



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0025383

(51)⁷ C07K 16/42; C12P 21/08; G01N 33/53; (13) B
C12N 5/10

-
- (21) 1-2011-00880 (22) 03/09/2009
(86) PCT/JP2009/004350 03/09/2009 (87) WO 2010/026758 A1 11/03/2010
(30) 2008-228370 05/09/2008 JP; 2008-272642 23/10/2008 JP; 2008-286521 07/11/2008 JP
(45) 25/09/2020 390 (43) 25/09/2011 282A
(73) SEKISUI MEDICAL CO., LTD. (JP)
1-3, Nihonbashi 2-chome, Chuo-ku, Tokyo 1030027, Japan
(72) TAKAHASHI, Yuki (JP); SHIMIZU, Tomo (JP); TAKAHASHI, Hiroshi (JP);
NAKAMURA, Yasushi (JP).
(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)
-

(54) PHƯƠNG PHÁP THỬ NGHIỆM NGỪNG KẾT MIỄN DỊCH ĐỂ PHÂN TÍCH MẪU

(57) Sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng kháng IgM người mà có khả năng phản ứng đặc hiệu với IgM người và gây ra sự ngưng kết miễn dịch dựa vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể với IgM người trong dung dịch và phương pháp thử nghiệm miễn dịch sử dụng kháng thể đơn dòng nêu trên. Mục đích khác theo sáng chế là đề cập đến tác nhân ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu gây ra bởi IgM người mà phản ứng này không thể ngăn chặn được bằng các phương pháp thông thường, và thử nghiệm miễn dịch trong đó các phản ứng không đặc hiệu gây ra bởi IgM người được ngăn chặn. Bằng cách lựa chọn kháng thể đơn dòng phản ứng với IgM người trên cơ sở đánh giá khả năng phản ứng với IgM người trong dung dịch, kháng thể đơn dòng mới có khả năng ngưng kết IgM người bởi chính nó và thực hiện thử nghiệm ngưng kết miễn dịch thực tiễn đã đạt được, và bằng cách đó đã đạt được các mục đích nêu trên.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng có khả năng phản ứng đặc hiệu với globulin miễn dịch M người (IgM) và gây ra ngưng kết dựa vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể với globulin miễn dịch M người trong dung dịch, và đoạn chức năng dẫn xuất từ kháng thể đơn dòng này, cũng như thử nghiệm miễn dịch, chất phản ứng của thử nghiệm và bộ dụng cụ thử nghiệm sử dụng kháng thể đơn dòng hoặc đoạn chức năng nêu trên. Sáng chế cũng đề cập đến tế bào lai sản xuất ra kháng thể đơn dòng nêu trên.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến tác nhân ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu và phương pháp thử nghiệm miễn dịch sử dụng tác nhân này, và cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến tác nhân ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu gây ra bởi IgM người và thử nghiệm miễn dịch sử dụng tác nhân này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Một ví dụ về các phương pháp thử nghiệm được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực chẩn đoán đó là phương pháp thử nghiệm miễn dịch phát hiện chất phân tích (chất để được thử nghiệm) có mặt trong mẫu thử nghiệm bằng cách sử dụng trước kháng thể kháng lại chất phân tích. Cụ thể, phương pháp thử nghiệm ngưng kết miễn dịch là phương pháp xác định về mặt định tính hoặc định lượng đối với chất phân tích trong mẫu dựa vào mức độ ngưng kết của phức hợp miễn dịch dạng lưới được tạo ra thông qua sự bắc cầu liên kết của các chất phân tích bởi kháng thể. Vì thử nghiệm ngưng kết miễn dịch thích hợp trong phương pháp phát hiện quang học và có thể dễ dàng được tự động hóa, nên thử nghiệm này được áp dụng rộng rãi để thử nghiệm cho nhiều mục thử nghiệm lâm sàng.

IgM người, được sản xuất ở các giai đoạn sớm nhất của đáp ứng miễn dịch, có mặt trong huyết tương với nồng độ nằm trong khoảng từ 50 đến 200mg/dL (từ 500 đến 2000 μ g/ml), và là yếu tố đánh dấu bệnh tiềm tàng có thể chỉ ra

nhiều bệnh như bệnh đa u tủy và bệnh lý ruột mất protein khi mức nồng độ của chất này thấp hơn mức bình thường, hoặc bệnh chất tạo keo và macroglobulin huyết khi mức nồng độ của chất này cao hơn mức bình thường.

Nhiều sản phẩm chẩn đoán dựa trên nguyên tắc của thử nghiệm ngưng kết miễn dịch và dự định dùng cho IgM người cũng đã được đưa vào sử dụng thực tiễn, tuy nhiên, kháng thể sử dụng trong các sản phẩm này cho đến nay vẫn là kháng thể đa dòng.

Kháng thể đa dòng là một tập hợp các kháng thể có các khả năng phản ứng khác nhau, và liên kết với nhiều epitop trên phân tử chất phân tích. Do đó kháng thể đa dòng có đặc tính ngưng kết mạnh và rất thích hợp trong thử nghiệm ngưng kết miễn dịch của chất phân tích mà không có nhiều bản sao của cùng một epitop trong phân tử. Tuy nhiên, kháng thể đa dòng mà liên kết với nhiều epitop có tính đặc hiệu thấp. Điều này được minh họa cụ thể trong ví dụ về IgM người. Vì có 5 globulin miễn dịch giống nhau về cấu trúc (bao gồm globulin miễn dịch G) trong cơ thể, nên việc điều chế kháng thể đa dòng đặc hiệu IgM đòi hỏi cần có các bước loại bỏ các phần kháng thể phản ứng chéo với các globulin miễn dịch khác, điều này dẫn đến cồng kềnh và tốn nhiều công sức.

Trái lại, kháng thể đơn dòng, kháng thể này bao gồm kháng thể đơn duy nhất và có tính đặc hiệu cao khi liên kết với epitop đặc hiệu, được điều chế dễ dàng và tiến hành thực hiện thích hợp. Ngoài ra, vì việc cải biến hoặc biến đổi các kháng thể đơn dòng thông qua kỹ thuật gen học đã trở nên dễ dàng trong những năm gần đây, nên các kháng thể đơn dòng đang trở nên ngày càng quan trọng không chỉ trong chẩn đoán mà còn cả trong lĩnh vực điều trị, và phạm vi ứng dụng của chúng đang ngày càng mở rộng thêm nữa.

Về nguyên tắc, kháng thể đơn dòng có thể được sử dụng trong thử nghiệm ngưng kết miễn dịch của chất phân tích có nhiều bản sao của cùng một epitop. Tuy nhiên, tin chắc rằng, kháng thể đơn dòng kháng IgM không thể gây ra ngưng kết một cách hiệu quả với globulin miễn dịch M mà có 10 bản sao của cùng một epitop trong phân tử của nó, và các kháng thể đơn dòng cho tới hiện

nay vẫn còn chưa được sử dụng trong các phương pháp thử nghiệm ngưng kết miễn dịch. Như được thể hiện trong hình vẽ trên Fig. 1, IgM trong huyết tương có cấu hình dạng ngôi sao trong đó 5 cấu trúc đơn vị hình chữ Y được sắp xếp với các đoạn cuối của các cấu trúc này ở tâm và ở các phần đầu ở vùng ngoại vi. Hình chữ Y là cấu trúc đơn vị của globulin miễn dịch, và đã biết rằng, vùng bản lề của nó có tính linh hoạt. Ngoài ra, như được thể hiện trên hình ảnh hiển vi điện tử theo tài liệu 1, 5 cấu trúc đơn vị hình chữ Y có thể có (b) cấu hình dạng ngôi sao phẳng với các đoạn cuối của hình chữ Y ở tâm và các phần đầu ở vùng ngoại vi hoặc (c) cấu dạng được mô tả ở “dạng con cua” trong đó các phần đầu của hình chữ Y hướng theo cùng chiều từ phần đáy neo giữ các đoạn cuối, khẳng định rằng, vùng neo giữ đoạn cuối của hình chữ Y cũng có tính linh hoạt.

Vì vùng neo giữ mỗi một trong số các cấu trúc dưới phân tử trong phân tử IgM là có tính linh hoạt và cấu trúc ba chiều của phân tử thay đổi dễ dàng như được giải thích ở trên, nên kháng thể đơn dòng kháng IgM sẽ không tạo ra cầu liên kết liên phân tử bằng cách liên kết hai phân tử IgM, nhưng thay vì hầu như tạo ra cầu liên kết gọi là cầu liên kết nội phân tử bằng cách liên kết epitop tại hai vị trí trên một phân tử IgM đơn như được thể hiện trong hình vẽ trên Fig. 2. Do đó, tin chắc rằng, kháng thể đơn dòng kháng IgM sẽ không có khả năng gây ra ngưng kết miễn dịch với IgM người một cách hiệu quả, và các kháng thể đa dòng mà liên kết với nhiều epitop bất đặc đã mới được sử dụng. Thậm chí mặc dù đã có những ví dụ trong đó các kháng thể đơn dòng được sử dụng, nhưng chỉ là đại diện cho các trường hợp trong đó các kháng thể đơn dòng đa chức được sử dụng kết hợp để tạo ra hiệu quả của một kháng thể đa dòng (ví dụ, tài liệu sáng chế 4, ví dụ 3). Do đó, kháng thể đơn dòng có đặc tính ngưng kết trên chính IgM người vẫn còn chưa biết. Ngoài ra, các quy trình sàng lọc khi sản xuất các tế bào lai tạo ra kháng thể đơn dòng kháng IgM người trước đây đã được tiến hành dựa vào các cường độ về khả năng phản ứng được đánh giá trong điều kiện mà ở đó IgM người hoặc kháng thể đơn dòng kháng IgM người được cố định trên pha rắn; tức là, khả năng phản ứng giữa chúng trong dung dịch còn chưa được sử dụng làm chỉ số (các tài liệu sáng chế từ 1 đến 3).

Những tiến bộ về kỹ thuật trong những năm gần đây khiến cho có thể sản xuất kháng thể kháng lại các chất khác nhau, và do đó việc sử dụng các chất phản ứng chẩn đoán dựa vào các thử nghiệm miễn dịch tiếp tục gia tăng. Do đó, các mức tính năng thực hiện đòi hỏi ở các chất phản ứng đang trở nên cao hơn bao giờ hết, và xuất hiện các nhu cầu mới về ngăn chặn hoàn toàn các phản ứng không đặc hiệu.

Phản ứng không đặc hiệu đề cập đến một hiện tượng trong đó (các) yếu tố chứa trong mẫu thử nghiệm tạo thuận lợi cho liên kết mà không dựa vào phản ứng đặc hiệu, hoặc ức chế các phản ứng miễn dịch đặc hiệu, như vậy có thể dẫn đến các kết quả thử nghiệm không đúng. Các yếu tố mà đã biết là gây ra các phản ứng không đặc hiệu bao gồm các kháng thể dị ái và các yếu tố dạng thấp (RF).

Kháng thể dị ái là một thuật ngữ chung của các kháng thể người thể hiện khả năng phản ứng kháng lại các kháng thể dẫn xuất từ động vật mà là các thành phần chính trong thử nghiệm miễn dịch. Một ví dụ điển hình về kháng thể dị ái đó là HAMA (kháng thể globulin miễn dịch người kháng chuột). Kháng thể dị ái có thể được tạo ra do kết quả của quá trình miễn cảm bị kích thích theo cách chưa biết đối với kháng nguyên, như thông qua ăn uống, tiếp xúc với động vật, và thông qua việc sử dụng các chất sinh dục. Tuy nhiên, kháng thể không nhạy cũng có thể có khả năng thể hiện đặc tính của kháng thể dị ái, và do đó vẫn rất cần phải hiểu rõ về các nguồn gốc của các kháng thể dị ái. Mặt khác, các yếu tố dạng thấp xuất hiện ở các bệnh nhân viêm khớp dạng thấp và vị trí liên kết của chúng cũng đã được xác định rõ. Do đó, yếu tố dạng thấp được hiểu là một khái niệm tách biệt với kháng thể dị ái, nhưng chúng có chung đặc tính thể hiện khả năng phản ứng kháng lại các kháng thể dẫn xuất từ động vật, và các đặc tính của cả hai đều đã được biết là IgG hoặc IgM người như được mô tả trong tài liệu 2.

Đối với các biện pháp chống lại các phản ứng không đặc hiệu gây ra bởi kháng thể dị ái, chất phản ứng ngăn chặn dị ái HBR bao gồm kháng thể đơn dòng kháng IgM người được mô tả trong các tài liệu 3 và 4 trước đây đang có

sẵn trên thị trường, và đã được sử dụng trong nhiều thử nghiệm lâm sàng mà sử dụng các nguyên tắc của thử nghiệm miễn dịch.

Các biện pháp khác trước đây đưa ra để ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu bao gồm các biện pháp nêu trong tài liệu sáng chế 5 đề cập đến việc bổ sung một kháng thể đa dòng kháng lại các kháng thể IgM người tự nhiên, các kháng thể này được điều chế ở cùng loài động vật như kháng thể được sử dụng trong thử nghiệm, và biện pháp nêu trong tài liệu sáng chế 6 đề cập đến việc bổ sung một kháng thể kháng lại vị trí liên kết của yếu tố dạng thấp, yếu tố này dẫn xuất từ động vật bất kỳ trong số các động vật khác nhau. Tuy nhiên, việc sử dụng kháng thể đa dòng đòi hỏi cần có một lượng lớn kháng nguyên trong một thời gian dài để gây miễn dịch cho động vật. Ngoài ra, biện pháp nêu trước chỉ có thể ngăn chặn được các phản ứng không đặc hiệu gây ra bởi các kháng thể tự nhiên, và biện pháp nêu sau chỉ có hiệu quả ngăn chặn các phản ứng không đặc hiệu hạn chế bởi vì vị trí liên kết của yếu tố dạng thấp được nhận diện trên đó có bản chất dễ thay đổi ở vị trí đầu tiên. Trên thực tiễn, vì số lượng thử nghiệm và các mục thử nghiệm sử dụng thử nghiệm miễn dịch gia tăng, nên rõ ràng là các biện pháp thông thường để ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu không hoạt động một cách hiệu quả đối với một số mẫu.

Tài liệu trích dẫn

Các tài liệu sáng chế:

Tài liệu sáng chế 1: Công bố đơn sáng chế Nhật Bản số S60-42400

Tài liệu sáng chế 2: Công bố đơn sáng chế Nhật Bản số S63-58260

Tài liệu sáng chế 3: Công bố đơn sáng chế Nhật Bản số H06-504424

Tài liệu sáng chế 4: Công bố đơn sáng chế Nhật Bản số S60-237363

Tài liệu sáng chế 5: Bằng sáng chế Nhật Bản số 4065600

Tài liệu sáng chế 6: Công bố đơn sáng chế Nhật Bản số H07-012818

Các tài liệu khác:

Tài liệu 1: Roitt, Essential Immunology, third edition in the original language, Figure 2.16.

Tài liệu 2: Rinsho Kagaku, Volume 23 Supplement 175a-1 – 175a-10 (1994).

Tài liệu 3: Advertisement material for the heterophilic blocking reagent HBR (Nagase & Co. Ltd., 1993).

Tài liệu 4: CLIN. CHEM. 45/7, 942 - 956 (1999).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề cập đến kháng thể đơn dòng kháng IgM người phản ứng đặc hiệu với IgM người và có khả năng gây ra ngưng kết miễn dịch dựa vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể trong dung dịch với IgM người, các đoạn chức năng của kháng thể đơn dòng này, và các thử nghiệm miễn dịch, các chất phản ứng thử nghiệm và các bộ dụng cụ thử nghiệm sử dụng kháng thể đơn dòng này hoặc các đoạn của nó, và ngoài ra sáng chế còn đề cập đến tế bào lai sản xuất ra kháng thể đơn dòng này.

Mục đích khác của sáng chế là đề cập đến tác nhân ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu gây ra bởi IgM người, và các phương pháp thử nghiệm miễn dịch sử dụng tác nhân này.

Các tác giả sáng chế đã tiến hành nghiên cứu sâu rộng để đạt được các mục đích nêu trên, và bằng cách sử dụng khả năng phản ứng trong dung dịch làm chỉ số đánh giá trong việc sàng lọc các kháng thể đơn dòng mà phản ứng với IgM người, các tác giả sáng chế đã có thể phát hiện ra một kháng thể đơn dòng mới mà bằng chính bản thân kháng thể này (tức là bằng duy nhất kháng thể đơn dòng), có khả năng tạo ra cầu liên kết giữa các phân tử IgM người để gây ra sự ngưng kết, và có khả năng thực hiện một thử nghiệm ngưng kết miễn dịch thực tiễn. Phát hiện này đã dẫn đến hoàn thành sáng chế. Kháng thể đơn dòng thu được theo cách như vậy không nhất thiết thể hiện khả năng phản ứng cao trong

phương thức đánh giá thông thường mà trong đó kháng nguyên được cố định trên pha rắn.

Các tác giả sáng chế cũng đã có phát hiện bất ngờ rằng, các phản ứng không đặc hiệu, thậm chí ngay cả các phản ứng mà không thể ngăn chặn được bằng các biện pháp thông thường, có thể được ngăn chặn hoàn toàn bằng kháng thể đơn dòng kháng IgM người nêu trên mà kháng thể này có khả năng ngưng kết IgM người bởi chính nó. Do đó, mục đích khác của sáng chế là đề cập đến tác nhân ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu bao gồm kháng thể đơn dòng kháng IgM người có khả năng ngưng kết IgM người bởi chính nó.

Mục đích khác của sáng chế là đề cập đến phương pháp thử nghiệm miễn dịch, các chất phản ứng thử nghiệm, và các bộ dụng cụ thử nghiệm, khác biệt bằng việc ngăn chặn các phản ứng không đặc hiệu và tính chính xác của các phép đo trong các thử nghiệm miễn dịch mà dựa trên các phản ứng kháng nguyên-kháng thể thu được bằng cách bổ sung kháng thể đơn dòng kháng IgM người có khả năng ngưng kết IgM người bởi chính nó.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến:

1. Kháng thể đơn dòng kháng IgM người phản ứng đặc hiệu với IgM người và có khả năng tạo ra khối ngưng kết miễn dịch dựa vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể với IgM người trong dung dịch.

2. Kháng thể đơn dòng kháng IgM người theo mục 1 nêu trên, thu được bằng phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng kháng IgM người bao gồm các bước sau:

bước 1): thu thập các tế bào lai sản xuất ra kháng thể kháng IgM người, bằng cách sử dụng IgM người làm kháng nguyên;

bước 2): đưa các kháng thể được tạo ra bởi tế bào lai thu được trong bước 1 tiếp xúc với IgM người trong dung dịch, và lựa chọn tế bào lai sản xuất ra kháng thể có khả năng tạo ra khối ngưng kết miễn dịch dựa vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể với IgM người trong dung dịch nêu trên;

bước 3): thu thập kháng thể được tạo ra bởi tế bào lai được lựa chọn trong bước 2.

3. Kháng thể được lựa chọn từ phần (a) hoặc (b) dưới đây:

(a) kháng thể đơn dòng được tạo ra bởi tế bào lai FERM BP-11134;

(b) kháng thể theo điểm (1) nêu trên, thể hiện khả năng phản ứng chéo với kháng thể theo phần (a) nêu trên.

4. Đoạn chức năng dẫn xuất từ kháng thể đơn dòng kháng IgM người theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 nêu trên.

5. Phương pháp thử nghiệm ngưng kết miễn dịch để xác định lượng IgM người trong mẫu, bao gồm việc sử dụng kháng thể đơn dòng theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 3 nêu trên và/hoặc đoạn chức năng dẫn xuất từ kháng thể đơn dòng theo mục 4 nêu trên.

6. Chất phản ứng thử nghiệm ngưng kết miễn dịch và bộ dụng cụ thử nghiệm ngưng kết miễn dịch để xác định lượng IgM người trong mẫu, bao gồm kháng thể đơn dòng theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 3 nêu trên và/hoặc đoạn chức năng dẫn xuất từ kháng thể đơn dòng theo mục 4 nêu trên.

7. Tế bào lai sản xuất ra kháng thể đơn dòng theo mục 1 hoặc 2 nêu trên.

8. Tế bào lai FERM BP-11134.

9. Phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng kháng IgM người bao gồm các bước sau:

bước 1): thu thập các tế bào lai sản xuất ra kháng thể kháng IgM người, bằng cách sử dụng IgM người làm kháng nguyên;

bước 2): đưa các kháng thể được tạo ra bởi tế bào lai thu được trong bước 1 tiếp xúc với IgM người trong dung dịch và lựa chọn tế bào lai sản xuất ra kháng thể có khả năng tạo ra khối ngưng kết miễn dịch dựa vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể với IgM người trong dung dịch nêu trên;

bước 3): thu thập kháng thể được tạo ra bởi tế bào lai được lựa chọn trong bước 2.

10. Tác nhân ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu gây ra bởi IgM người, bao gồm kháng thể đơn dòng theo điểm bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 3 nêu trên và/hoặc đoạn chức năng dẫn xuất từ kháng thể đơn dòng theo mục 4 nêu trên.

11. Phương pháp thử nghiệm miễn dịch để xác định lượng chất phân tích trong mẫu dựa vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể giữa chất phân tích và kháng thể thử nghiệm hoặc kháng nguyên thử nghiệm, trong đó các phản ứng không đặc hiệu gây ra bởi IgM người mà không bao gồm phản ứng kháng nguyên-kháng thể nêu trên được ngăn chặn bằng cách bổ sung tác nhân ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu gây ra bởi IgM người, tác nhân này bao gồm kháng thể đơn dòng theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 3 nêu trên và/hoặc đoạn chức năng dẫn xuất từ kháng thể đơn dòng theo mục 4 nêu trên.

12. Phương pháp thử nghiệm miễn dịch theo mục 11 nêu trên, trong đó kháng thể thử nghiệm hoặc kháng nguyên thử nghiệm được đỡ trên chất mang không hòa tan.

13. Phương pháp thử nghiệm miễn dịch theo mục 12 nêu trên, trong đó chất mang không hòa tan bao gồm nhựa latex, kim loại keo, hoặc silic oxit.

14. Chất phản ứng thử nghiệm miễn dịch và bộ dụng cụ thử nghiệm miễn dịch, bao gồm:

tác nhân ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu gây ra bởi IgM người bao gồm kháng thể đơn dòng theo điểm bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 3 nêu trên và/hoặc đoạn chức năng dẫn xuất từ kháng thể đơn dòng theo mục 4 nêu trên; và

kháng thể thử nghiệm hoặc kháng nguyên thử nghiệm để xác định lượng chất phân tích trong mẫu.

15. Chất phản ứng thử nghiệm miễn dịch và bộ dụng cụ thử nghiệm miễn dịch theo mục 14 nêu trên, trong đó kháng thể thử nghiệm hoặc kháng nguyên thử nghiệm được đặt trên chất mang không hòa tan.

16. Chất phản ứng thử nghiệm miễn dịch và bộ dụng cụ thử nghiệm miễn dịch theo mục 15 nêu trên, trong đó chất mang không hòa tan bao gồm nhựa latex, kim loại keo, hoặc silic oxit.

Hiệu quả của sáng chế

Kháng thể đơn dòng theo sáng chế khiến cho có thể tạo ra phương pháp phát hiện đặc hiệu IgM người, cũng như chất phản ứng chất lượng cao và rẻ tiền và bộ dụng cụ để thử nghiệm ngưng kết miễn dịch của IgM người.

Ngoài ra, vì phương pháp sàng lọc kháng thể đơn dòng theo sáng chế đánh giá mức độ ngưng kết trong dung dịch làm chỉ số để lựa chọn kháng thể, nên phương pháp này hữu hiệu và có khả năng lựa chọn kháng thể đơn dòng mong muốn với độ chính xác cao.

Ngoài ra, vì tác nhân ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu theo sáng chế không tạo ra phức theo tỷ lệ 1:1 với IgM biểu thị sự bắc cầu liên kết nội phân tử, nên tác nhân có thể trung hòa sự can thiệp của IgM một cách hiệu quả. Do đó, phương pháp thử nghiệm miễn dịch, chất phản ứng thử nghiệm miễn dịch và bộ dụng cụ thử nghiệm miễn dịch sử dụng tác nhân theo sáng chế có thể ngăn chặn không chỉ các kiểu phản ứng không đặc hiệu thông thường gây ra bởi IgM người mà còn cả các kiểu phản ứng không đặc hiệu mà không thể ngăn chặn được bằng các biện pháp thông thường. Do đó, sáng chế cho phép đánh giá trong một phạm vi rộng gồm nhiều danh mục thử nghiệm và mẫu thử nghiệm một cách chính xác hơn so với các phương pháp đánh giá thông thường, và có thể được sử dụng thích hợp cho thử nghiệm miễn dịch được sử dụng trong các thử nghiệm lâm sàng đang ngày một gia tăng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện mẫu cấu trúc của IgM người.

Fig.2 thể hiện các phương thức liên kết của IgM người và kháng thể đơn dòng kháng IgM người thông thường.

Fig.3 thể hiện kết quả của các thử nghiệm đánh giá ngưng kết miễn dịch sử dụng kháng thể đơn dòng kháng IgM người theo sáng chế (ví dụ 1).

Fig.4 thể hiện các hiệu quả của tác nhân ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu theo sáng chế và các tác nhân đối chứng để ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu, trên thử nghiệm một mẫu bình thường với chất phản ứng nhựa latex để thử nghiệm PSA.

Fig.5 thể hiện các hiệu quả ngăn chặn của tác nhân theo sáng chế và các tác nhân đối chứng để ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu trên thử nghiệm của một mẫu phản ứng không đặc hiệu với chất phản ứng nhựa latex để thử nghiệm PSA.

Fig.6 thể hiện các hiệu quả ngăn chặn của tác nhân theo sáng chế và các tác nhân đối chứng để ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu trên đánh giá một mẫu phản ứng không đặc hiệu với chất phản ứng để thử nghiệm insulin.

Mô tả chi tiết sáng chế

Kháng thể đơn dòng kháng IgM người

Kháng thể đơn dòng kháng IgM người theo sáng chế không bị hạn chế bởi các giới hạn cụ thể, với điều kiện nó có đặc tính tương tác đặc hiệu với IgM người, tạo ra cầu liên kết liên phân tử giữa các phân tử IgM người trong dung dịch, và có khả năng thực hiện thử nghiệm ngưng kết miễn dịch ở dạng kháng thể đơn dòng duy nhất. “Phản ứng đặc hiệu với IgM người” như được sử dụng ở đây có nghĩa là kháng thể đơn dòng được cho tiến hành phản ứng kháng nguyên-kháng thể với IgM người nhưng không phản ứng với các globulin miễn dịch người khác. Một nghiên cứu về kháng thể đơn dòng kháng IgM trước đây chưa được tiến hành thực hiện theo quan điểm nó có thể gây ra ngưng kết miễn dịch hay không, và do đó, kháng thể đơn dòng kháng IgM người theo sáng chế mà có thể ngưng kết IgM người bởi chính kháng thể này là có tính mới.

Ngoài ra, các kháng thể đơn dòng kháng IgM thông thường không tạo ra sự bắc cầu liên kết giữa hai phân tử globulin miễn dịch và chỉ có khả năng tạo ra cầu liên kết nội phân tử bên trong phân tử globulin miễn dịch đơn. Tuy nhiên, kháng thể đơn dòng theo sáng chế mà bản thân nó có thể ngưng kết IgM người có thể tạo ra cầu liên kết liên phân tử giữa các phân tử IgM người, và do đó nó có khả năng ngăn chặn hoàn toàn các phản ứng không đặc hiệu gây ra bởi IgM người, và như được mô tả dưới đây, nó có thể được sử dụng thích hợp làm tác nhân ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu.

Ví dụ cụ thể về các kháng thể đơn dòng kháng IgM người theo sáng chế như vậy bao gồm kháng thể đơn dòng được tạo ra bởi tế bào lai FERM BP-11134. Ngoài ra, các kháng thể thể hiện khả năng phản ứng chéo với kháng thể đơn dòng được tạo ra bởi tế bào lai FERM BP-11134 cũng được bao gồm trong phạm vi kháng thể theo sáng chế. Các kháng thể thể hiện khả năng phản ứng chéo với kháng thể đơn dòng được tạo ra bởi tế bào lai FERM BP-11134 bao gồm các kháng thể mà có thể nhận diện đặc hiệu trình tự axit amin của cùng epitop (yếu tố xác định kháng nguyên) như kháng thể đơn dòng nêu trên.

Đoạn chức năng

Theo sáng chế, đoạn chức năng bất kỳ bao gồm vùng Fab dẫn xuất từ kháng thể đơn dòng nêu trên có thể được sử dụng, dù vùng Fab có thu được bằng cách phân cắt enzym của kháng thể đơn dòng nêu trên, bằng kỹ thuật gen học, hoặc bằng phương tiện khác hay không. Do đó, trong đoạn chức năng theo sáng chế, thuật ngữ “chức năng” cụ thể có nghĩa rằng, đoạn có khả năng liên kết với IgM người.

Mẫu thử nghiệm

Mẫu thử nghiệm của thử nghiệm ngưng kết miễn dịch cho IgM người sử dụng kháng thể đơn dòng kháng IgM người hoặc đoạn chức năng của nó theo sáng chế có thể là mẫu sinh học bất kỳ, như dịch cơ thể, ví dụ máu, huyết thanh, huyết tương và nước tiểu.

Phương pháp thử nghiệm

Thử nghiệm ngưng kết miễn dịch của IgM người theo sáng chế không bị hạn chế bởi bất kỳ giới hạn cụ thể nào, với điều kiện là thử nghiệm này tiến hành thử nghiệm về IgM người bằng cách kết hợp kháng thể đơn dòng kháng IgM người theo sáng chế và mẫu thử nghiệm theo một phương thức nào đó và do đó gây ra ngưng kết miễn dịch. Để tạo điều kiện thuận lợi hơn nữa cho sự ngưng kết miễn dịch, kháng thể đơn dòng kháng IgM người khác mà nhận diện một epitop khác với epitop của kháng thể đơn dòng nêu trên cũng có thể được sử dụng cùng nhau, và không có giới hạn cụ thể nào về đặc tính của kháng thể đơn dòng bổ sung này.

Chất phản ứng thử nghiệm ngưng kết miễn dịch và bộ dụng cụ thử nghiệm

Chất phản ứng và bộ dụng cụ cho các thử nghiệm ngưng kết miễn dịch của IgM người sử dụng kháng thể đơn dòng kháng IgM người hoặc đoạn chức năng của nó theo sáng chế có thể chứa thành phần đệm cường độ ion, cường độ thẩm thấu hoặc tương tự của mẫu, hoặc thành phần tăng cường ngưng kết miễn dịch. Các ví dụ về thành phần đệm cường độ ion, cường độ thẩm thấu hoặc tương tự của mẫu bao gồm axit axetic, axit xitric, axit phosphoric, Tris, glyxin, axit boric, axit carbonic, và dung dịch đệm Good, cũng như muối natri, muối kali, và muối canxi. Các ví dụ về thành phần tăng cường ngưng kết miễn dịch bao gồm polyetylen glycol, polyvinylpyrrolidon, và polyme phospholipit.

Chất phản ứng và bộ dụng cụ của các thử nghiệm ngưng kết miễn dịch đối với IgM người sử dụng kháng thể đơn dòng kháng IgM người hoặc đoạn chức năng của nó theo sáng chế tương thích với các phép đo xác định quang học, được thực hiện trên phổ quang kế, thiết bị phân tích tự động của Tập đoàn Hitachi sử dụng các nguyên tắc phổ quang kế, thiết bị phân tích tự động tổng quan như loạt TBA của Tập đoàn Toshiba, loạt BM của Tập đoàn JEOL, loạt AU của Tập đoàn Olympus, và CP2000 của Tập đoàn Sekisui Medical, thiết bị phân tích phạm vi bước sóng cận hồng ngoại (ví dụ, LPIA của Tập đoàn Mitsubishi Kagaku Iatron), thiết bị để xác định cường độ ánh sáng tán xạ (ví dụ, hệ BN của Tập đoàn Dade Behring), hoặc tương tự.

Không có giới hạn cụ thể nào đối với các kỹ thuật được sử dụng để điều chế kháng thể đơn dòng kháng IgM người theo sáng chế, tuy nhiên thông thường, các kỹ thuật này liên quan đến quá trình sản xuất các tế bào lai. Trong qui trình đánh giá để lựa chọn kháng thể đơn dòng kháng IgM người theo sáng chế, các kháng thể được sàng lọc dựa trên các mức độ ngưng kết của IgM người mà các kháng thể này có thể gây ra trong dung dịch. Do đó, kháng thể đơn dòng kháng IgM người thu được theo cách như vậy sẽ có đặc tính tương tác đặc hiệu với IgM người và ngưng kết IgM người bởi chính nó.

Sự biến đổi hoặc cải biến cấu trúc bất kỳ có thể được cho phép đối với kháng thể đơn dòng kháng IgM người được điều chế theo sáng chế, với điều kiện là sự biến đổi hoặc cải biến không tác động nhiều đến các đặc tính của kháng thể đơn dòng về khả năng phản ứng với IgM người.

Tế bào lai

Tế bào lai được sử dụng để sản xuất kháng thể đơn dòng kháng IgM người theo sáng chế có thể là tế bào lai bất kỳ mà có khả năng tạo ra kháng thể đơn dòng kháng IgM người có thể phản ứng đặc hiệu với IgM người và gây ra ngưng kết miễn dịch với IgM người dựa vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể trong dung dịch, và tế bào lai này có thể được lựa chọn trên cơ sở kháng thể đơn dòng được tạo ra bởi tế bào lai này có khả năng cao gây ra ngưng kết miễn dịch với IgM người trong dung dịch. Do đó, kháng thể đơn dòng kháng IgM người theo sáng chế có thể được tạo ra thông qua các bước từ 1) đến 3) sau.

Bước 1): thiết lập các tế bào lai sản xuất ra kháng thể kháng IgM người bằng cách sử dụng IgM người làm kháng nguyên;

Bước 2): đưa các kháng thể được tạo ra bởi tế bào lai thu được trong bước 1 tiếp xúc với IgM người trong dung dịch và lựa chọn tế bào lai sản xuất ra kháng thể có khả năng tạo ra khối ngưng kết miễn dịch dựa vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể với IgM người trong dung dịch nêu trên;

Bước 3): thu thập kháng thể được tạo ra bởi tế bào lai lựa chọn trong bước 2.

Ví dụ về các tế bào lai lựa chọn trong bước 2 bao gồm FERM BP-11134.

Cụ thể hơn, việc sàng lọc các tế bào lai trong quy trình sản xuất nêu trên có thể được tiến hành thực hiện bằng cách cho các kháng thể đã tinh chế phản ứng với IgM người trong dung dịch và lựa chọn các tế bào lai dựa vào những sự chênh lệch của các kháng thể tương ứng về khả năng kích thích ngưng kết miễn dịch trong dung dịch. Để lựa chọn tế bào lai sản xuất ra kháng thể theo sáng chế hiệu quả hơn nữa, việc lựa chọn sơ bộ các tế bào lai sản xuất ra kháng thể kháng IgM người có thể được thực hiện, trước quy trình lựa chọn nêu trên, bằng cách sử dụng, ví dụ, các lớp nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy của các tế bào lai thay vì các kháng thể tinh chế trên IgM người trên pha rắn, như trong phương pháp ELISA, v.v..

Kháng thể thu được thông qua quy trình lựa chọn được mô tả ở trên sẽ có đặc tính phản ứng đặc hiệu với IgM người và có khả năng tạo ra trên chính nó cầu liên kết liên phân tử giữa các phân tử IgM người trong dung dịch và do đó tạo ra khối ngưng kết miễn dịch.

Các ứng dụng

Kháng thể đơn dòng kháng IgM người theo sáng chế có thể được áp dụng cho mục đích bất kỳ mà tận dụng đặc tính phản ứng đặc hiệu của nó với IgM người và ngưng kết IgM người bởi chính nó. Các ví dụ ưu tiên bao gồm việc sử dụng trong thử nghiệm ngưng kết miễn dịch của IgM người nêu trên cũng như việc sử dụng làm tác nhân ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu gây ra bởi IgM người. Kháng thể đơn dòng kháng IgM người theo sáng chế có thể được sử dụng thích hợp làm tác nhân ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu gây ra bởi IgM người, vì nó không gây ra sự bắc cầu liên kết nội phân tử theo tỷ lệ 1:1 với phân tử IgM người, và do đó nó có thể trung hòa hiệu quả IgM người. Vẫn chưa rõ ràng thông qua cơ chế nào, kháng thể theo sáng chế có khả năng ngăn chặn, thậm chí ngay cả các phản ứng không đặc hiệu gây ra bởi IgM mà không thể ngăn chặn được bằng các tác nhân ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu thông thường, nhưng rõ ràng là khả năng ngưng kết IgM người trong dung dịch của nó

rất thích hợp với cơ chế này. Ví dụ, có thể là, kháng thể đơn dòng kháng IgM người mà có thể ngưng kết IgM người trong dung dịch sẽ nhận diện epitop tồn tại phổ biến trong số các phân tử IgM người, bất kể chúng thuộc loại kháng thể dị ái hay không, thuộc kiểu yếu tố dạng thấp (RF) hay không, hoặc dạng khác.

Do đó, các phản ứng không đặc hiệu gây ra bởi IgM người, trong bối cảnh theo sáng chế, đề cập đến tất cả các phản ứng không đặc hiệu gây ra bởi IgM người, bao gồm cả các phản ứng mà các cơ chế hoạt động của chúng đã biết như IgM người ở dạng kháng thể dị ái hoặc yếu tố dạng thấp (RF) phản ứng với kháng thể dẫn xuất từ động vật, cũng như các phản ứng mà cơ chế hoạt động của chúng vẫn còn chưa rõ ràng. Do đó, tác nhân ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu theo sáng chế được dự định sử dụng trong tất cả các phản ứng không đặc hiệu trong đó yếu tố nguyên nhân là IgM người.

Sử dụng kháng thể đơn dòng kháng IgM người theo sáng chế làm tác nhân ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu có thể là hữu hiệu trong dung dịch cũng như trên pha rắn. Ví dụ, việc sử dụng tác nhân ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu trong dung dịch theo sáng chế có thể trong trường hợp, trong đó tác nhân này được bổ sung vào mẫu dung dịch và cho phép phản ứng với IgM người trong dung dịch để gây ra ngưng kết IgM người. Ví dụ, việc sử dụng tác nhân này trên pha rắn có thể trong trường hợp, trong đó dung dịch chứa tác nhân này được bổ sung vào chất đệm mẫu của phương pháp miễn dịch sắc ký và được làm khô và cố định trên đó trước, và IgM người chứa trong mẫu dung dịch được áp dụng và đưa qua chất đệm mẫu nêu trên sẽ được bắt giữ bởi tác nhân mà tác nhân này đã được cố định.

Tác nhân ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu theo sáng chế có thể được sử dụng trong thử nghiệm miễn dịch để xác định lượng chất phân tích trong mẫu dựa vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể giữa chất phân tích và kháng thể thử nghiệm hoặc kháng nguyên thử nghiệm, và thông qua việc sử dụng này, các phản ứng không đặc hiệu gây ra bởi IgM người mà không bao gồm phản ứng

kháng nguyên-kháng thể nêu trên có thể được ngăn chặn một cách hiệu quả, và do đó, các sự xác định miễn dịch chính xác có thể đạt được.

Mẫu thử nghiệm của thử nghiệm miễn dịch, chất phản ứng của thử nghiệm, và bộ dụng cụ thử nghiệm theo sáng chế, khác biệt ở chỗ, bằng việc bổ sung kháng thể đơn dòng kháng IgM người mà bản thân kháng thể này có khả năng ngưng kết IgM người để ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu và để thu được các xác định chính xác, có thể là mẫu bất kỳ trong số các mẫu sinh học của người, trong đó các phản ứng không đặc hiệu gây ra bởi IgM người có thể có khả năng xuất hiện. Các ví dụ về mẫu thử nghiệm bao gồm các dịch cơ thể như máu, huyết thanh, huyết tương và nước tiểu. Tương tự, chất phân tích có thể là phân tử bất kỳ với điều kiện là nó có thể được cho tiến hành phản ứng kháng nguyên-kháng thể, và các ví dụ về chất phân tích bao gồm CRP (protein phản ứng C), Lp (a), MMP3 (metalloproteinaza cơ chất 3), collagen typ IV, PSA (kháng nguyên đặc hiệu tiền liệt tuyến), BNP (peptit natri lợi niệu não), insulin, microalbumin, xystatin C, kháng thể kháng phospholipit, kháng thể kháng *Treponema pallidum*, FDP (sản phẩm thoái biến fibrin/fibrinogen), D-dime, SF (fibrin hòa tan), TAT (phức thrombin-kháng thrombin III), yếu tố XIII, và các pepsinogen I và II, cũng như các hapten như các thuốc sau: phenytoin, phenobarbital, carbamazepin, valproat, và theophylin. Tuy nhiên, nguyên tắc của sáng chế này không cho phép IgM người được bao gồm trong các ví dụ về chất phân tích này.

Kháng thể đơn dòng kháng IgM người theo sáng chế chính bản thân nó có khả năng ngưng kết IgM người, được sử dụng làm tác nhân ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu gây ra bởi IgM, có thể được bổ sung vào dung dịch hoặc vào pha rắn. Không có giới hạn đặc biệt nào về nồng độ mà ở nồng độ đó, tác nhân này được bổ sung vào, với điều kiện là nó đủ tạo ra hiệu quả ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu và không tác động lên phản ứng chính của thử nghiệm miễn dịch, tuy nhiên tác nhân tốt hơn được sử dụng với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01 đến 10mg/ml, và tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 0,05 đến 1mg/ml. Trong một thử nghiệm thực tiễn, các phản ứng không đặc hiệu có thể được ngăn chặn hiệu quả hơn nữa nếu như kháng thể đơn dòng kháng IgM người theo sáng chế

được cho tiếp xúc với mẫu thử nghiệm trước bước đưa kháng thể thử nghiệm hoặc kháng nguyên thử nghiệm tiếp xúc với mẫu thử nghiệm. Các biện pháp khác để ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu hoặc các thành phần ức chế khác cũng có thể được sử dụng kết hợp.

Trong thử nghiệm miễn dịch, chất phản ứng của thử nghiệm và bộ dụng cụ thử nghiệm theo sáng chế trong đó thành phần mà là dụng cụ trong xác định miễn dịch (kháng thể thử nghiệm hoặc kháng nguyên thử nghiệm) được đỡ trên chất mang không hòa tan, chất mang không hòa tan có thể là chất bất kỳ với điều kiện chất này là một chất không hòa tan được chấp nhận làm một thành phần trong chất phản ứng thử nghiệm y học; các ví dụ cụ thể bao gồm hạt nhựa latex, kim loại keo, silic oxit, và cacbon, và tốt nhất là hạt nhựa latex. Nguyên liệu và kích thước của chất mang không hòa tan có thể được lựa chọn thích hợp theo loại chất phân tích và nguyên tắc phát hiện của thử nghiệm miễn dịch, chất phản ứng của thử nghiệm và bộ dụng cụ thử nghiệm theo sáng chế. Trong trường hợp hạt nhựa latex nêu trên, phần tử chất mang bao gồm copolyme được tạo ra bởi quá trình polyme hóa một monome có nhóm phenyl và một monome có nhóm phenyl và axit sulfonic là được ưu tiên, và kích thước hạt trung bình của nó, khi được xác định bằng kính hiển vi điện tử truyền qua, nằm trong khoảng từ 0,01 đến 1,5 μm , tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,03 đến 0,8 μm , và tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,5 μm .

Trong thử nghiệm miễn dịch theo sáng chế khác biệt ở chỗ ngăn chặn sự tác động của các yếu tố không đặc hiệu lên kháng thể mà liên kết đặc hiệu với phân tử chất phân tích để có được các xác định chính xác, nguyên tắc phát hiện bất kỳ có thể được sử dụng, như phương pháp phát hiện enzym, phát hiện huỳnh quang, phát hiện hóa - quang, phương pháp phát hiện dựa vào độ đục, và phương pháp tương tự. Ngoài ra, các thao tác và các đánh giá có thể được thực hiện thủ công bằng tay hoặc cơ học. Do đó, chất phản ứng thử nghiệm miễn dịch và bộ dụng cụ thử nghiệm theo sáng chế có thể được sử dụng theo phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp sau: phương pháp ELISA, EIA, phương pháp

hóa - quang, phương pháp sắc ký miễn dịch, ngưng kết miễn dịch, phương pháp ngưng kết miễn dịch tăng cường bằng nhựa latex, và phương pháp tương tự. Cụ thể, phương pháp ngưng kết miễn dịch và phương pháp ngưng kết miễn dịch tăng cường bằng nhựa latex có thể được thực hiện trong các thiết bị giống như các thiết bị được sử dụng đối với chất phản ứng thử nghiệm ngưng kết miễn dịch và bộ dụng cụ thử nghiệm của IgM người được mô tả ở trên.

Tương tự, chất phản ứng thử nghiệm miễn dịch và bộ dụng cụ thử nghiệm theo sáng chế sử dụng tác nhân ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu gây ra bởi IgM người có thể chứa, ngoài thành phần chính, thành phần đệm cường độ ion, cường độ thẩm thấu hoặc tương tự của mẫu, hoặc thành phần tăng cường ngưng kết miễn dịch, các thành phần này có thể tương tự như các thành phần được mô tả ở trên cho chất phản ứng thử nghiệm ngưng kết miễn dịch và bộ dụng cụ thử nghiệm của IgM người.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, một phần của sáng chế sẽ được giải thích chi tiết bằng các ví dụ về phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng kháng IgM người có khả năng gây ra ngưng kết miễn dịch của IgM người bởi chính nó, thử nghiệm ngưng kết miễn dịch sử dụng kháng thể đơn dòng nêu trên, và thử nghiệm miễn dịch sử dụng kháng thể đơn dòng nêu trên làm tác nhân ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu. Tuy nhiên, sáng chế không bị hạn chế bởi những ví dụ này.

Ví dụ thử nghiệm 1: Sản xuất kháng thể đơn dòng kháng IgM người theo sáng chế

(1) Thiết lập các tế bào lai sản xuất ra kháng thể đơn dòng kháng IgM người

100 μ g IgM người tinh chế (được sản xuất bởi Tập đoàn CHEMICON) được sử dụng để gây miễn dịch đơn. Trong quá trình gây miễn dịch lần đầu, 200 μ l nhũ tương được điều chế bằng cách trộn các thể tích tương đương của IgM người và tá dược Freund hoàn chỉnh được tiêm vào khoang bụng của từng con chuột BALB/c. Để gây miễn dịch bổ sung, 200 μ l nhũ tương điều chế tương

tự bằng cách sử dụng tá dược Freund không hoàn chỉnh được sử dụng, và quá trình gây miễn dịch được lặp lại 3 lần với các khoảng giãn cách cứ mỗi 2 tuần. Hiệu giá kháng thể của các mẫu máu tập hợp từ các tĩnh mạch vồng mạc của chuột được xác định bằng phương pháp ELISA, và chuột thể hiện hiệu giá cao được lựa chọn cho dung hợp tế bào. Hai tuần sau khi gây miễn dịch lần thứ tư, 100µg IgM người hòa tan trong 200µl dung dịch nước muối được tiêm vào khoang bụng của chuột, và lách được lấy ra 3 ngày sau đó. Lách được phá vỡ trong môi trường RPMI1640, và các tế bào lách sau đó được tập hợp bằng cách ly tâm với tốc độ 1.500 vòng/phút. Các tế bào được rửa ít nhất 3 lần trong môi trường RPMI1640 không chứa huyết thanh thai bò, và sau đó được tạo huyền phù trong 2ml môi trường RPMI1640 chứa 15% huyết thanh thai bò, để tạo ra huyền phù tế bào lách. Sau khi các tế bào lách và các tế bào u tủy SP2/O-AG14 được trộn kết hợp theo tỷ lệ 6 với 1, quá trình dung hợp tế bào được cảm ứng với sự có mặt của 50% polyetylen glycol, và do đó thu được các tế bào lai (các tế bào dung hợp). Sau khi ly tâm với tốc độ 1.500 vòng/phút, viên kết được tập hợp và được tạo huyền phù trong dung dịch GKN (2g glucoza, 0,4g kali clorua, 8g natri clorua, 1,41g dinatri hydro phosphat, và 0,78g natri dihydro phosphat dihydrat được hòa tan trong nước tinh khiết để tạo ra 1L dung dịch GKN), được rửa bằng cách ly tâm, và viên kết được tập hợp. Các tế bào kết viên được tạo huyền phù trong 30ml môi trường RPMI1640 chứa 15% huyết thanh thai bò, và 100µl huyền phù này và 200µl môi trường HAT chứa các tế bào tuyến ức của chuột BALB/c (là các tế bào tiếp liệu) với mật độ $2,5 \times 10^6$ tế bào/ml được phân bố vào mỗi một lỗ của ba vi đĩa 96 lỗ. Các tế bào lai được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong một thiết bị ủ có 5% cacbon dioxit.

Sự hiện diện của các kháng thể kháng IgM người trong các lớp nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy được kiểm tra bằng phương pháp ELISA với IgM người trên pha rắn. Mười ngày sau khi dung hợp tế bào, sự phát triển của các tế bào lai được xác nhận trong mỗi một lỗ. Một cách chi tiết, 100µl dung dịch đệm phosphat 10mM (pH = 7,2; sau đây gọi tắt là PBS) chứa natri clorua 150mM và

10µg/ml IgM người được phân bố vào mỗi một lỗ của các vi đĩa 96 lỗ, và được giữ ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Sau khi các vi đĩa 96 lỗ này được rửa 3 lần bằng 300µl PBS chứa Tween 20 0,05% và 1% huyết thanh albumin bò, các lớp nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy được bổ sung với lượng 50µl/lỗ, và các đĩa được giữ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ. Sau khi các đĩa được rửa 3 lần bằng PBS chứa Tween 20 0,05% (sau đây gọi tắt là PBS-T), kháng thể dê kháng IgG chuột đánh dấu bằng peroxidaza (Tập đoàn SouthernBiotech) được bổ sung với lượng 50µl/lỗ, và các đĩa được giữ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ. Các đĩa sau đó được rửa 3 lần bằng PBS-T, dung dịch đệm axit xitric (pH = 5,0) chứa ortho-phenylendiamin 0,2% và hydro peroxit 0,02% được bổ sung vào đó với lượng 50µl/lỗ, các đĩa được giữ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 15 phút, và axit sulfuric 4,5N được bổ sung với lượng 50µl/lỗ để dừng phản ứng. Độ hấp thụ ở mỗi một lỗ với bước sóng 492nm được xác định, và các lỗ thể hiện sự chênh lệch so với đối chứng được lựa chọn là các lỗ dương tính.

Các tế bào được làm thành đơn dòng bằng phương pháp pha loãng giới hạn. Tức là, các tế bào lai từ các lỗ dương tính nêu trên được pha loãng thành 10 tế bào/ml và 0,1ml mỗi một trong số các dung dịch pha loãng này được đặt vào trong một lỗ của các vi đĩa 96 lỗ mà các tế bào tuyến ức chuột BALB/c là các tế bào tiếp liệu đã được phân bố vào trong đó với mật độ 10^6 tế bào/lỗ. Môi trường HAT được sử dụng cho nuôi cấy lần đầu và RPMI1640 chứa 15% huyết thanh thai bò được sử dụng cho các nuôi cấy sau đó. Mỗi một nuôi cấy được tiếp tục trong thời gian 10 ngày ở nhiệt độ 37°C trong một thiết bị ủ có 5% cacbon dioxit. Phương pháp ELISA để lựa chọn các lỗ dương tính và phương pháp pha loãng giới hạn để thiết lập tính đơn dòng, mỗi một phương pháp này được lặp lại 3 lần, và do đó đã thu được 26 dòng tế bào lai (từ A đến Z) sản xuất ra kháng thể đơn dòng kháng IgM người.

(2) Sản xuất các kháng thể đơn dòng

Xấp xỉ 10^5 tế bào từ mỗi một dòng tế bào lai được cấy chuyển vào khoang bụng của chuột mà đã được xử lý trước bằng pristan, và dịch cổ trướng tạo ra

trong đó được tập hợp. Các dịch cô trướng tập hợp được ly tâm để loại bỏ các chất không hòa tan và được trộn kết hợp với một thể tích tương đương của dung dịch amoni sulfat bão hòa. Các hỗn hợp được khuấy qua đêm, và sau khi ly tâm, các chất kết tủa được tập hợp. Các chất kết tủa tập hợp được hòa tan trong dung dịch đệm Tris 20mM (pH = 8,0) và được thẩm tách trong cùng dung dịch đệm. Các chất đã thẩm tách được cho hấp phụ riêng biệt lên các cột DEAE-Sepharose mà các cột này đã được cân bằng bởi dung dịch đệm tương tự, và các kháng thể đơn dòng kháng IgM người thu được bằng cách rửa giải với gradient nồng độ natri clorua nằm trong khoảng từ 0 đến 300mM trong dung dịch đệm tương tự. Các kháng thể đơn dòng kháng IgM người được sản xuất ra bởi các tế bào lai từ A đến Z lần lượt được ký hiệu là các kháng thể từ a đến z, và được cho tiến hành các thử nghiệm mô tả dưới đây.

Các ví dụ đánh giá

(1) Ví dụ đánh giá 1: Đánh giá về khả năng phản ứng trên pha rắn (phương pháp đánh giá thông thường)

50µl PBS chứa IgM người ở nồng độ 1µg/ml được phân bố trong vi đĩa 96 lỗ và được giữ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ, và do đó IgM người được cố định lên vi đĩa. Sau đó, vi đĩa được cho tiến hành phong bế bằng 200µl PBS chứa 3% BSA (albumin huyết thanh bò), và sau đó bổ sung 50µl PBS chứa kháng thể đơn dòng kháng IgM người ở nồng độ 1µg/ml vào lỗ, lỗ này được giữ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ. Vi đĩa sau đó được rửa 3 lần bằng PBS-T, kháng thể kháng chuột đánh dấu bằng peroxidaza được bổ sung với nồng độ 50µL/lỗ, và vi đĩa được giữ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ. Sau khi rửa 3 lần bằng PBS-T, 50µl dung dịch nền axit 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulphonic (ABTS) (được sản xuất bởi Tập đoàn KPL) được bổ sung vào mỗi một lỗ, và vi đĩa được giữ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 20 phút. Phản ứng được làm dừng bằng cách bổ sung 50µl dung dịch SDS 1% vào mỗi một lỗ. Độ hấp thụ với bước sóng 405nm được xác định, và cường

độ khả năng phản ứng của các kháng thể đơn dòng kháng IgM người được sắp xếp theo độ hấp thụ (Bảng 1).

(2) Ví dụ đánh giá 2: Đánh giá về khả năng phản ứng trong dung dịch (phương pháp đánh giá theo sáng chế)

750 μ l mỗi một trong số các dung dịch kháng thể đơn dòng kháng IgM người (tức là, dung dịch đệm Tris-axit clohydric 100mM, pH = 8,0, chứa 400 μ g/ml kháng thể đơn dòng kháng IgM người tinh chế, 3% polyetylen glycol 6000, trinati xitrat 5mM và canxi clorua 2,5mM (anhydrit)) được bổ sung vào 150 μ l PBS chứa IgM người ở nồng độ 200 μ g/ml, và hỗn hợp được khuấy. Sau 10 phút, độ hấp thụ được xác định bằng cách sử dụng hai bước sóng (bước sóng chính 340nm và bước sóng phụ 800nm) trong phổ quang kế Hitachi U-3310 (Độ hấp thụ 2). Trong mẫu đối chứng, 750 μ l mỗi một trong số các dung dịch kháng thể đơn dòng kháng IgM người được bổ sung vào 150 μ l PBS không chứa IgM người, hỗn hợp được khuấy, và độ hấp thụ được xác định trong điều kiện tương tự (Độ hấp thụ 1). Sự thay đổi về độ hấp thụ mà kèm theo sự ngưng kết miễn dịch đặc hiệu IgM người được tính toán bằng cách lấy Độ hấp thụ 2 trừ đi Độ hấp thụ 1 (Bảng 1).

Bảng 1

Kháng thể	Kiểu phụ	Đánh giá thông thường		Đánh giá theo sáng chế		
		Độ hấp thụ (Abs)	Phạm vi về khả năng phản ứng	Độ hấp thụ 1 (mAbs)	Độ hấp thụ 2 (mAbs)	Sự thay đổi về độ hấp thụ
a	G	0,070	23	4,1	5,3	1,2
b	G	0,069	24	3,6	4,8	1,2
c	G	0,103	18	4,3	4,7	0,4
d	G	0,064	25	4,0	4,8	0,8
e	G	0,416	15	5,3	7,5	2,2
f	G	0,315	17	6,0	12,1	6,1
g	G	0,619	8	4,6	8,3	3,7
h	G	0,509	13	3,5	11,5	8,0
i	G	0,545	12	5,0	10	5,0
j	G	0,710	4	4,4	8,7	4,3
k	G	1,464	1	5,6	10,3	4,7
l	G	0,619	8	3,9	7,6	3,7
m	G	0,084	20	3,9	4,5	0,6
n	G	0,087	19	3,9	5,3	1,4
o	G	0,318	16	18,3	20,6	2,3
p	G	0,080	21	4,7	5,6	0,9
q	G	0,070	23	4,0	4,3	0,3
r	G	0,781	3	4,6	10,9	6,3
s	G	0,603	10	4,9	8,3	3,4
t	G	0,685	6	5,1	161,8	<u>156,7</u>
u	G	0,627	7	2,9	6,5	3,6
v	G	0,078	22	5,4	5,7	0,3
w	G	0,694	5	5,2	8,7	3,5
x	G	0,448	14	6,7	11,4	4,7
y	G	0,567	11	5,0	13,8	8,8
z	G	1,161	2	14,1	16,7	2,6

(3) Các kết quả đánh giá

Từ sự thay đổi về độ hấp thụ, kháng thể t được phát hiện là kháng thể đơn dòng kháng IgM người phản ứng đặc hiệu với IgM người và có khả năng gây ra

ngưng kết miễn dịch dựa vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể với IgM người trong dung dịch. Lưu ý rằng, trong phương pháp đánh giá thông thường (tức là, đánh giá trong điều kiện pha rắn), các cường độ khả năng phản ứng của các kháng thể k và z là dễ nhận thấy, và mặc dù khả năng phản ứng của kháng thể t được xếp đứng thứ 6, song vẫn chưa bằng một nửa khả năng phản ứng của kháng thể k, và do đó, kháng thể t theo sáng chế không có khả năng được lựa chọn. Đồng thời, có thể thấy rằng, khả năng tạo ra khối ngưng kết miễn dịch dựa vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể với IgM người trong dung dịch không nhất thiết trùng với khả năng phản ứng mạnh, và do đó kháng thể đơn dòng có đặc tính theo sáng chế sẽ rất khó nhận diện mà chỉ dựa vào đánh giá thông thường về khả năng phản ứng trong điều kiện pha rắn. Tế bào lai T sản xuất ra kháng thể t đã được lưu trữ với số hiệu lưu giữ là FERM BP-11134.

Ví dụ 1

Kiểm tra sự ngưng kết miễn dịch bởi kháng thể đơn dòng kháng IgM người và khả năng sử dụng tiềm tàng của nó làm tác nhân ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu

(1) Điều chế các dung dịch IgM người

Dung dịch chứa IgM người (được sản xuất bởi Tập đoàn CHEMICON) ở nồng độ 200 μ g/ml lần lượt được pha loãng trong PBS để điều chế ra các dung dịch IgM người với nồng độ 100, 50, và 25 μ g/ml.

(2) Điều chế dung dịch kháng thể đơn dòng kháng IgM người t

Dung dịch đệm Tris-axit clohydric 100mM (pH = 8,0) chứa 3% polyetylen glycol 6000, trinati xitrat 5mM và canxi clorua 2,5mM (anhydrit) (sau đây gọi là dung dịch pha loãng kháng thể) được sử dụng để pha loãng kháng thể đơn dòng kháng globulin miễn dịch M người t theo sáng chế tới nồng độ cuối là 400 μ g/ml, để điều chế dung dịch kháng thể đơn dòng kháng IgM người t. Để làm đối chứng, dung dịch của chất phản ứng ngăn chặn dị ái HBR được điều chế bằng cách pha loãng chất phản ứng ngăn chặn dị ái HBR (được sản xuất bởi

SCANTIBODIES LABORATORY, INC. và được nhập khẩu bởi Nagase & Co. Ltd.) mà bao gồm kháng thể đơn dòng kháng IgM người được sử dụng làm tác nhân ngăn chặn các phản ứng không đặc hiệu, thay cho kháng thể đơn dòng kháng globulin miễn dịch M người t, trong dung dịch pha loãng kháng thể tới nồng độ cuối là 400 μ g/ml.

(3) Phương pháp thử nghiệm

Thử nghiệm ngưng kết miễn dịch được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị phân tích tự động 7170 Hitachi. Cụ thể, 150 μ l dung dịch kháng thể đơn dòng kháng globulin miễn dịch M người t được điều chế trong phần (2) hoặc 150 μ l dung dịch của chất phản ứng ngăn chặn dị ái HBR được bổ sung vào 30 μ l dung dịch của IgM người ở mỗi một nồng độ được điều chế trong phần (1), hỗn hợp được khuấy và được làm ấm ở nhiệt độ 37°C, và sự thay đổi về độ hấp thụ ở bước sóng chính 340nm và bước sóng phụ 800nm trong thời gian 10 phút được xác định làm số đo cường độ phản ứng (mAb). Kết quả được thể hiện trong hình vẽ trên Fig 3.

(4) Kết quả

Kháng thể đơn dòng kháng IgM người t theo sáng chế (số tham chiếu nội bộ là 73224) thể hiện gia tăng cường độ phản ứng phụ thuộc nồng độ ở nồng độ IgM người 25 μ g/ml và cao hơn, và do đó, khả năng của chính kháng thể này trong việc thực hiện thử nghiệm ngưng kết miễn dịch thực tiễn đối với IgM người được khẳng định. Mặt khác, chất phản ứng ngăn chặn dị ái HBR được sử dụng làm đối chứng không thể hiện bất kỳ sự gia tăng cường độ phản ứng nào, và khẳng định không có khả năng ngưng kết IgM người. Điều này cho thấy rằng, kháng thể đơn dòng kháng IgM người theo sáng chế có thể có khả năng ngăn chặn các phản ứng không đặc hiệu gây ra bởi IgM người mà không thể ngăn chặn được bằng các chất phản ứng thông thường để ngăn chặn các phản ứng không đặc hiệu, nhờ có đặc tính khác biệt rõ ràng với các kháng thể đơn dòng kháng IgM người khác mà đã được sử dụng trong các chất phản ứng thông thường để ngăn chặn các phản ứng không đặc hiệu.

Sau đây, hiệu quả ngăn chặn các phản ứng không đặc hiệu theo sáng chế được kiểm tra trong một số thử nghiệm liên quan đến các phản ứng miễn dịch (các ví dụ từ 2 đến 4).

Ví dụ 2

Kiểm tra hiệu quả ngăn chặn các phản ứng không đặc hiệu [1] (với chất phản ứng nhựa latex để thử nghiệm PSA)

Hiệu quả lên các phản ứng không đặc hiệu được quan sát với chất phản ứng nhựa latex để thử nghiệm PSA, thử nghiệm này sử dụng kháng thể đơn dòng kháng PSA, được kiểm tra bằng cách xác định cường độ phản ứng trong một thiết bị phân tích tự động tổng quan. PSA là một glycoprotein có trọng lượng phân tử khoảng 34.000 và được tạo ra đặc hiệu trong các tế bào biểu mô của tuyến tiền liệt, và nó được sử dụng trong việc sàng lọc (thăm khám lâm sàng) đối với ung thư tiền liệt tuyến, một trong số các khối u ác tính điển hình gặp ở nam giới cao tuổi.

(1) Các chất phản ứng

(1-1) Chất phản ứng thứ nhất

(i) Chất phản ứng kiểm

Dung dịch đệm HEPES 30mM (pH = 7,0) chứa KCl 0,5M và 0,1% BSA (albumin huyết thanh bò)

(ii) Chất phản ứng theo sáng chế

Dung dịch kháng thể đơn dòng kháng IgM người t mà có khả năng gây ra ngưng kết miễn dịch dựa vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể với globulin miễn dịch M người bởi chính nó được bổ sung vào chất phản ứng kiểm nêu trên để tạo ra nồng độ kháng thể cuối cùng là 25, 50 hoặc 100µg/ml.

(iii) Chất phản ứng đối chứng

Chất phản ứng ngăn chặn dị ái HBR có sẵn trên thị trường hoặc kháng thể đa dòng dê kháng IgM người (được sản xuất bởi Tập đoàn MBC) được bổ sung

vào chất phản ứng kiểm nêu trên để tạo ra nồng độ cuối là 25, 50 hoặc 100µg/ml.

(1-2) Chất phản ứng thứ hai

Dung dịch 2 gồm PSA Nanopia (tên thương mại), chất phản ứng nhựa latex PSA (Tập đoàn Sekisui Medical)

(2) Thiết bị đánh giá

Thiết bị phân tích tự động Hitachi kiểu 7170:

Các điều kiện về thông số

(i) Các thể tích mẫu, chất phản ứng thứ nhất, và chất phản ứng thứ hai: 4µl, 100µl, và 100µl.

(ii) Phương pháp phân tích: phương pháp kết thúc 2 điểm (các điểm phát hiện 19-34)

(iii) Các bước sóng xác định: bước sóng chính 570nm / bước sóng phụ 800nm

(3) Các mẫu thử nghiệm

(i) Mẫu bình thường

Huyết thanh của phụ nữ được sử dụng. Máu của phụ nữ chứa ít PSA nếu có, và do đó thường được sử dụng làm đối chứng âm.

(ii) Mẫu phản ứng không đặc hiệu

Huyết thanh của phụ nữ thể hiện cường độ phản ứng ở mức cao bất thường được sử dụng. PSA là một kháng nguyên đặc hiệu nam giới và không được phát hiện trong huyết thanh nữ giới. Do đó, huyết thanh nữ giới thể hiện cường độ phản ứng ở mức cao bất thường được cho là gây ra phản ứng không đặc hiệu trong đó sự ngưng kết nhựa latex cảm ứng không liên quan đến hàm lượng PSA. Cụ thể, huyết thanh nữ giới thể hiện mức độ hấp thụ cao được nhận diện bằng cách sàng lọc các huyết thanh có sẵn trên thị trường (Huyết thanh từ máu toàn phần không chứa chất chống đông của nữ giới bình thường, có tại TENNESSEE

BLOOD SERVICES, INC.) bằng việc sử dụng kết hợp chất phản ứng kiềm và chất phản ứng thứ hai nêu trên, và huyết thanh nhận diện này được sử dụng dưới đây.

(4) Phương pháp thử nghiệm

Mẫu bình thường và mẫu phản ứng không đặc hiệu được thử nghiệm trong thiết bị phân tích tự động Hitachi kiểu 7170, với chất phản ứng thứ nhất là chất phản ứng kiềm, chất phản ứng theo sáng chế hoặc chất phản ứng đối chứng, và chất phản ứng thứ hai là Dung dịch 2 gồm chất phản ứng nhựa latex PSA, PSA Nanopia (tên thương mại), và cường độ phản ứng được kiểm tra.

(5) Các kết quả thử nghiệm

Trong thử nghiệm của mẫu bình thường được thể hiện trên Fig. 4, với chất phản ứng theo sáng chế hoặc chất phản ứng đối chứng, nồng độ gia tăng của kháng thể kháng IgM người bổ sung hoặc chất phản ứng ngăn chặn dị ái HBR không dẫn đến sự thay đổi về cường độ phản ứng, cho thấy rằng, PSA không có mặt trong mẫu và việc bổ sung kháng thể kháng IgM người hoặc HBR tuyệt đối không tác động lên phản ứng thử nghiệm. Trái lại, trong thử nghiệm của mẫu phản ứng không đặc hiệu được thể hiện trên Fig. 5, độ hấp thụ dị thường không dưới 150mAbs được quan sát thấy với chất phản ứng kiềm không có chất phản ứng bổ sung. Kháng thể đa dòng dê kháng IgM người, chất phản ứng đối chứng, không thể hiện hiệu quả ngăn chặn có ý nghĩa nào ở các nồng độ bổ sung lên đến 100µg/ml, và việc bổ sung chất phản ứng ngăn chặn dị ái HBR có sẵn trên thị trường mà chất phản ứng này bao gồm kháng thể đơn dòng kháng IgM người, thậm chí làm gia tăng cường độ phản ứng, mặc dù rất ít, hơn là ngăn chặn nó.

Khi chất phản ứng theo sáng chế bao gồm kháng thể đơn dòng kháng IgM người t được bổ sung, ở nồng độ 25µg/ml, sự suy giảm đáng kể về độ hấp thụ dị thường được nhận thấy, và ở nồng độ 50µg/ml, phản ứng không đặc hiệu hầu như được ngăn chặn hoàn toàn. Do đó, khẳng định rằng, phương pháp thử nghiệm theo sáng chế thể hiện hiệu quả ngăn chặn mạnh các phản ứng không

đặc hiệu gây ra bởi IgM người mà không thể ngăn chặn được bằng các kháng thể đơn dòng kháng IgM người bình thường hoặc các kháng thể đa dòng kháng IgM người mà đã được sử dụng nhằm mục đích ngăn chặn các phản ứng không đặc hiệu.

Ví dụ 3

Kiểm tra hiệu quả ngăn chặn các phản ứng không đặc hiệu [2] (với chất phản ứng nhựa latex để thử nghiệm CRP)

Hiệu quả theo sáng chế đối với các phản ứng không đặc hiệu được quan sát với chất phản ứng nhựa latex để thử nghiệm CRP, thử nghiệm này sử dụng kháng thể đơn dòng kháng CRP, được kiểm tra bằng cách tiến hành các xác định trong thiết bị phân tích tự động tổng quan. CRP được biết rõ là yếu tố đánh dấu viêm không đặc hiệu.

(1) Chất phản ứng

(1-1) Chất phản ứng thứ nhất

(i) Chất phản ứng kiềm

Dung dịch đệm Tris-axit clohydric 20mM (pH = 8,5) chứa natri clorua 500mM.

(ii) Chất phản ứng theo sáng chế

Dung dịch kháng thể đơn dòng kháng IgM người t mà có khả năng gây ra ngưng kết miễn dịch dựa vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể với IgM người bởi chính nó được bổ sung vào chất phản ứng kiềm để tạo ra nồng độ kháng thể cuối cùng là 50µg/ml.

(iii) Chất phản ứng đối chứng

IgG chuột bình thường có hiệu quả ngăn chặn các phản ứng không đặc hiệu bị động hoặc chất phản ứng ngăn chặn dị ái HBR có sẵn trên thị trường được bổ sung vào chất phản ứng kiềm để tạo ra nồng độ cuối là 50µg/ml.

(1-2) Chất phản ứng thứ hai

Dung dịch 2 gồm Pureauto (tên thương mại) S kiểu SS, nhựa latex CRP, chất phản ứng nhựa latex (Tập đoàn Sekisui Medical)

(1-3) Dụng cụ định chuẩn

Pureauto (tên thương mại) S kiểu SS, nhựa latex CRP, dụng cụ định chuẩn (Tập đoàn Sekisui Medical)

(2) Thiết bị đánh giá

Thiết bị phân tích tự động Hitachi kiểu 7170:

Các điều kiện về thông số

(i) Các thể tích mẫu, chất phản ứng thứ nhất, và chất phản ứng thứ hai: lần lượt là 3 μ l, 150 μ l, và 50 μ l.

(ii) Phương pháp phân tích: phương pháp kết thúc 2 điểm (các điểm phát hiện 19-34)

(iii) Các bước sóng xác định: bước sóng chính 570nm/bước sóng phụ 800nm

(iv) Sự định chuẩn: Spline

(3) Các mẫu thử nghiệm

Mẫu phản ứng không đặc hiệu 1: mẫu độ hấp thụ cao dị thường được phát hiện trong số các huyết thanh bình thường

Mẫu phản ứng không đặc hiệu 2: mẫu độ hấp thụ cao dị thường được phát hiện trong số các huyết thanh bình thường

(4) Phương pháp thử nghiệm

Các mẫu phản ứng không đặc hiệu được thử nghiệm trong thiết bị phân tích tự động Hitachi kiểu 7170, với chất phản ứng thứ nhất là chất phản ứng kiểm, chất phản ứng theo sáng chế hoặc chất phản ứng đối chứng và chất phản ứng thứ hai là dung dịch 2 gồm Pureauto (tên thương mại) S kiểu SS, nhựa latex CRP, chất phản ứng nhựa latex, và các giá trị xác định được ghi lại.

(5) Các kết quả thử nghiệm

Như được thể hiện trong Bảng 2, các giá trị xác định của các mẫu phản ứng không đặc hiệu 1 và 2 thu được với chất phản ứng kiềm cao hơn từ 5 đến 10 lần so với các giá trị xác định bình thường (tức là, các giá trị tham chiếu được kiểm tra bằng cách sử dụng chất phản ứng nhựa latex từ nhà sản xuất khác chứa kháng thể đa dòng thô. Tên sản phẩm: CRP-Latex (II) “Seiken” X2, của Tập đoàn Denka Seiken). Với chất phản ứng đối chứng chứa IgG chuột bình thường ở nồng độ 50µg/ml, sự cải thiện về giá trị xác định được quan sát thấy ở mẫu phản ứng không đặc hiệu 1, nhưng không quan sát thấy ở mẫu phản ứng không đặc hiệu 2. Do đó, có thể hiểu rằng, mẫu phản ứng không đặc hiệu 1 được gọi là mẫu HAMA bao gồm các kháng thể dị ái. Với chất phản ứng đối chứng chứa chất phản ứng ngăn chặn dị ái HBR ở nồng độ 50µg/ml, sự cải thiện được quan sát thấy ở cả hai mẫu phản ứng không đặc hiệu 1 và 2, với các giá trị xác định giảm tới mức thấp tương đương như các giá trị xác định bình thường. Chất phản ứng theo sáng chế bao gồm kháng thể đơn dòng kháng IgM người t cũng cải thiện các giá trị xác định ở cả hai mẫu phản ứng không đặc hiệu 1 và 2, và hiệu quả này lớn hơn so với hiệu quả được thể hiện bởi chất phản ứng ngăn chặn dị ái HBR. Do đó, khẳng định rằng, phương pháp thử nghiệm theo sáng chế có thể ngăn chặn các phản ứng không đặc hiệu bình thường mà các phản ứng này không thể ngăn chặn được bằng chất phản ứng ngăn chặn dị ái HBR, với tính hiệu quả tương đương hoặc lớn hơn so với chất phản ứng ngăn chặn dị ái HBR.

Bảng 2

	Giá trị xác định bình thường (Giá trị tham chiếu)	Chất phản ứng kiềm	Chất phản ứng đối chứng		Chất phản ứng theo sáng chế
			IgG chuột bình thường	HBR	
Mẫu phản ứng không đặc hiệu 1	1,4	15,0	1,5	1,8	1,3
Mẫu phản ứng không đặc hiệu 2	1,3	6,6	6,0	1,3	1,3

Đơn vị (mg/dL)

Ví dụ 4

Kiểm tra hiệu quả ngăn chặn các phản ứng không đặc hiệu [3] (với chất phản ứng nhựa latex để thử nghiệm insulin)

Hiệu quả ngăn chặn các phản ứng không đặc hiệu theo sáng chế cũng được kiểm tra bằng chất phản ứng nhựa latex để thử nghiệm insulin.

(1) Sự tạo ra các kháng thể đơn dòng chuột kháng insulin

Hai loại kháng thể đơn dòng chuột kháng insulin có các vị trí nhận diện kháng nguyên khác nhau được tạo ra theo phương pháp thông thường để điều chế kháng thể đơn dòng, với insulin người (30-AI51, được sản xuất bởi Tập đoàn Fitzgerald) được sử dụng làm chất sinh miễn dịch. Các số tham chiếu nội bộ 66221 và 66412 lần lượt được gán cho các kháng thể này (sau đây lần lượt được gọi là kháng thể 66221 và kháng thể 66412).

(2) Sự tạo ra các hạt nhựa latex

1.100g nước cất vô trùng, 200g styren, 0,2g natri styrensulfonat, và dung dịch mà 1,5g kali persulfat được hòa tan trong dung dịch này trong 50g nước cất vô trùng được cho vào trong một bình phản ứng thủy tinh (thể tích: 2L) có trang bị một thiết bị khuấy, bộ làm lạnh để hồi lưu, bộ phát hiện nhiệt độ, ống nạp nitơ, và một hộp đựng. Không khí bên trong bình được thay thế bằng khí nitơ, và quá trình polyme hóa được thực hiện trong thời gian 48 giờ kết hợp với khuấy liên tục ở nhiệt độ 70°C. Sau khi quá trình polyme hóa kết thúc, dung dịch nêu trên được cho tiến hành lọc bằng giấy lọc và các hạt nhựa latex được tạo ra. Hình ảnh của các hạt nhựa latex tạo ra được phóng đại 10.000 lần bằng cách sử dụng kính hiển vi điện tử truyền dẫn ("kiểu JEM-1010", được sản xuất bởi Tập đoàn JEOL), và sự phân tích hình ảnh được tiến hành thực hiện trên ít nhất 100 hạt để xác định kích thước hạt trung bình. Kích thước hạt trung bình thu được là 0,3µm.

(3) Điều chế các dung dịch của các hạt nhựa latex hấp phụ kháng thể đơn dòng kháng insulin

1) Điều chế dung dịch của các hạt nhựa latex hấp phụ kháng thể 66221

Dung dịch 1,0% của các hạt nhựa latex có kích thước hạt trung bình $0,3\mu\text{m}$ (dung dịch đệm Tris 5mM, pH = 8,5) được bổ sung thêm một lượng tương đương của dung dịch chứa kháng thể 66221 ở nồng độ 0,60mg/ml (dung dịch đệm Tris 5mM, pH = 8,5), và hỗn hợp được khuấy trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ 4°C . Sau đó, lượng thể tích tương đương của dung dịch đệm Tris 5mM (pH = 8,5) chứa 0,5% BSA được bổ sung, và hỗn hợp được khuấy trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 4°C . Hỗn hợp sau đó được ly tâm để lấy ra lớp nổi trên bề mặt, và phần kết tủa được tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm Tris 5mM (pH = 8,5) để thu được dung dịch của các hạt nhựa latex hấp phụ kháng thể 66221.

2) Điều chế dung dịch của các hạt nhựa latex hấp phụ kháng thể 66412

Dung dịch của các hạt nhựa latex hấp phụ kháng thể 66412 được tạo ra bằng cách sử dụng quy trình tương tự như được mô tả trong phần 1) nêu trên bằng kháng thể 66412.

(4) Các chất phản ứng

1) Điều chế chất phản ứng thứ nhất

(i) Chất phản ứng kiềm

Dung dịch đệm Tris 5mM (pH = 8,5) chứa natri clorua 500mM và 0,2% BSA.

(ii) Chất phản ứng theo sáng chế

Chất phản ứng này được sản xuất ra bằng cách bổ sung dung dịch kháng thể đơn dòng t vào chất phản ứng kiềm để tạo ra nồng độ kháng thể cuối cùng là $50\mu\text{g/ml}$.

(iii) Chất phản ứng đối chứng

Chất phản ứng này được tạo ra bằng cách bổ sung chất phản ứng ngăn chặn dị ái HBR có sẵn trên thị trường, thay vì kháng thể đơn dòng t theo sáng chế, tới nồng độ kháng thể cuối cùng là $50\mu\text{g/ml}$.

2) Điều chế chất phản ứng thứ hai

Các lượng thể tích tương đương của dung dịch các hạt nhựa latex hấp phụ kháng thể 66221 và dung dịch các hạt nhựa latex hấp phụ kháng thể 66412 được trộn kết hợp, và hỗn hợp được pha loãng bằng dung dịch đệm Tris 5mM (pH = 8,5) sao cho độ hấp thụ ở bước sóng 600nm là 5,0Abs. Hỗn hợp tạo ra là chất phản ứng thứ hai.

(5) Các mẫu

Các mẫu huyết thanh tập hợp cho các thử nghiệm dung nạp glucoza được sử dụng làm các mẫu.

(6) Phương pháp thử nghiệm

(i) Các xác định với chất phản ứng theo sáng chế và chất phản ứng đối chứng

Nồng độ insulin trong mẫu được xác định bằng cách sử dụng thiết bị phân tích tự động Hitachi kiểu 7170 và hỗn hợp các chất phản ứng thứ nhất và thứ hai. Cụ thể, 150 μ l chất phản ứng thứ nhất được bổ sung vào 10 μ l mẫu, hỗn hợp được giữ ấm ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 5 phút, và sau khi bổ sung thêm 50 μ l chất phản ứng thứ hai, hỗn hợp được khuấy. Những thay đổi về độ hấp thụ đi kèm theo sự xuất hiện ngưng kết được xác định trong thời gian 5 phút ở bước sóng chính 570nm và ở bước sóng phụ 800nm, và được so sánh với đường cong chuẩn đã thu được với các chất tiêu chuẩn có nồng độ đã biết, để tính toán các nồng độ insulin.

(ii) Các xác định với các chất phản ứng tiêu chuẩn

Nồng độ của insulin trong mẫu được xác định bằng cách sử dụng Insulin-N có tên là LUMIPULSE (tên thương mại) (được sản xuất bởi Tập đoàn Fujirebio) theo sách hướng dẫn kèm theo và theo các khuyến cáo của nhà sản xuất. Fig. 6 thể hiện các mối tương quan giữa tập hợp các giá trị xác định insulin này và tập hợp thu được ở trên với chất phản ứng theo sáng chế hoặc chất phản ứng đối chứng.

(7) Các kết quả thử nghiệm và thảo luận

Trên Fig. 6 thể hiện các mối tương quan, một số mẫu không thể hiện mối tương quan được ghi nhận trong thử nghiệm với chất phản ứng đối chứng (HBR). Mặt khác, sự thiếu mối tương quan được ngăn chặn trong Ví dụ này, trong đó chất phản ứng theo sáng chế đã được sử dụng, trong đó các mối tương quan rõ ràng với insulin-N LUMIPULSE (tên thương mại) có mặt. Do đó, khẳng định rằng, cũng trong thử nghiệm insulin, chất phản ứng theo sáng chế ngăn chặn các phản ứng không đặc hiệu mà các phản ứng này không thể ngăn chặn được bằng chất phản ứng ngăn chặn dị ái HBR có sẵn trên thị trường.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Vì kháng thể đơn dòng theo sáng chế được lựa chọn trên cơ sở hiệu lực gây ra các phản ứng ngưng kết trong dung dịch, nên kháng thể đơn dòng này phản ứng hiệu quả với IgM người, cho phép thử nghiệm ngưng kết miễn dịch đối với IgM người chính xác và thích hợp hơn.

Kháng thể đơn dòng theo sáng chế cũng tạo ra chất phản ứng chất lượng cao và rẻ tiền cho thử nghiệm và bộ dụng cụ thử nghiệm trong thử nghiệm ngưng kết miễn dịch của IgM người.

Tác nhân ngăn chặn phản ứng không đặc hiệu theo sáng chế, cũng như thử nghiệm miễn dịch, chất phản ứng thử nghiệm miễn dịch và bộ dụng cụ thử nghiệm miễn dịch sử dụng tác nhân này, có thể ngăn chặn các phản ứng không đặc hiệu thông thường gây ra bởi HAMA hoặc tương tự. Ngoài ra, các tác nhân này cũng có thể ngăn chặn thậm chí ngay cả các phản ứng không đặc hiệu mà không thể ngăn chặn được bằng các phương tiện đã biết, bất luận là kiểu mục thử nghiệm nào, với điều kiện là các phản ứng không đặc hiệu này có thể được gây ra bởi IgM người, do đó cho phép xác định chính xác hơn so với các thử nghiệm thông thường.

Tham chiếu vi sinh vật được nộp lưu:

A. Tên và địa chỉ của viện nhận lưu giữ liệu sinh học được nộp lưu:

Cơ quan lưu giữ vật liệu sinh học patent quốc tế,

Viện Khoa học và Công nghệ Công nghiệp cao Quốc gia

Chuo 6, Higashi 1-1-1, Tsukuba-City, Ibaraki, 305-8566 JAPAN

B. Ngày mà vật liệu sinh học được nộp lưu tại viện lưu giữ nêu trên:

Ngày 19 tháng 09 năm 2008 (ngày nộp lưu đầu tiên)

Ngày 9 tháng 06 năm 2009 (ngày mà tại thời điểm đó, ngày nộp lưu đầu tiên được chuyển đổi theo Hiệp ước Budapest).

C. Số nộp lưu được gán cho việc nộp lưu bởi viện lưu giữ nêu trên:

FERM BP-11134

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp thử nghiệm ngưng kết miễn dịch để xác định lượng IgM người trong mẫu, trong đó phương pháp này bao gồm bước trộn mẫu này và kháng thể đơn dòng kháng IgM người hoặc đoạn chức năng của nó mà phản ứng đặc hiệu với IgM người và bản thân kháng thể này có khả năng gây ra sự ngưng kết miễn dịch dựa vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể với IgM người trong dung dịch, và gây ra sự ngưng kết miễn dịch, trong đó đoạn chức năng này chứa vùng Fab thu được từ kháng thể đơn dòng nêu trên.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó kháng thể đơn dòng kháng IgM người được tạo ra bởi tế bào lai được lưu giữ tại Viện khoa học và Công nghệ công nghiệp cao quốc gia (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) với số nộp lưu là FERM BP-11134.
3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phương pháp này dựa vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể giữa chất phân tích và kháng thể thử nghiệm hoặc kháng nguyên thử nghiệm, còn bao gồm kìm hãm các phản ứng không đặc hiệu.
4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó kháng thể thử nghiệm hoặc kháng nguyên thử nghiệm được mang trên chất mang không hòa tan.
5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó chất mang không hòa tan bao gồm hạt latex, kim loại dạng keo, hoặc silic oxit.
6. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó ít nhất một trong các phản ứng không đặc hiệu dưới đây bị kìm hãm:
 - a) các phản ứng không đặc hiệu do IgM người gây ra,
 - b) các phản ứng không đặc hiệu do HAMA gây ra, và
 - c) các phản ứng không đặc hiệu không bị kìm hãm bởi chất phản ứng ngăn chặn dị ái.
7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó chất phản ứng ngăn chặn dị ái được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể đa dòng kháng IgM người, IgG chuột bình thường hoặc kháng thể đơn dòng kháng IgM người mà bản thân kháng thể này không có

khả năng gây ra sự ngưng kết miễn dịch dựa vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể với IgM người trong dung dịch.

8. Phương pháp thử nghiệm miễn dịch để xác định lượng chất phân tích trong mẫu dựa vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể giữa chất phân tích và kháng thể thử nghiệm hoặc kháng nguyên thử nghiệm,

trong đó các phản ứng không đặc hiệu được kìm hãm bằng cách bổ sung kháng thể đơn dòng kháng IgM người mà phản ứng đặc hiệu với IgM người và bản thân kháng thể này có khả năng gây ra sự ngưng kết miễn dịch dựa vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể với IgM người trong dung dịch, hoặc đoạn chức năng thu được từ kháng thể kháng IgM người nêu trên,

trong đó đoạn chức năng chứa vùng Fab thu được từ kháng thể kháng IgM người nói trên,

và trong đó chất phân tích không phải là IgM người.

9. Phương pháp thử nghiệm miễn dịch theo điểm 8, trong đó kháng thể đơn dòng kháng IgM người được chọn từ (a) hoặc (b) dưới đây:

(a) kháng thể đơn dòng được tạo ra bởi tế bào lai FERM BP-11134;

(b) kháng thể mà có khả năng phản ứng chéo với kháng thể theo mục (a) ở trên.

10. Phương pháp thử nghiệm miễn dịch theo điểm 8 hoặc 9, trong đó kháng thể thử nghiệm hoặc kháng nguyên thử nghiệm được mang trên chất mang không hòa tan.

11. Phương pháp thử nghiệm miễn dịch theo điểm 10, trong đó chất mang không hòa tan bao gồm hạt latex, kim loại dạng keo hoặc silic oxit.

12. Phương pháp thử nghiệm miễn dịch theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 8 đến 11, trong đó kháng thể đơn dòng kháng IgM người được cho tiếp xúc với mẫu trước bước đưa kháng thể thử nghiệm hoặc kháng nguyên thử nghiệm tiếp xúc với mẫu này.

Fig.1

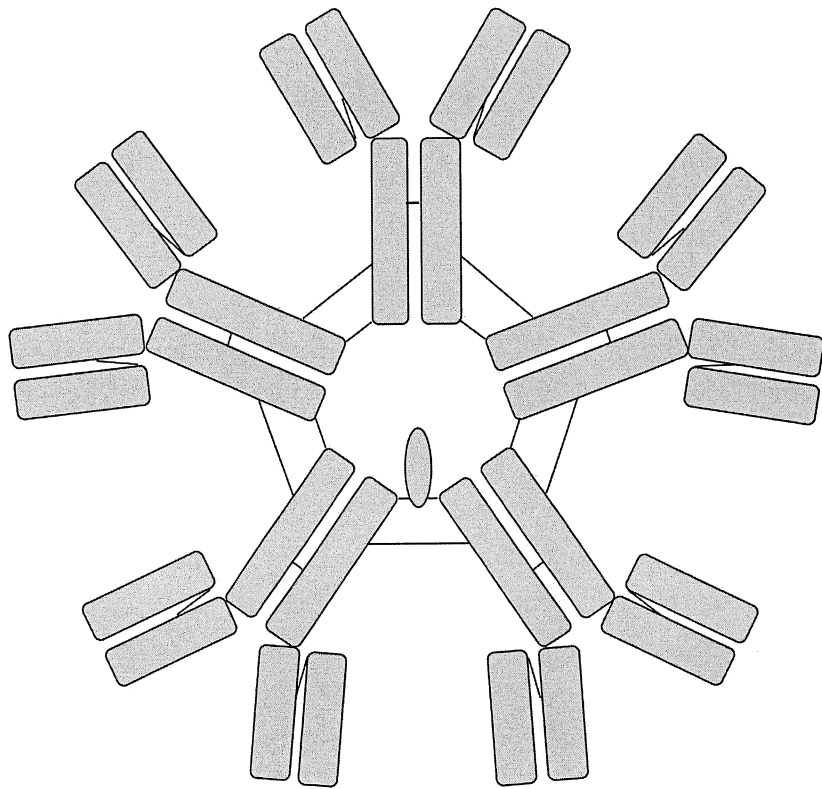


Fig.2

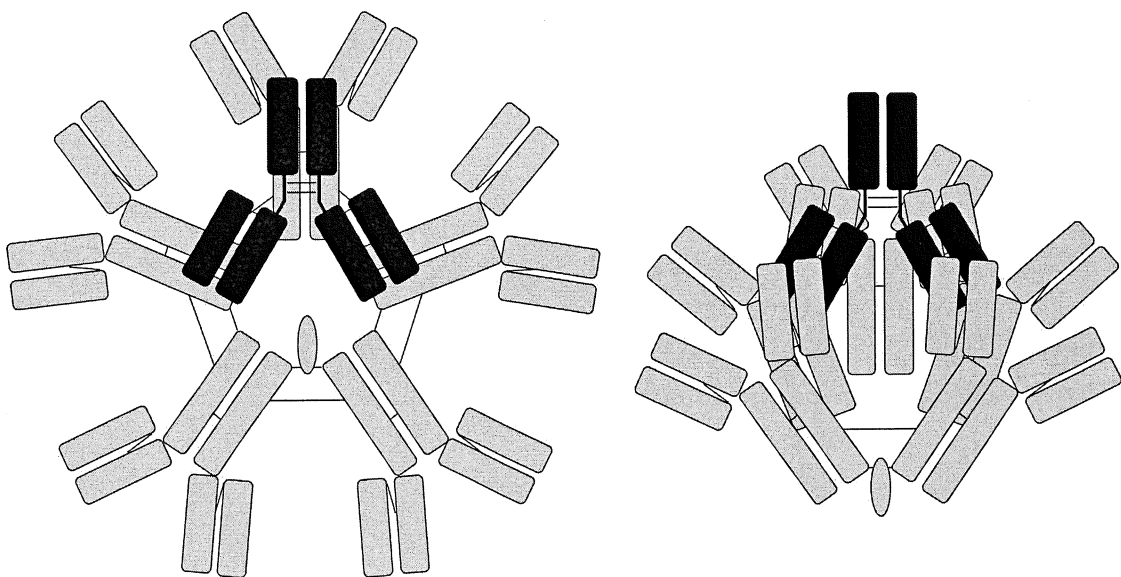


Fig.3

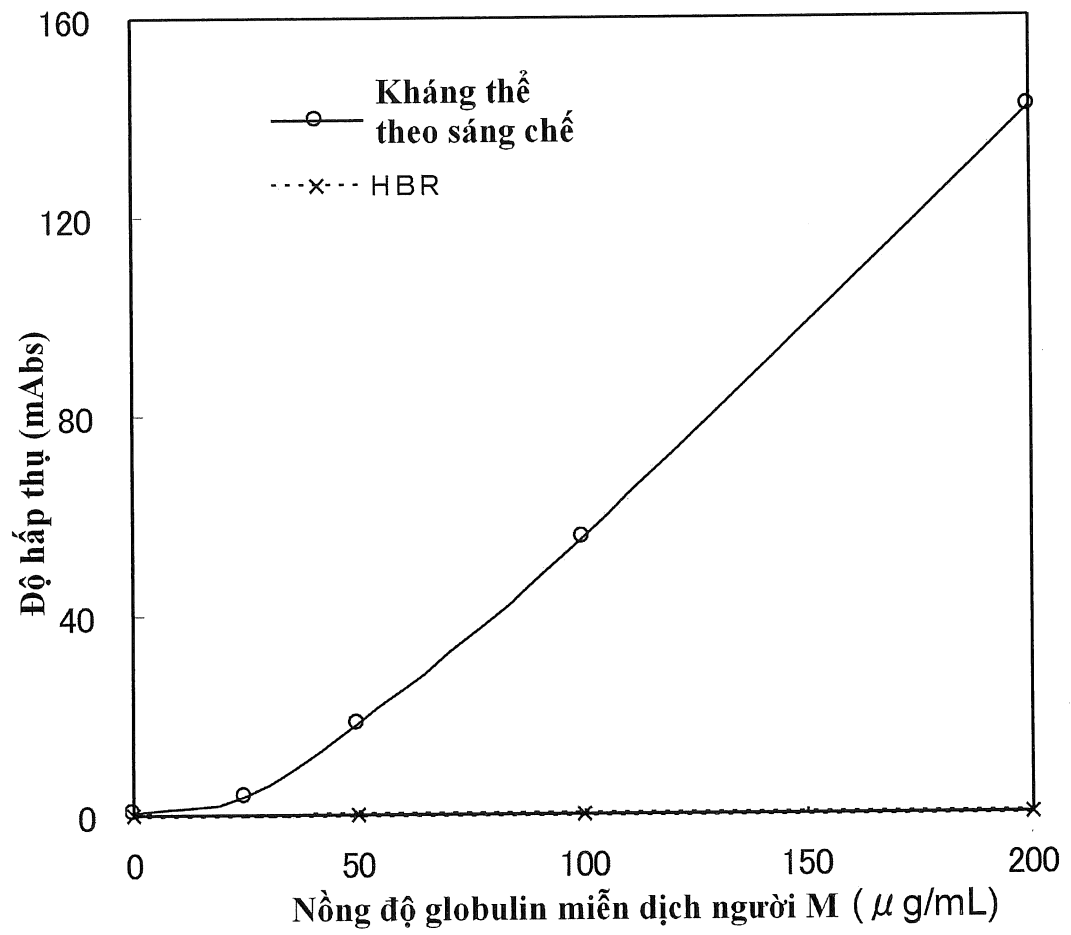


Fig.4

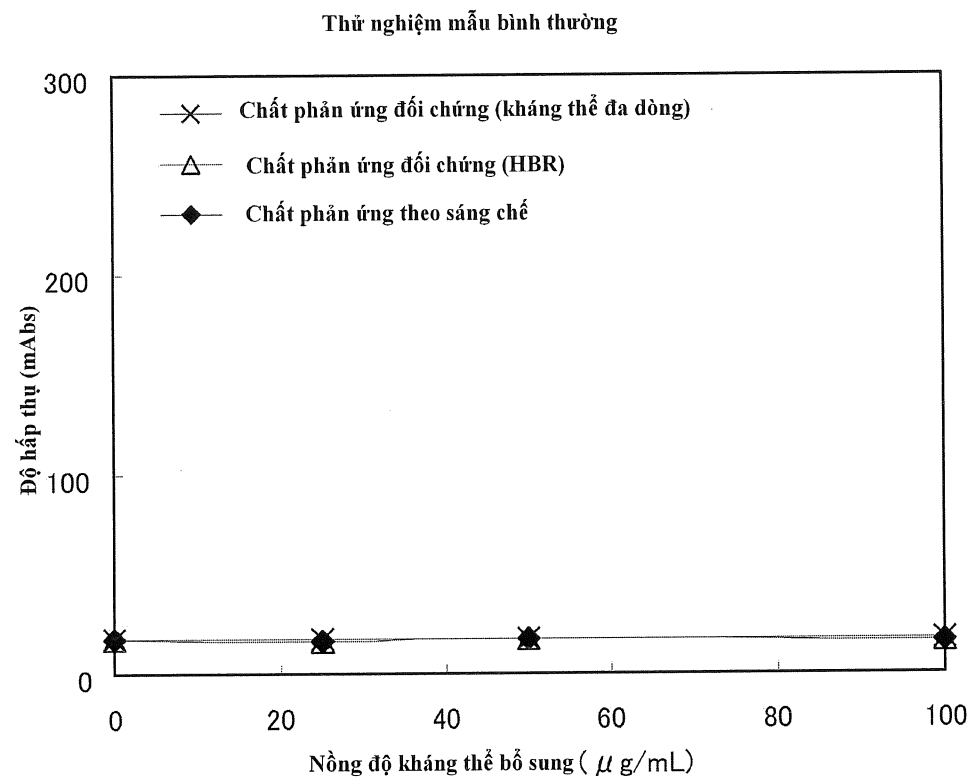


Fig.5

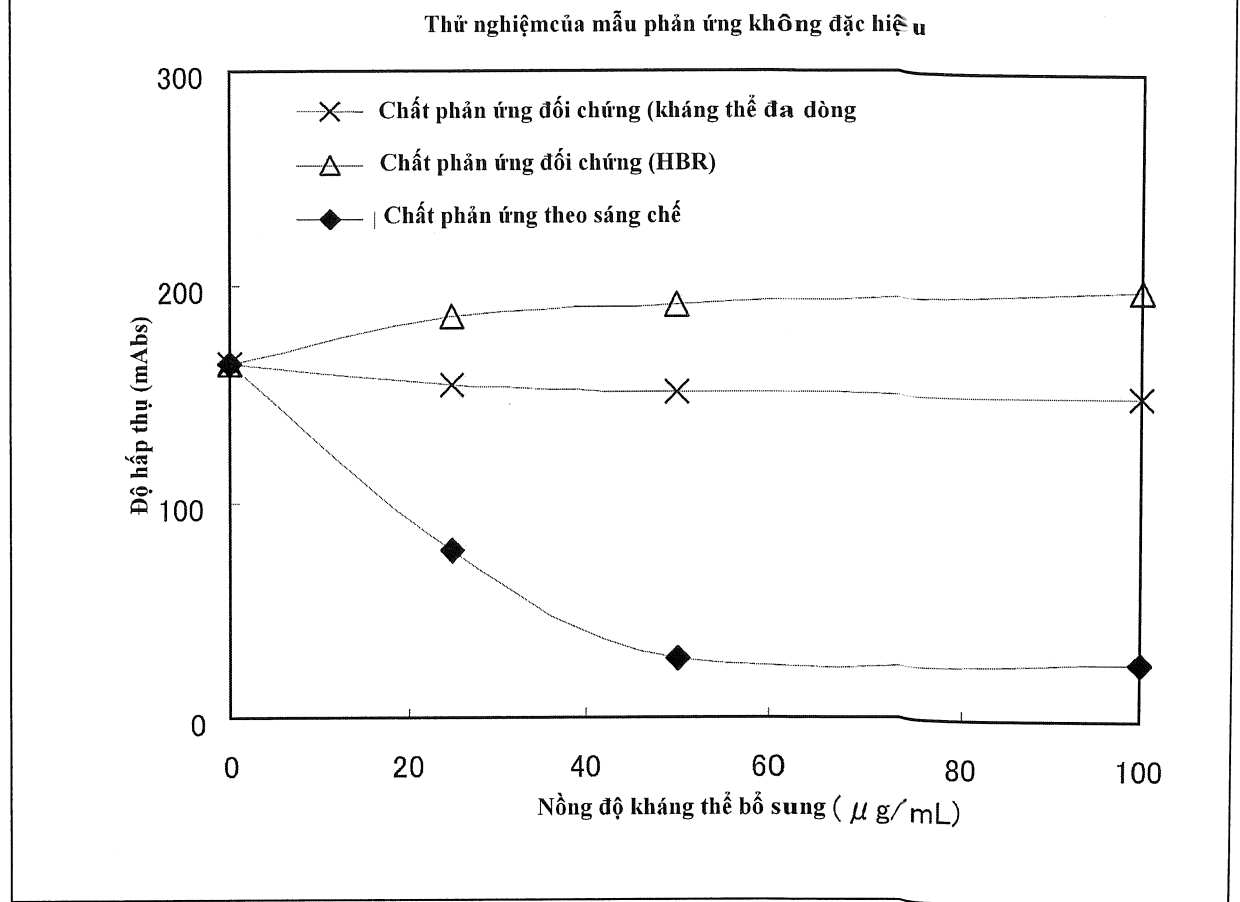


Fig.6

