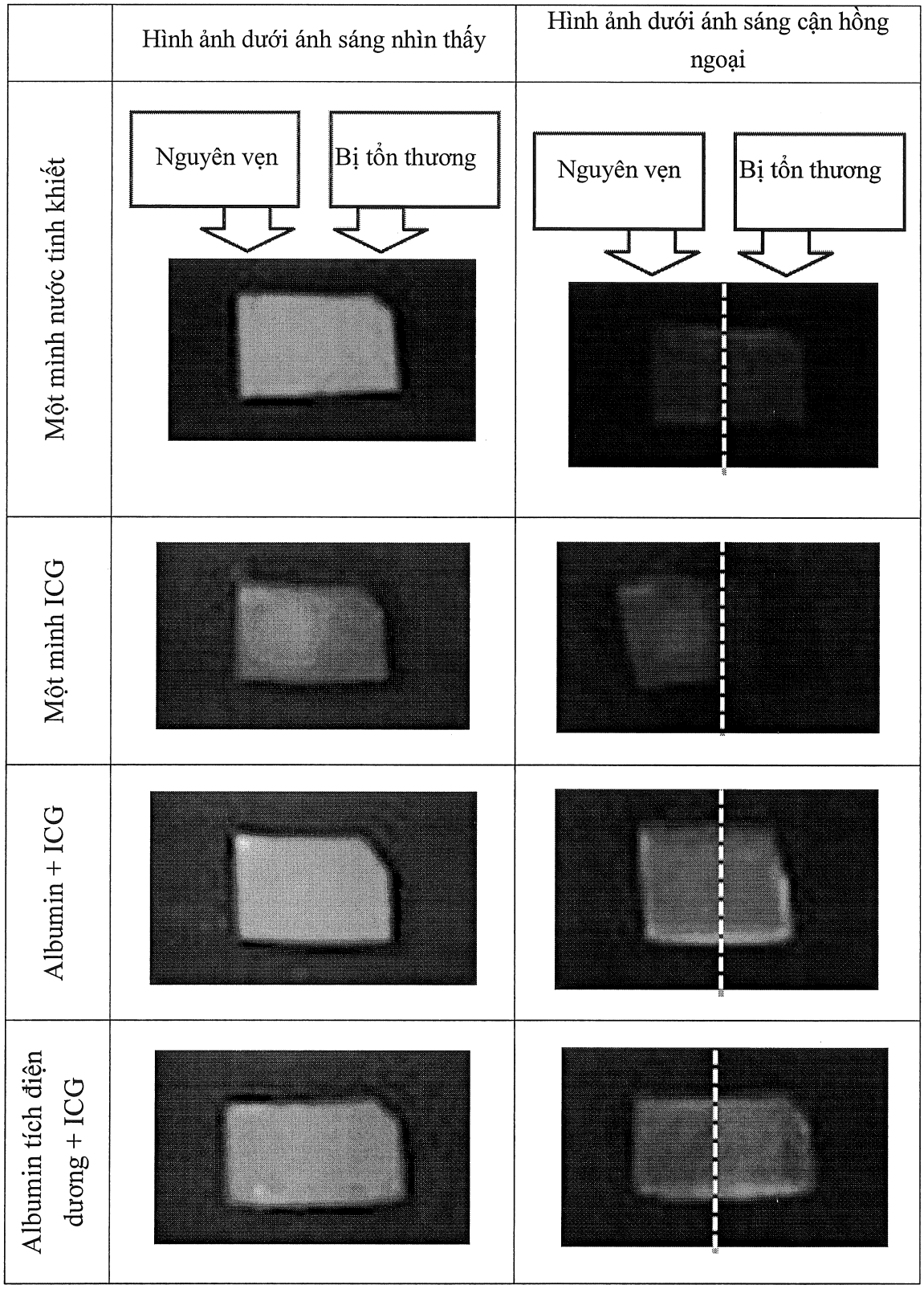
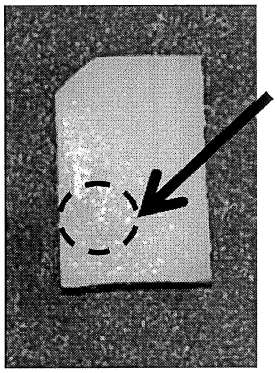
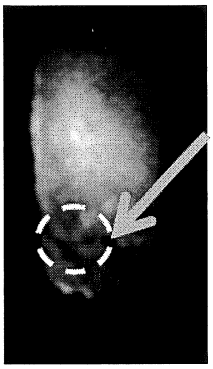

Hình ảnh dưới ánh sáng nhìn thấy
Hình ảnh dưới ánh sáng cận hồng ngoại
Một mình nước tinh khiết
Nguyên vẹn
Bị tổn thương
Nguyên vẹn
Bị tổn thương
Một mình ICG
Albumin + ICG
Albumin tích điện dương + ICG

Fig. 5

<table>
<tr><td>Hình ảnh dưới ánh sáng nhìn thấy</td><td colspan="2">Hình ảnh dưới ánh sáng cận hồng ngoại</td></tr>
<tr><td>Mặt phía trên</td><td>Mặt phía trên</td><td>Mặt bên</td></tr>
<tr><td> 
</td><td> 
</td><td> </td></tr>
</table>