



(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)



1-0025384

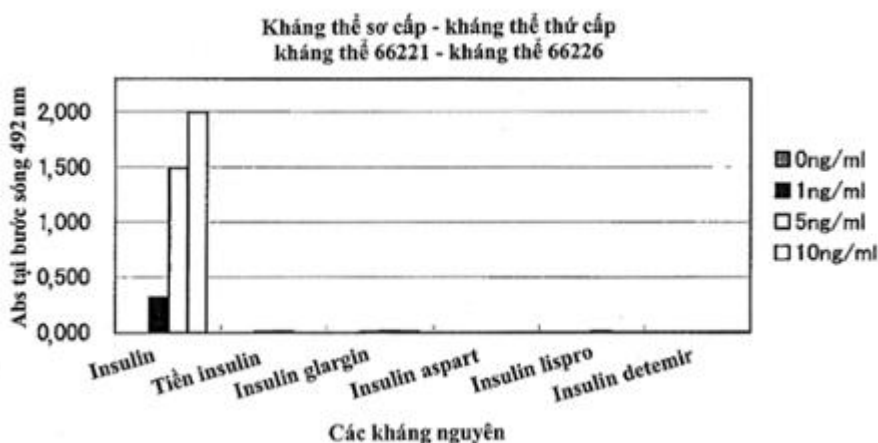
(51)⁷ G01N 33/53; G01N 33/545; G01N
33/543

(13) B

- (21) 1-2011-01168 (22) 21/07/2010
(86) PCT/JP2010/062261 21/07/2010 (87) WO 2011/010673 A1 27/01/2011
(30) 2009-170292 21/07/2009 JP
(45) 25/09/2020 390 (43) 25/08/2011 281A
(73) SEKISUI MEDICAL CO., LTD. (JP)
1-3, Nihonbashi 2-chome, Chuo-ku, Tokyo 1030027, Japan
(72) KONDOU, Junichi (JP); SHIMIZU, Tomo (JP); YAMAMOTO, Mitsuaki (JP);
NAKAMURA, Yasushi (JP).
(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) PHƯƠNG PHÁP XÉT NGHIỆM INSULIN VÀ CHẤT PHẢN ỨNG TRONG
PHƯƠNG PHÁP XÉT NGHIỆM INSULIN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp xét nghiệm đặc hiệu insulin và chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm có khả năng xét nghiệm insulin nhạy và đặc hiệu sử dụng kháng thể có đặc tính phản ứng với insulin liên kết với kháng thể kháng insulin trong khi không phản ứng với insulin không liên kết với kháng thể kháng insulin, mà không bị ảnh hưởng bởi tiền chất insulin và các chất tương tự insulin.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp xét nghiệm insulin và chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm insulin bằng phản ứng miễn dịch. Cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể mà phản ứng với insulin liên kết với kháng thể kháng insulin khác nhưng không phản ứng với insulin không liên kết với kháng thể kháng insulin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Insulin là một hormon peptit (phân tử lượng: xấp xỉ 5800) được tạo ra thông qua một tiền chất, tiền chất insulin, trong các tế bào beta ở các đảo tụy Langerhans. Insulin liên quan đến quá trình chuyển hóa đường, axit amin và mỡ, và về sinh lý nó có tác dụng quan trọng là làm giảm đường huyết. Tiểu đường là bệnh gây ra bởi sự tiết insulin không đủ do suy giảm hoặc tổn thương về chức năng của các tế bào beta hoặc do hoạt tính insulin không đầy đủ trong các mô ngoại vi. Do đó, việc xác định nồng độ insulin trong máu phản ánh chức năng tiết insulin của các tế bào beta là một chỉ số hữu dụng trong chẩn đoán và để hiểu được tình trạng lâm sàng của tiểu đường và xác định được nguyên nhân của dung nạp glucoza bất thường.

Các kỹ thuật sau đây là các phương pháp xét nghiệm insulin đã biết sử dụng các kháng thể đơn dòng.

Tài liệu sáng chế 1 bộc lộ phương pháp định lượng insulin trong thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA). Phương pháp xét nghiệm này sử dụng kháng thể đơn dòng liên kết với vật mang không hòa tan và kháng thể đơn dòng không cạnh tranh với kháng thể nêu trên về epitop được đánh dấu bằng một enzym.

Tài liệu sáng chế 2 bộc lộ phương pháp định lượng insulin trong thử nghiệm miễn dịch ngưng kết hạt. Phương pháp xét nghiệm này sử dụng hai

kháng thể đơn dòng có các vị trí nhận diện khác nhau và được liên kết với các vật mang không hòa tan.

Mặc dù cả hai tài liệu đều bộc lộ về các phương pháp xét nghiệm insulin sử dụng nhiều kháng thể đơn dòng có các vị trí nhận diện khác nhau đối với insulin, nhưng không tài liệu nào được thực hiện đề cập đến khả năng phản ứng chéo với tiền chất insulin hoặc các chất tương tự insulin, như các chế phẩm tương tự insulin. Do đó, vẫn còn chưa biết liệu insulin có thể được xác định một cách nhạy và đặc hiệu hay không.

Các tài liệu viện dẫn

Các tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm số H01-148962

Tài liệu sáng chế 2: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm số H03-118472

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề được giải quyết bởi sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp xét nghiệm đặc hiệu insulin và chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm có khả năng xét nghiệm insulin nhạy và đặc hiệu mà không bị ảnh hưởng bởi tiền chất insulin và các chất tương tự insulin.

Cách thức giải quyết vấn đề

Kết quả của quá trình nghiên cứu tích cực, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng, insulin có thể được xét nghiệm một cách nhạy và đặc hiệu mà không bị ảnh hưởng bởi tiền chất insulin và các chất tương tự insulin bằng cách kết hợp kháng thể đơn dòng thứ nhất phản ứng với insulin với kháng thể đơn dòng thứ hai phản ứng với insulin liên kết với kháng thể đơn dòng thứ nhất nhưng không phản ứng với insulin không liên kết với kháng thể đơn dòng thứ nhất. Bằng cách nghiên cứu thêm, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng, các

dạng thử nghiệm insulin khác nhau này có thể được thiết lập sử dụng các kháng thể phản ứng với insulin liên kết với các kháng thể kháng insulin (các phức insulin–kháng thể kháng insulin, sau đây đôi khi được gọi là “phức insulin–kháng thể”), bằng cách đó đã hoàn thành sáng chế. Do đó, sáng chế đề cập đến các nội dung sau:

[1] Phương pháp xét nghiệm insulin sử dụng kháng thể phản ứng với insulin liên kết với kháng thể kháng insulin nhưng không phản ứng với insulin không liên kết với kháng thể kháng insulin.

[2] Phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm [1], sử dụng hai loại kháng thể, trong đó

1) kháng thể thứ nhất phản ứng với insulin, và

2) kháng thể thứ hai phản ứng với insulin liên kết với kháng thể thứ nhất nhưng không phản ứng với insulin không liên kết với kháng thể thứ nhất.

[3] Phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm [2], trong đó cả hai kháng thể thứ nhất và thứ hai là các kháng thể đơn dòng.

[4] Phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm [2], trong đó kháng thể thứ nhất là kháng thể đa dòng và kháng thể thứ hai là kháng thể đơn dòng.

[5] Phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm [3], trong đó kháng thể đơn dòng thứ nhất bao gồm hai hoặc nhiều kháng thể đơn dòng có các vị trí nhận diện khác nhau.

[6] Phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [3] đến [5], trong đó ít nhất một trong số các kháng thể đơn dòng là kháng thể không phản ứng với tiền chất insulin hoặc các chất tương tự insulin.

[7] Phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [3] đến [6], trong đó kháng thể đơn dòng thứ hai là kháng thể không phản ứng với tiền chất insulin hoặc các chất tương tự insulin.

[8] Phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm [3], [5], [6], và [7], trong đó các kháng thể đơn dòng thứ nhất và thứ hai được cố

định lên nhựa latex và insulin được xét nghiệm bằng xét nghiệm ngưng kết miễn dịch trên latex.

[9] Phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm [3], [5], [6], và [7], trong đó kháng thể đơn dòng thứ nhất được cố định lên pha rắn, kháng thể đơn dòng thứ hai được đánh dấu bằng chất đánh dấu, và insulin được xét nghiệm bằng kỹ thuật ELISA.

[10] Phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm [3], [5], [6], và [7], trong đó kháng thể đơn dòng thứ nhất được đánh dấu bằng chất đánh dấu, kháng thể đơn dòng thứ hai được cố định lên pha rắn, và insulin được xét nghiệm bằng kỹ thuật ELISA hoặc kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

[11] Chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm insulin bao gồm kháng thể có khả năng phản ứng với insulin liên kết với kháng thể kháng insulin trong khi không phản ứng với insulin không liên kết với kháng thể kháng insulin.

[12] Chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm [11], bao gồm hai loại kháng thể, trong đó

1) kháng thể thứ nhất có đặc tính phản ứng với insulin, và

2) kháng thể thứ hai có đặc tính phản ứng với insulin liên kết với kháng thể thứ nhất nhưng không phản ứng với insulin không liên kết với kháng thể thứ nhất.

[13] Chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm [12], trong đó cả hai kháng thể thứ nhất và thứ hai là các kháng thể đơn dòng.

[14] Chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm [12], trong đó kháng thể thứ nhất là kháng thể đa dòng và kháng thể thứ hai là kháng thể đơn dòng.

[15] Chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm [13], trong đó kháng thể đơn dòng thứ nhất bao gồm hai hoặc nhiều kháng thể đơn dòng có các vị trí nhận diện khác nhau.

[16] Chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [13] đến [15], trong đó ít nhất một trong số các kháng thể đơn dòng là kháng thể không phản ứng với tiền chất insulin hoặc các chất tương tự insulin.

[17] Chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [13] đến [16], trong đó kháng thể đơn dòng thứ hai là kháng thể không phản ứng với tiền chất insulin hoặc các chất tương tự insulin.

[18] Chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm [13], [15], [16], và [17], trong đó các kháng thể đơn dòng thứ nhất và thứ hai được cố định trên nhựa latex và insulin được xét nghiệm bằng xét nghiệm ngưng kết miễn dịch trên latex.

[19] Chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm [13], [15], [16], và [17], trong đó kháng thể đơn dòng thứ nhất được cố định lên pha rắn, kháng thể đơn dòng thứ hai được đánh dấu bằng chất đánh dấu, và insulin được xét nghiệm bằng kỹ thuật ELISA.

[20] Chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm [13], [15], [16], và [17], trong đó kháng thể đơn dòng thứ nhất được đánh dấu bằng chất đánh dấu, kháng thể đơn dòng thứ hai được cố định lên pha rắn, và insulin được xét nghiệm bằng kỹ thuật ELISA hoặc kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

[21] Kháng thể đơn dòng có các đặc tính sau:

1) không phản ứng với insulin không liên kết với kháng thể kháng insulin, và

2) phản ứng với insulin liên kết với kháng thể kháng insulin.

[22] Kháng thể đơn dòng theo điểm [21], có thêm đặc tính không phản ứng với tiền chất insulin hoặc các chất tương tự insulin.

[23] Phương pháp sàng lọc các kháng thể đơn dòng bao gồm các bước sau:

1) lựa chọn kháng thể phản ứng với insulin, và

2) lựa chọn kháng thể đơn dòng phản ứng với insulin liên kết với kháng thể được lựa chọn trong bước 1) nhưng không phản ứng với insulin không liên kết với kháng thể nêu trên.

Hiệu quả của sáng chế

Bằng sáng chế, insulin có thể được xét nghiệm một cách nhạy và đặc hiệu mà không bị ảnh hưởng bởi tiền chất insulin và các chất tương tự insulin. Vì quá trình tiết insulin từ các tế bào beta có thể được giám sát theo dõi chính xác nhờ sáng chế, nên sáng chế cũng có thể được sử dụng để cung cấp hình ảnh về tình trạng lâm sàng của tiểu đường và do đó sẽ rất hữu ích.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là sơ đồ trình tự axit amin của insulin. Trong hình vẽ trên Fig. 1, từ (a) đến (e) biểu thị các biến thể về trình tự axit amin từ các chế phẩm tương tự insulin khác nhau chú ý đến khả năng phản ứng với các kháng thể theo sáng chế. Các ký tự chữ cái trong các vòng tròn trên Fig. 1 biểu thị các axit amin được thể hiện bằng một ký tự. Insulin lispro: (a) và (b) là “K-P” thay vì “P-K.” Insulin aspart: (a) là “D” thay vì “P.” Insulin glargin: (d) là “G” thay cho “N” và “RR” được bổ sung vào “T” của (c). Insulin detemir: (c) không phải là “T” và axit myristic ($C_{14}H_{28}O_2$) được bổ sung vào “K” của (b). Insulin glulisin: (b) là “E” thay cho “K” và (e) là “K” thay cho “N.”

Fig. 2 là sơ đồ về các kết quả của phương pháp xét nghiệm sử dụng Biacore (nhãn hiệu thương mại đăng ký) T100 để kiểm tra khả năng phản ứng của kháng thể 66221 với insulin.

Fig. 3 là sơ đồ về các kết quả của phương pháp xét nghiệm sử dụng Biacore (nhãn hiệu thương mại đăng ký) T100 để kiểm tra khả năng phản ứng của kháng thể 66226 với insulin.

Fig. 4-1 là sơ đồ về các kết quả của phương pháp xét nghiệm sử dụng Biacore (nhãn hiệu thương mại đăng ký) T100 để kiểm tra khả năng phản ứng của kháng thể 66221 với tiền chất insulin và các chế phẩm tương tự insulin khác

nhau. (a), (b), và (c) lần lượt là các kết quả của tiền chất insulin, insulin lispro, và insulin aspart.

Fig. 4-2 là sơ đồ như nêu trên. (d) và (e) lần lượt là các kết quả của insulin glargin và insulin detemir.

Fig. 5-1 là sơ đồ về các kết quả của phương pháp xét nghiệm sử dụng Biacore (nhãn hiệu thương mại đăng ký) T100 để kiểm tra khả năng phản ứng của kháng thể 66226 với tiền chất insulin và các chế phẩm tương tự insulin khác nhau. (a), (b), và (c) lần lượt là các kết quả của tiền chất insulin, insulin lispro, và insulin aspart.

Fig. 5-2 là tương tự như ở trên. (d) và (e) lần lượt là các kết quả của insulin glargin và insulin detemir.

Fig. 6 là sơ đồ thể hiện các kết quả của phương pháp xét nghiệm ELISA để kiểm tra khả năng phản ứng với insulin, tiền chất insulin, và các chế phẩm tương tự insulin khác nhau bằng cách sử dụng kháng thể 66221 và kháng thể 66226 lần lượt làm các kháng thể sơ cấp và thứ cấp, với kháng thể sơ cấp được tạo pha rắn trên đĩa.

Fig. 7 là sơ đồ kết quả của phương pháp xét nghiệm ELISA để kiểm tra khả năng phản ứng với insulin, tiền chất insulin, và các chế phẩm tương tự insulin khác nhau sử dụng kháng thể 66226 và kháng thể 66221 lần lượt làm các kháng thể sơ cấp và thứ cấp, với kháng thể sơ cấp được tạo pha rắn trên đĩa.

Fig. 8 là sơ đồ kết quả của phương pháp xét nghiệm sử dụng Biacore (nhãn hiệu thương mại đăng ký) T100 để kiểm tra khả năng phản ứng của kháng thể 66221 (a) và kháng thể 66226 (b) với chế phẩm tương tự insulin, insulin glulisin.

Fig. 9 là sơ đồ kết quả của phương pháp xét nghiệm ELISA để kiểm tra khả năng phản ứng với insulin, tiền chất insulin, và chế phẩm tương tự insulin, insulin glulisin, sử dụng kháng thể 66221 và kháng thể 66226 lần lượt làm các kháng thể sơ cấp và thứ cấp, với kháng thể sơ cấp được tạo pha rắn trên đĩa.

Fig. 10 là sơ đồ kết quả của phương pháp xét nghiệm ELISA để kiểm tra khả năng phản ứng với insulin, tiền chất insulin, và chế phẩm tương tự insulin, insulin glulisin, sử dụng kháng thể 66226 và kháng thể 66221 lần lượt làm các kháng thể sơ cấp và thứ cấp, với kháng thể sơ cấp được tạo pha rắn trên đĩa.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các phương án của sáng chế sẽ được mô tả bằng cách lấy phương án [3] mô tả sau đây làm ví dụ, đây là phương án đại diện của sáng chế. Phương án [3] được mô tả cụ thể như sau: “phương pháp xét nghiệm insulin sử dụng hai loại kháng thể đơn dòng, trong đó

(1) kháng thể đơn dòng thứ nhất phản ứng với insulin, và

(2) kháng thể đơn dòng thứ hai phản ứng với insulin liên kết với kháng thể đơn dòng thứ nhất và không liên kết với insulin không liên kết với kháng thể đơn dòng thứ nhất.”

Các kháng thể đơn dòng theo sáng chế bao gồm các kháng thể đơn dòng thứ nhất và thứ hai, và các kháng thể này được sử dụng kết hợp để xét nghiệm insulin. Kháng thể đơn dòng thứ nhất có thể là kháng thể đơn dòng bất kỳ với điều kiện nó phản ứng với insulin, và kháng thể này không những có thể là phân tử kháng thể đầy đủ mà còn là đoạn chức năng phản ứng với insulin, như đoạn Fab của kháng thể.

Kháng thể đơn dòng thứ hai có thể là kháng thể đơn dòng bất kỳ với điều kiện nó có các đặc tính 1) và 2) sau đây:

1) kháng thể đơn dòng thứ hai không phản ứng với insulin không liên kết với kháng thể đơn dòng thứ nhất, và

2) kháng thể đơn dòng thứ hai phản ứng với insulin liên kết với kháng thể đơn dòng thứ nhất.

Nếu như “kháng thể đơn dòng thứ hai phản ứng với insulin liên kết với kháng thể đơn dòng thứ nhất” như mô tả ở trên, thì tốt hơn là vị trí phản ứng (vị trí nhận diện) của kháng thể đơn dòng thứ hai nhận diện sự thay đổi về cấu trúc

của insulin được phát sinh bằng cách liên kết với kháng thể đơn dòng thứ nhất và phản ứng với insulin có cấu trúc thay đổi. Trong trường hợp này, “sự thay đổi về cấu trúc của insulin” biểu thị sự thay đổi về cấu trúc phát sinh độc lập trong chính phân tử insulin do sự hình thành phức hợp insulin–kháng thể hoặc cấu trúc bao gồm kháng thể và phân tử insulin hợp tác trong insulin liên kết với kháng thể.

Vì tốt hơn là phương pháp xét nghiệm theo sáng chế không bị ảnh hưởng bởi tiền chất insulin và các chất tương tự insulin, nên ít nhất một kháng thể đơn dòng tốt hơn không phản ứng với tiền chất insulin và các chất tương tự insulin. Các chất tương tự insulin cụ thể bao gồm các chế phẩm tương tự insulin như insulin lispro, insulin aspart, insulin glargin, insulin detemir, và insulin glulisin.

Một dạng của kháng thể đơn dòng thứ hai theo sáng chế có thể là kháng thể mà không phản ứng chéo với bất kỳ trong số các hợp chất này, và nếu kháng thể này được sử dụng trong phương pháp xét nghiệm insulin, thì insulin có thể được xác định đặc hiệu ngay cả khi có sự hiện diện của các hợp chất trong mẫu. Nếu như một trong số các kháng thể đơn dòng không phản ứng với tiền chất insulin và các chất tương tự insulin, thì kháng thể đơn dòng khác có thể phản ứng hoặc không phản ứng với các chất tương tự này.

Mặc dù các thuật ngữ diễn giải “phản ứng với” insulin, “nhận diện” insulin, “liên kết với” insulin, và “thể hiện khả năng phản ứng chéo với/phản ứng chéo với” insulin được sử dụng đồng nghĩa trong phần mô tả này, nhưng các cách diễn giải này phải được hiểu trong phạm vi rộng nhất không chỉ giới hạn trong các ví dụ minh họa này. Kháng thể có “phản ứng với” kháng nguyên (hợp chất) như insulin hay không có thể được xác định bằng kỹ thuật ELISA kháng nguyên pha rắn, ELISA cạnh tranh, và ELISA kiểu kẹp (sandwich) mô tả sau và cũng có thể được xác định bằng phương pháp sử dụng nguyên tắc của cộng hưởng plasmon bề mặt (phương pháp SPR). Phương pháp SPR có thể được tiến hành thực hiện sử dụng các thiết bị, các cảm biến, và các chất phản ứng có

sẵn trên thị trường với tên thương mại là Biacore (nhãn hiệu thương mại đăng ký).

Thông báo là kháng thể theo sáng chế “không phản ứng với” hợp chất ý nói rằng, kháng thể theo sáng chế cơ bản không phản ứng với hợp chất, trong khi thông báo là “cơ bản không phản ứng” ý nói rằng, khả năng phản ứng cao của kháng thể theo sáng chế không được nhận diện khi Biacore (nhãn hiệu thương mại đăng ký) T100 được sử dụng để cố định và xét nghiệm kháng thể theo sáng chế, ví dụ dựa trên phương pháp SPR. Cụ thể, có nghĩa là, khả năng phản ứng giữa kháng thể và hợp chất không khác với mức có ý nghĩa so với khả năng phản ứng trong phương pháp xét nghiệm đối chứng (không có hợp chất bổ sung). Đương nhiên có thể khẳng định rằng, kháng thể “cơ bản không phản ứng” với hợp chất bằng phương pháp đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực, ngoài phương pháp SPR.

Kháng thể theo sáng chế có thể nhận diện phân tử insulin đầy đủ hoặc một phần ở dạng kháng nguyên.

Kháng thể đơn dòng (kháng thể 66221) được tạo ra bởi tế bào lai (FERM BP-11233) có thể được viện dẫn cụ thể làm “kháng thể đơn dòng thứ nhất” và kháng thể đơn dòng khác (kháng thể 66226) được tạo ra bởi tế bào lai (FERM BP-11234) có thể được viện dẫn làm “kháng thể đơn dòng thứ hai”.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được tạo ra dễ dàng bằng cách hòa tan insulin ở dạng kháng nguyên (chất sinh miễn dịch) trong dung môi, như nước muối đệm phosphat (PBS), và sử dụng dung dịch này để gây miễn dịch cho động vật. Quá trình gây miễn dịch có thể được tiến hành thực hiện sử dụng dung dịch nhũ hóa sau khi bổ sung chất phụ gia thích hợp vào dung dịch khi cần thiết. Chất phụ gia có thể là chất phụ gia được sử dụng rộng rãi, như nhũ tương nước trong dầu, nhũ tương nước trong dầu trong nước, nhũ tương dầu trong nước, liposome, hoặc gel nhôm hydroxit cũng như protein hoặc chất peptit thu được từ các thành phần sinh học. Ví dụ, chất phụ gia đầy đủ hoặc không đầy đủ của Freund có thể được sử dụng theo cách ưu tiên hơn. Mặc dù không bị giới hạn cụ

thể, nhưng tốt hơn là đường sử dụng, liều lượng sử dụng, và thời gian sử dụng chất phụ gia được lựa chọn thích hợp sao cho đáp ứng miễn dịch mong muốn có thể được tăng cường ở động vật được gây miễn dịch bằng kháng nguyên.

Mặc dù việc lựa chọn động vật sử dụng để gây miễn dịch không bị giới hạn cụ thể, nhưng tốt hơn là động vật có vú và có thể là chuột nhắt, chuột, bò, thỏ, dê, và cừu, mặc dù chuột được ưu tiên hơn. Động vật có thể được gây miễn dịch theo kỹ thuật thông thường, ví dụ, quá trình gây miễn dịch có thể thu được bằng cách tiêm theo đường dưới da, trong da, trong tĩnh mạch, hoặc theo đường trong phúc mạc của động vật bằng dung dịch kháng nguyên, tốt hơn là hỗn hợp với chất phụ gia. Vì đáp ứng miễn dịch thông thường khác nhau tùy thuộc vào kiểu và chủng động vật được gây miễn dịch, nên tốt hơn là phác đồ gây miễn dịch được thiết đặt thích hợp tùy thuộc vào động vật được sử dụng. Tốt hơn là, việc sử dụng kháng nguyên được lặp lại vài lần sau gây miễn dịch lần đầu.

Bản thân chính phương pháp tạo ra kháng thể đơn dòng có thể được tiến hành thực hiện theo phương pháp, ví dụ được mô tả trong tài liệu *Antibodies, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988)). Các thao tác tiếp theo sau đó được thực hiện để thu được kháng thể đơn dòng, nhưng các thao tác này không bị giới hạn.

Sau khi gây miễn dịch lần đầu, tế bào lai có thể được tạo ra bằng cách chiết các tế bào lách hoặc hạch lymphô, đây là các tế bào sinh kháng thể, từ động vật đã gây miễn dịch và bằng cách dung hợp các tế bào này với các tế bào u tủy tăng sinh. Tốt hơn là các tế bào có khả năng sinh kháng thể cao (định lượng và định tính) được sử dụng để dung hợp tế bào và các tế bào u tủy là tương thích với động vật mà các tế bào sinh kháng thể cần dung hợp có nguồn gốc từ động vật này. Quá trình dung hợp tế bào có thể được tiến hành thực hiện theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực, và phương pháp polyetylen glycol, phương pháp sử dụng virus Sendai, hoặc phương pháp sử dụng dòng điện có thể được sử dụng. Tế bào lai thu được có thể được làm tăng sinh theo phương pháp đã biết, và tế bào lai mong muốn có thể được lựa chọn trong khi nhận dạng đặc

tính của kháng thể tạo ra. Tế bào lai có thể được tách dòng bằng phương pháp đã biết như phương pháp pha loãng giới hạn hoặc phương pháp thạch agar mềm.

Việc lựa chọn tế bào lai sinh kháng thể đơn dòng thứ nhất sẽ được mô tả.

Tế bào lai có thể được lựa chọn một cách hiệu quả ở giai đoạn lựa chọn, xem xét điều kiện trong đó kháng thể tạo ra thực tiễn được sử dụng trong phương pháp xét nghiệm. Ví dụ, tế bào lai có thể thu được bằng cách lựa chọn tế bào lai tạo ra kháng thể phản ứng với insulin thông qua phương pháp ELISA hoặc RIA. Cụ thể, trước tiên, phương pháp ELISA kháng nguyên pha rắn, cho kháng thể đơn dòng ở lớp nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy phản ứng với insulin tạo pha rắn và sau đó cho các kháng thể kháng IgG đánh dấu phản ứng với insulin tạo pha rắn, được sử dụng để lựa chọn tế bào lai tạo ra kháng thể đơn dòng phản ứng mạnh với insulin.

Kháng thể đơn dòng có đặc tính mong muốn có thể được tạo ra bằng cách nuôi cấy với số lượng lớn tế bào lai được lựa chọn theo cách này. Phương pháp nuôi cấy với số lượng lớn không bị giới hạn cụ thể và có thể bao gồm, ví dụ, phương pháp tạo ra kháng thể đơn dòng trong môi trường nuôi cấy bằng cách nuôi cấy tế bào lai trong môi trường nuôi cấy thích hợp và phương pháp tạo ra kháng thể trong dịch ổ bụng bằng cách tiêm tế bào lai vào khoang bụng của động vật có vú để gây tăng sinh. Kháng thể đơn dòng có thể được tinh chế bằng cách kết hợp một cách thích hợp phương pháp sắc ký trao đổi anion, phương pháp sắc ký ái tính, phương pháp cất phân đoạn amoni sulfat, phương pháp cất phân đoạn PEG, và phương pháp cất phân đoạn etanol.

Tế bào lai sinh kháng thể đơn dòng thứ hai có thể được lựa chọn bằng cách kết hợp một cách thích hợp các phương pháp sau: phương pháp lựa chọn sử dụng insulin liên kết với kháng thể đơn dòng thứ nhất thay cho insulin tạo pha rắn được sử dụng trong trường hợp lựa chọn tế bào lai sinh kháng thể đơn dòng thứ nhất (phương pháp trong đó insulin được liên kết với kháng thể đơn dòng tạo pha rắn thứ nhất để quan sát sự hình thành sandwich với ứng cử kháng thể đơn dòng thứ hai), phương pháp lựa chọn trong đó ứng cử của kháng thể đơn dòng

thứ hai được tạo pha rắn để quan sát khả năng phản ứng với phức hợp insulin–kháng thể tạo ra bằng cách ủ kháng thể đơn dòng thứ nhất và insulin trước, hoặc phương pháp trong đó các kháng thể không thể hiện khả năng phản ứng với insulin được lựa chọn sử dụng Biacore (nhãn hiệu thương mại đăng ký) T100 để nhận diện.

Các kháng thể theo sáng chế có thể là các phân tử kháng thể đầy đủ cũng như các đoạn chức năng có hoạt tính phản ứng kháng nguyên–kháng thể. Các kháng thể có thể là các kháng thể thu được thông qua quá trình gây miễn dịch các động vật, bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen, hoặc các kháng thể khảm. Các đoạn chức năng của các kháng thể bao gồm $F(ab')_2$ và Fab' , và các đoạn chức năng này có thể được tạo ra bằng cách xử lý các kháng thể thu được như mô tả ở trên bằng một enzym phân hủy protein (ví dụ, pepsin hoặc papain).

Một hoặc cả hai kháng thể đơn dòng thứ nhất và thứ hai theo sáng chế có thể được cố định trên vật mang không hòa tan hoặc được đánh dấu bằng chất đánh dấu đã biết và được sử dụng thông thường, chất đánh dấu này sẽ được mô tả sau. Chúng tôi gọi các kháng thể này lần lượt là “các kháng thể cố định (pha rắn)” và các kháng thể đánh dấu. Các kháng thể cố định hoặc đánh dấu này được bao gồm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế. Ví dụ, kháng thể cố định có thể được tạo ra bằng cách làm cho vật mang không hòa tan hấp phụ theo kiểu vật lý hoặc liên kết theo kiểu hóa học với kháng thể đơn dòng (chất đệm thích hợp có thể tồn tại giữa chúng). Vật mang không hòa tan có thể được tạo ra từ nguyên liệu gốc polyme như nhựa polystyren, nguyên liệu gốc vô cơ như thủy tinh, và nguyên liệu gốc polysacarit như xenluloza và agaroza, và hình dạng không bị giới hạn cụ thể và có thể được lựa chọn tùy ý. Ví dụ, vật mang không hòa tan có thể ở dạng hình đĩa (ví dụ, vi đĩa và màng), dạng hạt, hạt (ví dụ, các hạt latex và các hạt vàng dạng keo), hoặc dạng trụ (ví dụ, ống xét nghiệm).

Lượng insulin trong mẫu có thể được xác định sử dụng kháng thể đánh dấu, như protein A hoặc G đánh dấu, các loại này có thể liên kết với kháng thể đơn dòng thứ hai theo sáng chế. Các chất đánh dấu của các kháng thể bao gồm

các enzym, các chất huỳnh quang, các chất phát quang hóa học, biotin, avidin, các chất đồng vị phóng xạ, các hạt vàng dạng keo, và nhựa latex màu. Các chất đánh dấu có thể được liên kết với các kháng thể bằng các phương pháp thông thường, như glutaraldehyt, maleimit, pyridyl disulfit, hoặc phương pháp axit định kỳ. Tuy nhiên, các kiểu kháng thể cố định hoặc đánh dấu và các phương pháp sản xuất không bị giới hạn bởi các kháng thể và các phương pháp được mô tả ở trên. Ví dụ, khi enzym như peroxidaza hoặc phosphataza kiềm được sử dụng làm chất đánh dấu, thì hoạt tính enzym có thể được xét nghiệm sử dụng chất nền đặc hiệu của enzym, ví dụ, o-phenylendiamin (OPD) hoặc 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin cho peroxidaza cải ngựa (HRP), và p-nitrophenyl phosphat cho ALP. Khi biotin được sử dụng làm chất đánh dấu, ít nhất avidin hoặc avidin cải biến bằng enzym thông thường được sử dụng trong phản ứng.

Trong phần mô tả này, “vật mang không hòa tan” có thể được thể hiện ở dạng “pha rắn” và mang kháng nguyên hoặc kháng thể theo kiểu vật lý hoặc hóa học bằng vật mang không hòa tan hoặc trạng thái mang có thể được biểu thị là “cố định,” “được cố định,” “pha rắn,” “tính nhạy,” hoặc “sự hấp phụ”. Thuật ngữ “phát hiện” hoặc “xác định” cần được hiểu theo nghĩa rộng nhất, bao gồm bằng chứng tồn tại và/hoặc việc định lượng insulin.

“Các mẫu” chứa chất phân tích cần được phát hiện trong phương pháp xét nghiệm sử dụng các kháng thể theo sáng chế chủ yếu có thể là các dịch cơ thể thu được từ cơ thể sống (sinh vật). Các dịch cơ thể cụ thể có thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn bởi, máu (máu toàn phần), huyết thanh, huyết tương, nước tiểu, nước bọt, đờm dãi, dịch chiết của tụy, nước mắt, dịch ở tai, và dịch tiền liệt tuyến.

Dạng của chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm (bộ dụng cụ) được cung cấp bởi sáng chế không bị giới hạn cụ thể với điều kiện chất phản ứng có khả năng phân tích xét nghiệm insulin. Các phương pháp xét nghiệm miễn dịch đánh dấu đại diện, tức là kỹ thuật ELISA và kỹ thuật sắc ký miễn dịch, và xét nghiệm miễn dịch ngưng kết hạt đại diện, tức là xét nghiệm ngưng

kết miễn dịch trên latex (LITA) sau đây sẽ được xem là các ví dụ và sẽ được mô tả.

Xét nghiệm miễn dịch liên kết đánh dấu: ELISA

Dạng của chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm (bộ dụng cụ) để phát hiện insulin có mặt trong mẫu có thể bao gồm các yếu tố sau:

(a) pha rắn (như đĩa chẳng hạn) với kháng thể đơn dòng thứ nhất được cố định, và

(b) kháng thể đơn dòng thứ hai được đánh dấu bằng chất đánh dấu.

Pha rắn (như đĩa chẳng hạn) với kháng thể đơn dòng thứ nhất được cố định bấy giữ insulin trong mẫu để tạo ra phức hợp insulin–kháng thể. Kháng thể đơn dòng thứ hai được đánh dấu bằng chất đánh dấu phản ứng với phức hợp insulin–kháng thể để tạo ra sandwich, và insulin trong mẫu có thể được phân tích xét nghiệm bằng cách xác định lượng chất đánh dấu bằng phương pháp thích hợp với chất đánh dấu. Đối với các phương pháp cụ thể để cấu hình chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm (bộ dụng cụ), như phương pháp cố định kháng thể đơn dòng thứ nhất vào pha rắn và phương pháp đánh dấu kháng thể đơn dòng thứ hai bằng chất đánh dấu, các kỹ thuật đã biết có thể được sử dụng không giới hạn, ngoài các phương pháp được mô tả ở đây. Mặc dù cấu hình này có thể được tạo ra như một hệ thống xét nghiệm đồng nhất, nhưng tốt hơn cấu hình được tạo ra ở dạng hệ thống xét nghiệm không đồng nhất.

Phương án [19] có thể được khuyến cáo là dạng đặc biệt được ưu tiên (chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm [13], [15], [16], và [17], trong đó kháng thể đơn dòng thứ nhất được cố định lên pha rắn, kháng thể đơn dòng thứ hai được đánh dấu bằng chất đánh dấu, và insulin được xét nghiệm bằng kỹ thuật ELISA).

Xem xét tính nhạy và tính đặc hiệu của chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm, cấu hình ngược lại với cấu hình nêu trên có thể được sử dụng như sau:

- (a) kháng thể đơn dòng thứ nhất được đánh dấu bằng chất đánh dấu, và
- (b) pha rắn (như đĩa chẳng hạn) với kháng thể đơn dòng thứ hai được cố định.

Trong trường hợp cấu hình này, mẫu xét nghiệm tốt hơn được kết hợp với dung dịch chứa kháng thể đơn dòng thứ nhất được đánh dấu bằng chất đánh dấu để tạo ra phức hợp insulin–kháng thể trong dung dịch trước, và phức hợp insulin–kháng thể được bổ sung vào pha rắn với kháng thể đơn dòng thứ hai được cố định. Trong cấu hình này, với mục đích tăng cường tính nhạy, hai hoặc nhiều kháng thể đơn dòng có các vị trí nhận diện khác nhau có thể được sử dụng theo cách ưu tiên làm kháng thể đơn dòng thứ nhất được đánh dấu bằng chất đánh dấu, tức là phương án [15] (chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm insulin theo phương án [13], trong đó kháng thể đơn dòng thứ nhất bao gồm hai hoặc nhiều kháng thể đơn dòng có các vị trí nhận diện khác nhau).

Phương án [20] có thể được khuyến cáo là dạng được ưu tiên đặc biệt (chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm [13], [15], [16], và [17], trong đó kháng thể đơn dòng thứ nhất được đánh dấu bằng chất đánh dấu, kháng thể đơn dòng thứ hai được cố định lên pha rắn, và insulin được xét nghiệm bằng kỹ thuật ELISA).

Xét nghiệm miễn dịch liên kết đánh dấu: Kỹ thuật sắc ký miễn dịch

Kỹ thuật sắc ký miễn dịch điển hình được cấu hình sao cho, theo trình tự của khoảng cách từ mép theo chiều dọc trên giá đỡ pha rắn dạng phiến như màng, dung dịch mẫu xét nghiệm dịch chuyển liên tục do bởi tính mao dẫn (hiện tượng mao dẫn) qua: “1. vị trí nạp mẫu,” “2. vị trí chất phản ứng đánh dấu giữ, theo cách có thể lan rộng được trên màng, chất phản ứng đánh dấu chứa kháng thể đơn dòng thứ nhất (kháng thể đơn dòng thứ nhất được đánh dấu bằng chất đánh dấu như các hạt vàng dạng keo),” và “3. vị trí chất phản ứng bẫy giữ với kháng thể đơn dòng thứ hai được cố định để bẫy giữ phức của kháng thể đơn dòng thứ nhất được đánh dấu bằng chất đánh dấu và insulin”.

Cụ thể, khi lượng xác định trước của mẫu xét nghiệm chứa insulin được bổ sung vào vị trí nạp mẫu, mẫu xâm nhập vị trí chất phản ứng đánh dấu trong tiến trình lan rộng và di chuyển lên giá đỡ pha rắn, và insulin liên kết với chất phản ứng đánh dấu (chứa kháng thể đơn dòng thứ nhất) để tạo ra phức hợp chất phản ứng đánh dấu–insulin (phức hợp chất phản ứng đánh dấu–insulin). Phức hợp chất phản ứng đánh dấu–insulin tiếp tục lan rộng và di chuyển lên màng, và khi xâm nhập vào vị trí chất phản ứng bẫy giữ trên màng, phức hợp chứa kháng thể đơn dòng thứ hai, phức hợp được bẫy giữ bởi chất phản ứng bẫy giữ cố định trên giá đỡ pha rắn để tạo ra phức hợp chất phản ứng bẫy giữ (kháng thể đơn dòng thứ hai)–insulin–chất phản ứng đánh dấu (kháng thể đơn dòng thứ nhất) tại vị trí. Sự hiện diện của chất phân tích có thể được xác định bằng cách phát hiện chất phản ứng đánh dấu bằng phương pháp tùy theo lựa chọn, ví dụ, phát hiện sự xuất hiện ngưng kết (ảnh/hình ảnh ngưng kết) trong trường hợp các hạt vàng dạng keo có thể nhìn thấy và phát hiện phản ứng tạo màu do việc bổ sung chất nền trong trường hợp enzym.

Mặc dù có những mô tả riêng biệt đối với “1. vị trí nạp mẫu” và “2. vị trí chất phản ứng đánh dấu giữ, theo cách có thể lan rộng được trên màng, chất phản ứng đánh dấu chứa kháng thể đơn dòng thứ nhất (kháng thể đơn dòng thứ nhất được đánh dấu bằng chất đánh dấu như các hạt vàng dạng keo)” theo trình tự chiều dịch chuyển của mẫu xét nghiệm để dễ hiểu, song các chuyên gia trong lĩnh vực có thể dễ dàng hiểu rằng, các dạng/cấu hình đã biết có thể được sử dụng, như cấu trúc xếp chồng theo trình tự “1” và “2” tính từ trên.

Trong kỹ thuật sắc ký miễn dịch, phức hợp insulin–kháng thể được tạo ra tại thời điểm mẫu xét nghiệm di chuyển sang “2. vị trí chất phản ứng đánh dấu giữ, theo cách có thể lan rộng được trên màng, chất phản ứng đánh dấu chứa kháng thể đơn dòng thứ nhất (kháng thể đơn dòng thứ nhất được đánh dấu bằng chất đánh dấu như các hạt vàng dạng keo),” và do đó, theo quan điểm tăng cường tính nhạy, như trong trường hợp ELISA, hai hoặc nhiều kháng thể đơn dòng có các vị trí nhận diện khác nhau có thể được sử dụng theo cách ưu tiên làm kháng thể đơn dòng thứ nhất được đánh dấu bằng chất đánh dấu, tức là,

phương án [15] (chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm [13], trong đó kháng thể đơn dòng thứ nhất bao gồm hai hoặc nhiều kháng thể đơn dòng có các vị trí nhận diện khác nhau).

Phương án [20] có thể được khuyến cáo là dạng được ưu tiên đặc biệt (chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm [13], [15], [16], và [17], trong đó kháng thể đơn dòng thứ nhất được đánh dấu bằng chất đánh dấu, kháng thể đơn dòng thứ hai được cố định lên pha rắn, và insulin được xét nghiệm bằng kỹ thuật sắc ký miễn dịch).

Xét nghiệm miễn dịch đo độ đục: LTIA

Bốn phương án từ A đến D về chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm (bộ dụng cụ) để phát hiện insulin có mặt trong mẫu có thể bao gồm các phương án sau:

A. (a) các hạt latex với kháng thể đơn dòng thứ nhất được cố định và (b) các hạt latex với kháng thể đơn dòng thứ hai được cố định;

B. (a) các hạt latex với kháng thể đơn dòng thứ nhất được cố định và (b) kháng thể đơn dòng thứ hai;

C. (a) kháng thể đơn dòng thứ nhất và (b) các hạt latex với kháng thể đơn dòng thứ hai được cố định; và

D. (a) các hạt latex với cả hai kháng thể đơn dòng thứ nhất và thứ hai được cố định.

Các chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm này (các bộ dụng cụ) có thể được sử dụng trong LTIA theo cách ưu tiên. Các hạt latex được sử dụng trong các phần từ A đến D có thể được lựa chọn thích hợp theo đường kính hạt và kiểu hạt để thu được khả năng mong muốn, như tính nhạy gia tăng. Các hạt latex có thể là các hạt thích hợp để mang kháng nguyên hoặc kháng thể. Ví dụ, các hạt latex có thể thuộc loại polystyren, copolyme styren–axit sulfonic (sulfonat), copolyme styren–axit metacrylic, copolyme acrylonitril–butadien–styren, copolyme vinyl clorua– este acrylic, hoặc copolyme vinyl axetat–este

của axit acrylic. Mặc dù hình dạng của các hạt latex không bị giới hạn cụ thể, nhưng tốt hơn là đường kính hạt trung bình được xác định sao cho khối kết tập tạo ra, là kết quả của phản ứng kết dính giữa kháng thể (hoặc kháng nguyên) lên bề mặt hạt latex và chất phân tích, có kích thước đủ để được phát hiện bằng mắt hoặc quang học. Đường kính hạt trung bình tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,02 đến 1,6 μ m và tốt nhất nằm trong khoảng từ 0,03 đến 0,5 μ m. Các hạt được tạo ra từ keo kim loại, gelatin, liposome, vi hạt, đioxit silic, alumin, muối than, hợp chất kim loại, kim loại, gốm, hoặc nguyên liệu từ tính có thể được sử dụng thay cho các hạt latex.

Ví dụ, chất phản ứng của LTIA được sử dụng trong các thăm khám lâm sàng thông thường được cung cấp ở dạng các dung dịch chất phản ứng thứ nhất và thứ hai, các dung dịch này được kết hợp tuần tự với mẫu xét nghiệm đang sử dụng. Một hoặc cả (a) và (b) ở mỗi một trong số các dạng từ A đến D có thể được bao gồm trong dung dịch chất phản ứng thứ nhất hoặc thứ hai. Các phương pháp bao gồm (a) và (b) có thể được lựa chọn thích hợp tùy thuộc vào các chi tiết của thiết bị xác định trong thăm khám lâm sàng và thiết kế của chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm (như khả năng và tính khả dụng). Mặc dù, tốt hơn là cả (a) và (b) của dạng A được bao gồm trong chất phản ứng thứ hai, nhưng (a) và (b) của dạng A cũng có thể được bao gồm lần lượt trong các chất phản ứng thứ nhất và thứ hai, theo cách ưu tiên hơn.

Phương án [18] có thể được khuyến cáo là dạng đặc biệt được ưu tiên (chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm [13], [15], [16], và [17], trong đó các kháng thể đơn dòng thứ nhất và thứ hai được cố định lên latex và insulin được xét nghiệm bằng xét nghiệm ngưng kết miễn dịch trên latex).

Mặc dù các phương án theo sáng chế đã được mô tả lấy phương án [3] làm ví dụ, đây là dạng đại diện của sáng chế, nhưng các chuyên gia trong lĩnh vực hiển nhiên có thể hiểu rằng, sáng chế có thể được thực hiện theo các phương án khác nhau, ví dụ, sử dụng kháng thể đa dòng cho kháng thể thứ nhất, theo

phương án [4], và hai hoặc nhiều kháng thể đơn dòng có các vị trí nhận diện khác nhau cho kháng thể thứ nhất, theo phương án [5], với điều kiện là kháng thể của “phức hợp insulin–kháng thể” được sử dụng.

Mặc dù sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn kết hợp tham khảo các ví dụ, nhưng sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ xét nghiệm thứ nhất

Phương pháp tạo ra kháng thể đơn dòng theo sáng chế

1. Điều chế kháng nguyên gây miễn dịch

Sau khi insulin người (Fitzgerald Industries International, 30-AI51) được kết hợp theo tỷ lệ 1:1 với chất phụ gia Freund đầy đủ (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), các bơm kết nối được sử dụng để tạo ra nhũ tương để được sử dụng làm kháng nguyên gây miễn dịch.

2. Sự tạo ra tế bào lai

Kháng nguyên gây miễn dịch được tiêm theo đường dưới da vào các vùng lưng của chuột cái BALB/c (từ 20 đến 50 μ g cho mỗi chuột). Quá trình gây miễn dịch được lặp lại hai lần mỗi tuần. Sau thời gian ba tuần tính từ khi bắt đầu quá trình gây miễn dịch, lách được lấy ra khỏi chuột có hiệu giá kháng thể cao trong mẫu máu, và quá trình dung hợp tế bào được tiến hành thực hiện theo phương thức thông thường sử dụng PEG 1450 50% (Sigma). Các tế bào u tủy SP2/O được sử dụng. Các tế bào dung hợp tạo ra được tạo huyền phù ở nồng độ $2,5 \times 10^6$ /mL (là các tế bào lách) trong môi trường RPMI 1640 chứa HAT, huyết thanh bào thai bò 15%, và dung dịch bổ sung tách dòng tế bào lai BM-Condimed H1 10% (Roche Diagnostics K.K.) được phân bố vào trong đĩa nuôi cấy 96 lỗ với các phần phân ước 0,2mL. Các tế bào dung hợp được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ chứa 5% CO₂.

3. Sàng lọc tế bào lai sinh kháng thể đơn dòng thứ nhất

Sau thời gian 7 ngày tính từ khi dung hợp tế bào, lớp nổi trên bề mặt nuôi cấy được sử dụng để tiến hành thực hiện kỹ thuật ELISA kháng nguyên pha rắn mô tả sau đây như là quá trình sàng lọc sơ cấp để lựa chọn các lỗ thể hiện khả năng phản ứng cao với insulin làm các lỗ dương tính sơ cấp. Các tế bào ở các lỗ dương tính sơ cấp được cấy chuyển hàng loạt vào trong đĩa 24 lỗ. Sau thời gian 2 ngày nuôi cấy hàng loạt, lớp nổi trên bề mặt nuôi cấy được sử dụng để tiến hành thực hiện kỹ thuật ELISA cạnh tranh mô tả sau đây như là quá trình sàng lọc thứ cấp để lựa chọn các lỗ thể hiện khả năng phản ứng cao với insulin làm các lỗ dương tính thứ cấp.

3-1. Sự tạo ra đĩa ELISA kháng nguyên pha rắn

Insulin được điều chế ở nồng độ 1µg/mL bằng PBS 10mM (pH = 7,2) chứa natri clorua 150mM được tạo pha rắn làm kháng nguyên sàng lọc trên đĩa 96 lỗ ở nồng độ 50µL/lỗ và được để yên qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Sau khi rửa ba lần bằng 400µL/lỗ của dung dịch PBS chứa Tween 20 0,05% (nhãn hiệu thương mại đăng ký) và ProClin 300 0,1% (Supelco; PBST), PBST chứa BSA 1% (BSA-PBST) được phân bố với nồng độ 100µL/lỗ và được để yên 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng để tạo khối để tạo ra đĩa ELISA. Đĩa ELISA được rửa ba lần bằng PBST và được sử dụng cho các xét nghiệm ELISA mô tả trong các ví dụ bằng cách bổ sung các chất phản ứng.

3-2. ELISA kháng nguyên pha rắn

(i) Kháng huyết thanh chuột hoặc lớp nổi trên bề mặt nuôi cấy của các tế bào dung hợp được pha loãng từng nấc bằng BSA-PBST được phân bố trên đĩa ELISA kháng nguyên pha rắn ở nồng độ 50µL/lỗ và được để yên 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng.

(ii) Sau khi rửa ba lần bằng PBST, dung dịch của HRP-Gt F(ab')₂-Kháng Ig chuột (BioSource, AMI4404) pha loãng 5000 lần bằng BSA-PBST được phân bố với nồng độ 50µL/lỗ và được để yên 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng.

(iii) Sau khi rửa ba lần bằng PBST, OPD (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) được hòa tan ở nồng độ 2mg/mL trong dung dịch đệm xitrat 0,2 M chứa

hydro peroxit 0,02%/nước (sau đây gọi là chất nền-dung dịch hòa tan), được bổ sung ở nồng độ 50 μ L/lỗ, và được để yên 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng.

(iv) Ngoài ra, axit sulfuric 1,5N chứa EDTA 1mM (sau đây gọi là dịch làm ngừng phản ứng) được bổ sung với nồng độ 50 μ L/lỗ, và độ hấp thụ được xác định tại bước sóng 492nm sử dụng Titertek (nhãn hiệu thương mại đăng ký) Multiskan Plus MK II (Flow Laboratories Inc).

3-3. ELISA cạnh tranh

(i) Các dung dịch insulin người (Fitzgerald Industries International, 30-AI51) pha loãng bằng BSA-PBST ở các nồng độ 0, 2,5, 5, và 10 μ g/mL được phân bố trên đĩa ELISA kháng nguyên pha rắn với nồng độ 25 μ L/lỗ.

(ii) Lớp nổi trên bề mặt nuôi cấy của các tế bào dung hợp pha loãng tới 5 và 25 lần bằng BSA-PBST hoặc dung dịch không pha loãng của nó sau đó được phân bố với nồng độ 25 μ L/lỗ và được để yên 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng.

(iii) Các thao tác sau đó được tiến hành thực hiện theo cách tương tự như các bước từ (ii) đến (iv) trong phần “3-2. ELISA kháng nguyên pha rắn” mô tả ở trên.

4. Sàng lọc tế bào lai sinh kháng thể đơn dòng thứ hai

Sau thời gian 7 ngày từ khi dung hợp tế bào, lớp nổi trên bề mặt nuôi cấy được sử dụng để tiến hành thực hiện ELISA kiểu sandwich mô tả sau để lựa chọn các lỗ thể hiện khả năng phản ứng cao với insulin liên kết với kháng thể đơn dòng F(ab')₂ thứ nhất được tập hợp trước bằng cách tách dòng và tập hợp kháng thể đơn dòng mô tả sau.

4-1. ELISA kiểu sandwich

(i) Kháng thể đơn dòng thứ nhất (trong trường hợp này, kháng thể 66221) được xử lý để điều chế F(ab')₂ sử dụng bộ dụng cụ điều chế F(ab')₂ tên là Immuno Pure (nhãn hiệu thương mại đăng ký) (Pierce, prod# 44888).

(ii) Kháng thể đơn dòng F(ab')₂ thứ nhất được điều chế ở nồng độ 2 μ g/mL với dung dịch PBS được tạo pha rắn trên đĩa 96 lỗ ở nồng độ 50 μ L/lỗ và được

để yên qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Sau khi rửa ba lần bằng 400μL/lỗ của PBST, BSA-PBST được phân bố ở nồng độ 100μL/lỗ và được để yên 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng để tạo khối để tạo ra đĩa ELISA.

(iii) Dung dịch insulin người (Fitzgerald Industries International, 30-AI51) pha loãng bằng BSA-PBST ở nồng độ 0,5μg/mL được phân bố trên đĩa ELISA ở nồng độ 50μL/lỗ và được để yên 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng.

(iv) Sau khi rửa ba lần bằng PBST, lớp nổi trên bề mặt nuôi cấy của các tế bào dung hợp pha loãng từng nấc bằng BSA-PBST được phân bố ở nồng độ 50μL/lỗ và được để yên 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng.

(v) Sau khi rửa ba lần bằng PBST, dung dịch của HRP-Gt-Kháng IgG-Fc chuột (Bethyl Laboratories, A90-131P) pha loãng 10000 lần bằng BSA-PBST được phân bố ở nồng độ 50μL/lỗ và được để yên 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng.

(vi) Sau khi rửa ba lần bằng PBST, OPD (Tokyo Chemical Industry) được hòa tan ở nồng độ 2mg/mL trong chất nền-dung dịch hòa tan, được bổ sung ở nồng độ 50μL/lỗ, và được để yên 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng.

(vii) Dịch làm ngừng phản ứng được bổ sung ở nồng độ 50μL/lỗ, và độ hấp thụ được xác định tại bước sóng 492nm sử dụng Titertek (nhãn hiệu thương mại đăng ký) Multiskan Plus MK II (Flow Laboratories).

5. Tách dòng và tập hợp kháng thể đơn dòng

Các tế bào lai lựa chọn trong các bước sàng lọc 3. và 4. mô tả ở trên được tách dòng bằng phương pháp pha loãng giới hạn để lần lượt thu được các tế bào lai 66221 và 66226. Để tập hợp các kháng thể đơn dòng tạo ra bởi các tế bào lai, các tế bào lai được sử dụng theo đường trong phúc mạc, với lượng tương đương $0,5 \times 10^6$ tế bào, cho chuột cái BALB/c 12 tuần tuổi đã được tiêm 0,5mL pristan theo đường trong phúc mạc 2 tuần trước đó. Các dịch dịch cổ chướng được tập hợp sau thời gian 14 ngày, và các lớp nổi trên bề mặt thu được bằng cách ly tâm. Các lớp nổi trên bề mặt được kết hợp với lượng tương tự của dung dịch đệm hấp phụ (NaCl 3mol/L, dung dịch đệm Glyxin-NaOH 1,5mol/L, pH = 8,5) và sau đó

được lọc. Các dịch lọc được đưa qua cột protein A sepharosa được cân bằng bởi dung dịch đệm hấp phụ để hấp phụ các kháng thể trong các phần dịch lọc sử dụng cột, và các kháng thể được rửa giải bằng dung dịch đệm xitrat 0,1mol/L (pH = 3,0). Sau khi trung hòa dịch rửa giải bằng dung dịch đệm Tris-HCl 1mol/L (pH = 8,0), quá trình thẩm tách được tiến hành thực hiện với PBS để tập hợp các kháng thể.

Các kháng thể được đề cập là kháng thể 66221 và kháng thể 66226 sau đó được sử dụng trong các phương pháp xét nghiệm.

Các tế bào lai tạo ra kháng thể 66221 và kháng thể 66226 được lưu ký tại International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Address: Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japan) vào ngày 8 tháng 4 năm 2009 với các số truy cập lần lượt là FERM P-21800 và FERM P-21801. Sau đó, các tế bào lai này được chuyển sang Hiệp ước Budapest vào ngày 17 tháng 02 năm 2010, dựa trên lưu ký ban đầu, với các số truy cập lần lượt là FERM BP-11233 và FERM BP-11234.

Ví dụ xét nghiệm thứ hai

Khả năng phản ứng chéo của kháng thể đơn dòng theo sáng chế với tiền chất insulin và các chất tương tự insulin

Xét nghiệm được tiến hành thực hiện sử dụng Biacore (nhãn hiệu thương mại đăng ký) T100 về khả năng phản ứng chéo của kháng thể 66221 và kháng thể 66226 với tiền chất insulin và các chất tương tự insulin. Đối với các chất tương tự insulin, các chế phẩm tương tự insulin như insulin lispro, insulin aspart, insulin glargin, và insulin detemir được sử dụng.

1. Các chất phản ứng và dụng cụ

1-1. Các kháng thể đơn dòng

(i) kháng thể 66221: 2,30mg/mL

(ii) kháng thể 66226: 3,99mg/mL

1-2. Các chất phân tích

- (i) insulin người tái tổ hợp: Fitzgerald Industries International, 30-AI51
- (ii) tiền chất insulin: tiền chất insulin IRR, Người, dùng cho xét nghiệm miễn dịch; mã NIBSC: 84/611
- (iii) các chế phẩm tương tự insulin
 - (1) insulin lispro, 100 đơn vị/mL: Eli Lilly Japan K.K.
 - (2) insulin aspart, 100 đơn vị/mL: Novo Nordisk Pharma Ltd.
 - (3) insulin glargin, 100 đơn vị/mL: sanofi-aventis K.K.
 - (4) insulin detemir, 100 đơn vị/mL: Novo Nordisk Pharma Ltd.

1-3. Các thiết bị Biacore (nhãn hiệu thương mại đăng ký) và bộ chất phản ứng chuyên dụng (Biacore: hiện tại là GE Healthcare; mặc dù các phần từ (i) đến (viii) mô tả dưới đây là các sản phẩm và các mã số catalog của Biacore sau đó, các loại này hiện đang có tại GE Healthcare.)

- (i) Biacore (nhãn hiệu thương mại đăng ký) T100: Biacore, JJ-1037-02
- (ii) Loạt chip cảm biến S CM5: Biacore, BR-1005-30
- (iii) Bộ dụng cụ ghép cặp amin: Biacore, BR-1000-50
- (iv) Axetat 5,0: Biacore, BR-1003-51
- (v) Các α -globulin miễn dịch của chuột: Biacore, BR-1005-14
- (vi) Glyxin 1,5: Biacore, BR-1003-54
- (vii) Glyxin 2,0: Biacore, BR-1003-55
- (viii) HBS-EP+ 10 $\times$ (Running Buffer): Biacore, BR-1006-69 (được điều chế ở độ pH = 8,5 bằng NaOH và được pha loãng 10 lần bằng nước tinh khiết khi sử dụng)

2. Phương pháp xét nghiệm

Kháng thể 66221 hoặc kháng thể 66226 được bắt giữ bằng các α -globulin miễn dịch của chuột cố định trên chip cảm biến, và insulin, tiền chất insulin, và

các chế phẩm tương tự insulin khác nhau được bổ sung làm các chất phân tích để đánh giá khả năng phản ứng trên đó. Các bước thao tác cụ thể được sử dụng như sau.

(i) Các α -globulin miễn dịch của chuột được cố định trên chip cảm biến CM5 (theo sách hướng dẫn kèm theo).

(ii) Kháng thể 66221 hoặc kháng thể 66226 được pha loãng bằng HBS-EP+ (pH = 8,5) tới nồng độ 5 μ g/mL và được bổ sung ở tốc độ dòng 30 μ L/phút trong thời gian 300 giây.

(iii) Các kháng nguyên khác nhau được pha loãng bằng HBS-EP+ (pH = 8,5) tới nồng độ 10ng/mL và được bổ sung ở 2 nồng độ là 0 và 10ng/mL trong thời gian 120 giây cho mỗi nồng độ. Thời gian phân ly hoạt động tự do được thiết đặt là 120 giây trong trường hợp này.

(iv) Glyxin 1,5 và Glyxin 2,0 được kết hợp theo tỷ lệ 1:1 để tạo ra dung dịch tái sinh, và việc xử lý tái sinh được tiến hành thực hiện trong thời gian 180 giây.

3. Kết quả

3-1. Kết quả của phản ứng với Insulin

Đối với kháng thể 66221 và kháng thể 66226, khả năng phản ứng với insulin được kiểm tra sử dụng Biacore (nhãn hiệu thương mại đăng ký) T100. Các kết quả được thể hiện trong hình vẽ trên các Fig. 2 và 3. Kháng thể 66221 thể hiện khả năng phản ứng 8,5 RU ở nồng độ insulin 10ng/mL (Fig. 2). Ngược lại, kháng thể 66226 không phát hiện thấy có khả năng phản ứng (Fig. 3). Trục tung (RU) biểu thị đơn vị chi liên quan đến hệ xét nghiệm Biacore (nhãn hiệu thương mại đăng ký) và biểu thị sự thay đổi khối lượng do phản ứng trên bề mặt cảm biến.

3-2. Các kết quả của phản ứng với tiền chất insulin và các chế phẩm tương tự insulin

Đối với kháng thể 66221 và kháng thể 66226, khả năng phản ứng với tiền chất insulin hoặc các chế phẩm tương tự insulin khác nhau (insulin lispro, insulin aspart, insulin glargin, và insulin detemir) được kiểm tra sử dụng Biacore (nhãn hiệu thương mại đăng ký) T100. Kết quả được thể hiện trong hình vẽ trên các Fig. 4-1, 4-2, 5-1, và 5-2. Trong mỗi trường hợp, ở nồng độ kháng nguyên 10ng/mL, các đáp ứng nằm trong khoảng từ 5,5 đến 13 RU được phát hiện đối với kháng thể 66221. Ngược lại, không phát hiện thấy có khả năng phản ứng đối với kháng thể 66226.

Ví dụ 1

Xét nghiệm insulin sử dụng hỗn hợp các kháng thể đơn dòng theo sáng chế 1

1. Sự tạo ra các hạt latex

Bình chứa phản ứng bằng thủy tinh (dung tích: 2L) có trang bị máy khuấy, bộ ngưng tụ hồi lưu, thiết bị cảm biến nhiệt, ống dẫn nhập nitơ, và bao ngoài được nạp đầy bởi 1100g nước cất, 200g styren, 0,2g natri styren sulfonat, và dung dịch nước của 1,5g kali peroxodisulfat hòa tan trong 50g nước cất, và sau khi bên trong bình chứa được thay thế bằng khí nitơ, quá trình polyme hóa được tiến hành thực hiện trong thời gian 48 giờ trong khi khuấy ở nhiệt độ 70°C.

Sau khi kết thúc quá trình polyme hóa, dung dịch được lọc bằng giấy lọc để chiết các hạt latex. Thiết bị hiển vi điện tử truyền qua (JEOL Ltd., model “JEM-1010”) được sử dụng để ghi hình ảnh các hạt latex với độ phóng đại 10000 lần và phân tích các đường kính của ít nhất 100 hạt latex thu được để xác định đường kính hạt trung bình. Đường kính hạt trung bình thu được là 0,3µm.

2. Điều chế hạt latex nhạy kháng thể kháng insulin

2-1. Sự tạo ra dung dịch hạt latex nhạy kháng thể 66221

Dung dịch latex 1,0% có đường kính hạt trung bình 0,3µm [trong dung dịch đệm Tris 5mM (sau đây là Tris-HCl), pH = 8,5] được bổ sung thêm dung dịch kháng thể 66221 pha loãng tới 0,60mg/mL bằng lượng thể tích tương đương của Tris-HCl 5mM (pH = 8,5) và được khuấy ở nhiệt độ 4°C trong thời

gian 2 giờ. Lượng thể tích tương đương của Tris-HCl 5mM (pH = 8,5) chứa BSA 0,5% sau đó được bổ sung và được khuấy ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 1 giờ. Sau khi dung dịch được ly tâm và lớp nổi trên bề mặt được lấy ra, phần kết tủa được tái tạo huyền phù trong Tris-HCl 5mM (pH = 8,5) để tạo ra dung dịch hạt latex nhạy kháng thể 66221.

2-2. Sự tạo ra dung dịch hạt latex nhạy kháng thể 66226

Latex có đường kính hạt trung bình 0,3µm được sử dụng để tạo ra dung dịch hạt latex nhạy kháng thể 66226 theo cách tương tự như ở trên.

3. Điều chế các chất phản ứng

3-1. Điều chế chất phản ứng đầu tiên

Tris-HCl 5mM (pH = 8,5) chứa 500mM natri clorua và BSA 0,2% được sử dụng làm chất phản ứng thứ nhất.

3-2. Điều chế chất phản ứng thứ hai

Các thể tích tương đương của các dung dịch hạt latex nhạy kháng thể 66221 và kháng thể 66226 được kết hợp và pha loãng bằng Tris-HCl 5mM (pH = 8,5) sao cho độ hấp thụ 5,0Abs thu được tại bước sóng 600nm để điều chế chất phản ứng thứ hai.

4. Xét nghiệm

Các chất phản ứng thứ nhất và thứ hai được kết hợp, và sự hình thành khối hạt kết tập phụ thuộc nồng độ insulin được xác định sử dụng thiết bị phân tích tự động Hitachi 7170. Cụ thể, 150µL chất phản ứng thứ nhất được bổ sung vào 10µL các dung dịch insulin tại các nồng độ 0, 5, 25, 50, 100, và 200µU/mL và được gia nhiệt ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 5 phút. Sau đó, 50µL chất phản ứng thứ hai được bổ sung, tiếp theo bằng cách khuấy. Sau thời gian 5 phút, những thay đổi về độ hấp thụ kết hợp với sự hình thành ngưng kết được xác định ở bước sóng 570nm và bước sóng phụ 800nm.

Bảng 1

Nồng độ insulin $\mu\text{U}/\text{mL}$	Độ hấp thụ m A b s
0	11,4
5	23,6
25	40,9
50	57,7
100	82,9
200	117,1

5. Kết quả xét nghiệm

Bảng 1 chứng minh rằng, tính nhạy gia tăng tùy thuộc vào nồng độ insulin và có thể định lượng được.

Ví dụ 2

Xét nghiệm insulin sử dụng hỗn hợp các kháng thể đơn dòng theo sáng chế 2

Kháng thể 66221 hoặc kháng thể 66226 được tạo pha rắn, và kháng thể còn lại được sử dụng làm kháng thể thứ hai để xét nghiệm khả năng phản ứng với tiền chất insulin và các chất tương tự insulin bằng kỹ thuật ELISA.

1. Các kháng thể và kháng nguyên được sử dụng

(1) Các kháng thể đơn dòng

kháng thể 66221: 2,30mg/mL

kháng thể 66226: 3,99mg/mL

(2) Các kháng nguyên

Insulin, tiền chất insulin, và các chế phẩm tương tự insulin (insulin lispro, insulin aspart, insulin glargin, và insulin detemir) được sử dụng tương tự như trong ví dụ xét nghiệm thứ hai.

2. Phương pháp ELISA

(i) Dung dịch của kháng thể 66221 hoặc kháng thể 66226 pha loãng tới $2\mu\text{g/mL}$ bằng PBS được tạo pha rắn trong đĩa 96 lỗ ở nồng độ $50\mu\text{U/lỗ}$ và được để yên 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng.

(ii) Sau khi rửa ba lần bằng $400\mu\text{U/lỗ}$ của PBST, BSA-PBST được phân bố với lượng $100\mu\text{L/lỗ}$ và được để yên 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng để tạo khối để tạo ra đĩa ELISA.

(iii) Dung dịch của mỗi một trong số insulin người, tiền chất insulin, và các chế phẩm tương tự insulin pha loãng bằng BSA-PBST tới các nồng độ 0, 1, 5, và 10ng/mL được phân bố trên đĩa ELISA với lượng $50\mu\text{L/lỗ}$ và được để yên 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng.

(iv) Sau khi rửa ba lần bằng PBST, dung dịch của kháng thể 66226 hoặc kháng thể 66221 đánh dấu bằng biotin pha loãng tới $1\mu\text{g/mL}$ bằng BSA-PBST được phân bố với lượng $50\mu\text{L/lỗ}$ và được để yên 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng.

(v) Sau khi rửa ba lần bằng PBST, dung dịch của Immuno Pure (nhãn hiệu thương mại đăng ký) Streptavidin, HRP liên hợp (PIERCE, Prod# 21126) pha loãng 5000 lần bằng BSA-PBST được phân bố với lượng $50\mu\text{L/lỗ}$ và được để yên 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng.

(vi) Sau khi rửa ba lần bằng PBST, OPD (Tokyo Chemical Industry) được hòa tan ở 2 mg/mL trong chất nền-dung dịch hòa tan, được bổ sung $50\mu\text{L/lỗ}$, và được để yên 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng.

(vii) Dung dịch làm ngừng phản ứng được bổ sung với lượng $50\mu\text{L/lỗ}$, và độ hấp thụ được xác định ở bước sóng 492nm sử dụng Titertek (nhãn hiệu thương mại đăng ký) Multiskan Plus MK II (Flow Laboratories).

3. Kết quả

3-1. Các kết quả xét nghiệm đĩa kháng thể pha rắn 66221

Các kết quả xét nghiệm được thể hiện trong Bảng 2 và trên Fig. 6.

Khi kháng thể 66221 được sử dụng làm kháng thể thứ nhất và kháng thể 66226 được sử dụng làm kháng thể thứ hai, sự gia tăng về độ hấp thụ phụ thuộc nồng độ được quan sát thấy đối với insulin, trong khi không quan sát thấy sự gia tăng độ hấp thụ phụ thuộc nồng độ đối với tiền chất insulin và các chế phẩm tương tự insulin (insulin lispro, insulin aspart, insulin glargin, và insulin detemir).

Bảng 2

Kháng thể sơ cấp	Kháng thể 66221					
Kháng thể thứ cấp	Kháng thể 66226 đánh dấu Biotin					
Các kháng nguyên Nồng độ kháng nguyên	Insulin người	Tiền insulin người	Chế phẩm tương tự insulin/Insulin glargin	Chế phẩm tương tự insulin/Insulin aspart	Chế phẩm tương tự insulin/Insulin lispro	Chế phẩm tương tự insulin/Insulin detemir
0ng/ml	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1ng/ml	0,316	0,005	0,004	-0,011	-0,005	-0,017
5ng/ml	1,491	0,006	0,013	0,001	0,007	-0,013
10ng/ml	1,995	-0,013	0,008	-0,006	0,000	-0,016

3-2. Các kết quả xét nghiệm đĩa kháng thể pha rắn 66226

Các kết quả xét nghiệm được thể hiện trong Bảng 3 và trên Fig. 7.

Khi kháng thể 66226 được sử dụng làm kháng thể thứ nhất và kháng thể 66221 được sử dụng làm kháng thể thứ hai, không quan sát thấy sự gia tăng về độ hấp thụ phụ thuộc nồng độ ở bất kỳ trong số insulin, tiền chất insulin, và các chế phẩm tương tự insulin (insulin lispro, insulin aspart, insulin glargin, và insulin detemir).

Bảng 3

Kháng thể sơ cấp	Kháng thể 66226					
Kháng thể thứ cấp	Kháng thể 66221 đánh dấu Biotin					
Các kháng nguyên Nồng độ kháng nguyên	Insulin người	Tiền insulin người	Chế phẩm tương tự insulin/Insulin glargin	Chế phẩm tương tự insulin/Insulin aspart	Chế phẩm tương tự insulin/Insulin lispro	Chế phẩm tương tự insulin/Insulin detemir
0ng/ml	0 000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1ng/ml	-0 011	-0,002	0,001	-0,004	-0,006	-0,017
5ng/ml	-0 010	0,004	0,004	-0,003	-0,002	-0,011
10ng/ml	-0 010	0,014	0,015	-0,001	0,006	-0,007

4. Thảo luận

Từ các kết quả ở trên, kết luận rằng, insulin có thể được định lượng không bị ảnh hưởng bởi tiền chất insulin và các chế phẩm tương tự insulin vì không quan sát thấy khả năng phản ứng chéo khi kháng thể 66221 và kháng thể 66226 được sử dụng lần lượt làm các kháng thể sơ cấp và thứ cấp. Insulin không thể được xét nghiệm khi kháng thể 66226 và kháng thể 66221 được sử dụng lần lượt làm các kháng thể sơ cấp và thứ cấp, và do đó, lưu ý rằng, kháng thể 66226 không thể hiện khả năng phản ứng với insulin nhưng thể hiện phản ứng với insulin liên kết với kháng thể 66221. Lưu ý rằng, về kết quả xét nghiệm khả năng phản ứng chéo của các kháng thể đơn dòng theo sáng chế sử dụng Biacore (nhãn hiệu thương mại đăng ký) T100 (ví dụ xét nghiệm thứ hai), kháng thể 66221 phản ứng với insulin, tiền chất insulin, và tất cả các chế phẩm tương tự insulin, trong khi kháng thể 66226 không phản ứng với bất kỳ chất nào trong số đó.

Do đó, vì cơ chế phản ứng của hệ xét nghiệm này, có thể suy xét rằng, một sự thay về cấu trúc nào đó xuất hiện trong insulin khi kháng thể 66221 trước tiên liên kết với insulin và kháng thể 66226 nhận diện đặc hiệu vị trí thay đổi về cấu trúc để tạo ra sandwich.

Ví dụ xét nghiệm 3

Khả năng phản ứng chéo của các kháng thể đơn dòng theo sáng chế với các chất tương tự insulin

Xét nghiệm được tiến hành thực hiện sử dụng Biacore (nhãn hiệu thương mại đăng ký) T100 về khả năng phản ứng chéo của kháng thể 66221 và kháng thể 66226 với các chất tương tự insulin. Chế phẩm tương tự insulin, tức là, insulin glulisin, được sử dụng làm chất tương tự insulin.

1. Các chất phản ứng và dụng cụ

1-1. Các kháng thể đơn dòng

(i) kháng thể 66221: 2,30mg/mL

(ii) kháng thể 66226: 3,99mg/mL

1-2. Các chất phân tích

Chế phẩm tương tự insulin

(i) insulin glulisin, 100 đơn vị/mL: sanofi-aventis K.K.

1-3. Các thiết bị Biacore (nhãn hiệu thương mại đăng ký) và bộ chất phản ứng chuyên dụng

Các thiết bị Biacore (nhãn hiệu thương mại đăng ký) và bộ chất phản ứng chuyên dụng được sử dụng là tương tự như trong ví dụ xét nghiệm 2.

2. Phương pháp xét nghiệm

Xét nghiệm được tiến hành thực hiện theo cách tương tự như trong ví dụ xét nghiệm 2, chỉ khác ở chỗ insulin glulisin, chế phẩm tương tự insulin, được sử dụng làm chất phân tích.

3. Kết quả

3-1. Kết quả của phản ứng với chế phẩm tương tự insulin

Đối với cả kháng thể 66221 và kháng thể 66226, khả năng phản ứng với chế phẩm tương tự insulin, insulin glulisin được kiểm tra sử dụng Biacore (nhãn

hiệu thương mại đăng ký) T100. Kết quả được thể hiện trên Fig. 8. Cả kháng thể 66221 và kháng thể 66226 đều không có khả năng phản ứng. Trục tung (RU) chỉ ra đơn vị duy nhất cho hệ xét nghiệm Biacore (nhãn hiệu thương mại đăng ký) và biểu thị sự thay đổi khối lượng do phản ứng trên bề mặt cảm biến.

Ví dụ 3

Xét nghiệm insulin sử dụng hỗn hợp các kháng thể đơn dòng theo sáng chế 3

Kháng thể 66221 hoặc kháng thể 66226 được tạo pha rắn, trong khi kháng thể kia được kết hợp làm kháng thể thứ hai để xét nghiệm khả năng phản ứng với insulin, tiền chất insulin, và chất tương tự insulin bằng kỹ thuật ELISA.

1. Các kiểu kháng thể và kháng nguyên được sử dụng

(1) Các kháng thể đơn dòng

kháng thể 66221: 2,30mg/mL

kháng thể 66226: 3,99mg/mL

(2) Các kháng nguyên: insulin, tiền chất insulin, và chế phẩm tương tự insulin (insulin glulisin)

2. Phương pháp ELISA

Phương pháp tương tự như trong Ví dụ 2 được tiến hành thực hiện, chỉ khác ở chỗ, insulin glulisin được sử dụng làm chế phẩm tương tự insulin.

3. Kết quả

3-1. Các kết quả xét nghiệm đĩa kháng thể pha rắn 66221

Các kết quả xét nghiệm được thể hiện trong Bảng 4 và trên Fig. 9.

Như trường hợp của Ví dụ 2, khi kháng thể 66221 được sử dụng làm kháng thể sơ cấp và kháng thể 66226 được sử dụng làm kháng thể thứ hai thứ cấp, sự gia tăng về độ hấp thụ phụ thuộc nồng độ được phát hiện đối với insulin trong khi không có sự gia tăng về độ hấp thụ phụ thuộc nồng độ nào được phát hiện đối với tiền chất insulin và chế phẩm tương tự insulin (insulin glulisin).

Bảng 4

Kháng thể sơ cấp	Kháng thể 66221		
Kháng thể thứ cấp	Kháng thể 66226 đánh dấu Biotin		
Các kháng nguyên Nồng độ kháng nguyên	Insulin người	Tiền insulin người	Chế phẩm tương tự insulin/insulin glulisin
0ng/mL	0, 000	0, 000	0, 000
1ng/mL	0, 316	0, 005	0, 031
5ng/mL	1, 491	0, 006	0, 000
10ng/mL	1, 995	-0, 013	0, 003

3-2. Các kết quả xét nghiệm đĩa kháng thể pha rắn 66226

Các kết quả xét nghiệm được thể hiện trong Bảng 5 và trên Fig. 10.

Như trong trường hợp của Ví dụ 2, khi kháng thể 66226 là kháng thể sơ cấp và kháng thể 66221 là kháng thể thứ cấp, không có sự gia tăng về độ hấp thụ phụ thuộc nồng độ nào được phát hiện đối với insulin, tiền chất insulin, hoặc chế phẩm tương tự insulin (insulin glulisin).

Bảng 5

Kháng thể sơ cấp	Kháng thể 66226		
Kháng thể thứ cấp	Kháng thể 66221 đánh dấu Biotin		
Các kháng nguyên Nồng độ kháng nguyên	Insulin người	Tiền insulin người	Chế phẩm tương tự insulin/Insulin glusin
0ng/mL	0, 000	0, 000	0, 000
1ng/mL	-0, 011	-0, 002	0, 022
5ng/mL	-0, 010	0, 004	0, 001
10ng/mL	-0, 010	0, 014	0, 001

4. Thảo luận

Các kết quả ở trên chứng minh rằng, không có khả năng phản ứng chéo được thể hiện đối với chế phẩm tương tự insulin, insulin glulisin, khi kháng thể 66221 và kháng thể 66226 được sử dụng lần lượt làm các kháng thể sơ cấp và thứ cấp, và khi kháng thể 66226 và kháng thể 66221 được sử dụng lần lượt làm các kháng thể sơ cấp và thứ cấp.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Bằng các kháng thể đơn dòng theo sáng chế, insulin có thể được xét nghiệm một cách nhạy và đặc hiệu mà không bị ảnh hưởng bởi tiền chất insulin và các chất tương tự insulin. Vì sự tiết insulin từ các tế bào beta có thể được giám sát theo dõi chính xác theo sáng chế, nên sáng chế cũng có thể được sử dụng để quan sát tình trạng lâm sàng của tiểu đường và do đó rất hữu dụng.

Số truy cập

(1) FERM BP-11233

(2) FERM BP-11234

Tham khảo nguyên liệu sinh học lưu ký

(1) Tế bào lai 66221 sản xuất kháng thể 66221

i) Tên và địa chỉ cơ quan lưu ký mà các nguyên liệu sinh học được lưu ký tại đó.

International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan

ii) Ngày lưu ký nguyên liệu sinh học tại cơ quan lưu ký trong phần i).

Ngày 8 tháng 04 năm 2009 (ngày lưu ký ban đầu)

Ngày 17 tháng 02 năm 2010 (ngày chuyển sang Budapest Treaty từ lưu ký ban đầu)

iii) Số truy nhập được qui định bởi cơ quan lưu ký trong phần i).

FERM BP-11233

(2) Tế bào lai 66226 sản xuất kháng thể 66226

i) Tên và địa chỉ cơ quan lưu ký mà các nguyên liệu sinh học được lưu ký tại đó.

International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan

ii) Ngày lưu ký nguyên liệu sinh học tại cơ quan lưu ký trong phần i).

Ngày 8 tháng 04 năm 2009 (ngày lưu ký ban đầu)

Ngày 17 tháng 02 năm 2010 (ngày chuyển sang Budapest Treaty từ lưu ký ban đầu)

iii) Số truy nhập được qui định bởi cơ quan lưu ký trong phần i).

FERM BP-11234

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp xét nghiệm insulin sử dụng kháng thể phản ứng với insulin liên kết với kháng thể kháng insulin nhưng không phản ứng với insulin không liên kết với kháng thể kháng insulin, trong đó xét nghiệm này sử dụng hai loại kháng thể, và trong đó

1) kháng thể thứ nhất có đặc tính phản ứng với insulin, và

2) kháng thể thứ hai phản ứng với insulin liên kết với kháng thể thứ nhất nhưng không phản ứng với insulin không liên kết với kháng thể thứ nhất.

2. Phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm 1, trong đó cả kháng thể thứ nhất lẫn kháng thể thứ hai là các kháng thể đơn dòng.

3. Phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm 1, trong đó kháng thể thứ nhất là kháng thể đa dòng và kháng thể thứ hai là kháng thể đơn dòng.

4. Phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm 1, trong đó kháng thể đơn dòng thứ nhất bao gồm hai hoặc nhiều kháng thể đơn dòng có các vị trí nhận diện khác nhau.

5. Phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4, trong đó ít nhất một trong số các kháng thể đơn dòng là kháng thể không phản ứng với tiền chất insulin và các chất tương tự insulin.

6. Phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 5, trong đó kháng thể đơn dòng thứ hai là kháng thể không phản ứng với tiền chất insulin và các chất tương tự insulin.

7. Phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm 2, 4, 5, và 6, trong đó các kháng thể đơn dòng thứ nhất và thứ hai được cố định lên nhựa latex và insulin được xét nghiệm bằng xét nghiệm ngưng kết miễn dịch trên latex.

8. Phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm 2, 4, 5, và 6, trong đó kháng thể đơn dòng thứ nhất được cố định lên pha rắn, kháng thể

đơn dòng thứ hai được đánh dấu bằng chất đánh dấu, và insulin được xét nghiệm bằng kỹ thuật ELISA.

9. Phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm 2, 4, 5, và 6, trong đó kháng thể đơn dòng thứ nhất được đánh dấu bằng chất đánh dấu, kháng thể đơn dòng thứ hai được cố định lên pha rắn, và insulin được xét nghiệm bằng kỹ thuật ELISA hoặc sắc ký miễn dịch.

10. Chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm insulin chứa kháng thể phản ứng với insulin liên kết với kháng thể kháng insulin nhưng không phản ứng với insulin không liên kết với kháng thể kháng insulin, trong đó xét nghiệm này sử dụng hai loại kháng thể, và trong đó

1) kháng thể thứ nhất có đặc tính phản ứng với insulin, và

2) kháng thể thứ hai có đặc tính phản ứng với insulin liên kết với kháng thể thứ nhất trong khi không phản ứng với insulin không liên kết với kháng thể thứ nhất.

11. Chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm 10, trong đó cả kháng thể thứ nhất lẫn kháng thể thứ hai là các kháng thể đơn dòng.

12. Chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm 10, trong đó kháng thể thứ nhất là kháng thể đa dòng và kháng thể thứ hai là kháng thể đơn dòng.

13. Chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm 11, trong đó kháng thể đơn dòng thứ nhất bao gồm hai hoặc nhiều kháng thể đơn dòng có các vị trí nhận diện khác nhau.

14. Chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 13, trong đó ít nhất một loại kháng thể đơn dòng là kháng thể không phản ứng với tiền chất insulin và các chất tương tự insulin.

15. Chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 14, trong đó kháng thể đơn dòng thứ hai là kháng thể không phản ứng với tiền chất insulin và các chất tương tự insulin.

16. Chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm 11, 13, 14, và 15, trong đó các kháng thể đơn dòng thứ nhất và thứ hai được cố định lên nhựa latex và insulin được xét nghiệm bằng xét nghiệm ngưng kết miễn dịch trên latex.

17. Chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm 11, 13, 14, và 15, trong đó kháng thể đơn dòng thứ nhất được cố định lên pha rắn, kháng thể đơn dòng thứ hai được đánh dấu bằng chất đánh dấu, và insulin được xét nghiệm bằng kỹ thuật ELISA.

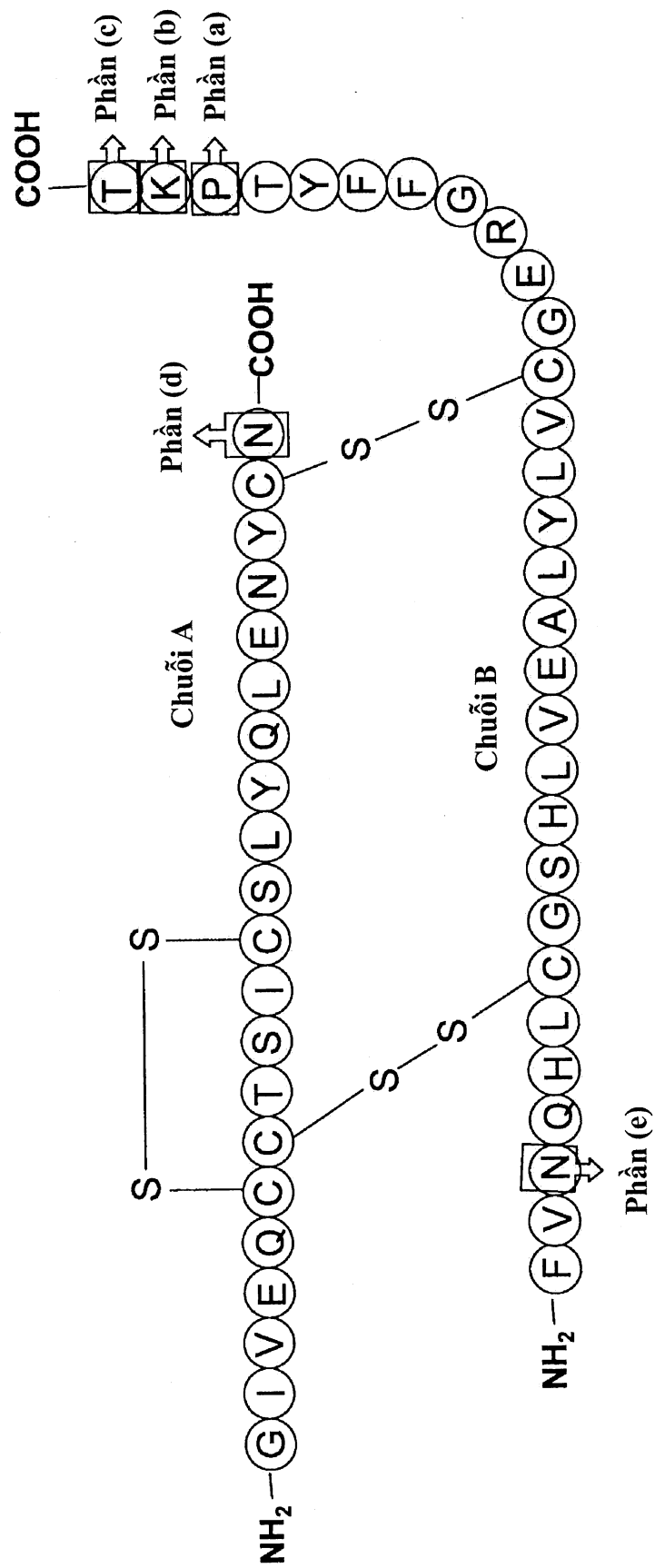
18. Chất phản ứng trong phương pháp xét nghiệm insulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm 11, 13, 14, và 15, trong đó kháng thể đơn dòng thứ nhất được đánh dấu bằng chất đánh dấu, kháng thể đơn dòng thứ hai được cố định lên pha rắn, và insulin được xét nghiệm bằng kỹ thuật ELISA hoặc sắc ký miễn dịch.

19. Phương pháp sàng lọc các kháng thể đơn dòng bao gồm các bước sau:

1) chọn kháng thể phản ứng với insulin, và

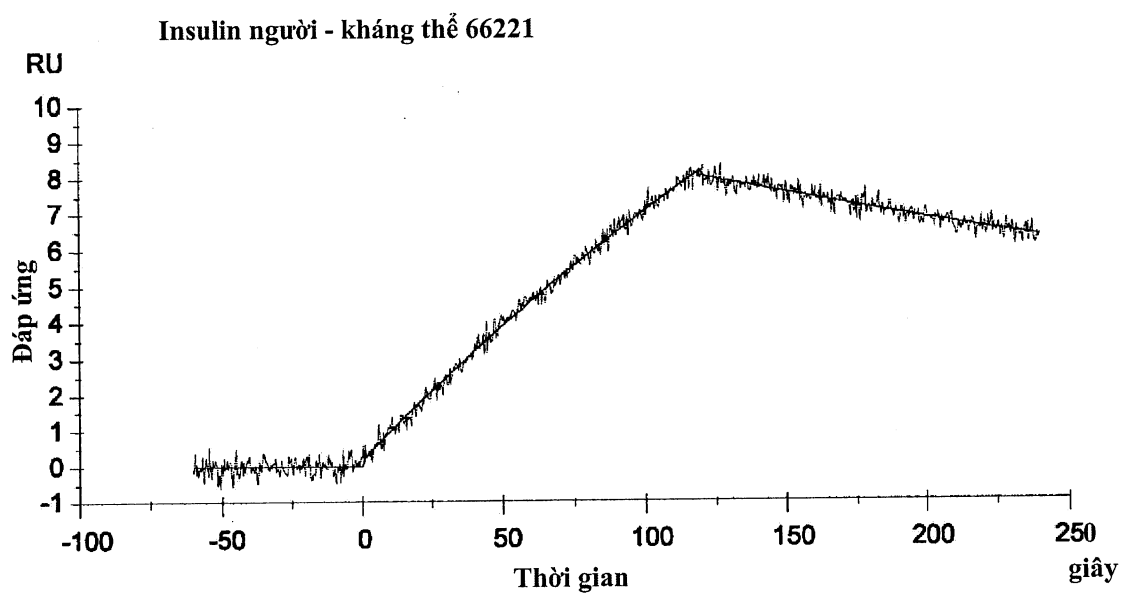
2) chọn kháng thể đơn dòng phản ứng với insulin liên kết với kháng thể được chọn ở bước 1) nhưng không phản ứng với insulin không liên kết với kháng thể nêu trên.

[FIG. 1]

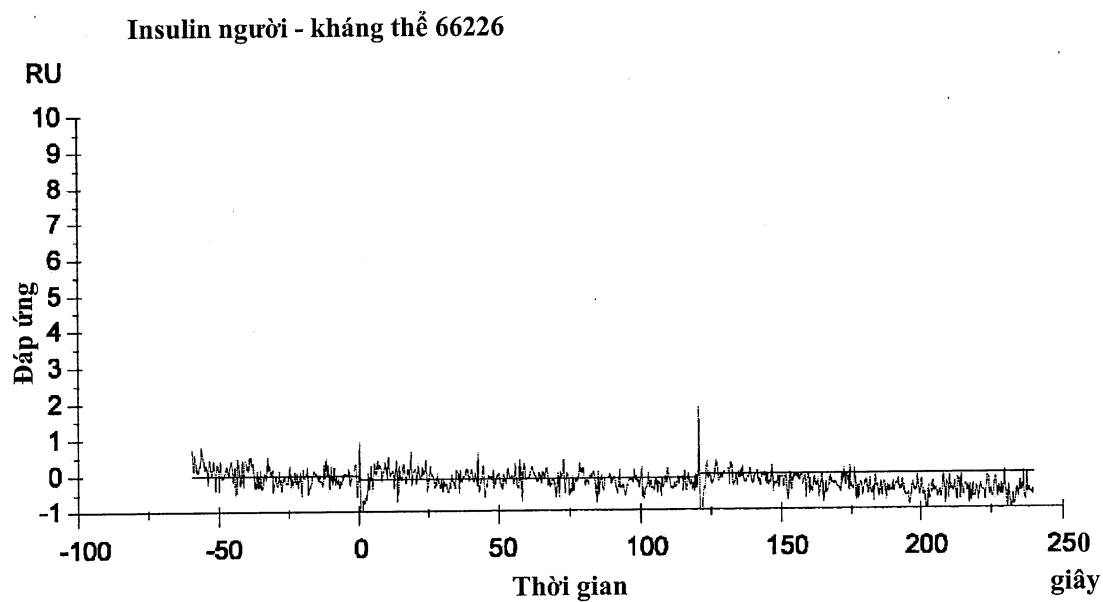


TRÌNH TỰ AXIT AMIN INSULIN

[FIG. 2]

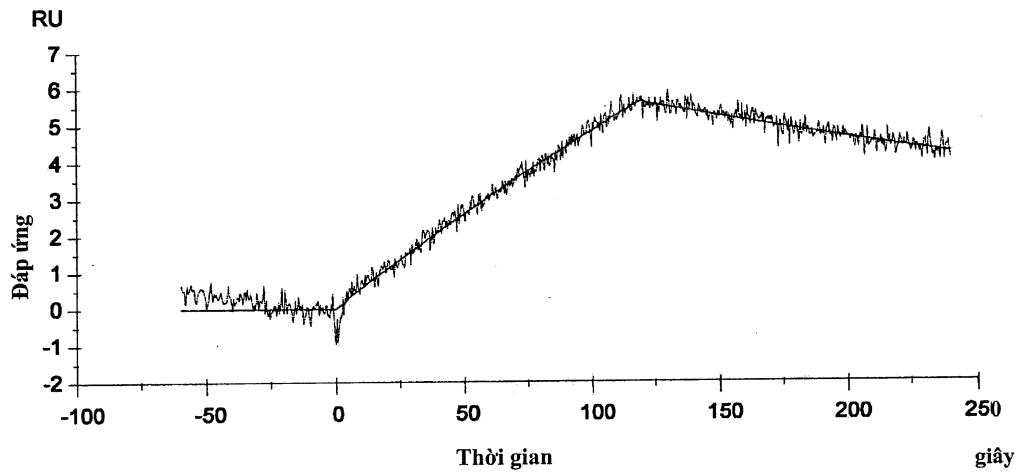


[FIG. 3]

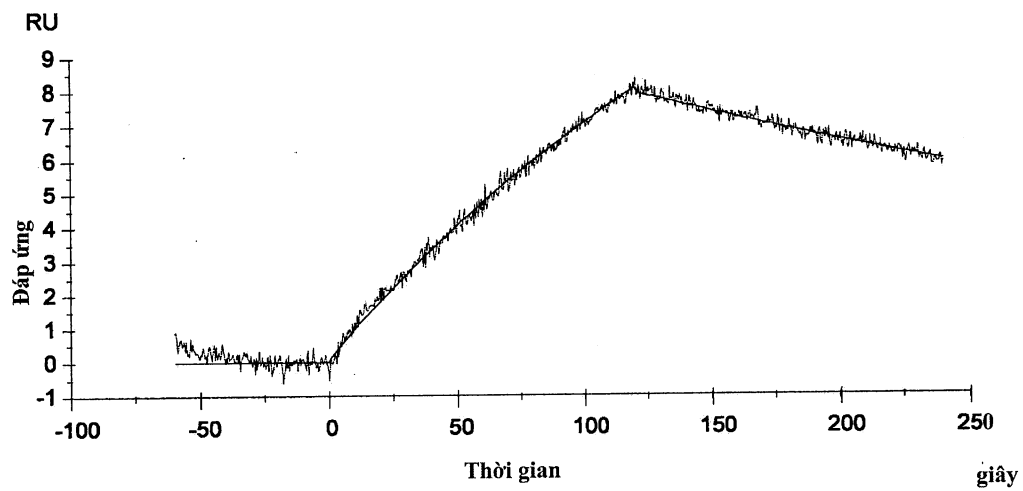


[FIG. 4-1]

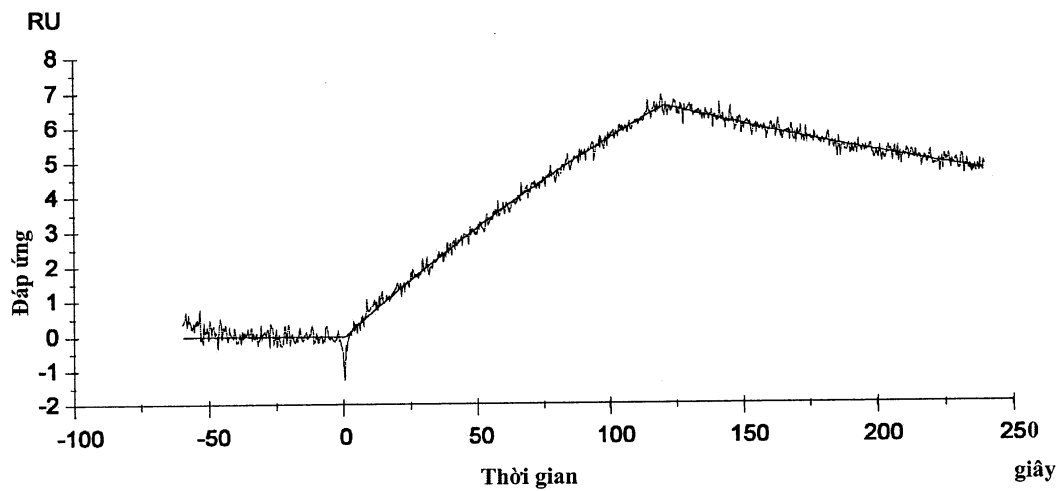
(a) Tiền insulin - kháng thể 66221



(b) Insulin lispro - kháng thể 66221

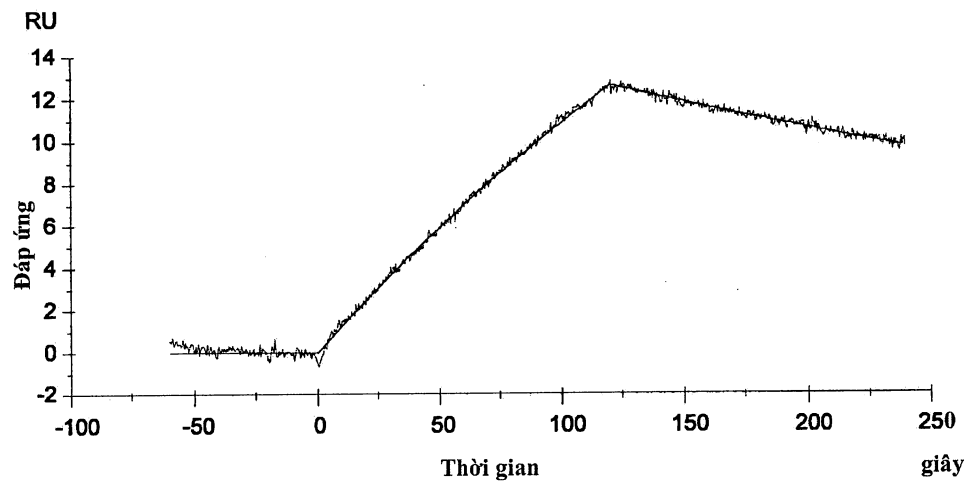


(c) Insulin aspart - kháng thể 66221

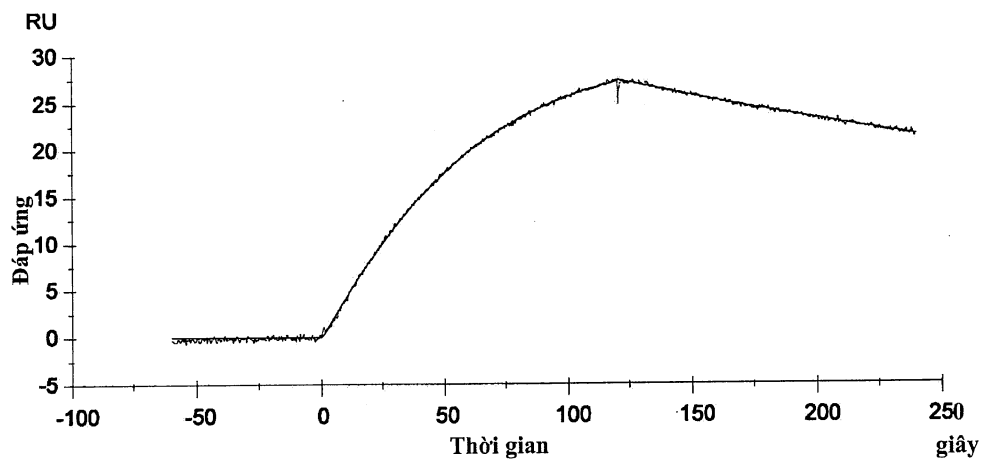


[FIG. 4-2]

(d) Insulin glargin - kháng thể 66221

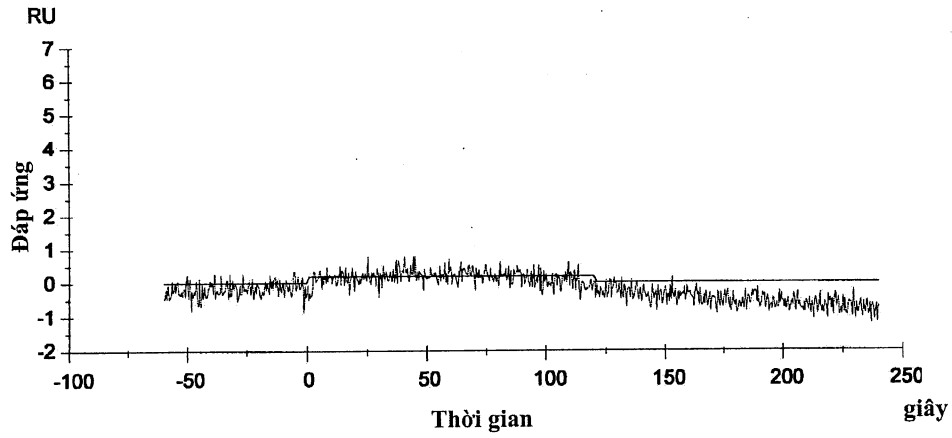


(e) Insulin detemir - kháng thể 66221

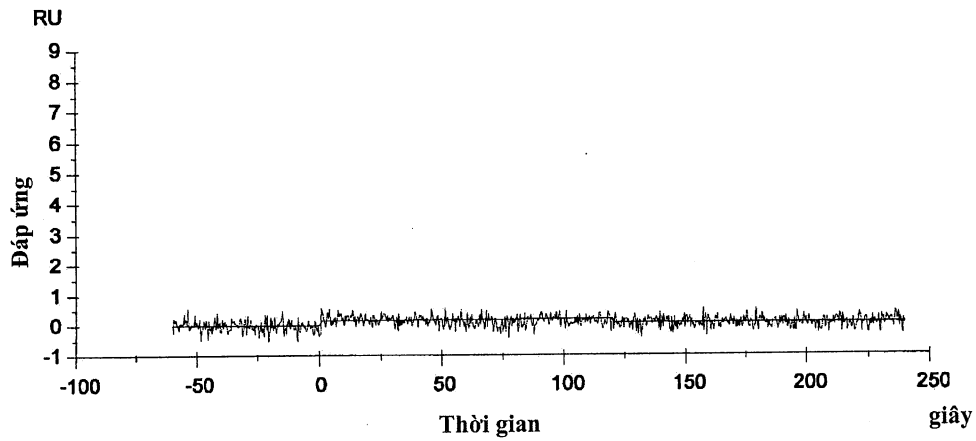


[FIG. 5-1]

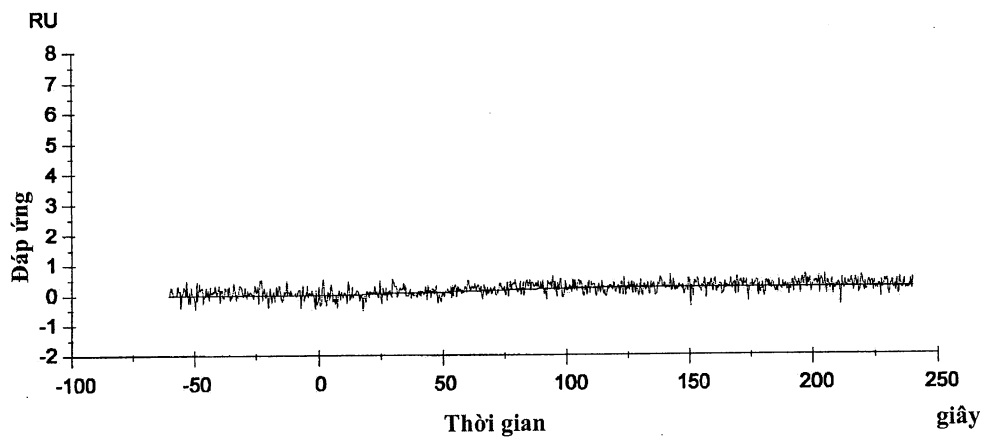
(a) Tiền insulin - kháng thể 66226



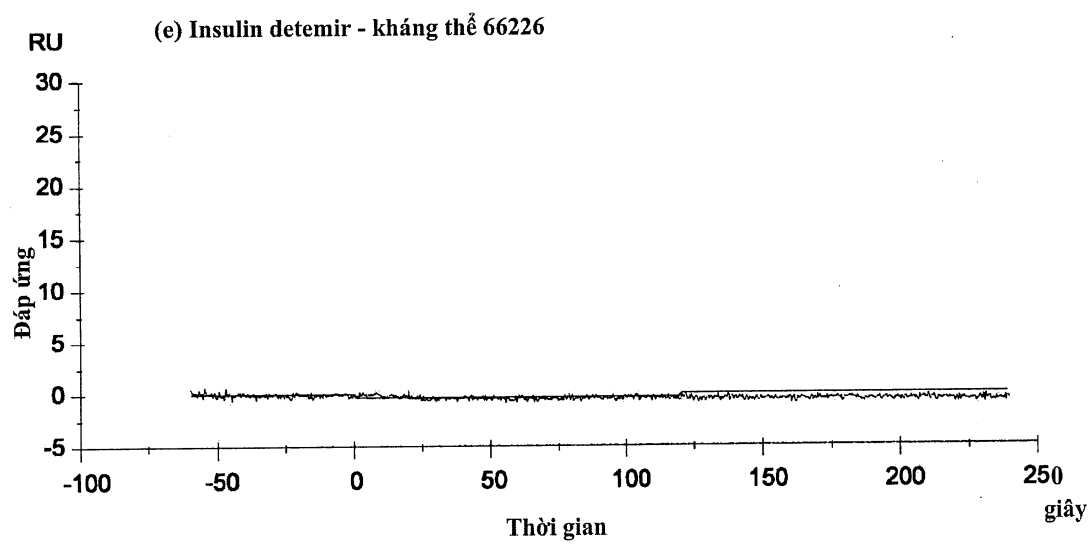
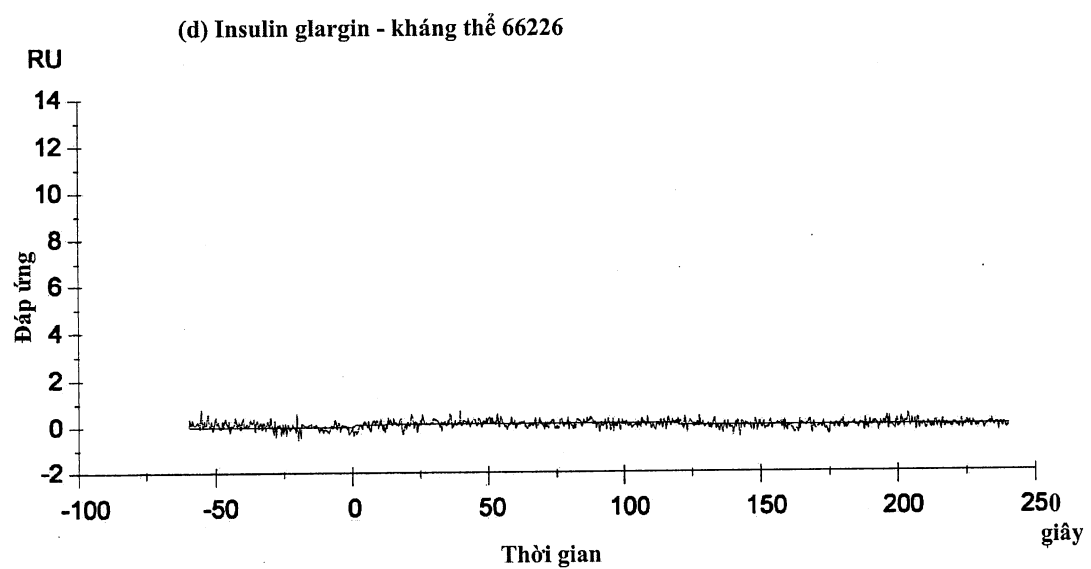
(b) Insulin lispro - kháng thể 66226



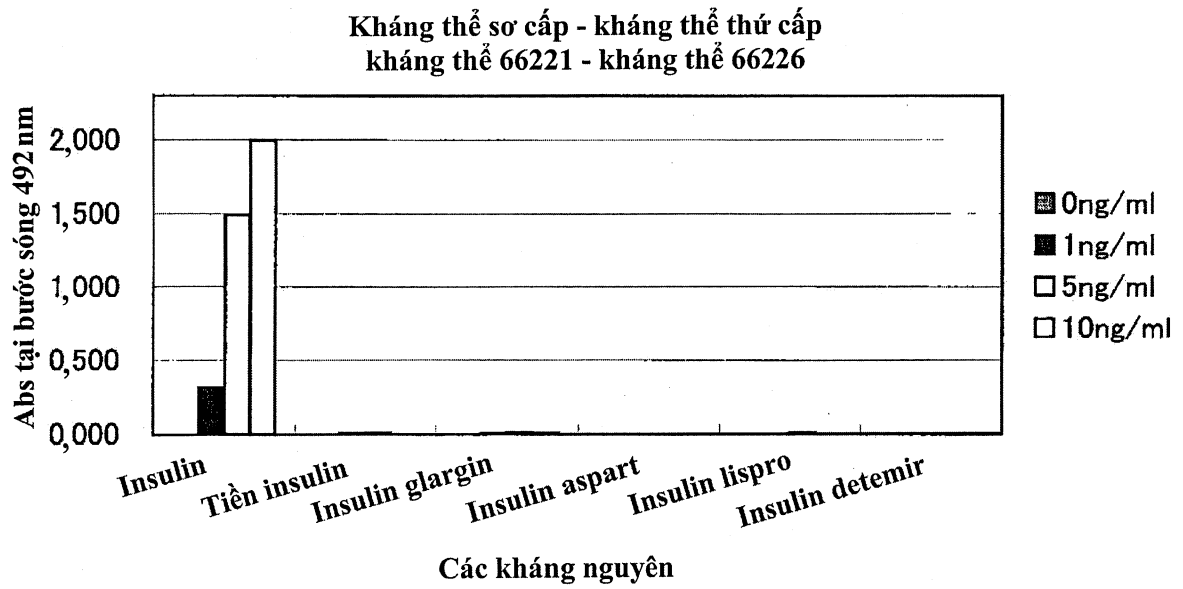
(c) Insulin aspart - kháng thể 66226



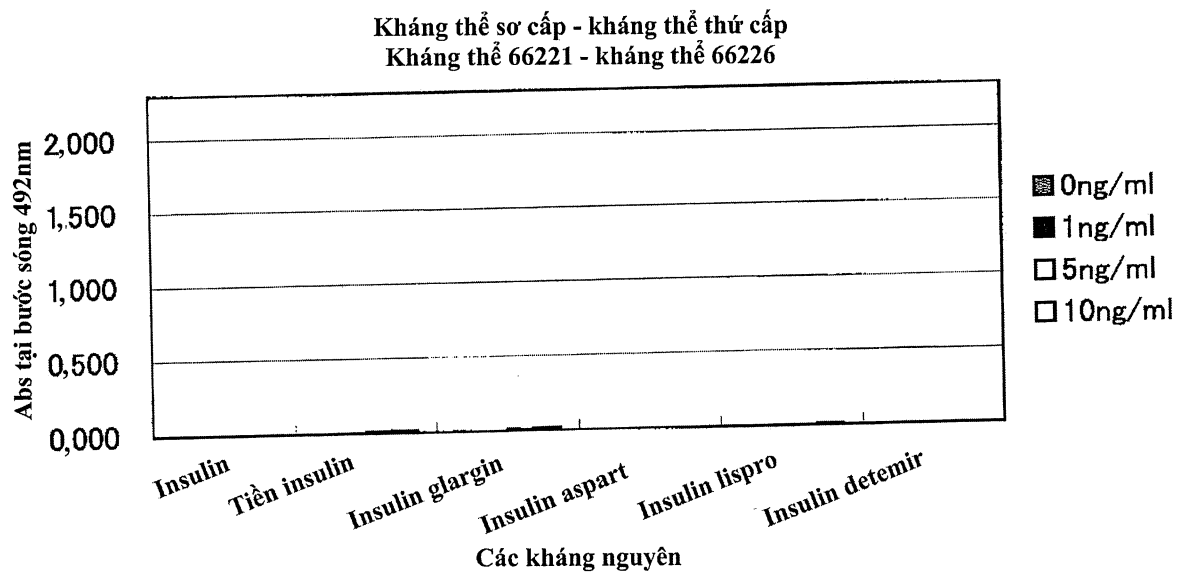
[FIG. 5-2]



[FIG. 6]

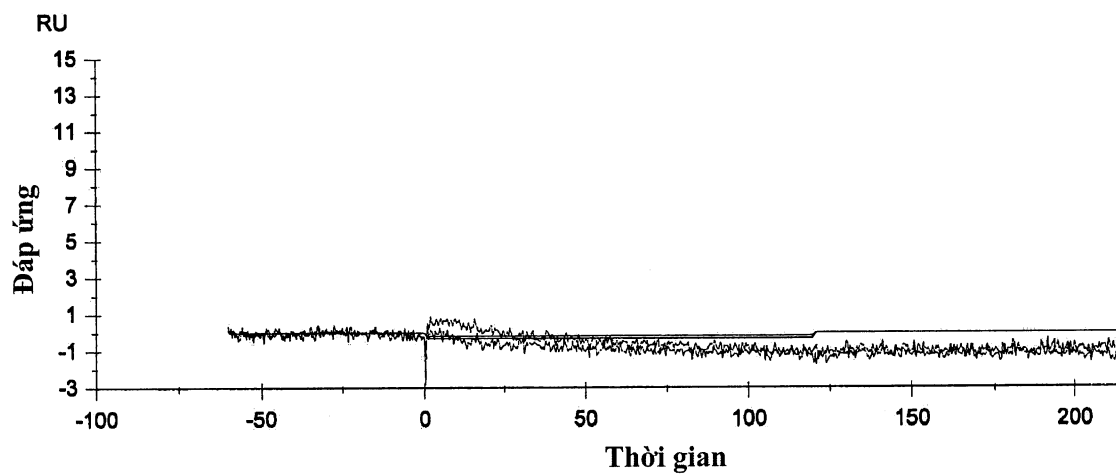


[FIG. 7]

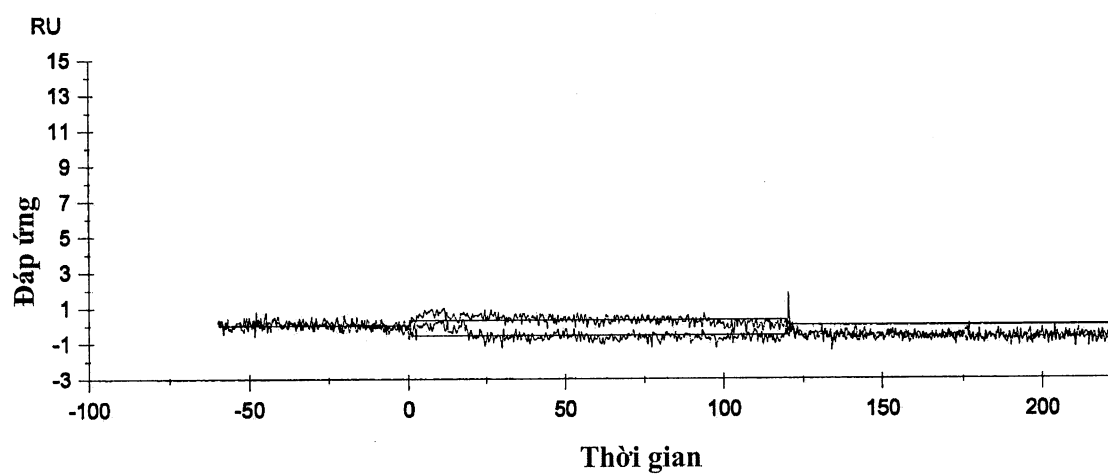


[FIG. 8]

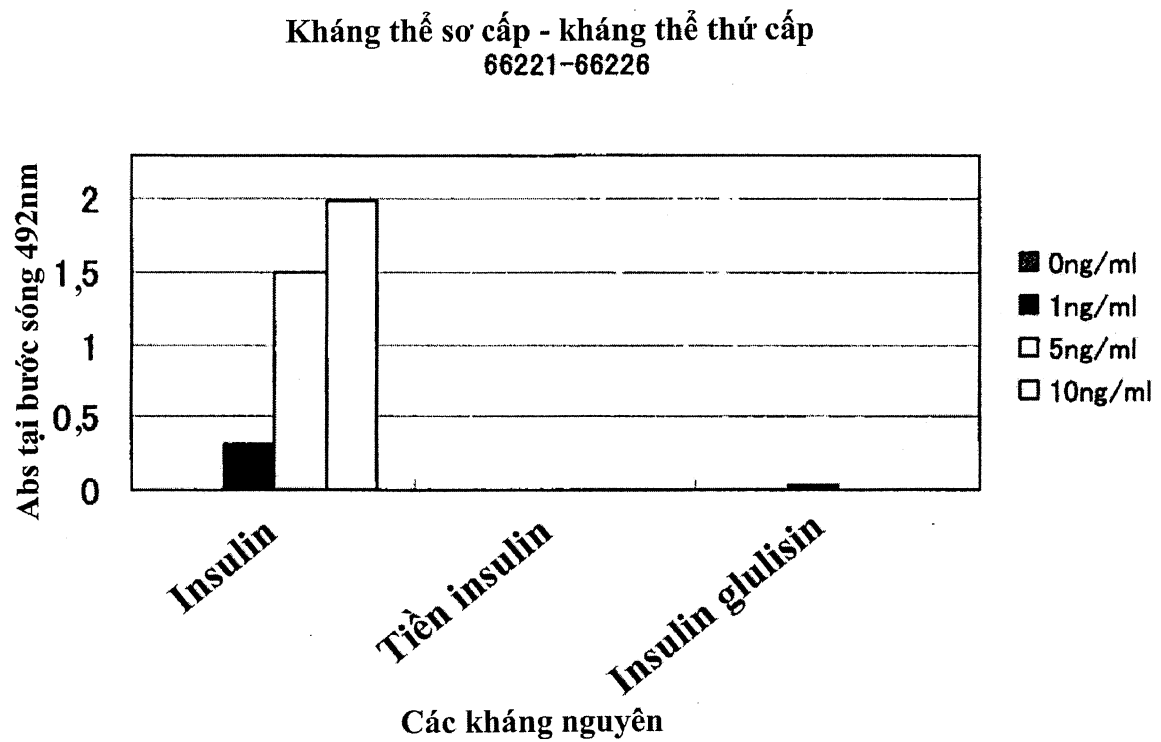
(a) Kháng thể 66221 - insulin glulisin



(b) Kháng thể 66226 - insulin glulisin



[FIG. 9]



[FIG. 10]

