



(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



1-0033296

(51)⁷ A61K 39/395; C07K 16/18; A61P 25/28; (13) B
A61K 39/00; A61K 49/00

(21) 1-2018-00092

(22) 12/07/2016

(86) PCT/EP2016/066470 12/07/2016

(87) WO 2017/009308 19/01/2017

(30) 1512211.2 13/07/2015 GB; 1518375.9 16/10/2015 GB

(45) 25/09/2022 414

(43) 25/07/2018 364A

(73) H. LUNDBECK A/S (DK)

Ottiliavej 9, 2500 Valby, Denmark

(72) PEDERSEN, Jan, Torleif (DK); PEDERSEN, Lars, Østergaard (DK); DÄCHSEL, Justus, Claus, Alfred (DE); ABDUR-RASHEED ASUNI, Ayodeji (GB); ROSENQVIST, Nina (SE).

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

(54) PHÂN TỬ GLOBULIN MIỄN DỊCH CÓ KHẢ NĂNG LIÊN KẾT ĐẶC HIỆU MIỄN DỊCH VỚI BIẾN THỂ ĐƯỢC HYPERPHOSPHORYL HÓA CỦA PROTEIN TAU CỦA NGƯỜI VÀ ĐƯỢC PHẪM CHỨA PHÂN TỬ GLOBULIN MIỄN DỊCH NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến nhóm mới của kháng thể đơn dòng mà liên kết đặc hiệu gốc serin 396 phosphoryl hóa trên protein tau hyperphosphoryl hóa (PHF) bệnh lý (pS396), cũng như phương pháp sử dụng các phân tử này và đoạn liên kết protein tau của chúng trong điều trị bệnh Alzheimer và bệnh do protein tau.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến nhóm mới của kháng thể đơn dòng mà liên kết đặc hiệu gốc serin 396 phosphoryl hóa trên protein tau hyperphosphoryl hóa (PHF) bệnh lý (pS396), cũng như phương pháp sử dụng các phân tử này và đoạn liên kết protein tau của chúng trong điều trị bệnh Alzheimer và bệnh do protein tau.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh thoái hóa thần kinh liên quan đến tuổi tác như bệnh Alzheimer (AD) và chứng mất trí là một trong những thách thức xã hội lớn nhất ngày nay. Tổ chức Y tế Thế giới ước tính rằng chi phí chăm sóc người già sẽ tiếp tục tăng và số lượng trường hợp mắc chứng mất trí được chẩn đoán sẽ tăng gấp ba lần vào năm 2050 (World Health Organization và Alzheimer's Disease International - Status Report (2012) DEMENTIA: A public health priority, WHO). Việc điều trị đầu tiên đối với AD là tác nhân điều biến chất dẫn truyền thần kinh như chất ức chế axetylcholin esteraza và tác nhân điều biến NMDA. Các liệu pháp chữa bệnh này có vào khoảng cuối thiên niên kỷ và vẫn tạo thành viên gạch nền tảng cho việc giảm nhẹ triệu chứng sa sút trí nhớ do chứng mất trí và AD. Tuy nhiên, các thuốc này không nhắm đích nguyên nhân cơ bản của AD, tích tụ peptit amyloid- β (A β) và kết tụ protein tau và mất synap neuron liên quan và neuron cuối cùng.

Nghiên cứu diện rộng trong cộng đồng người già, theo thời gian (Weiner, M.W. và cộng sự. (2014) ADNI trực tuyến: <http://www.adni-info.org/>; Breteler, M.M. và cộng sự. (1992) Neuroepidemiology 11 Suppl 1, 23-28; Launer, L.J. (1992) Neuroepidemiology 11 Suppl 1, 2-13) cùng với nghiên cứu kết hợp bộ gen lớn diện rộng (Lambert, J.C. và cộng sự. (2013) Nat. Genet. 45, 1452-1458) thể hiện rằng AD là hỗn hợp không đồng nhất của chứng mất trí mà có đến 10 phần trăm bệnh nhân AD tăng không có bệnh lý amyloid (Crary, J.F. và cộng sự. (2014) Acta Neuropathol. 128, 755-766). Ngoài ra, nghiên cứu bệnh lý hạt giống bởi Braak & Braak (Braak, H. và Braak, E. (1996) Acta Neurol. Scand. Suppl 165, 3-12) chứng minh sự hiệu chỉnh rõ giữa mức bệnh lý đám rối sợi thần kinh và tình trạng nhận thức trước khi khám nghiệm tử thi. Các quan sát này được củng cố bằng một vài người điều tra (Nelson, P.T. và cộng sự. (2012)

J. Neuropathol. Thí nghiệm Neurol. 71, 362-381), và trong nghiên cứu chất đánh dấu sinh học theo thời gian gần đây, mà chỉ ra rằng các mức dịch não tủy (CSF) của protein tau và phospho-tau tăng qua các giai đoạn đầu và sau của bệnh (Jack, C.R., Jr. và cộng sự. (2013) Lancet Neurol. 12, 207-216).

Như chỉ ra ở trên, protein liên quan đến vi cấu trúc hình ống, tau, và phiên bản hyper-phosphoryl hóa của chúng, tạo thành thành phần chính của đám rối sợi thần kinh trong tế bào, mà là một trong các dấu hiệu chính của AD. Ngoài ra, các biến thể gen đặc hiệu của protein tau kết hợp với dạng di truyền của chứng mất trí trans-thái dương (FTD). Việc xuất hiện của bệnh lý protein tau ở AD xảy ra ở mẫu không gian khác biệt, bắt đầu trong khúu não, sau đó hồi hải mã và vùng vỏ não (Braak, H. và Braak, E. (1996) Acta Neurol. Scand. Suppl 165, 3-12). Giai đoạn đặc trưng của bệnh lý protein tau còn rất tương ứng với khả năng nhận thức (Nelson, P.T. và cộng sự. (2012) J. Neuropathol. Thí nghiệm Neurol. 71, 362-381; Braak, E. và cộng sự (1999) Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. 249 Suppl 3, 14-22). Được lấy cùng nhau, bằng chứng này tạo thành cơ sở của giả thuyết dựa trên tau đối với AD. Kế thừa rằng việc tích tụ trong tế bào của protein tau dẫn đến thoái hóa vi cấu trúc hình ống và phá hủy tùy sống. Kết quả là, gây ra trục trặc liên lạc giữa các nơon và chết tế bào. Gần đây, cũng được thể hiện rằng bản thân protein tau tạo thành các loài endo bệnh lý mà có thể dẫn truyền thoái hóa thần kinh từ tế bào đến tế bào tiếp theo (Clavaguera, F. và cộng sự (2009) Nat. Cell Biol. 11, 909-913).

I. Tau làm thể sinh bệnh Endo

Clavaguera và cộng sự đã chứng minh rằng bản thân protein tau có thể đóng vai trò làm thể sinh bệnh endo (Clavaguera, F. và cộng sự (2009) Nat. Cell Biol. 11, 909-913). Các chiết xuất não mức spin thấp được phân lập từ chuột chuyển gen protein tau P301S (Allen, B. và cộng sự (2002) J. Neurosci. 22, 9340-9351), được pha loãng và được tiêm vào hồi hải mã và vùng vỏ não của chuột non ALZ17. Chuột ALZ17 là dòng chuột chuyển gen protein tau mà chỉ phát triển bệnh lý muộn (Probst, A. và cộng sự. (2000) Acta Neuropathol. 99, 469-481). Chuột ALZ17 được tiêm nhanh chóng phát triển bệnh lý dạng sợi rắn, và dùng chiết xuất não nghèo miễn dịch từ chuột P301S hoặc chiết xuất từ chuột kiểu đại không cảm ứng bệnh lý protein tau. Việc phân đoạn chiết xuất não trong tau tan được (S1) và tau không tan được trong sarcosyl (P3) (Sahara, N. và cộng sự. (2013) J. Alzheimer's. Dis. 33, 249-263) và tiêm chúng vào chuột ALZ17 chứng

minh rằng việc phân đoạn P3 hầu hết có khả năng trong việc cảm ứng bệnh lý. Nó bao gồm hầu hết trong số tau sợi hyper-phosphoryl hóa trong tế bào. Phần lớn bệnh lý có thể còn được cảm ứng bằng cách tiêm chiết xuất P301S vào não của chuột kiểu đại, nhưng không có NFTs được tạo thành. Trong các nghiên cứu sau đó, Clavaguera và cộng sự thể hiện rằng protein tau của người chiết xuất từ mô não mắc bệnh do protein tau khác xét nghiệm tử thi (Bệnh hạt ura bạc (AGD), Liệt trên nhân tiến triển (PSP), và Thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD)) có thể còn bao gồm bệnh lý protein tau trong mô hình ALZ17 (Clavaguera, F. và cộng sự. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 9535-9540). Vì việc thể hiện các dữ liệu này, một vài mô hình tạo hạt và rải protein tau khác đã được báo cáo (Ahmed, Z. và cộng sự. (2014) *Acta Neuropathol.* 127, 667-683; Walker, L.C. và cộng sự. (2013) *JAMA Neurol.* 70, 304-310). Kết luận chính từ các nghiên cứu này chỉ ra rằng cơ chế mà protein tau bệnh lý trong thể vùi trong tế bào được bài tiết từ tế bào vào chu chất. Vật liệu protein tau bệnh lý sau đó được chuyển cùng với bao túi theo cả hướng ra trước và ngược lại và sau đó được hấp thụ bởi tế bào lân cận bằng cách nhập bào khối. Cơ chế này giải thích tại sao việc mở rộng bệnh lý quan sát được ở bệnh của người theo mẫu giải phẫu tự khác biệt. Có lợi là, việc dùng ngoại vi protein tau bệnh lý có thể thúc đẩy việc hình thành bệnh lý protein tau ở chuột ALZ17 (Clavaguera, F. và cộng sự (2014) *Acta Neuropathol.* 127, 299-301). Cơ chế mở rộng này có thể giải thích sự tiến triển bệnh ở các bệnh do protein khác (Goedert, M. và cộng sự. (2010) *Trends Neurosci.* 33, 317-325; Sigurdsson, E.M. và cộng sự. (2002) *Trends Mol. Med.* 8, 411-413).

II. Các loài Tau

Phát hiện rằng protein tau có thể đóng vai trò như thể sinh bệnh endo đã nghiên cứu cho "The Pathogenic Species" mà có thể nhắm đích trong liệu pháp điều trị can thiệp tiềm năng.

Gen protein tau kết hợp vi cấu trúc hình ống (MAPT) nằm trên nhiễm sắc thể 17 của bộ gen của người và biểu hiện sáu chất đồng phân của protein tau ở não người trưởng thành. Chất đồng phân này phát sinh từ việc ghép nối tùy ý của exon 2, 3 và 10 của 16 exon trong gen MAPT. Exon 2 và 3 biểu hiện lặp 29 axit amin và exon 10 biểu hiện vùng liên kết vi cấu trúc hình ống bổ sung. Kết quả là, chất đồng phân protein tau sẽ chứa 0, 1 hoặc 2 đoạn lặp đầu N và 3 hoặc 4 vùng liên kết vi cấu trúc hình ống đầu C (3R hoặc 4R tau). Sáu chất đồng phân thông thường của protein tau được biểu hiện. Chất

đồng phân dài nhất (2N4R) và ngắn nhất (0N3R) gồm 441 và 352 axit amin, tương ứng (Kolarova, M. và cộng sự (2012) *Int. J. Alzheimers. Dis.* 2012, 731526). Vùng chiều đầu N của protein tau (2N4R) gồm đuôi 44 axit amin giàu glyxin và các gốc 45-102 bao gồm hai vùng axit cao (vùng N1, N2). Hai vùng giàu prolin thấy ở gốc 151-243 (vùng P1, P2). Phần còn lại của protein được cấu thành bởi bốn vùng liên kết vi cấu trúc hình ống (R1-R4), sau đó bởi vùng đầu C ngắn.

Tau là protein rất tan và dễ phosphoryl hóa cao. Xấp xỉ 20 phần trăm hoặc 85 gốc axit amin ở chất đồng phân dài nhất của protein tau là vị trí (Ser, Thr hoặc Tyr) phosphoryl hóa tiềm năng. Khoảng hơn một nửa trong số chúng được quan sát được về mặt thử nghiệm (Hanger, D.P. và cộng sự. (2009) *Trends Mol. Med.* 15, 112-119; Hasegawa, M. và cộng sự. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 17047-17054), và kết cụm quanh gốc đầu của vùng liên kết vi cấu trúc hình ống. Tau được phosphoryl hóa động và khử phosphoryl hóa trong chu kỳ tế bào. Nó cần phải tách ra từ vi cấu trúc hình ống để cho phép xảy ra phân bào giảm nhiễm. Vai trò chính của nó trong tế bào sau nguyên phân (noron phân biệt) là để làm chất ổn định vi cấu trúc hình ống, cho phép vận chuyển sợi trục tối ưu. Nó chỉ có thể kết hợp với vi cấu trúc hình ống dưới dạng khử phosphoryl hầu hết, do đó việc phosphoryl hóa đóng vai trò chuyển đổi kết hợp/phân tách vi cấu trúc hình ống trực tiếp trong noron. Dưới điều kiện bình thường, protein tau dịch tế bào chứa trung bình hai vị trí phosphoryl hóa. Trong vật liệu sợi xoắn bắt cặp, ít nhất 7-8 vị trí được phosphoryl hóa (Hanger, D.P. và cộng sự. (2009) *Trends Mol. Med.* 15, 112-119; Hasegawa, M. và cộng sự. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 17047-17054). Protein tau hyperphosphoryl hóa, sợi xoắn bắt cặp là dấu hiệu chính của bệnh Alzheimer (Kosik và cộng sự (1986) *PNAS*, 86, 4044-4048), sự thay đổi tính linh động rõ ràng của protein tau hyperphosphoryl hóa quan sát được ở phân tích miễn dịch-hóa học tế bào của vật liệu não AD của người.

Khó khăn cho nghiên cứu protein tau bằng kỹ thuật cấu trúc truyền thống như tinh thể học tia x hoặc quang phổ NMR, thể hiện bản chất siêu ổn định của nó. Nghiên cứu này chủ yếu được tiến hành trên đoạn vùng của protein không phosphoryl hóa. Nghiên cứu chỉ cấu trúc đến nay trên protein tau chiều dài đầy đủ (2N4R), sử dụng quang phổ NMR, cho thấy rằng protein chỉ chứa strv.vhes thừa thớt cấu trúc thứ cấp ổn định (Mukrasch, M.D. và cộng sự. (2009) *PLoS. Biol.* 7, e34). Phân tích này chỉ ra rằng cấu trúc thứ cấp của mạch chính peptit có khuynh hướng lớn chấp nhận cấu trúc tấm β .

200 gốc đầu tiên của mạch chính đúng trật tự hơn đáng kể so với vùng liên kết vi cấu trúc hình ống bao gồm đầu C. Sự có mặt của nhiều tương tác khoảng dài đặc hiệu trong protein trong dung dịch chỉ ra rằng nó tồn tại trong trạng thái cầu nóng chảy rối loạn (Ohgushi, M. và Wada, A. (1983) FEBS Lett. 164, 21-24).

Các sản phẩm proteaza của protein tau tạo ra cụ thể là bởi caspaza và calpain (Asp13, Glu391 và Asp421) được xác định trong vật liệu đám rối (Gamblin, T.C. và cộng sự (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.100, 10032-10037). Cụ thể là, cắt đứt ở Asp421 được nghiên cứu cụ thể sử dụng kháng thể protein tau C3, mà liên kết với đầu Asp421 tự do. Sự cắt đứt này được đòi hỏi làm sự kiện sớm ở phát sinh bệnh AD liên quan đến gây ra chết rụng tế bào (deCalignon A. và cộng sự. (2010) Nature 464, 1201-1204). Phân cắt đầu N ở Asp13 và phân cắt đầu C ở Glu391 được xem là sự kiện muộn trong phát sinh bệnh (deCalignon A. và cộng sự. (2010) Nature 464, 1201-1204; Delobel, P. và cộng sự. (2008) Am. J. Pathol. 172, 123-131). Gần đây, đoạn đầu N bổ sung (gốc 1-224) được xác định trong CSF ở bệnh nhân AD và PSP, và đã được giả định là dấu hiệu sớm của bệnh và cụ thể là sinh bệnh (US14/092539; Bright, J. và cộng sự. (2014) Neurobiol. Ageing, 1-17). Đoạn phân cắt calpain tương tự được báo cáo bởi các nhóm khác (Ferreira, A. và Bigio, E.H. (2011) Mol. Med. 17, 676-685; Reinecke, J.B. và cộng sự. (2011) PLoS. One. 6, e23865).

Ngoại trừ hyper-phosphoryl hóa và phân đoạn protein tau, axetyl hóa sau dịch mã (Cohen, T.J. và cộng sự. (2011) Nat. Commun. 2, 252; Min, S.W. và cộng sự. (2010) Neuron 67, 953-966) và O-GlcNAcylation (Zhu, Y. và cộng sự. (2014) J. Biol. Chem.) được đề làm quy trình xác định bệnh lý trong việc hình thành bệnh lý đám rối liên quan đến AD.

III. Liệu pháp miễn dịch Tau

Liệu pháp miễn dịch thường tách thành nghiên cứu vắc-xin chủ động và bị động. Trong nghiên cứu vắc-xin chủ động, tác nhân sinh bệnh được tiêm vào bệnh nhân và hệ miễn dịch bẩm sinh thể hiện đáp ứng miễn dịch. Điều này gây ra sự trưởng thành của tế bào B tạo ra các kháng thể có ái lực cao kháng lại kháng nguyên được sử dụng. Trong nghiên cứu vắc-xin bị động, việc kích thích hệ miễn dịch bẩm sinh bao bọc bằng cách truyền kháng thể đặc hiệu kháng kháng nguyên. Hệ loại bỏ vốn có sau đó loại bỏ kháng thể liên kết phối tử.

Miễn dịch AClà theo đuôi kháng thể đơn dòng chuột kháng phospho-serin 409 của tau. Các kháng thể được định hình đối với mô não AD của người và mô não đối chứng và được chọn dựa trên khả năng nhận diện bệnh lý đám rối của chúng. Phiên bản người hóa của hai kháng thể, hACI-36-2B6-Ab1 và hACI-36-3A8-Ab1, đều liên kết với protein tau epitop trong axit amin 401-418 (WO 2013/151762).

Nhóm của Roger Nitsch đã phân lập các tự kháng thể protein tau từ cá thể khỏe mạnh cao tuổi không có dấu hiệu của bệnh thoái hóa do protein tau. Nhiều kháng thể được phân lập sử dụng protein tau tái tổ hợp chiều dài đầy đủ của người (2N4R) để tìm kháng thể đặc hiệu protein tau. Sau đó chúng được sàng lọc về khả năng phân biệt protein tau phân lập từ cá thể bệnh và các thể khỏe mạnh. Ba kháng thể dẫn, 4E4, 4A3 và 24B2, được mô tả trong tài liệu sáng chế (WO2012049570; US2012087861). Bản đồ epitop của chúng chỉ ra rằng tất cả nhận diện axit amin trong và đầu C đến vùng liên kết vi cấu trúc hình ống, từ vị trí V339 đến K369. Các kháng thể này không thể hiện bất kỳ đặc hiệu phospho.

C2N chẩn đoán chủ yếu tập trung vào việc phát triển công cụ chẩn đoán để phát hiện sớm bệnh thoái hóa thần kinh. Các kháng thể tạo thành kháng protein tau chiều dài đầy đủ của người và chuột. Tám và năm các kháng thể được xác định, nhận diện tau của người và chuột, tương ứng (Yanamandra, K. và cộng sự. (2013) Neuron 80, 402-414). Ba kháng thể với động lực liên kết khác nhau được chọn để đánh giá trong cơ thể. Cụ thể là, HJ9.3, HJ9.4 và HJ8.5, nhận diện gốc protein tau 306-320, 7-13 và 25-30, tương ứng, với kháng thể cuối cùng đặc hiệu đối với protein tau của người. Các kháng thể còn được chọn dựa trên khả năng của chúng để ngăn chặn việc chuyển bệnh học trong thử nghiệm báo cáo cơ giới tinh vi của việc lan truyền xuyên bào của protein tau (Sanders, D.W. và cộng sự. (2014) Neuron 82, 1271-1288; Kfoury, N. và cộng sự. (2012) J. Biol. Chem. 287, 19440-19451). Việc đánh giá chúng trong nghiên cứu tiêm i.c.v. mạn tính ở chuột chuyển gen P301S chứng minh khả năng của chúng làm giảm mức protein tau hyperphosphoryl hóa protein như được xác định bởi việc nhuộm AT8 ở phân tích hóa mô miễn dịch của chuột được điều trị.

Các kháng thể của Peter Davies được phát triển ban đầu là công cụ chẩn đoán mà có thể phân biệt giữa protein tau bệnh lý và bình thường ở vật liệu não AD và đối chứng (Greenberg, S.G. và Davies, P. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 5827-5831). Việc đánh giá tính hữu ích chữa bệnh của of các kháng thể PHF1 và MC1 được chứng

minh ở P301S và JPNL3 (P301L) (Boutajangout, A. và cộng sự. (2011) *J. Neurochem.* 118, 658-667; Chai, X. và cộng sự. (2011) *J. Biol. Chem.* 286, 34457-34467; D'Abramo, C. và cộng sự. (2013) *PLoS. One.* 8, chuột e62402). PHF1 nhận diện phospho-tau epitop tuyến tính (pS396, pS404) trong khi đó MC1 là kháng thể phụ thuộc hình thể mà nhận diện protein tau epitop cấu trúc yêu cầu hai phần khác nhau của trình tự tuyến tính, epitop ở gốc 46-202 và epitop đầu C giữa gốc 312-342 (Jicha, G.A. và cộng sự. (1997) *J. Neurosci. Res.* 48, 128-132). Việc tiêm hai các kháng thể này trong thử nghiệm chủng ngừa mạn tính 12-13 tuần tạo ra sự giảm cơ bản bệnh lý tủy sống và cuống não trong số các vùng não khác, mà được dịch mã để làm giảm đi thiếu hụt vận động quan sát được ở các chuột này. (D'Abramo, C. và cộng sự. (2013) *PLoS. One.* 8, e62402).

iPerian / Bristol Meyers Squibb đã phát triển các kháng thể protein tau đối với các loài protein tau bệnh lý yêu cầu, gồm có các đoạn đầu N của protein tau (etau: gốc1-224), mà thúc đẩy siêu hoạt tính ở nuôi cấy neuron trên cơ sở tế bào cuống đa năng cảm ứng. Đặc điểm của các kháng thể được phát triển, nhưng sự đặc trưng hóa tập trung vào các kháng thể IPN001 và IPN002 mà nhận diện epitop đầu N trong gốc 9-18. Theo đó, các kháng thể này phát hiện mức tăng protein tau ở CSF từ bệnh nhân AD và PSP chia cấp mà có thể là dấu hiệu sớm của bệnh. Tiêm trong cơ thể các kháng thể ở chuột JPNL3 (P301L) dẫn đến đảo ngược một phần thiếu hụt vận động tiến triển (US14/092539).

Einar Sigurdsson là chương trình đầu tiên để chứng minh tính hiệu quả của liệu pháp miễn dịch trên cơ sở protein tau. Vắc-xin hoạt tính gồm có peptit protein tau 379-408[pS396, pS404] cùng với tá được Adju-Phos được sử dụng để chủng ngừa chuột JPNL3 (P301L). Trong thử nghiệm này việc giảm nổi bật bệnh lý protein tau quan sát được ở chuột được điều trị vắc-xin khi so với động vật đối chứng. Việc giảm bớt kiểu hình vận động liên quan đến bệnh do protein tau cũng được phát hiện. Tính hiệu quả của nó được xác nhận ở mô hình chuột khác nhau (htau/PS1) không dẫn bởi protein tau đột biến (Boutajangout, A. và cộng sự. (2011) *AAIC 2011* (7, issue 4, Supplement edn) p. s480-s431; Congdon, E.E. và cộng sự. (2013) *J. Biol. Chem.* 288, 35452-35465; Gu, J. và cộng sự. (2013) *J. Biol. Chem.* 288, 33081-33095).

Prothema đánh giá ba kháng thể protein tau ở chuột chuyển gen protein tau K369I (K3) và ở mô hình chuột P301L. Các kháng thể với các đặc điểm khác nhau được lựa chọn để đánh giá trong cơ thể. Hai kháng thể pS404 với isotyp khác nhau (IgG1/k và IgG2a/k) hoặc tổng (pan) kháng thể kháng-tau (IgG1/k) được tiêm theo kiểu mạn tính.

Chuột K369I được điều trị với tiêm hàng tuần trong 21 tuần bắt đầu ở 3 tuần tuổi, và chuột P301L được điều trị trong 7 tháng với tiêm hàng tuần bắt đầu từ 4 tháng tuổi. Việc giảm thể vùi sợi thần kinh dương tính protein tau quan sát được ở chuột K3 với kháng thể IgG2a/k pS404. Cả hai kháng thể pS404 đều có khả năng làm giảm mức tau dương tính pS422, trong khi đó không quan sát thấy giảm ở chuột được điều trị với kháng thể pan-anti-tau. Nghiên cứu này đề xuất rằng: 1) việc loại bỏ protein tau có thể phụ thuộc isotyp, và; 2) có thể quan trọng để nhắm đích loài protein tau mà liên quan đến bệnh, như kháng thể hoàn toàn kháng tau không có khả năng làm giảm protein tau hyperphosphoryl hóa (PCT/US2014/025044).

Tác giả của sáng chế đã phát hiện một cách đáng ngạc nhiên các kháng thể đặc hiệu để phosphoryl hóa protein tau gốc serin 396 (pS396); điều này ngược lại với các kháng thể có trong lĩnh vực mà nhận diện cơ bản protein tau phosphoryl hóa ở cả gốc 396 và 404, phosphoryl hóa chỉ ở gốc 404 hoặc ở các gốc khác trên protein tau.

Tác giả đã phát triển các kháng thể mà còn có tính đặc hiệu và tính chọn lọc đáng kể đối với protein tau bệnh lý của người. Có nhu cầu đối với các kháng thể mà chọn lọc và đặc hiệu cao đối với protein tau bệnh lý. Các kháng thể theo sáng chế thể hiện mức đặc hiệu và tính chọn lọc cao hơn nhiều đối với protein tau bệnh lý của người so với protein tau không bệnh lý so với các kháng thể của WO2013/050567 (xem Hình 1 of WO2013/050567). Các kháng thể của WO2012/045882 được báo cáo là có liên kết đặc hiệu, được tạo ra từ trình tự axit amin gốc 6 đến 9 của axit amin protein tau 393-401, 396-401, 394-400 và 393-400. Điều này ngược với các kháng thể theo sáng chế mà tạo ra đối với protein tau bệnh lý hyperphosphoryl hóa bao gồm trình tự axit amin dài hơn như được mô tả ở đây.

Như được thể hiện trong phần Ví dụ, so với năm kháng thể protein tau được công bố: hACI-2B6 (được mô tả trong WO2013151762); IPN002 (được mô tả trong WO 2014028777); HJ8,5 (được mô tả trong WO 2014008404); kháng thể đơn dòng kháng Tau pS422 2.10.3 (được mô tả trong US8609097); PHF13 (kháng thể bán trên thị trường (ví dụ SigmaAldrich) được đề xuất để phát hiện protein tau phosphoryl hóa ở Ser 396 có nguồn gốc chuột, chuột cống và người và được bàn đến bởi Sankaranarayanan (PLOS ONE, DOI:10.1371/journal.pone.0125614 May 1, 2015 và Otvos (Biochemistry 1997, 36, 8114-8124); và kháng thể 4E4, (được mô tả là liên kết với V339, E342, D387, E391 và K395 trong US8940272), thể hiện rằng kháng thể, và đoạn liên kết epitop của

chúng, theo sáng chế thể hiện mức đặc hiệu và tính chọn lọc cao hơn đối với protein tau sinh bệnh ở người so với bất kỳ trong các kháng thể so sánh.

Ngoài ra, các kháng thể, và đoạn liên kết epitop của chúng, theo sáng chế thể hiện nhiều dấu hiệu có lợi như khả năng phân biệt giữa protein tau bệnh lý và không bệnh lý của người, và cụ thể là liên kết protein tau liên quan đến bệnh lý Alzheimer (AD). Trong các nghiên cứu điện sinh lý, kháng thể, và đoạn liên kết epitop của chúng, theo sáng chế còn có khả năng đảo ngược giảm thuận lợi xung bắt cặp và dòng synap kích thích cỡ nhỏ tự phát (mEPSC).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng, và đoạn liên kết epitop của chúng, có khả năng liên kết đặc hiệu với gốc phosphoryl hóa serin 396 của protein tau của người (chất đồng phân 2N4R) (SEQ ID NO:33) và các kháng thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp mới cho phép phân lập và tái tạo đặc hiệu này. Các kháng thể còn khác biệt ở chỗ khả năng của chúng để phân biệt giữa gốc phosphoryl hóa 396 và 404 sao cho chúng cơ bản không liên kết gốc được phosphoryl hóa 404.

Không bị ràng buộc bởi lý thuyết cụ thể, bằng chứng từ tác giả chứng minh rằng sự phân biệt và tính chọn lọc của các kháng thể theo sáng chế đối với protein tau của người protein phosphoryl hóa ở gốc 396 với sự có mặt của protein tau phosphoryl hóa ở gốc 404 nhưng không ở 396 đáng kể so với triển vọng bệnh lý và chữa bệnh. Các kháng thể theo sáng chế chọn lọc cho protein tau bệnh lý với sự có mặt của tau phosphoryl hóa không bệnh lý. Các kháng thể theo sáng chế có khả năng làm nghèo đám rối protein tau của protein tau bệnh lý với sự có mặt của tau bình thường. Không bị ràng buộc bởi lý thuyết cụ thể, tin rằng việc làm nghèo đám rối protein tau bao gồm tau protein mà được phosphoryl hóa ở vị trí protein 396 ngăn cản sự tạo hạt của protein tau bệnh lý thành đám rối protein tau. Theo đó, một khía cạnh theo sáng chế đề cập đến kháng thể mà có khả năng liên kết chọn lọc với tau 396-phosphoryl hóa ngay cả khi phân tử này có mặt của protein tau được phosphoryl hóa ở vị trí protein tau 404. Khía cạnh liên quan theo sáng chế đề cập đến kháng thể mà có khả năng liên kết chọn lọc với tau 396-phosphoryl hóa ngay cả khi phân tử này có mặt protein tau không bệnh lý. Cũng được xác định, sáng chế đề cập đến kháng thể chọn lọc cho protein tau bệnh lý protein tau bệnh lý này là protein tau hyperphosphoryl hóa xuất hiện là dải 64 kDa (bằng phân

tích Western Blot) ở chuột chuyển gen biểu hiện quá mức chất đồng phân 2N4R tau của người.

Một khía cạnh theo sáng chế nhắm đến kháng thể kháng tau đáp ứng các tiêu chí thử nghiệm sau đây: i) kháng thể không liên kết với protein tau không phosphoryl hóa; ii) kháng thể không liên kết với protein tau phosphoryl hóa ở 404 và không được phosphoryl hóa ở 396; iii) kháng thể liên kết với protein tau phosphoryl hóa ở 396; và iv) kháng thể liên kết với protein tau phosphoryl hóa ở cả 396 và 404. Tác giả phát hiện ra rằng liên kết dưới các tiêu chí thử nghiệm iii) và iv) trong cùng trật tự độ lớn và yêu cầu rằng phosphoryl hóa ở vị trí 404 không ảnh hưởng hoặc tăng cường quá trình liên kết. Tác giả còn phát hiện ra rằng, trái với tiêu chí thử nghiệm ii), liên kết với protein tau mà không được phosphoryl hóa ở 396 nhưng được phosphoryl hóa ở 404, không làm nghèo đám rối hoặc xóa bỏ protein tau bệnh lý ở mô hình thử nghiệm.

Một khía cạnh theo sáng chế nhắm đến kháng thể kháng-tau mà, khi được sử dụng với chiết xuất rTg4510 nghèo miễn dịch từ chuột chuyển gen, làm giảm đặc hiệu dải protein tau hyperphosphoryl hóa 64 và 70kDa ít nhất 90%, trong khi làm giảm dải protein tau 55 kDa không hơn 10%. Khía cạnh khác theo sáng chế nhắm đến kháng thể kháng protein tau mà giảm đặc hiệu dải protein tau hyperphosphoryl hóa 64 và 70kDa ít nhất 90%, trong khi việc làm giảm dải protein tau 55 kDa không hơn 10%; hoặc khả năng, khi được sử dụng như được mô tả ở đây với chiết xuất từ não AD xét nghiệm tử thi của người, để làm giảm đặc hiệu dải tau hyperphosphoryl hóa S396 phosphoryl hóa ít nhất 90%, trong khi đó không làm giảm dải protein tau không hyperphosphoryl hóa hơn 10%.

Khía cạnh khác nữa theo sáng chế nhắm đến phương pháp điều trị bệnh nhân mắc bệnh do protein tau, như bệnh Alzheimer, bao gồm làm nghèo đám rối hoặc bớt đi sự tiến triển của đám rối này, đám rối này bao gồm tau hyperphosphoryl hóa, phương pháp này bao gồm cho protein tau hyperphosphoryl hóa tiếp xúc với kháng thể theo sáng chế sao cho đám rối được làm nghèo, làm giảm hàm lượng protein tau hyperphosphoryl hóa của nó hoặc tiến triển của việc hình thành đám rối giảm dần.

Được xác định tùy ý, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh nhân mắc bệnh do protein tau, như bệnh Alzheimer, phương pháp này bao gồm việc cho đám rối tiếp xúc với kháng thể chọn lọc cho protein tau có gốc 396 phosphoryl hóa sao cho đám

rồi được làm nghèo protein tau hyperphosphoryl hóa.

Đặc biệt hơn là sáng chế đề cập đến một điểm bất kỳ trong số bốn kháng thể đơn dòng được chọn từ nhóm bao gồm:

Kháng thể C5.2

trong đó Kháng thể C5.2 bao gồm:

- (a) CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:17;
- (b) CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:18;
- (c) CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:19;
- (d) CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:20;
- (e) CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:21; và
- (f) CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:22;

Kháng thể C8.3

trong đó Kháng thể C8.3 bao gồm:

- (a) CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:25;
- (b) CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:26;
- (c) CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:27;
- (d) CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:28;
- (e) CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:29; và
- (f) CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:30;

Kháng thể C10-2

trong đó Kháng thể C10-2 bao gồm:

- (a) CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:9;
- (b) CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:10;
- (c) CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:11;
- (d) CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:12;
- (e) CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:13; và

(f) CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:14;

và

Kháng thể D1.2

trong đó Kháng thể D1.2 bao gồm:

- (a) CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:1;
- (b) CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:2;
- (c) CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:3;
- (d) CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:4;
- (e) CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:5; và
- (f) CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:6.

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng đầy đủ của kháng thể ví dụ C5.2, bao gồm vùng hằng định trong đó, như được thể hiện ở SEQ ID NO:23 và SEQ ID NO:24, tương ứng (như được sử dụng trong các Ví dụ).

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng đầy đủ của kháng thể ví dụ C8.3, bao gồm vùng hằng định trong đó, như được thể hiện ở SEQ ID NO:31 và SEQ ID NO:32, tương ứng (như được sử dụng trong các Ví dụ).

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng đầy đủ của kháng thể có lợi C10-2, bao gồm vùng hằng định trong đó, như được thể hiện ở SEQ ID NO:15 và SEQ ID NO:16, tương ứng (như được sử dụng trong các Ví dụ). Trình tự axit amin nêu ở chuỗi nặng nêu ở kháng thể C10-2 người hóa như được thể hiện ở SEQ ID NO:35. Trình tự axit amin nêu ở chuỗi nhẹ nêu ở kháng thể C10-2 người hóa như được thể hiện ở SEQ ID NO:36. Một khía cạnh theo sáng chế đề cập đến kháng thể theo sáng chế bao gồm SEQ ID NO:35 hoặc SEQ ID NO:36, hoặc cả hai.

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng đầy đủ của kháng thể ví dụ D1.2, bao gồm vùng hằng định trong đó, như được thể hiện ở SEQ ID NO:7 và SEQ ID NO:8, tương ứng (như được sử dụng trong các Ví dụ).

Theo phương án tùy ý, kháng thể D1.2 bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:34, trong đó axit amin ở vị trí 3 là valin (trong khi đó trong chuỗi nhẹ ví dụ nêu ở SEQ ID NO:7, axit amin này là methionin). Chuỗi nhẹ này có thể bắt cặp

với chuỗi nặng như được mô tả ở trên, cụ thể là có CDRs nêu ở SEQ ID NOs:4, 5 và 6. Ví dụ, kháng thể có thể bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:34 cùng với chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:8 (kháng thể "D1.2*").

Một khía cạnh theo sáng chế nhắm đến kháng thể bao gồm:

- (a) CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:9;
- (b) CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:10; và/hoặc
- (c) CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:11.

Khía cạnh khác theo sáng chế nhắm đến kháng thể bao gồm, hoặc còn bao gồm:

- (a) CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:12;
- (b) CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:13; và/hoặc
- (c) CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:14.

Các kháng thể, và đoạn liên kết epitop của chúng, theo sáng chế có thể được sử dụng trong điều trị bệnh do protein tau như bệnh Alzheimer (AD), Bệnh hạt u bạc (AGD), Liệt trên nhân tiến triển (PSP), Thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), TBI (trấn thương sọ não, nhẹ, cấp hoặc mạn tính), và tổn thương não mạn tính do chấn thương (CTE).

Các kháng thể, và đoạn liên kết epitop của chúng, theo sáng chế còn dự kiến để dùng trong điều trị Chứng rối loạn tâm thần, cụ thể là Chứng rối loạn tâm thần do AD hoặc Chứng rối loạn tâm thần ở bệnh nhân mắc AD.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: Liên kết với dot-blot vật liệu bệnh lý

Hình 1 (Các bảng A-B) thể hiện kết quả của phân tích dot blot thể hiện 500 ng phần S1 và P3 (việc hình thành các phần S1 và P3 được bộc lộ ở Ví dụ 3) dẫn xuất từ não bệnh nhân AD (AD) và các thể khỏe mạnh có tuổi (con) hoặc từ rTg4510 32 tuần tuổi và con cùng lứa không chuyển gen (wt) được dò bằng 1 µg/ml D1.2 hoặc C10-2 để đánh giá sự phát hiện protein tau bệnh lý (Ví dụ 3). Dot plot thể hiện rằng D1.2 (Bảng A) hoặc C10-2 (Bảng B) phản ứng đặc hiệu trên vật liệu bệnh từ bệnh nhân AD hoặc protein tau của người (P301L) như được biểu hiện ở chuột chuyển gen (Tg4510).

Hình 2: Phân tích Western blot của kháng thể D1.2 và C10-2

Hình 2 (Các bảng A-B) thể hiện kết quả của Phân tích Western blot thể hiện 2 μ g phần S1 và P3 dẫn xuất từ não của rTg4510 32 tuần tuổi và con cùng lứa không chuyển gen (wt) hoặc 20 μ g phần S1 và P3 dẫn xuất từ não của bệnh nhân AD (AD) và các thể khỏe mạnh có tuổi (con) được dò với 1 μ g/ml D1.2 (Bảng A) hoặc C10-2 (Bảng B). Các phần S1 và P3 được nạp ở tỷ lệ 1:50 (dựa trên khối lượng mô) mà dẫn xuất từ 0,01 mg mô. Trong Western blot, protein tau 4R0N của người đột biến P301L bình thường được thể hiện ở 55 kDa, trong khi các loài protein tau 4R0N của người đột biến P301L hyperphosphoryl hóa thể hiện ở 64 và 70 kDa. Các phần P3 từ protein tau hyperphosphoryl hóa AD thể hiện ở 54, 64, 69 và 74 kDa (Ví dụ 3). Hình minh họa rằng các kháng thể liên kết đặc hiệu với hyper-phosphoryl hóa, protein tau thay đổi tính biến động.

Hình 3: Liên kết với vật liệu P3 bệnh lý ở MSD

Hình 3 (Các bảng A-D) thể hiện kết quả của Meso Scale Discovery (MSD) ELISA liên kết của D1.2 (Bảng A), C5-2 (Bảng B), C10-2 (Bảng C) và C8-3 (Bảng D) đối với protein tau phân lập từ não AD người và não đối chứng không mắc bệnh (Ví dụ 4). Tương tự như được chứng minh trên Hình 1, việc làm bất động protein tau phân lập từ não bệnh (AD) và não đối chứng khỏe mạnh trên tấm ELISA có thể được dùng để chứng minh rằng các kháng thể theo sáng chế liên kết đặc hiệu các loài protein tau bệnh lý. Tăng nồng độ của kháng thể dẫn đến liên kết bão hòa. Lượng kháng thể được liên kết được phát hiện bằng kháng thể kháng chuột thứ cấp.

Hình 4: Ải lực peptit và pS396 tính chọn lọc (liên kết peptit)

Hình 4 (Các bảng A-D) thể hiện kết quả của phân tích liên kết đặc hiệu của C10-2 (Bảng A) và D1.2 (Bảng B) đối với protein tau (386-409) peptit với tất cả kết hợp phosphoryl hóa ở các vị trí S396 và S404 (Ví dụ 5). Ải lực đặc hiệu đối với vật liệu bệnh lý ở người là khó đánh giá, vì lý do này tác giả sử dụng peptit đặc hiệu liên kết để xác định ái lực epitop chính xác, sử dụng peptit phosphoryl hóa đặc hiệu và không-phosphoryl hóa. Đường cong đáp ứng liều, đặc hiệu thể hiện liên kết của các kháng thể C10-2 (Bảng C) và D1.2 (Bảng D) với peptit: TDHGAEIVYK^{p}SPVVSGDT^{p}SPRHL (SEQ ID NO:37) (pS396/pS404), phosphoryl hóa ở gốc Ser396 và Ser404. Liên kết cạnh tranh được thực hiện bằng peptit không phosphoryl hóa (NP) và peptit phosphoryl hóa một lần (pS396 và pS404). Ngoài ra, peptit đối chứng tương tự với serin 262 phosphoryl hóa được bao gồm. Liên kết cạnh tranh chứng minh rằng tất cả liên kết thu

được qua gốc serin 396 phosphoryl hóa. Ngoài ra, dữ liệu chứng minh rằng phosphoryl hóa ở gốc 404 không ảnh hưởng đến liên kết của các kháng thể ở phosphor-serin 396.

Hình 5: Đặc trưng nghiên cứu mô của kháng thể đặc hiệu

Hình 5, Bảng A thể hiện rằng C10-2 (cột trái) and D1.2 (cột phải) các kháng thể liên kết với các loài p-tau trong thể bào Tg4510 (hàng trên) và mạch thần kinh. Không có phản ứng miễn dịch được phát hiện ở các phần não không Tg (hàng dưới). Hình 5, Bảng B thể hiện rằng C10-2 (cột trái) and D1.2 (cột phải) các kháng thể liên kết với các loài p-tau trong thể bào và sợi mạch thần kinh ở não cho AD (AD) (hàng trên). Não cho đối chứng không có phản ứng miễn dịch (hàng dưới) (Ví dụ 6).

Hình 6: Liên kết với P3 bệnh lý và không bệnh lý đối với các kháng thể C10-2 và đối chứng

Hình 6 (Các bảng A-E) thể hiện kết quả chứng minh sự khá hơn của kháng thể C10-2 (Bảng C) theo sáng chế trong việc nhận diện vật liệu bệnh lý so với các kháng thể 2-10-3 trong lĩnh vực (Bảng A), HAcI-2B6 (Bảng B), IPN 002 (Bảng D), và HJ8,5 (Bảng E). Hình thể hiện liên kết đặc hiệu của C10-2 với protein tau từ não người khỏe mạnh (làm đối chứng) và não người bệnh (AD), cùng với liên kết với protein tau từ chuột Tg4510 10 tháng tuổi biểu hiện protein tau P301L đột biến của người. Tăng nồng độ kháng thể được thêm vào vật liệu protein tau P3 được cố định trên tấm ELISA. Tỷ lệ của tính chọn lọc đối với protein tau bệnh lý được xác định ở bão hòa toàn bộ với các loài hoạt tính. Số lần tính chọn lọc đối với mỗi trong các kháng thể trong lĩnh vực như được thể hiện ở hình (Ví dụ 7).

Hình 7: Ngăn cản tạo hạt ở tế bào HEK293 và trong ống nghiệm

Hình 7 (Các bảng A-C) thể hiện định lượng của kết tụ protein tau bằng thử nghiệm Cisbio. Tế bào pcADN HEK293 tạo hạt thể hiện không có tín hiệu, xác nhận sự vắng mặt của việc dò vật liệu tạo hạt đầu vào. Vật liệu tạo hạt wt (kiểu đại) (WW) thể hiện không tạo hạt, nhưng ngược lại chất đồng chất rTg4510 (CC) tạo hạt hiệu quả, so với không tạo hạt. Hiệu quả tạo hạt này không ảnh hưởng bởi việc điều trị bằng HEL, nhưng đảo ngược một phần bởi điều trị bằng các kháng thể protein tau (C10-2>D1.2>hACI36-2B6-Ab1). Đồ thị (Các bảng A-C) thể hiện ba bộ mẫu độc lập và được vẽ đồ thị là kết tụ protein tau tương đối (số lần tín hiệu so với nền chuẩn hóa cho protein tổng) (Ví dụ 8).

Hình 8: Đảo ngược thiếu hụt điện sinh lý

Hình 8 thể hiện kháng thể đảo ngược tạo điều kiện xung bắt cặp (Các bảng B và D) và dẫn truyền synap cơ sở (Bảng A và C) thể hiện thể trường kích thích CA1 (C10-2, Bảng A; D1.2, Bảng B), minh họa thể trường kích thích ở điều trị CA1 dưới mạn tính bằng C10-2 ở chuột Tg4510 mắc và chuột tTA làm đối chứng. Động vật được điều trị mỗi tuần hai lần với liều 15 mg/kg kháng thể trong hai tuần (xem Ví dụ 9). Trong Bảng A (for C10-2) và Bảng C (for D1.2), độ dốc thể trường (fEPSP) được vẽ đồ thị đối với cường độ kích thích. Các bảng A và C minh họa rằng trong đánh giá điện sinh lý trong cơ thể của dẫn truyền synap và độ mềm dẻo trong vùng CA1 của hồi hải mã ở chuột rTg4510 4,5 đến 5,5 tháng tuổi (2 đường cong dưới) và chuột đối chứng tTA (2 đường cong trên) i) dẫn truyền synap cơ sở suy yếu đáng kể ở chuột rTg4510 so với chuột tTA, và ii) tạo điều kiện xung bắt cặp giảm đáng kể chuột rTg4510 so với chuột tTA.

Tạo điều kiện xung bắt cặp, tính mềm dẻo synap ngắn hạn được tin là phụ thuộc cơ chế tiền synap, còn được đo ở chuột rTg4510 và chuột tTA (Bảng B for C10-2 và Bảng D for D1.2). Tóm lại, cặp kích thích bằng khoảng cách giữa kích thích (ISI) thay đổi trong khoảng từ 25 đến 1000 ms được áp dụng cho Schaffer phụ, và độ dốc của fEPSP thứ hai được so với độ dốc của fEPSP thứ nhất. Tạo điều kiện quan sát ở tất cả ISIs, với tạo điều kiện tối đa ở ISIs của 50 và 75 ms. Có lợi là, PPF giảm đáng kể thấy ở chuột rTg4510 (2 thanh thứ hai) so với chuột tTA (2 thanh thứ nhất).

Hình 9: Tổng quan sàng lọc như thể hiện trên Hình 1-8

Các kháng thể tăng đối với peptit phosphoryl hóa hai lần: TDHGAEIVYK^{p}SPVVSGDT^{p}SPRHL (SEQ ID NO:37) bao phủ các gốc 386-410 của protein tau 2N4R. Khối tế bào lai được sàng lọc sử dụng dot-blot và MSD ELISA với protein tau bệnh lý và không bệnh lý của người được cố định (Ví dụ 4) để phân lập dòng vô tính mà đặc hiệu cao đối với hoặc là phospho-epitop S396 và/hoặc S404 và vào cùng thời điểm nhận diện đặc hiệu protein tau hyperphosphoryl hóa từ não bệnh Alzheimer của người. Khả năng phân biệt giữa protein tau của người bệnh lý và không bệnh lý trong dot-blot và Western blot dùng để lựa chọn khối tế bào lai. 16 dòng vô tính được chọn trong đó bốn dòng vô tính (D1.2, C10-2, C5.2 và C8.3) thể hiện khả năng khác thường đối với liên kết với vật liệu bệnh lý của người. Sử dụng chủng ngừa đặc hiệu và phương pháp sàng lọc tạo ra kháng thể phospho-serin-396 (pS396) đặc hiệu cao.

Hình 10: Gốc pSer396 liên kết ở tâm của vị trí kháng nguyên liên kết của mAb C5.2

Cấu trúc tinh thể của mAb C5.2 trong phức với phospho-peptit 386-410 ở độ phân giải 1,9Å. Trong cấu trúc này mật độ electron của gốc 392-398 được phân giải. Gốc ^(p)Ser396 được liên kết ở tâm của vị trí kháng nguyên liên kết của mAb C5.2 Trong nghiên cứu cấu trúc này của mAbs kháng-Tau, epitop được liên kết qua chuỗi nặng (phía dưới bên phải) và chuỗi nhẹ (phía dưới bên trái).

Hình 11: Kháng thể C5.2 tương tác với phosphoserin protein tau (292-298) peptit

Hình 11 thể hiện tương tác giữa kháng thể C5.2 với phosphoserin protein tau (292-298) peptit. Cấu trúc của Ile(392)-VAL(393)-Tyr(394)-Lys(395)-P-Ser(396)-Pro(397)-Val(398) được thể hiện. Tương tác chính tham gia vào túi kỵ nước tạo thành bởi L3:H3, L3:F8*, H1:H13, H2:Y1, H2:Y3 và Y(394) của peptit protein tau. Có khung liên kết hydro rộng tạo thành giữa ^(p)S(396) solvat hóa và L3:T4, H1:R10, H1:T11, H3:R1, H3:T3. Theo danh pháp đượ sử dụng, ký tự thứ nhất (ví dụ, "L" của L3:H3) chỉ xem gốc CDR tham gia là CDR chuỗi nhẹ hoặc CDR chuỗi nặng, số thứ nhất chỉ CDR nào trong chuỗi này tham gia (ví dụ, "L3" chỉ CDR3 của chuỗi nhẹ), thuật ngữ còn lại (ví dụ, "H3" of L3:H3) chỉ tên và vị trí của axit amin tham gia (ví dụ, "H3" chỉ histidin ở vị trí gốc thứ ba của CDR); thus "L3:H3" chỉ gốc histidin ở vị trí thứ ba của CDR3 chuỗi nhẹ. Có liên kết hydro mạnh và tương tác điện tích/phân cực giữa chuỗi bên Y(394) và mạch chính với phosphonat của ^(p)S396 tạo thành sự quay lại trong mạch peptit. (*) L3:F8 là gốc khung kẹp hai bên đầu C của CDR L3.

Trình tự CDR của C5.2 là:

CDR L1: QASQDTSINLN (SEQ ID NO:17)

CDR L2: GASNLED (SEQ ID NO:18)

CDR L3: LQHTYLP (SEQ ID NO:19)

CDR H1: KASGYTFTDRTIH(SEQ ID NO:20)

CDR H2: YIYPGDDSTKYNDNFKG (SEQ ID NO:21)

CDR H3: RGTMDY (SEQ ID NO:22)

Hình 12: Làm nghèo protein tau đối với thử nghiệm tạo hạt (HEK293)

Hình 12 (Các bảng A-B) thể hiện làm nghèo miễn dịch của chất đồng chất não

rTg4510 sử dụng C10-2 (mC10-2) chuột và C10-2 (hC10-2) người hóa. Western blot của chất đồng chất làm nghèo được phát hiện với E1 (tổng tau; Bảng A; Dưới)) và C10-2 (pS396 tau; Bảng A; Trên) và cả mC10-2 và hC10-2 làm nghèo hiệu quả protein tau hyperphosphoryl hóa (dải trên blot E1 và tất cả dải trên blot C10-2). Chất đồng chất làm nghèo còn được phân tích về việc làm nghèo protein tau kết tụ sử dụng thử nghiệm Cisbio. Bảng B thể hiện thay đổi protein tau kết tụ trong mẫu. Nghiên cứu làm nghèo với mC10-2 và hC10-2 loại bỏ kết tụ protein tau 99 và 99,5% tương ứng (Bảng B).

Hình 13: Thử nghiệm tạo hạt (HEK293) với vật liệu làm nghèo

Các bảng A-C thể hiện chất đồng chất làm nghèo dùng để tạo hạt P301L-hTau trong tế bào HEK293. Chất đồng chất từ động vật đối chứng (WW) không tạo hạt, trong khi đó chất đồng chất rTg4510 (CC) tạo hạt hiệu quả, như đo bằng thử nghiệm kết tụ Cisbio trên tổng số hợp chất dung giải tế bào hoặc bằng cách phân đoạn tế bào HEK293 trong 1% triton-X (định lượng D1.2 hyperphosphoryl hóa không tan và tau (Bảng A, Trên và Dưới)). Làm nghèo bằng các kháng thể HEL và hHEL không ảnh hưởng đến việc kết hạt, trong khi đó làm nghèo bằng mC10-2 và hC10-2 ngăn cản kết tụ protein tau 88% và 96% (Bảng C) và protein tau không tan 97% và 100% (Bảng B) tương ứng.

Hình 14: Vật liệu rTg4510 làm nghèo miễn dịch (dùng cho nghiên cứu kết hạt trong cơ thể)

Các bảng A-C chứng minh phân tích Western blot (Bảng A; Trên, Dưới) chiết xuất não rTg4510 làm nghèo miễn dịch. C10-2 và D1.2 làm giảm đặc hiệu dải 64 kDa hyperphosphoryl hóa của người 90% và không ảnh hưởng đến 55 kDa protein tau Tau5, kháng thể tổng protein tau bán trên thị trường ngược lại làm giảm 55 kDa protein tau bình thường 74% và không ảnh hưởng đến 64 kDa Tau của người (Các bảng B-C).

Hình 15: Vật liệu AD làm nghèo miễn dịch (dùng trong nghiên cứu kết hạt trong cơ thể)

Hình 15 (Các bảng A-C) thể hiện phân tích Western blot (Bảng A) của chiết xuất não Alzheimer làm nghèo miễn dịch. Làm nghèo miễn dịch sử dụng C10-2 và D1.2 không làm giảm tổng mức protein tau hơn 10%, nhưng protein tau hyperphosphoryl hóa đặc biệt thấp hơn (90% giảm) (Các bảng B-C).

Hình 16 (Bảng A): Bệnh lý protein tau hồi hải mã ở chuột rTg4510 kết hạt với vật liệu rTg4510 làm nghèo miễn dịch

Hình 16 (Bảng A) minh họa định lượng bệnh lý protein tau ở não rTg4510 kết hạt với rTg4510 hoặc chất đồng chất não AD. Trước khi kết hạt tau hyperphosphoryl hóa, nhưng không phải Tau thường, giảm chất đồng chất 90-95% bằng cách sử dụng C10-2 hoặc D1.2. Bằng việc loại bỏ protein tau hyperphosphoryl hóa khỏi chất đồng chất, chất đồng chất không còn gây ra kết hạt bệnh lý protein tau.

Hình 16 (Bảng B) Bệnh lý đám rối hồi hải mã ở chuột rTg4510 kết hạt với vật liệu AD làm nghèo miễn dịch

Hình 16 (Bảng B) minh họa định lượng bệnh lý protein tau trong não rTg4510 kết hạt với chất đồng chất não rTg4510 (A) hoặc AD (B). Trước khi kết hạt tau hyperphosphoryl hóa, nhưng không phải Tau thường, giảm chất đồng chất chất đồng chất 90-95% bằng cách sử dụng C10-2 hoặc D1.2. Bằng việc loại bỏ protein tau hyperphosphoryl hóa khỏi chất đồng chất, chất đồng chất không còn gây ra kết hạt bệnh lý protein tau

Hình 17: Bệnh lý đám rối hồi hải mã ở chuột rTg4510 kết hạt với D1.2

Hình 17 minh họa định lượng neuron mang đám rối ở hồi hải mã của chuột rTg4510 kết hạt. Bệnh lý tăng theo thời gian (Ig G, 1 tháng; IgG 2 tháng; IgG 3 tháng). Tuy nhiên, điều trị chuột với D1.2, bệnh lý giảm đáng kể 1, 2 và 3 tháng sau kết hạt. (D1.2 1 tháng; D1.2 2 tháng; D1.2 3 tháng).

Hình 18: Làm nghèo protein tau đối với thử nghiệm kết hạt (HEK293)

Bảng A thể hiện làm nghèo miễn dịch chất đồng chất não rTg4510 sử dụng C10-2 (mC10-2) chuột và C10-2 (hC10-2) người hóa. Western blot của chất đồng chất làm nghèo được phát hiện bằng E1 (tổng tau) và C10-2 (pS396 tau) và cả mC10-2 và hC10-2 làm nghèo hiệu quả protein tau hyperphosphoryl hóa (dải trên blot E1 và tất cả dải trên blot C10-2). Chất đồng chất làm nghèo được phân tích đối với làm nghèo protein tau kết tụ sử dụng thử nghiệm Cisbio. Bảng B thể hiện làm nghèo với mC10-2 và hC10-2 loại bỏ kết tụ protein tau 99 và 99,5% tương ứng.

Hình 19: Thử nghiệm kết hạt (HEK293) với vật liệu làm nghèo

Bảng A thể hiện phân đoạn protein tau (western trên phần không tan. Bảng B thể hiện định lượng Western blot. Bảng C thể hiện protein tau tích tụ trong hợp chất dung giải tế bào. Chất đồng chất làm nghèo được dùng để tạo hạt P301L-hTau trong tế bào

HEK293. Chất đồng chất từ động vật đối chứng (WW) không tạo hạt, trong khi đó rTg4510 chất đồng chất (CC) tạo hạt hiệu quả, như đo bằng thử nghiệm kết tụ Cisbio trên tổng hợp chất dung giải tế bào hoặc phân đoạn các tế bào HEK293 trong 1% triton-X (định lượng hyperphosphoryl hóa D1.2 không tan+ tau). Làm nghèo với các kháng thể HEL và hHEL không ảnh hưởng đến việc tạo hạt, trong khi đó làm nghèo với mC10-2 và hC10-2 (Bảng C) ngăn cản kết tụ protein tau 88% và 96% và protein tau không tan 97% và 100% tương ứng (Bảng B).

Hình 20: Tính chọn lọc miễn dịch của C10-2 và D1.2 đối với protein tau hyperphosphoryl hóa so với tau bình thường.

Làm nghèo miễn dịch vật liệu rTg4510 dùng trong nghiên cứu tạo hạt trong cơ thể: Bảng A thể hiện Phân tích Western blot của chiết xuất não rTg4510 làm nghèo miễn dịch. Bảng B thể hiện rằng C10-2 và D1.2 làm giảm đặc hiệu dải 64 kDa hyperphosphoryl hóa, phosphoryl hóa ở serin 396 so với dải protein tau 55 kDa, mà không bao gồm lượng đáng kể của p396. Ngược lại, Tau5, kháng thể protein tau tổng bán trên thị trường, không giảm 55 kDa protein tau bình thường và không hiệu quả trong liên kết với 64 kDa Tau.

Hình 21: Tính chọn lọc miễn dịch của f C10-2 và D1.2 đối với protein tau hyperphosphoryl hóa so với tau bình thường.

Vật liệu AD làm nghèo miễn dịch (sử dụng trong nghiên cứu tạo hạt trong cơ thể: Bảng A thể hiện Phân tích Western blot của chiết xuất não Alzheimer làm nghèo miễn dịch. Làm nghèo miễn dịch sử dụng mC10-2 và D1.2 không làm giảm tổng mức protein tau hơn 10% (Bảng B), nhưng đặc biệt giảm protein tau hyperphosphoryl hóa (90% giảm) (Bảng C).

Hình 22: Bệnh lý protein tau hồi hải mã ở chuột rTg4510

Bảng A thể hiện bệnh lý protein tau hồi hải mã ở chuột rTg4510 kết hạt với vật liệu rTg4510 nghèo miễn dịch. Bảng B thể hiện bệnh lý đám rối hồi hải mã ở chuột rTg4510 kết hạt với vật liệu AD nghèo miễn dịch. Định lượng bệnh lý protein tau ở não rTg4510 kết hạt với rTg4510 (A) hoặc chất đồng chất não AD (B). Trước khi kết hạt tau hyperphosphoryl hóa, nhưng không phải Tau bình thường, làm giảm chất đồng chất 90-95% bằng cách sử dụng các kháng thể C10-2 hoặc D1.2. Bằng việc loại bỏ protein tau hyperphosphoryl hóa khỏi chất đồng chất, chất đồng chất không còn tạo ra kết hạt bệnh

lý protein tau.

Hình 23: Bệnh lý đám rối hồi hải mã ở chuột rTg4510 kết hạt được điều trị bằng D1.2

Định lượng neuron mang đám rối ở hồi hải mã của chuột rTg4510 kết hạt. Hình thể hiện rằng bệnh lý tăng theo thời gian và bằng cách điều trị chuột với D1.2, bệnh lý tăng thấp hơn đáng kể 2 và 3 tháng sau khi kết hạt.

Hình 24: Phân tích Western blot của chiết xuất AD của người làm nghèo miễn dịch

Hình minh họa rằng phiên bản người hóa của C10-2 (hC10-2), cũng như mC10-2 khác với kháng thể 2.10.3 (P-S422), trong đó mặc dù tổng protein tau còn lại không khác bất ngờ (tấm bên tay trái) so với 2.10.3, C10-2 (hC10-2), cũng như mC10-2 loại bỏ nhiều protein tau hyperphosphoryl hóa có trong chiết xuất não Alzheimer bằng phương pháp làm nghèo miễn dịch. Điều này được xác nhận trên Hình 25 bằng cách định lượng.

Hình 25: Định lượng protein tau kết tụ sau khi làm nghèo miễn dịch

Các kháng thể hC10-2 và mC10-2 khác với kháng thể 2.10.3 ở khả năng của nó để loại bỏ nhiều protein tau kết tụ có trong chiết xuất não Alzheimer bằng phương pháp làm nghèo miễn dịch.

Hình 26: Tổng protein tau còn lại sau khi làm nghèo miễn dịch

Định lượng tín hiệu western blot sau khi làm nghèo miễn dịch chiết xuất Alzheimer sử dụng các lượng khác nhau của kháng thể người hóa C10-2 (▲) và kháng thể 2.10.3 (◆). Trên Hình 26, định lượng của tổng tín hiệu protein tau sử dụng Tau5 (tất cả chất đồng phân protein tau bao gồm trong phân tích) được thể hiện. Cả kháng thể loại bỏ phần nhỏ của protein tau khỏi chế phẩm não Alzheimer. 2.10.3, được thiết kế để có tính đặc hiệu đối với P-S422 protein tau loại bỏ đến 24% tổng lượng protein tau, trong khi C10-2 loại bỏ đến 15% tổng protein tau (xem Hình 26).

Hình 27: Tổng protein tau còn lại sau khi làm nghèo miễn dịch protein tau hyperphosphoryl hóa

Hình 27 minh họa định lượng của tau hyperphosphoryl hóa, được phosphoryl hóa ở serin 422 (tất cả dải và vết khối lượng phân tử cao được bao gồm trong phân tích). 2.10.3 (▲) và C10-2 (◆) đều loại bỏ hơn 90% protein tau phosphoryl hóa ở Serin 422. Tuy nhiên, lượng của kháng thể cần để loại bỏ 50% of protein tau khác nhau: đối với

kháng thể 2.10.3, 0,42 μg kháng thể cần trong khi đó đối với C10-2, 0,27 μg cần cho cùng hiệu quả.

Hình 28: Tổng protein tau còn lại sau khi làm nghèo miễn dịch của protein tau hyperphosphoryl hóa

Định lượng tau hyperphosphoryl hóa, được phosphoryl hóa ở serin 396 (tất cả dải và vết khối lượng phân tử cao được bao gồm trong phân tích). C10-2 (◆) loại bỏ hiệu quả protein tau được phosphoryl hóa ở serin 396 (Hiệu quả tối đa: 88% và một nửa hiệu quả đạt được bằng cách sử dụng 0,30 μg kháng thể). 2.10.3 (▲) loại bỏ phần nhỏ hơn protein tau được phosphoryl hóa ở serin 396 (Hiệu quả tối đa: 60% và một nửa hiệu quả đạt được khi sử dụng 0,63 μg kháng thể). Điều này chỉ ra rằng tất cả protein tau được phosphoryl hóa ở serin 422, cũng được phosphoryl hóa ở serin 396, nhưng có một phần protein tau hyperphosphoryl hóa được phosphoryl hóa ở serin 396 mà phosphoryl hóa serin ở vị trí 422 không có mặt.

Hình 29: Tổng protein tau còn lại sau làm nghèo miễn dịch protein tau hyperphosphoryl hóa

Định lượng tau hyperphosphoryl hóa, được phosphoryl hóa ở serin 199/202 (tất cả dải và vết khối lượng phân tử cao được bao gồm trong phân tích). Một phần lớn protein tau được loại bỏ bởi C10-2 (◆), cũng được phosphoryl hóa ở Serin 199/202, vì 69% protein tau có phosphoryl hóa này ảnh hưởng bởi làm nghèo miễn dịch (50% hiệu quả khi sử dụng 0,34 μg kháng thể). Làm nghèo miễn dịch 2.10.3 (▲) không tạo ra đáp ứng liều xich ma lên protein tau P-S199/202 mặc dù giọt tín hiệu thấy với việc tăng lượng của kháng thể (tối đa 52% giảm khi sử dụng lượng tối đa của kháng thể (5 μg). Dữ liệu này chỉ ra rằng kháng thể C10-2 nhắm đích the phosphoryl hóa serin 396 liên kết bề lớn hơn protein tau hyperphosphoryl hóa so với 2.10.3 kháng thể nhắm đích serin phosphoryl hóa ở vị trí 422.

Hình 30: mD1.2 và mC10-2 ức chế bắt kháng nguyên protein tau ở tấm phủ mC10-2

Trong ELISA pha lỏng, hỗn hợp của chế phẩm rTg4510 P3 và lượng biến đổi của các kháng thể C10-2 hoặc D1.2 được thêm lên tấm phủ C10-2. Càng nhiều kháng thể liên kết với P3 protein tau trong dung dịch, càng ít protein tau epitop có khả năng liên kết với tấm. Lượng của protein tau liên kết với tấm được xác định bằng kháng thể protein tau của người gắn thẻ sulfo. C10-2 (▲) và D1.2 (□) có liên kết khác nhau với protein

tau trong dung dịch, trong đó C10-2 có thể cạnh tranh tất cả liên kết với tấm (IC₅₀ 20 nM). D1.2, mặt khác, thể hiện mức liên kết rất thấp với protein tau trong dung dịch.

Hình 31: PHF13 và mC10-2 ức chế bắt kháng nguyên protein tau ở tấm phủ mC10-2

Trong ELISA pha lỏng, hỗn hợp của chế phẩm AD P3 và lượng biến đổi của các kháng thể C10-2 và PHF13 được thêm lên tấm phủ C10-2. Càng nhiều kháng thể liên kết với P3 protein tau trong dung dịch, càng ít protein tau epitop có khả năng liên kết với tấm. Lượng của protein tau liên kết với tấm được xác định bằng kháng thể protein tau của người gắn thẻ sulfo. C10-2 và PHF13 có liên kết khác nhau với protein tau trong dung dịch, trong đó C10-2 có thể cạnh tranh tất cả liên kết với tấm (IC₅₀ = 3 nM), trong khi đó PHF13 thì không.

Hình 32: Cả mC10-2 và PFH-13 liên kết phụ thuộc liều với Ptau 386-408 (pS396/pS404)

Hình 32 thể hiện mC10-2 và PHF-13 liên kết bằng nhau ở tấm MSD được phủ với 100 ng/ml p-tau 386-408 (pS396/pS404). Tăng nồng độ các kháng thể (thể hiện trên trục x) được ủ tổng giếng trong 2 giờ sau đó rửa và phát hiện các kháng thể liên kết sử dụng kháng thể IgG kháng người gắn thẻ sulfo. Điều này chỉ ra rằng PHF-13 điều chế ử dụng mẫu sau là hoạt tính.

Hình 33: So sánh mD1.2 và mC10-2 liên kết với AD-P3

Hình 33 thể hiện mD1.2 và mC10-2 liên kết bằng nhau ở tấm MSD phủ với 1 µg/ml AD-P3. Tăng nồng độ các kháng thể (thể hiện trên trục x) ủ với sự có mặt và không có mặt của 10 µM p-tau 386-408 (pS396/pS404) peptit trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng sau đó ủ trong giếng trong 2 giờ sau trước khi phát hiện các kháng thể liên kết sử dụng kháng thể IgG kháng người gắn thẻ sulfo. Giá trị IC₅₀ là 320 nM và 11 nM đối với bắt AD-P3 và AD-S1(p). Ngược lại mD1.2 thể hiện ức chế yếu hơn đáng kể bắt kháng nguyên protein tau với giá trị IC₅₀ bằng 589 và 503 nM – đề xuất ái lực thấp hơn nhiều liên kết với kháng thể tan.

Thử nghiệm được thực hiện trong hai bước A: 1 µg/ml AD-P3 và 20 ng/ml AD s1(p), tương ứng được ủ với việc tăng nồng độ của mD1.2 và mC10-2 và ủ 1 giờ ở nhiệt độ phòng để cho phép tăng liên kết kháng thể-kháng nguyên (mức chiếm). B: Mẫu được ủ trên tấm MSD phủ với AD-P3 (1 µg/ml) trong 2 giờ sau đó rửa và phát hiện kháng nguyên protein tau bắt được sử dụng kháng thể kháng tổng TauG gắn thẻ sulfo.

Hình 34: mC10-2 nhưng không PHF-13 liên kết hiệu quả với pha rắn thể hiện kháng nguyên AD-P3

Liên kết đặc hiệu cao của mC10-2 nhưng không PHF-13: Hình 34 thể hiện rằng mC10-2 liên kết hiệu quả với tấm MSD được phủ kháng nguyên AD-P3 (1 $\mu\text{g/ml}$). Trong so sánh, hoạt tính liên kết thấp của PHF-13 cho thấy ái lực thấp đối với kháng nguyên p-tau sinh lý. Hơn nữa PHF-13 chứng minh mức cơ bản cao hơn của liên kết không đặc hiệu so với mC10-2 (xem Bảng 6). Tăng nồng độ của các kháng thể (thể hiện trên trục x) ủ trong 2 giờ trước khi phát hiện các kháng thể liên kết sử dụng kháng thể IgG kháng người gắn thẻ sulfo. Liên kết tín hiệu được hiệu chỉnh cho hoạt tính liên kết không đặc hiệu (được xác định là tín hiệu đo được với sự có mặt của peptit 10 μM p-tau 386-408 (pS396/pS404). Giá trị IC_{50} là 3 nM đối với bắt mC10-2 của AD-P3. Ngược lại PHF-13 thể hiện gần như không ức chế.

Thử nghiệm được thực hiện thành hai bước. A: 1 $\mu\text{g/ml}$ AD-P3 được ủ với nồng độ tăng của mC10-2 và PHF-13 và ủ 1 giờ ở nhiệt độ phòng để cho phép làm tăng liên kết kháng thể-kháng nguyên (mức chiếm). B: Các mẫu được ủ trên tấm MSD phủ với AD-P3 (1 $\mu\text{g/ml}$) trong 2 giờ sau đó rửa và phát hiện kháng thể protein tau bắt sử dụng kháng thể kháng-tổng protein tau gắn thẻ sulfo.

CÁC TRÌNH TỰ ĐƯỢC KẾT HỢP BẰNG CÁCH VIỆN DẪN

SEQ ID NO:1	CDR1 chuỗi nhẹ D1.2
SEQ ID NO:2	CDR2 chuỗi nhẹ D1.2
SEQ ID NO:3	CDR3 chuỗi nhẹ D1.2
SEQ ID NO:4	CDR1 chuỗi nặng D1.2
SEQ ID NO:5	CDR2 chuỗi nặng D1.2
SEQ ID NO:6	CDR3 chuỗi nặng D1.2
SEQ ID NO:7	chuỗi nhẹ D1.2
SEQ ID NO:8	chuỗi nặng D1.2
SEQ ID NO:9	CDR1 chuỗi nhẹ C10-2
SEQ ID NO:10	CDR2 chuỗi nhẹ C10-2
SEQ ID NO:11	CDR3 chuỗi nhẹ C10-2

SEQ ID NO:12	CDR1 chuỗi nặng C10-2
SEQ ID NO:13	CDR2 chuỗi nặng C10-2
SEQ ID NO:14	CDR3 chuỗi nặng C10-2
SEQ ID NO:15	chuỗi nhẹ C10-2
SEQ ID NO:16	chuỗi nặng C10-2
SEQ ID NO:17	CDR1 chuỗi nhẹ C5.2
SEQ ID NO:18	CDR2 chuỗi nhẹ C5.2
SEQ ID NO:19	CDR3 chuỗi nhẹ C5.2
SEQ ID NO:20	CDR1 chuỗi nặng C5.2
SEQ ID NO:21	CDR2 chuỗi nặng C5.2
SEQ ID NO:22	CDR3 chuỗi nặng C5.2
SEQ ID NO:23	chuỗi nhẹ C5.2
SEQ ID NO:24	chuỗi nặng C5.2
SEQ ID NO:25	CDR1 chuỗi nhẹ C8.3
SEQ ID NO:26	CDR2 chuỗi nhẹ C8.3
SEQ ID NO:27	CDR3 chuỗi nhẹ C8.3
SEQ ID NO:28	chuỗi nặng C8.3 CDR1
SEQ ID NO:29	chuỗi nặng C8.3 CDR2
SEQ ID NO:30	chuỗi nặng C8.3 CDR3
SEQ ID NO:31	chuỗi nhẹ C8.3
SEQ ID NO:32	chuỗi nặng C8.3
SEQ ID NO:33	Protein tau của người
SEQ ID NO:34	chuỗi nhẹ D1.2*
SEQ ID NO:35	chuỗi nặng C10-2 người hóa
SEQ ID NO:36	chuỗi nhẹ C10-2 người hóa
SEQ ID NO:37	gốc tau 386-408 (pS396, pS404)

Mô tả chi tiết sáng chế

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "tau" là đồng nghĩa với "protein tau" và đề cập đến bất kỳ trong số các dạng đồng phân tau (được xác định trong, ví dụ, UniProt as P10636, 1-9). Việc đánh số axit amin của protein tau mà được sử dụng ở đây được cho liên quan đến dạng đồng phân 2 (SEQ ID NO:33) như thể hiện dưới đây, với methionin (M) là gốc axit amin 1:

SEQ ID NO:33:

MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD
AGLKESPLQT			
PTEDGSEEPG	SETSDAKSTP	TAEDVTAPLV	DEGAPGKQAA
AQPHTEIPEG			
TTAEEAGIGD	TPSLEDEAAG	HVTQARMVSK	SKDGTGSDDK
KAKGADGKTK			
IATPRGAAPP	GQKGQANATR	IPAKTPPAPK	TPPSSGEPPK
SGDRSGYSSP			
GSPGTPGSRS	RTPSLPTPPT	REPKKVAVVR	TPPKSPSSAK
SRLQTAPVPM			
PDLKNVFSKI	GSTENLKHQP	GGGKVQIINK	KLDLSNVQSK
CGSKDNIKHV			
PGGGSVQIVY	KPVDLSKVTS	KCGSLGNIHH	KPGGGQVEVK
SEKLDFKDRV			
QSKIGSLDNI	THVPGGGNKK	IETHKLTFRE	NAKAKTDHGA
EIVYKSPVVS			

GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

Sáng chế đề cập đến các kháng thể và đoạn liên kết epitop của chúng mà có khả năng liên kết đặc hiệu với tau, và cụ thể là protein tau của người, và theo một phương án thể hiện khả năng liên kết đặc hiệu với gốc phosphoryl hóa S396 (pS396) của protein tau của người. Các kháng thể và đoạn liên kết epitop của chúng theo sáng chế, còn khác biệt ở chỗ không có khả năng hoặc cơ bản không có khả năng liên kết đặc hiệu với

gốc phosphoryl hóa 404 (pS404) trên protein tau của người, ví dụ dưới các điều kiện giới hạn kháng thể hoặc không bão hòa. Ngoài ra, phosphoryl hóa ở pS404 không ảnh hưởng đến liên kết đặc hiệu với pS396. Như được sử dụng ở đây, ký hiệu "pS" và "^(p)S" chỉ gốc axit amin phosphoserin. Như được sử dụng ở đây, kháng thể "cơ bản" không có khả năng liên kết với epitop nếu so với epitop khác liên kết này ít hơn 20%, ít hơn 10%, ít hơn 5%, ít hơn 2%, và tốt hơn nữa là, ít hơn 1% of the liên kết quan sát được với epitop khác này.

Thuật ngữ "kháng thể" (Ab) trong bối cảnh của sáng chế đề cập đến phân tử immunoglobulin hoặc theo một số phương án theo sáng chế, đoạn của phân tử immunoglobulin mà có khả năng liên kết đặc hiệu với epitop của phân tử ("kháng nguyên"). Các kháng thể có trong tự nhiên thường bao gồm tetramer mà thường chứa ít nhất hai chuỗi nặng (H) và ít nhất hai chuỗi nhẹ (L). Mỗi chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (được viết tắt ở đây là VH) và a vùng hằng định chuỗi nặng, thường chứa ba vùng (CH1, CH2 và CH3). Chuỗi nặng có thể là của isotyp bất kỳ, bao gồm IgG (kiểu phụ IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4). Mỗi chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ(được viết tắt ở đây là VL) và vùng hằng định chuỗi nhẹ(CL). Chuỗi nhẹ bao gồm chuỗi kappa và chuỗi lambda. Vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ thường chịu trách nhiệm nhận diện kháng nguyên, trong khi vùng hằng định chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể trung gian cho liên kết của immunoglobulin với mô chủ hoặc các yếu tố, bao gồm các tế bào khác nhau của hệ miễn dịch (ví dụ, tế bào hiệu lực) và thành phần thứ nhất (C1q) của hệ bổ sung cổ điển. Vùng VH và VL có thể còn được chia nhỏ thành các vùng có tính siêu biến đổi, gọi là "vùng xác định hỗ trợ", mà nằm rải rác với các vùng có trình tự bảo tồn hơn, gọi là "vùng khung" (FR). Mỗi VH và VL chứa ba vùng CDR và bốn vùng FR được sắp xếp từ đầu amin đến đầu carboxy theo thứ tự sau đây: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ chứa vùng liên kết mà tương tác với kháng nguyên. Đặc biệt liên quan là các kháng thể và đoạn liên kết epitop của chúng mà "được phân lập" để tồn tại dưới môi trường vật chất khác biệt với môi trường trong đó chúng có thể có trong tự nhiên hoặc được biến đổi để khác với kháng thể có trong tự nhiên trong trình tự axit amin.

Thuật ngữ "epitop" nghĩa là quyết định kháng nguyên có khả năng liên kết đặc hiệu với kháng thể. Epitop thường gồm có nhóm bề mặt của các phân tử như axit amin hoặc chuỗi bên đường và thường có ba đặc điểm cấu trúc ba chiều đặc trưng, cũng như

đặc điểm điện tích đặc trưng. Các epitop cấu hình và tuyến tính được phân biệt trong đó liên kết với epitop cấu hình, nhưng không liên kết với epitop tuyến tính, luôn thiếu sự có mặt của dung môi biến tính. Epitop có thể bao gồm gốc axit amin trực tiếp tham gia vào liên kết và các gốc axit amin khác, mà không trực tiếp tham gia vào liên kết, như gốc axit amin mà bị chặn hiệu quả bởi peptit liên kết epitop đặc hiệu (nói cách khác, gốc axit amin là trong dấu chân của peptit liên kết epitop đặc hiệu).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "đoạn liên kết epitop của kháng thể" nghĩa là đoạn, phần, miền hoặc vùng của kháng thể (bất kể nó được tạo ra như thế nào (ví dụ, thông qua phân cắt, bằng cách tái tổ hợp, bằng cách tổng hợp, V.V.)) mà có khả năng liên kết đặc hiệu với epitop. Đoạn liên kết epitop có thể chứa 1, 2, 3, 4, 5 hoặc tất cả 6 trong số các vùng CDR của kháng thể này và, mặc dù có khả năng liên kết đặc hiệu với epitop, có thể thể hiện tính đặc hiệu, ái lực hoặc tính chọn lọc đối với epitop này mà khác với của kháng thể này. Tốt hơn là, tuy nhiên, đoạn liên kết epitop sẽ chứa tất cả 6 trong số các vùng CDR của kháng thể này. Đoạn liên kết epitop của kháng thể có thể là một phần của, hoặc bao gồm, chuỗi polypeptit đơn (ví dụ, scFv), hoặc có thể là một phần của, hoặc bao gồm, hai hoặc nhiều chuỗi polypeptit, mỗi chuỗi có đầu amin và đầu carboxyl (ví dụ, thể đa phức, đoạn Fab, đoạn Fab₂, v.v.). Các đoạn của các kháng thể mà thể hiện khả năng liên kết epitop có thể thu được, ví dụ, bằng cách phân cắt proteaza của kháng thể nguyên vẹn. Tốt hơn nữa là, mặc dù hai vùng của đoạn Fv, VL và VH, được mã hóa tự nhiên bằng gen riêng biệt, polynucleotit mà mã hóa trình tự gen này (ví dụ, cADN mã hóa của chúng) có thể được nối, sử dụng phương pháp tái tổ hợp, bằng liên kết linh hoạt mà cho phép chúng được tạo thành chuỗi protein đơn trong đó vùng VL và VH kết hợp để tạo thành phân tử liên kết epitop hóa trị một (gọi là Fv (scFv) chuỗi đơn; xem ví dụ, Bird và cộng sự, (1988) Science 242:423-426; và Huston và cộng sự, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:5879-5883). Tùy ý, bằng cách sử dụng liên kết linh hoạt mà rất ngắn (ví dụ, khoảng 9 gốc) để cho phép vùng VL và VH của chuỗi polypeptit đơn kết hợp với nhau, nó có thể tạo thành kháng thể hai đặc hiệu, thể đa phức, hoặc phân tử tương tự (trong đó hai chuỗi polypeptit này kết hợp với nhau để tạo thành phân tử liên kết epitop hóa trị hai) (xem ví dụ PNAS USA 90(14), 6444-8 (1993) về mô tả thể đa phức). Các ví dụ về đoạn liên kết epitop bao gồm trong sáng chế bao gồm (i) đoạn Fab' hoặc đoạn Fab, đoạn hóa trị một gồm có vùng VL, VH, CL và CH1, hoặc kháng thể hóa trị một như được mô tả trong WO2007059782; (ii) đoạn F(ab')₂, đoạn

hóa trị hai bao gồm hai đoạn Fabs liên kết bởi cầu disulfua ở vùng bản lề; (iii) đoạn Fd chủ yếu bao gồm vùng VH và CH1 ; (iv) đoạn Fv chủ yếu bao gồm vùng VL và VH, (v) đoạn dAb (Ward và cộng sự, Nature 341, 544-546 (1989)), mà cơ bản bao gồm vùng VH và còn gọi là các kháng thể vùng (Holt và cộng sự; Trends Biotechnol. 2003 Nov;21(11) :484-90); (vi) cameli hoặc thể nano (Reverts và cộng sự; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan;5_(1): 111-24) và (vii) vùng xác định bổ trợ (CDR) được phân lập. Ngoài ra, mặc dù hai vùng của đoạn Fv, VL và VH, được mã hóa các gen riêng biệt, chúng có thể được nối, sử dụng phương pháp tái tổ hợp, bằng liên kết tổng hợp mà cho phép chúng được tạo thành chuỗi protein đơn trong đó vùng VL và VH bắt cặp để tạo thành các phân tử hóa trị một (gọi là các kháng thể chuỗi đơn hoặc Fv (scFv) chuỗi đơn, xem ví dụ Bird và cộng sự, Science 242, 423-426 (1988) và Huston và cộng sự, PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Các đoạn kháng thể này và hữu dụng khác trong bối cảnh của sáng chế được bàn thêm ở đây. Cũng cần hiểu rằng thuật ngữ kháng thể, trừ khi có chỉ định khác, còn bao gồm các polypeptit giống kháng thể, như các kháng thể khảm và kháng thể người hóa, và đoạn kháng thể duy trì khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên (đoạn liên kết epitop) tạo ra bởi kỹ thuật bất kỳ, như phân cắt enzym, tổng hợp peptit, và kỹ thuật tái tổ hợp. Kháng thể được tạo ra này có thể có isotyp bất kỳ. Như được sử dụng ở đây, "isotyp" đề cập đến nhóm immunoglobulin (ví dụ IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4) mà được mã hóa bởi gen vùng hằng định chuỗi nặng . Các đoạn kháng thể này thu được bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực; các đoạn thích hợp có khả năng liên kết với epitop mong muốn có thể được sàng lọc sẵn về tính hữu ích theo cách tương tự với kháng thể nguyên vẹn.

Thuật ngữ "kháng thể hai đặc hiệu" đề cập đến kháng thể chứa hai đoạn liên kết epitop độc lập mà mỗi đoạn nhắm đích các đích độc lập. Các đích này có thể là epitop có trên các protein khác nhau hoặc epitop khác nhau có trên cùng đích. Phân tử kháng thể hai đặc hiệu có thể được tạo ra bằng cách thay đổi axit amin bù trừ trong vùng hằng định của HC của phân tử kháng thể hóa trị hai một đặc hiệu bố mẹ. Kháng thể dị dime thu được chứa một Fabs góp từ hai kháng thể một đặc hiệu bố mẹ khác nhau. Thay đổi axit amin trong vùng Fc dẫn đến tăng tính ổn định của kháng thể dị dime với hai đặc hiệu mà ổn định theo thời gian. (Ridgway và cộng sự, Protein Engineering 9, 617-621 (1996), Gunasekaran và cộng sự, JBC 285, 19637-1(2010), Moore và cộng sự, MAbs 3:6 546-557 (2011), Strop và cộng sự, JMB 420, 204-219 (2012), Metz và cộng sự,

Protein Engineering 25:10 571-580 (2012), Labrijn và cộng sự, PNAS 110:113, 5145 - 5150 (2013), Spreter Von Kreudenstein và cộng sự, MAbs 5:5 646-654 (2013)). Các kháng thể hai đặc hiệu có thể còn bao gồm phân tử mà tạo ra bằng cách dung hợp ScFv. Hai scfv một đặc hiệu sau đó nối độc lập với vùng Fc có khả năng tạo thành dị dime để tạo ra phân tử hai đặc hiệu đơn (Mabry và cộng sự, PEDS 23:3 115-127 (2010)). Phân tử hai đặc hiệu có khả năng liên kết kép.

Thuật ngữ "kháng thể D1.2" để chỉ kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, bao gồm, hoặc gồm, vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể có:

- (a) CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:1;
 - (b) CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:2; và
 - (c) CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:3;
- và vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể có:
- (d) CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:4;
 - (e) CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:5; và
 - (f) CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:6.

Theo một phương án, kháng thể D1.2 hoặc đoạn liên kết epitop của chúng có thể bao gồm hoặc gồm chuỗi nặng nêu ở SEQ ID NO:8 và/hoặc chuỗi nhẹ nêu ở SEQ ID NO:7.

Theo phương án liên quan, kháng thể D1.2* hoặc đoạn liên kết epitop của chúng có thể bao gồm hoặc gồm chuỗi nặng nêu ở SEQ ID NO:8 và/hoặc chuỗi nhẹ nêu ở SEQ ID NO:34.

Thuật ngữ "kháng thể C10-2" để chỉ kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng bao gồm, hoặc gồm, vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể có:

- (a) CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:9;
 - (b) CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:10; và
 - (c) CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:11;
- và vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể có:
- (d) CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:12;

- (e) CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:13; và
- (f) CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:14.

Theo một phương án, kháng thể C10-2 hoặc đoạn liên kết epitop của chúng có thể bao gồm hoặc gồm chuỗi nặng nêu ở SEQ ID NO:16 và/hoặc chuỗi nhẹ nêu ở SEQ ID NO:15.

Theo phương án khác, kháng thể C10-2 người hóa hoặc đoạn liên kết epitop của chúng có thể bao gồm hoặc gồm chuỗi nặng nêu ở SEQ ID NO:35, chuỗi nhẹ nêu ở SEQ ID NO:36., hoặc cả hai. Một phương án của sáng chế nhắm đến kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng bao gồm hoặc gồm có chuỗi nặng nêu ở SEQ ID NO:35, chuỗi nhẹ nêu ở SEQ ID NO:36.

Thuật ngữ "kháng thể C5.2" để chỉ kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng bao gồm, hoặc gồm, vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể có:

- (a) CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:17;
- (b) CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:18; và
- (c) CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:19;

và vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể có:

- (d) CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:20;
- (e) CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:21; và
- (f) CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:22.

Theo một phương án, kháng thể C5.2 hoặc đoạn liên kết epitop của chúng có thể bao gồm hoặc gồm chuỗi nặng nêu ở SEQ ID NO 24 và/hoặc chuỗi nhẹ nêu ở SEQ ID NO:23.

Thuật ngữ "kháng thể C8.3" để chỉ kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng đoạn của chúng bao gồm, hoặc gồm, vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể có:

- (a) CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:25;
- (b) CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:26; và
- (c) CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:27;

và vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể có:

- (d) CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:28;
- (e) CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:29; và
- (f) CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:30.

Theo một phương án, kháng thể C8.3 hoặc đoạn liên kết epitop của chúng có thể bao gồm hoặc gồm chuỗi nặng nêu ở SEQ ID NO 32 và/hoặc chuỗi nhẹ nêu ở SEQ ID NO:31.

"Kháng thể kháng protein tau" là kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, mà liên kết đặc hiệu với protein tau hoặc đoạn protein tau.

Các thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" hoặc "chế phẩm kháng thể đơn dòng" như được sử dụng ở đây đề cập đến chế phẩm của phân tử kháng thể của chế phẩm phân tử đơn. Chế phẩm kháng thể đơn dòng thông thường thể hiện một đặc hiệu và ái lực liên kết đối với epitop cụ thể. Theo các phương án nhất định kháng thể đơn dòng có thể gồm hơn một vùng Fab nhờ đó làm tăng tính đặc hiệu đối với hơn một đích. Các thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" hoặc "chế phẩm kháng thể đơn dòng" không nhằm bị giới hạn bởi bất kỳ phương pháp sản xuất cụ thể bất kỳ (ví dụ, tái tổ hợp, chuyển gen, khối lai, v.v.).

Các kháng thể theo sáng chế và đoạn liên kết epitop của chúng sẽ tốt hơn là "người hóa", cụ thể là nếu được dùng cho mục đích chữa bệnh. Thuật ngữ "người hóa" đề cập đến phân tử, thường được điều chế sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp, có vị trí liên kết epitop dẫn xuất từ immunoglobulin từ loài không phải người và cấu trúc còn lại dựa trên cấu trúc và /hoặc trình tự immunoglobulin của người. Vị trí liên kết epitop có thể bao gồm hoặc là kháng thể vùng biến đổi hoàn toàn không phải của người dung hợp với vùng hằng định của người, hoặc chỉ vùng xác định bổ trợ (CDRs) của vùng biến đổi này ghép với vùng khung của người thích hợp của vùng biến đổi của người. Gốc khung của phân tử người hóa này có thể là kiểu đại (ví dụ, hoàn toàn của người) hoặc chúng có thể được biến đổi để chứa một hoặc nhiều thể axit amin không thấy ở kháng thể của người mà trình tự của nó dùng làm cơ sở để người hóa. Sự người hóa làm giảm đi hoặc bớt đi khả năng mà vùng hằng định của phân tử sẽ đóng vai trò làm immunogen trong các cá thể người, nhưng vẫn giữ khả năng đáp ứng miễn dịch với vùng biến đổi bên ngoài (LoBuglio, A.F. và cộng sự (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics and Immune Response", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224). Nghiên cứu khác tập trung không chỉ vào việc tạo ra vùng hằng định dẫn xuất từ người,

mà cả bốn vùng biến đổi cũng như để tạo hình lại chúng gần nhất có thể với dạng của người. Đã biết rằng vùng biến đổi của cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ chứa ba vùng xác định bổ trợ (CDRs) mà thay đổi đáp ứng lại kháng nguyên yêu cầu và xác định khả năng liên kết, kẹp hai bên bởi bốn vùng khung (FRs) mà bảo tồn tương đối trong loài được cho và được cho là tạo ra khung cho CDRs. Khi các kháng thể không phải của người được điều chế liên quan đến kháng nguyên cụ thể, vùng biến đổi có thể được "tạo hình lại" hoặc "người hóa" bằng cách ghép CDRs dẫn xuất từ kháng thể không phải của người vào FRs có trong kháng thể của người được biến đổi. Việc áp dụng nghiên cứu này vào nhiều kháng thể khác nhau đã được báo cáo bởi Sato, K. và cộng sự (1993) *Cancer Res* 53:851-856. Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy, " *Nature* 332:323-327; Verhoeven, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity, " *Science* 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. et al. (1991) "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation, " *Protein Engineering* 4:773-778; Maeda, H. et al. (1991) "Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity, " *Human Antibodies Hybridoma* 2:124-134; Gorman, S. D. et al. (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody, " *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:4181-4185; Tempest, P.R. et al. (1991) "Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo, " *Bio/Technology* 9:266-271; Co, M. S. et al. (1991) "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy, " *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:2869-2873; Carter, P. et al. (1992) "Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy, " *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 89:4285-4289; and Co, M.S. et al. (1992) "Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen, " *J. Immunol.* 148:1149-1154. Theo một số phương án, các kháng thể người hóa bảo quản tất cả trình tự CDR (ví dụ, kháng thể người hóa của chuột mà chứa tất cả sáu CDRs từ kháng thể chuột). Theo các phương án khác, các kháng thể người hóa có một hoặc nhiều CDRs (một, hai, ba, bốn, năm, sáu) mà được thay thế liên quan đến kháng thể gốc, mà còn gọi là một hoặc nhiều CDRs "dẫn xuất từ" một hoặc nhiều CDRs từ kháng thể gốc. Khả năng người hóa kháng nguyên là đã biết (xem, ví dụ, Sáng chế Mỹ số 5,225,539; 5,530,101; 5,585,089; 5,859,205; 6,407,213; 6,881,557).

Thuật ngữ "kháng thể "XX" để chỉ kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng

(ví dụ kháng thể "C10-2"), bao gồm hoặc gồm có chuỗi nhẹ, vùng biến đổi chuỗi nhẹ, hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1-3, như được xác định bởi SEQ ID NO tương ứng của nó, và chuỗi nặng, vùng biến đổi chuỗi nặng, hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1-3 như được xác định bởi SEQ ID NO tương ứng của nó. Theo các phương án nhất định kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng được xác định bởi toàn bộ vùng biến đổi chuỗi nặng của chúng bao gồm như được xác định bởi SEQ ID NO của chúng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của chúng như được xác định bởi SEQ ID NO của chúng.

Trừ khi được quy định khác đi ở đây, việc đánh số các gốc axit amin trong vùng Fc hoặc vùng hằng định của kháng thể là theo hệ đánh số EU, còn gọi là chỉ số EU, như được mô tả trong Kabat và cộng sự, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, tái bản lần thứ 5 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Như được sử dụng ở đây, kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng được gọi là liên kết "đặc hiệu" vùng của phân tử khác (cụ thể là, epitop) nếu nó phản ứng hoặc liên kết thường xuyên hơn, nhanh hơn, với thời gian dài hơn và/hoặc với ái lực lớn hơn với epitop đó so với epitop tùy ý. Cũng hiểu rằng bằng cách đọc định nghĩa này, ví dụ, kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng mà liên kết đặc hiệu với đích thứ nhất có thể có hoặc không liên kết đặc hiệu hoặc ưu tiên với đích thứ hai. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "liên kết" trong bối cảnh liên kết của kháng thể với kháng nguyên định trước thường đề cập đến liên kết với ái lực tương đương với KD bằng khoảng 10^{-7} M hoặc ít hơn, như khoảng 10^{-8} M hoặc ít hơn, như khoảng 10^{-9} M hoặc ít hơn khi được xác định bằng ví dụ công nghệ cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) trong thiết bị BIAcore® 3000 sử dụng kháng nguyên làm phối tử và kháng thể làm chất phân tích, và liên kết với kháng nguyên định trước với ái lực tương đương với KD mà thấp hơn ít nhất mười lần, như thấp hơn ít nhất 100 lần, ví dụ thấp hơn ít nhất 1,000 lần, như thấp hơn ít nhất 10,000 lần, ví dụ thấp hơn ít nhất 100,000 lần so với ái lực của nó đối với liên kết với kháng nguyên không đặc hiệu (ví dụ, BSA, casein) khác kháng nguyên định trước hoặc kháng nguyên liên quan gần. Lượng mà với nó ái lực thấp hơn độc lập trên KD của kháng thể, sao cho khi KD của kháng thể rất thấp (tức là, kháng thể đặc hiệu cao hơn), thì lượng mà với nó ái lực đối với kháng nguyên thấp hơn so với ái lực đối với kháng nguyên không đặc hiệu có thể là ít nhất 10,000 lần.

Thuật ngữ "kd" (giây-1 hoặc 1/s), như được sử dụng ở đây, đề cập đến hằng số

tốc độ phân tách của tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể. Giá trị này còn ưu tiên là giá trị koff.

Thuật ngữ "ka" ($M^{-1} \times sec^{-1}$ hoặc $1/Msec$), như được sử dụng ở đây, đề cập đến hằng số tốc độ kết hợp của tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể.

Thuật ngữ "KD" (M), như được sử dụng ở đây, đề cập đến hằng số cân bằng phân tách của tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể và thu được bằng cách chia kd cho ka.

Thuật ngữ "KA" (M^{-1} hoặc $1/M$), như được sử dụng ở đây, đề cập đến hằng số cân bằng kết hợp của tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể và thu được bằng cách chia ka cho kd.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến an kháng thể kháng protein tau, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, mà thể hiện một hoặc nhiều trong số các đặc tính sau đây:

- (i) cơ bản không có khả năng liên kết với protein tau không phosphoryl hóa;
- (ii) cơ bản không có khả năng liên kết với protein tau mà được phosphoryl hóa ở S404 và không được phosphoryl hóa ở S396;
- (iii) khả năng liên kết với protein tau phosphoryl hóa ở S396;
- (iv) khả năng liên kết với protein tau phosphoryl hóa ở cả S396 và ở S404;
- (v) khả năng phân biệt chọn lọc giữa gốc protein tau được phosphoryl hóa S396 và S404 sao cho nó cơ bản không có khả năng liên kết gốc được phosphoryl hóa 404 (pS404);
- (vi) khả năng liên kết protein tau hyperphosphoryl hóa từ não bệnh Alzheimer của người;
- (vii) khả năng phân biệt giữa protein tau bệnh lý và không bệnh lý của người; và/hoặc
- (viii) khả năng, khi được sử dụng như được mô tả ở đây với chiết xuất rTg4510 nghèo miễn dịch từ chuột chuyển gen, để làm giảm đặc hiệu dải protein tau hyperphosphoryl hóa 64kDa và 70kDa ít nhất 90%, trong khi đó không làm giảm dải protein tau 55 kDa hơn 10%; hoặc khả năng, khi được sử dụng như được mô tả ở đây

với chiết xuất từ não AD xét nghiệm tử thi của người để làm giảm đặc hiệu dài tau hyperphosphoryl hóa S396 phosphoryl hóa ít nhất 90%, trong khi đó không làm giảm dài protein tau không hyperphosphoryl hóa hơn 10%.

Phương án khác theo sáng chế đề cập đến kháng thể được tạo ra bởi phương pháp tạo ra kháng thể đặc hiệu cao, ái lực cao mà đặc hiệu miễn dịch đối với protein tau bệnh lý hyperphosphoryl hóa bao gồm gốc phosphoryl hóa S396, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(A) tiêm chất kháng nguyên vào động vật có vú, chất kháng nguyên này bao gồm peptit phosphoryl hóa hai lần bao gồm 18-40, như ở 18-30, như 20-30 gốc axit amin liên tiếp bao gồm TDHGAEIVYK^(p)SPVVSGDT^(p)SPRHL (SEQ ID NO:37) bao phủ các gốc 386-410 của protein tau 2N4R., nhờ đó gây miễn dịch động vật có vú này;

(B) lặp lại việc gây miễn dịch động vật có vú này hai hoặc nhiều lần;

(C) sàng lọc mẫu huyết thanh từ động vật có vú được gây miễn dịch lặp lại này đối với sự có mặt của kháng thể đặc hiệu cao, ái lực cao có khả năng liên kết protein tau bệnh lý hyperphosphoryl hóa bao gồm gốc phosphoryl hóa S396, nhưng cơ bản ít có khả năng liên kết protein tau không bệnh lý; và

(D) thu kháng thể đặc hiệu cao, ái lực cao này.

Như được sử dụng ở đây, "cơ bản không có khả năng" liên kết phân tử protein tau chỉ hơn 20% khác biệt, hơn 40% khác biệt, hơn 60% khác biệt, hơn 80% khác biệt, hơn 100% khác biệt, hơn 150% khác biệt, hơn 2 lần khác biệt, hơn 4 lần khác biệt, hơn 5 lần khác biệt, hoặc hơn 10 lần khác biệt về chức năng, so với liên kết phát hiện được được trung gian bởi kháng thể viện dẫn.

Thuật ngữ "chọn lọc" và "chọn lọc miễn dịch" khi đề cập đến khả năng liên kết của kháng thể kháng protein tau liên quan đến hai epitop để chỉ rằng liên kết quan sát được dưới các điều kiện bão hòa thể hiện ít nhất 80% khác biệt, ít nhất 95% khác biệt, và tốt nhất là 100% khác biệt (tức là, không có liên kết phát hiện được với một epitop). Thuật ngữ "chọn lọc" và "chọn lọc miễn dịch" khi đề cập đến kháng thể protein tau còn để có nghĩa là kháng thể liên kết protein tau hyperphosphoryl hóa từ não bệnh Alzheimer của người và có khả năng phân biệt giữa protein tau bệnh lý và không bệnh lý của người.

Các thuật ngữ các phần TBS-chiết xuất được (S1), muối cao/sarkosyl-chiết xuất

được (S3), và sarkosyl-không tan (P3) là các phần như thu được bằng cách phân đoạn sinh hóa protein tau được mô tả ở đây.

Trong một số kháng thể, chỉ một phần của CDR, cụ thể là bộ phụ của gốc CDR cần cho liên kết, gọi là SDR, cần để duy trì liên kết trong kháng thể người hóa. Gốc CDR không tiếp xúc epitop liên quan không ở trong SDR có thể được xác định dựa trên các nghiên cứu trước đây (ví dụ gốc H60-H65 trong CDR H2 thường không được yêu cầu), từ vùng của Kabat CDRs nằm ngoài vòng siêu biến đổi Chothia (xem, Kabat và cộng sự. (1992) SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, National Institutes of Health Publication No. 91-3242; Chothia, C. et al. (1987) "Canonical Structures For The Hypervariable Regions Of Immunoglobulins, " J. Mol. Biol. 196:901-917), by molecular modeling and/or empirically, or as described in Gonzales, N.R. et al. (2004) "SDR Grafting Of A Murine Antibody Using Multiple Human Germline Templates To Minimize Its Immunogenicity, " Mol. Immunol. 41:863-872. Trong các kháng thể người hóa này ở các vị trí trong đó một hoặc nhiều gốc CDR cho không có mặt hoặc trong đó toàn bộ CDR cho bị thiếu, axit amin chiếm vị trí có thể là axit amin chiếm vị trí tương đương (bằng cách đánh số Kabat) trong trình tự kháng thể nhận. Số của các thể này của trình tự nhận đối với axit amin cho trong CDR bao gồm thể hiện cân bằng cạnh tranh xem xét. Việc thể này là có lợi tiềm năng trong việc làm giảm số lượng axit amin của chuỗi ở kháng thể người hóa và sau đó làm giảm tính sinh miễn dịch tiềm năng. Tuy nhiên, việc thể này còn có thể dẫn đến thay đổi về ái lực, và giảm đáng kể ái lực tốt hơn là được tránh. Các vị trí để thể trong CDR và axit amin để thể có thể còn được chọn lựa theo kinh nghiệm.

Thực tế là việc thay thế axit amin đơn của gốc CDR có thể tạo ra mất liên kết chức năng (Rudikoff, S. v.v. (1982) "Single Amino Acid Substitution Altering Antigen-Binding Specificity", Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79(6):1979-1983) provides a means for systematically identifying alternative functional CDR sequences. Theo một phương án được ưu tiên để thu được CDR biến thể này, polynucleotit mã hóa CDR được đột biến (ví dụ tổng qua đột biến ngẫu nhiên hoặc bằng phương pháp nhắm điểm (ví dụ, khuếch đại trung gian chuỗi polymeraza với đoạn mồi mà mã hóa vị trí đột biến)) để tạo ra CDR có gốc axit amin được thể. Bằng cách so sánh tính tương đồng của gốc liên quan trong trình tự CDR gốc (chức năng) với nhận diện của trình tự CDR biến đổi được thể (không chức năng), điểm thể BLOSUM62.iiij cho việc thể này có thể được xác định. Hệ

BLOSUM đề xuất ma trận thể axit amin tạo ra bằng cách phân tích cơ sở dữ liệu của trình tự để sắp thẳng hàng tin cậy (Eddy, S.R. (2004) "Where Did The BLOSUM62 Alignment Score Matrix Come From?", *Nature Biotech.* 22(8):1035-1036; Henikoff, J.G. (1992) "Amino acid substitution matrices from protein blocks, " *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 89:10915-10919; Karlin, S. et al. (1990) "Methods For Assessing The Statistical Significance Of Molecular Sequence Features By Using General Scoring Schemes, " *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 87:2264-2268; Altschul, S.F. (1991) "Amino Acid Substitution Matrices From An Information Theoretic Perspective, " *J. Mol. Biol.* 219, 555-565. Hiện nay, cơ sở dữ liệu BLOSUM cải tiến nhất là cơ sở dữ liệu BLOSUM62 (BLOSUM62.ijj). Bảng 1 thể hiện điểm thể BLOSUM62.ijj (điểm càng cao thể càng bảo tồn và do đó càng có thể thể không ảnh hưởng đến chức năng). Nếu đoạn liên kết epitop bao gồm CDR tạo thành không liên kết với tau, ví dụ, thì điểm thể BLOSUM62.ijj được xem là bảo tồn không đủ, và thể ứng viên mới được chọn và tạo ra có điểm thể cao hơn. Do đó, ví dụ, nếu gốc ban đầu là glutamat (E), và gốc thể không chức năng là histidin (H), thì điểm thể BLOSUM62.ijj sẽ bằng 0, và thay đổi bảo tồn nhiều hơn (như cho aspartat, asparagin, glutamin, hoặc lysin) được ưu tiên.

Bảng 1																				
	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	+4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	0	-3	-2	0
R	-1	+5	0	-2	-3	+1	0	-2	0	-3	-2	+2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3
N	-2	0	+6	+1	-3	0	0	0	+1	-3	-3	0	-2	-3	-2	+1	0	-4	-2	-3
D	-2	-2	+1	+6	-3	0	+2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3
C	0	-3	-3	-3	+9	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1
Q	-1	+1	0	0	-3	+5	+2	-2	0	-3	-2	+1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	-2
E	-1	0	0	+2	-4	+2	+5	-2	0	-3	-3	+1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	+6	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3
H	-2	0	+1	-1	-3	0	0	-2	+8	-3	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-2	+2	-3
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	+4	+2	-3	+1	0	-3	-2	-1	-3	-1	+3
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	+2	+4	-2	+2	0	-3	-2	-1	-2	-1	+1
K	-1	+2	0	-1	-3	+1	+1	-2	-1	-3	-2	+5	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	+1	+2	-1	+5	0	-2	-1	-1	-1	-1	+1
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	+6	-4	-2	-2	+1	+3	-1
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	+7	-1	-1	-4	-3	-2
S	+1	-1	+1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	+4	+1	-3	-2	-2
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	+5	-2	-2	0
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	+1	-4	-3	-2	+11	+2	-3
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	+2	-1	-1	-2	-1	+3	-3	-2	-2	+2	+7	-1
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	+3	+1	-2	+1	-1	-2	-2	0	-3	-1	+4

Sáng chế do đó bao gồm việc sử dụng đột biến ngẫu nhiên để xác định CDR cải thiện. Trong bối cảnh của sáng chế, thể bảo tồn có thể được xác định bằng thể trong nhóm axit amin được thể hiện trong một hoặc nhiều trong số các Bảng 2, 3, hoặc 4:

Nhóm gốc axit amin để thể bảo tồn:

Bảng 2	
Gốc axit	Asp (D) và Glu (E)
Gốc bazơ	Lys (K), Arg (R), và His (H)
Gốc ưa nước không tích điện	Ser (S), Thr (T), Asn (N), và Gln (Q)
Gốc béo không tích điện	Cly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L), và Ile (I)
Gốc không phân cực không tích điện	Cys (C), Met (M), và Pro (P)
Gốc thơm	Phe (F), Tyr (Y), và Trp (W)

Nhóm thể gốc axit amin bảo tồn tùy ý:

Bảng 3			
1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

Phân loại vật lý và chức năng tùy ý của Gốc axit amin:

Bảng 4	
Gốc chứa nhóm rượu	S và T
Gốc béo	I, L, V và M
Gốc kết hợp xycloalkenyl	F, H, W và Y
Gốc kỵ nước	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W và Y
Gốc tích điện âm	D và E
Gốc phân cực	C, D, E, H, K, N, Q, R, S và T
Gốc tích điện dương	H, K và R
Gốc nhỏ	A, C, D, G, N, P, S, T và V
Gốc rất nhỏ	A, G và S
Gốc tham gia vào việc tạo thành lần lượt	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P và T
Gốc linh hoạt	Q, T, K, S, G, P, D, E và R

Các nhóm thể bảo tồn khác bao gồm: valin-leuxin-isoleuxin, phenylalanin-tyrosin, lysin-arginine, alanin-valin, và asparagin-glutamin.

Nhóm bổ sung của axit amin có thể được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả trong, ví dụ, Creighton (1984) *Proteins: Structure and Molecular Properties* (2d Ed. 1993), W. H. Freeman và Company.

Công nghệ hiển thị thể thực khuẩn có thể tùy ý được sử dụng để làm tăng (hoặc giảm) ái lực CDR. Công nghệ này, đề cập đến sự chín muồi ái lực, sử dụng đột biến hoặc “đi trên CDR” và việc chọn lại sử dụng kháng nguyên đích hoặc đoạn liên kết epitop thuộc kháng nguyên của chúng để xác định kháng thể có các CDR mà liên kết với ái lực cao hơn (hoặc thấp hơn) với kháng nguyên khi so với kháng thể ban đầu hoặc bố mẹ (xem, ví dụ Glaser và cộng sự. (1992) *J. Immunology* 149:3903). Gây đột biến toàn bộ codon hơn là nucleotit đơn tạo ra danh mục bán ngẫu nhiên của đột biến axit amin. Thư viện có thể được xây dựng gồm bề các dòng biến thể mỗi trong số đó khác nhau bởi thay thế axit amin đơn trong CDR đơn và chứa các biến thể thể hiện mỗi việc thể axit amin

có thể đối với mỗi gốc CDR. Các đột biến với ái lực liên kết tăng (hoặc giảm) đối với kháng nguyên có thể được sàng lọc bằng cách cho đột biến được cố định tiếp xúc với kháng nguyên dán nhãn. Phương pháp sàng lọc bất kỳ đã biết trong lĩnh vực có thể được sử dụng để xác định kháng thể đột biến với ái lực tăng hoặc giảm đối với kháng nguyên (ví dụ, ELISA) (Xem Wu và cộng sự. 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 95:6037; Yelton và cộng sự, 1995, J. Immunology 155:1994). Đi trên CDR mà ngẫu nhiên hóa Chuỗi nhẹ có thể được sử dụng là có thể (xem, Schier và cộng sự, 1996, J. Mol. Bio. 263:551).

Phương pháp để thực hiện sự chín muồi ái lực được mô tả ví dụ trong: Krause, J.C. và cộng sự. (2011) "An Insertion Mutation That Distorts Antibody Binding Site Architecture Enhances Function Of A Human Antibody", MBio. 2(1) pii: e00345-10. doi: 10.1128/mBio.00345-10; Kuan, C.T. và cộng sự. (2010) "Affinity-Matured Anti-Glycoprotein NMB Recombinant Immunotoxins Targeting Malignant Gliomas And Melanomas, " Int. J. Cancer 10.1002/ijc.25645; Hackel, B.J. et al. (2010) "Stability And CDR Composition Biases Enrich Binder Functionality Landscapes, " J. Mol. Biol. 401(1):84-96; Montgomery, D.L. et al. (2009) "Affinity Maturation And Characterization Of A Human Monoclonal Antibody Against HIV-1 gp41, " MAbs 1(5):462-474; Gustchina, E. et al. (2009) "Affinity Maturation By Targeted Diversification Of The CDR-H2 Loop Of A Monoclonal Fab Derived From A Synthetic Naïve Human Antibody Library And Directed Against The Internal Trimeric Coiled-Coil Of Gp41 Yields A Set Of Fabs With Improved HIV-1 Neutralization Potency And Breadth, " Virology 393(1):112-119; Finlay, W.J. et al. (2009) "Affinity Maturation Of A Humanized Rat Antibody For Anti-RAGE Therapy: Comprehensive Mutagenesis Reveals A High Level Of Mutational Plasticity Both Inside And Outside The Complementarity-Determining Regions, " J. Mol. Biol. 388(3):541-558; Bostrom, J. et al. (2009) "Improving Antibody Binding Affinity And Specificity For Therapeutic Development, " Methods Mol. Biol. 525:353-376; Steidl, S. et al. (2008) "In Vitro Affinity Maturation Of Human GM-CSF Antibodies By Targeted CDR-Diversification, " Mol. Immunol. 46(1):135-144; and Barderas, R. et al. (2008) "Affinity Maturation Of Antibodies Assisted By In Silico Modeling", Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 105(26):9029-9034.

Do đó, trình tự của biến thể CDR của các kháng thể được bao hàm hoặc đoạn liên

kết epitop của chúng có thể khác với trình tự của CDR của kháng thể bố mẹ, D1.2, C10-2, C5.2 hoặc C8.3, thông qua thế; ví dụ 4 gốc axit amin, 3 gốc axit amin, 2 gốc axit amin hoặc 1 of gốc axit amin được thế. Theo một phương án sáng chế còn đề xuất rằng axit amin trong vùng CDR có thể được thế bằng thế bảo tồn, như nêu trong 3 bảng trên. Ví dụ, gốc axit Asp có thể được thế bằng Glu mà không ảnh hưởng cơ bản đến đặc điểm liên kết của kháng thể.

Thuật ngữ "tau bình thường" đề cập đến protein tau não bình thường chứa 2-3 mol phosphat mỗi mol protein.

Thuật ngữ "tau hyperphosphoryl hóa" đề cập đến loài poly-phosphoryl hóa của protein tau thống nhất với loài poly-anion tạo ra thay đổi tính lưu động trong Western Blot hoặc các loài protein tau mà có nhiều hơn năm, sáu hoặc bảy vị trí Serin, Threonin hoặc Tyrosin phosphoryl hóa.

Thuật ngữ "tau có gốc 396 phosphoryl hóa" đề cập đến protein tau hyperphosphoryl hóa trong đó gốc 396 được phosphoryl hóa và gốc 404 được hoặc không được phosphoryl hóa.

Thuật ngữ "động vật chuyển gen không phải người" đề cập đến a động vật không phải người có bộ gen bao gồm một hoặc nhiều gen chuyển chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của người hoặc chuyển nhiễm sắc thể (hoặc là được tích hợp hoặc không được tích hợp vào ADN bộ gen tự nhiên của động vật) và mà có khả năng biểu hiện đầy đủ kháng thể người hóa. Ví dụ, chuột chuyển gen có thể có gen chuyển chuỗi nhẹ người hóa và hoặc là gen chuyển chuỗi nặng người hóa hoặc chuyển nhiễm sắc thể chuỗi nặng người hóa, sao cho chuột tạo ra kháng thể kháng protein tau người hóa khi được gây miễn dịch bằng kháng nguyên protein tau và/hoặc tế bào biểu hiện tau. Gen chuyển chuỗi nặng người hóa có thể được tích hợp vào ADN nhiễm sắc thể của chuột, như là trường hợp của chuột chuyển gen, ví dụ chuột HuMAb, như chuột HCo7 hoặc HCo12, hoặc gen chuyển chuỗi nặng người hóa có thể duy trì ngoài nhiễm sắc thể, như là trường hợp của chuột KM chuyển nhiễm sắc thể như được mô tả trong WO02/43478. Chuột chuyển gen và chuyển nhiễm sắc thể này (gọi chung ở đây là "chuột chuyển gen") có khả năng tạo ra nhiều isotyp của các kháng thể đơn dòng người hóa cho kháng nguyên được cho (như IgG, IgA, IgM, IgD và/hoặc IgE) bằng cách đi qua tái tổ hợp V-D-J và chuyển đổi isotyp.

Động vật chuyển gen, không phải người còn có thể được dùng để sản xuất các

kháng thể đối với kháng nguyên đặc hiệu bằng cách đưa vào gene mã hóa kháng thể đặc hiệu này, ví dụ bằng cách liên kết hoạt động gen với gen mà được biểu hiện trong sữa của động vật.

Thuật ngữ “sự điều trị” hoặc “việc điều trị” như được sử dụng ở đây nghĩa là cải thiện, làm chậm, làm yếu hoặc đảo ngược sự phát triển hoặc mức độ trầm trọng của bệnh hoặc rối loạn, hoặc cải thiện, làm chậm, làm yếu hoặc đảo ngược một hoặc nhiều triệu chứng hoặc tác dụng phụ của bệnh hoặc rối loạn này. Nhằm mục đích của sáng chế, “sự điều trị” hoặc “việc điều trị” còn có nghĩa là phương pháp để thu được các kết quả lâm sàng có lợi hoặc mong muốn, trong đó “kết quả lâm sàng có lợi hoặc mong muốn” bao gồm, không giới hạn, làm nhẹ triệu chứng, giảm bớt sự mở rộng của rối loạn hoặc bệnh, ổn định (tức là, không tệ hơn) tình trạng bệnh hoặc rối loạn, trì hoãn hoặc làm chậm sự tiến triển của tình trạng bệnh hoặc rối loạn, cải thiện hoặc giảm nhẹ tình trạng bệnh hoặc rối loạn, và xóa bỏ bệnh hoặc rối loạn, hoặc là một phần hoặc toàn bộ, phát hiện được hoặc không phát hiện được.

"Lượng hiệu quả", khi được áp dụng cho kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, theo sáng chế, đề cập đến lượng đủ, ở các liều dùng và trong khoảng thời gian cần thiết, để đạt được hiệu quả sinh học dự kiến hoặc kết quả chữa bệnh mong muốn bao gồm, không giới hạn, kết quả lâm sàng. Câu “lượng có hiệu quả chữa bệnh”, khi được áp dụng cho kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo sáng chế, để chỉ lượng của kháng thể, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, mà đủ để cải thiện, làm nhẹ bớt, làm ổn định, đảo ngược, làm chậm, làm giảm hoặc trì hoãn sự tiến triển của tình trạng rối loạn hoặc bệnh, hoặc triệu chứng của rối loạn hoặc bệnh. Theo một phương án, phương pháp theo sáng chế đề xuất việc dùng kháng thể, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, kết hợp với các hợp chất khác. Trong trường hợp này, "lượng hiệu quả" là lượng của dạng kết hợp đủ để gây ra hiệu quả sinh học dự kiến.

Lượng có hiệu quả chữa bệnh của kháng thể kháng protein tau hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo sáng chế có thể thay đổi theo các yếu tố như tình trạng bệnh, độ tuổi, giới tính, và khối lượng của cá thể, và khả năng của kháng thể kháng protein tau, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, để tạo ra đáp ứng mong muốn ở cá thể. Lượng có hiệu quả chữa bệnh còn là lượng trong đó bất kỳ tác dụng độc tố hoặc bất lợi của kháng thể hoặc phần kháng thể nặng hơn tác dụng có lợi về mặt chữa bệnh.

Như chỉ ra ở trên, sáng chế cụ thể là đề cập đến kháng thể đơn dòng, hoặc liên kết epitop của chúng, và phương pháp hoàn toàn mới để tạo ra phân tử này (và do đó đoạn liên kết epitop của chúng). Phương pháp này được thể hiện trên Hình 9. Khả năng của phương pháp mới để phân lập các kháng thể đơn dòng được lấy ví dụ ở đây bằng cách sử dụng nó để phân lập các kháng thể đơn dòng mà có khả năng liên kết đặc hiệu với gốc phosphoryl hóa serin 396 (^pS396) của protein tau của người (SEQ ID NO:33). Các kháng thể này còn khác biệt ở chỗ khả năng của chúng để phân biệt giữa gốc phosphoryl hóa serin 396 và serin 404 (pS404) sao cho chúng không liên kết protein tau với phosphoryl hóa serin 404 trừ khi protein tau cũng phosphoryl hóa ở gốc 396.

Các kháng thể theo sáng chế, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, được tạo ra và phân lập bằng cách sử dụng phương pháp mới (Hình 9) mà giúp lựa chọn các kháng thể đặc hiệu ^pS396 (Hình 9). Ngoài ra, bằng cách áp dụng quy trình chọn lọc dòng vô tính kháng thể rất nghiêm ngặt này, các kháng thể được thu mà chỉ đặc hiệu cao đối với S396, nhưng cũng chọn lọc cao đối với epitop ^pS396 phosphoryl hóa. Các kháng thể này chỉ nhận diện protein tau từ não bệnh Alzheimer. Tác giả còn chứng minh rằng quá trình sàng lọc được thể hiện trên Hình 9 bảo đảm sự xác định các kháng thể mà có tính hữu ích chức năng và chữa bệnh.

Các kháng thể được nêu đối với peptit phosphoryl hóa hai lần: TDHGAEIVYK^pSPVVSGDT^pSPRHL (SEQ ID NO:37) bao phủ các gốc 386-408 của protein tau 2N4R (Ví dụ 1). Chuột được gây miễn dịch bằng phospho-peptit. Khi chuẩn độ kháng thể đủ thu được, chuột được gây chết và khối tế bào lai được tạo thành (Ví dụ 2). Khối tế bào lai được sàng lọc sử dụng dot-blot (Ví dụ 3) và MSD ELISA với protein tau bệnh lý và không bệnh lý cố định của người (Ví dụ 4). Khả năng phân biệt giữa protein tau bệnh lý và không bệnh lý của người trong dot-blot và Western blot được dùng để lựa chọn khối tế bào lai. Mười sáu dòng vô tính được lựa chọn, trong đó bốn dòng vô tính khối lai được tái tạo các kháng thể tạo ra mà biểu hiện khả năng khác thường đối với liên kết với vật liệu protein tau bệnh lý của người.

Liên kết đặc hiệu với protein tau bệnh lý và không bệnh lý cũng được xác định bằng các phân lập protein tau từ não AD có bệnh và không bệnh và cố định vật liệu này trên tấm MSD ELISA (Ví dụ 4).

Khía cạnh khác theo sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng hoặc đoạn liên kết

epitop của chúng thể hiện kháng peptit phosphoryl hóa hai lần bao gồm ít nhất 18, như ít nhất 20 gốc axit amin liên tiếp trong TDHGAEIVYK^(p)SPVVSGDT^(p)SPRHL (SEQ ID NO:37) bao phủ các gốc 386-410 của protein tau 2N4R. Theo khía cạnh này của sáng chế, kháng thể đơn dòng hoặc đoạn liên kết epitop của chúng thường thể hiện peptit phosphoryl hóa hai lần bao gồm 18-40, như ở 18-30, như 20-30 gốc axit amin liên tiếp bao gồm TDHGAEIVYK^(p)SPVVSGDT^(p)SPRHL (SEQ ID NO:37) bao phủ các gốc 386-410 của protein tau 2N4R.

Khía cạnh khác theo sáng chế nhằm đến kháng thể đơn dòng hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo sáng chế, có tính đặc hiệu đối với phosphoTau (pTau) từ bệnh nhân mắc AD so với đối chứng khỏe mạnh ngang tuổi, sao cho kháng thể đơn dòng hoặc đoạn liên kết epitop của chúng có khác biệt về tính đặc hiệu đối với phosphoTau (pTau) từ bệnh nhân mắc AD đối với protein tau từ đối chứng ngang tuổi khỏe mạnh bằng hơn 50 lần, như hơn 100 lần tăng về tính đặc hiệu đối với vật liệu bệnh AD so với vật liệu đối chứng khỏe mạnh trong thử nghiệm trên cơ sở ELISA phát hiện phosphoTau (pTau) trong chất đồng chất não từ đối tượng AD và từ đối tượng đối chứng khỏe mạnh, sử dụng ELISA cài đặt 1 đặc hiệu phospho và multime như được mô tả ở đây.

Khía cạnh liên quan theo sáng chế nhằm đến kháng thể đơn dòng hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo sáng chế, có tính đặc hiệu đối với protein tau bệnh AD sao cho kháng thể đơn dòng hoặc đoạn liên kết epitop của chúng có khác biệt về tính đặc hiệu đối với AD so với đối chứng ngang tuổi khỏe mạnh bằng hơn 50 lần, như hơn 100 lần tăng tính đặc hiệu đối với vật liệu bệnh AD so với vật liệu đối chứng khỏe mạnh trong thử nghiệm trên cơ sở ELISA phát hiện phosphoTau (pTau) trong chất đồng chất não từ đối tượng AD và từ đối tượng đối chứng khỏe mạnh, sử dụng ELISA cài đặt 1 đặc hiệu phospho và multime.

Phương pháp ELISA cài đặt 1 bao gồm các bước A) bắt protein tau bệnh lý của kháng thể của người từ não AD sử dụng tấm phủ C10-2; B) ủ kháng nguyên protein tau với nồng độ tăng của kháng thể đặc hiệu pS396; và C) phát hiện bắt kháng nguyên protein tau và ức chế trung gian kháng thể sử dụng các kháng thể protein tau gắn thẻ sulfo kháng người (tổng) từ MSD.

Sáng chế còn đề cập đến kháng thể được tạo ra bởi phương pháp tạo ra kháng thể đặc hiệu cao, ái lực cao mà đặc hiệu miễn dịch đối với protein tau bệnh lý

hyperphosphoryl hóa bao gồm gốc phosphoryl hóa S396, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(A) tiêm chất kháng nguyên vào động vật có vú, chất kháng nguyên này bao gồm peptit phosphoryl hóa hai lần bao gồm 18-40, như ở 18-30, như 20-30 gốc axit amin liên tiếp bao gồm TDHGAEIVYK^(p)SPVVSGDT^(p)SPRHL (SEQ ID NO:37) bao phủ các gốc 386-410 của protein tau 2N4R, nhờ đó gây miễn dịch động vật có vú này;

(B) lặp lại việc gây miễn dịch động vật có vú này hai hoặc nhiều lần;

(C) sàng lọc mẫu huyết thanh từ động vật có vú được gây miễn dịch lặp lại này đối với sự có mặt của kháng thể đặc hiệu cao, ái lực cao có khả năng liên kết protein tau bệnh lý hyperphosphoryl hóa bao gồm gốc phosphoryl hóa S396, nhưng cơ bản có khả năng liên kết protein tau không bệnh lý ít hơn; và

(D) thu kháng thể đặc hiệu cao, ái lực cao này.

Đặc biệt hơn là, bước A bao gồm: phủ tấm MSD (thường qua đêm ở 4 C) với kháng thể C10-2, thường 0,5 µg/ml (kháng thể bất) trong đệm bao, chằng (thường 1 giờ ở nhiệt độ phòng) và rửa, thường 3 lần. Bước B bao gồm: trộn mẫu hợp chất dung giải P3 (thường 1:1000 = 2-4 µg/ml tổng protein) và/hoặc S1(p) (thường 1:300=20-40 ng/ml tổng protein) từ AD (được gom từ 3 bệnh nhân) với nồng độ được phân chia của epitop peptit pS396 đặc hiệu kháng thể và ủ (thường 1 giờ ở nhiệt độ phòng). Phản ứng sau đó được ủ trong 2 giờ trên tấm được điều chế trong bước A. Bước C bao gồm phát hiện protein tau bất C10-2 được sử dụng protein tau gắn thẻ sulfo của người. Kháng thể tau (thường 1:50) từ MSD theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các tấm được phân tích trên MSD SECTOR® S600. AD P3 và AD S1(p) được thử trong cài đặt tương tự.

Phương án khác nhắm đến kháng thể, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của chúng, có khả năng liên kết đặc hiệu miễn dịch với gốc được phosphoryl hóa 396 của protein tau của người (SEQ ID NO:33), mà được tạo ra hoặc sản xuất trong dòng tế bào như dòng tế bào của người, dòng tế bào của động vật có vú không phải người, dòng tế bào côn trùng, nấm men hoặc vi khuẩn.

Kháng thể, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của chúng, có khả năng liên kết đặc hiệu miễn dịch với gốc được phosphoryl hóa 396 của protein tau của người (SEQ ID NO:33), được tạo ra trong dòng tế bào CHO, dòng tế bào HEK, dòng tế bào BHK-21,

dòng tế bào của chuột (như dòng tế bào u tủy), dòng tế bào sarcoma xơ, dòng tế bào PER.C6, dòng tế bào HKB-11, dòng tế bào CAP và dòng tế bào HuH-7 của người.

Ái lực đặc hiệu và đặc tính liên kết của D1.2 và C10-2 được đặc trưng bằng cách sử dụng peptit protein tau 386-410 (2R4N) mà hoặc là được phosphoryl hóa hoặc không được phosphoryl hóa ở vị trí 396 hoặc 404 (SEQ ID NOs:29-32). Sử dụng phương pháp gây miễn dịch đặc hiệu và sàng lọc (Hình 9) được thể hiện trong sáng chế này sẽ tạo ra các kháng thể đặc hiệu phosphor-serin-396 (pS396) cao như được chứng minh trong Hình 4.

Để chứng minh rằng các kháng thể đặc hiệu đối với tau bệnh lý, D1.2 và C10-2 các kháng thể cũng được đặc trưng bằng cách phân tích hóa mô miễn dịch (Ví dụ 6). Các kháng thể thể hiện liên kết đặc hiệu cao với đám rối sợi thần kinh ở não bệnh Alzheimer và trong các phần từ chuột chuyển gen protein tau Tg4510 biểu hiện protein tau đột biến (P301L) của người (Hình 5). Không có liên kết được thấy ở mô từ não đối chứng của người và từ não chuột không chuyển gen, chứng minh rằng các kháng thể liên kết đặc hiệu protein tau của người và cụ thể là protein tau liên quan đến bệnh lý Alzheimer.

Khả năng duy nhất của các kháng thể này để nhận diện protein tau liên quan đến bệnh lý của bệnh được chứng minh ở đây trong Ví dụ 7. Tác giả so sánh liên kết của protein tau bệnh lý với không bệnh lý trong thử nghiệm được mô tả trong Ví dụ 3. Sự so sánh là đối với năm kháng thể protein tau được công bố: hACI-2B6, IPN002, HJ8,5, 2.10.3, và 4E4. Hình 6 minh họa liên kết của mỗi trong số các kháng thể đối chứng đối với protein tau từ não khỏe và não bệnh, và liên kết với protein tau đột biến của người P301L phân lập từ chuột chuyển gen protein tau Tg4510 10 tháng tuổi. Điều này chứng minh rằng các kháng thể được phân lập thể hiện mức đặc hiệu cao đặc biệt và tính chọn lọc đối với protein tau bệnh lý của người. Tính chọn lọc này là cao cấp đối với bất kỳ trong số các kháng thể so sánh như được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5		
mAb được thử	AD/ctrl	TG/wt
hACI-2B6	3	1
IPN002	3	37

HJ8,5	3	51
4E4	không liên kết	1
2.10.3	5	2
C5-2_C10-2	>100	118

Ở bảo hòa liên kết các kháng thể D1.2 và C10-2 thể hiện hơn 100-lần tính chọn lọc đối với protein tau P3 phân lập từ não AD của người.

Để chứng minh rằng các kháng thể được chọn có hữu ích chức năng và chữa bệnh, các kháng thể được thử trong thử nghiệm kết tụ tau trong ống nghiệm và trong tế bào (Ví dụ 8). Các thử nghiệm này là thử nghiệm chức năng mà chứng minh rằng các kháng thể có khả năng tương tác với quá trình kết tụ bệnh lý của tau. Tế bào HEK293 được chuyển nạp tạm thời bằng protein tau của người -P301L-FLAG (4R0N). Sau đó tế bào được phơi lộ ra chiết xuất protein tau từ não AD của người hoặc từ não Tg4510 chuyển gen. Phơi lộ này ra protein tau bệnh lý thúc đẩy protein tau hấp thụ vào tế bào và kết tụ trong tế bào. Cả làm nghèo miễn dịch của chế phẩm tau sử dụng các kháng thể D1.2 và C10-2, và điều trị trực tiếp tế bào bằng các kháng thể này có thể làm giảm việc hình thành kết tụ protein tau đột ngột (Hình 7).

Hữu ích chữa bệnh của các kháng thể D1.2 và C10-2 còn được đánh giá trong protein tau của người /chuột PS1 (Ví dụ 9). Mô hình chuột này là mô hình động vật liên quan đến bệnh AD nhiều mà chỉ tạo ra bệnh lý AD muộn trong cuộc đời (12-18 tháng tuổi). Tuy nhiên, chuột thể hiện protein tau hyper phosphoryl hóa trước khi xảy ra bệnh lý đám rối răn. Chuột được tiêm mạn tính trong 13 tuần, mỗi tuần hai lần với 15 mg/kg liều. Chuột được điều trị bằng kháng thể thể hiện giảm đột ngột phosphoryl hóa protein tau như được chứng minh trên Hình 9, chỉ ra rằng điều trị mạn tính bằng các kháng thể D1.2 và C10-2 sẽ giảm bệnh lý đám rối và do đó thoái hóa thần kinh về sau trong cơ thể.

Các kháng thể theo sáng chế loại bỏ đặc hiệu protein tau hyperphosphoryl hóa từ chiết xuất não chuột rTg4510 bằng phwongn pháp làm nghèo miễn dịch. Hơn nữa, các kháng thể theo sáng chế không loại bỏ protein tau bình thường từ chất đồng chất, trong khi đó kháng thể tau5 bán trên thị trường thì có. Ngược với các kháng thể bán trên thị trường mà liên kết với protein tau trong đó phosphoryl hóa ở gốc 404 hoặc ở cả gốc 404

và 396, các kháng thể theo sáng chế loại bỏ đặc hiệu protein tau hyperphosphoryl hóa 95%, mà được phosphoryl hóa trên serin 396. Các thử nghiệm (Ví dụ 12) chứng minh rằng kháng thể theo sáng chế, bất kể chỉ loại bỏ phần rất nhỏ của tổng protein tau trong chất đồng chất não (8%), tuy nhiên các kháng thể loại bỏ đặc hiệu protein tau hyperphosphoryl hóa (90%). Theo đó, một khía cạnh theo sáng chế nhắm đến kháng thể đơn dòng, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, có khả năng liên kết đặc hiệu miễn dịch với tau hyperphosphoryl hóa bệnh lý. Ngoài ra, trong thử nghiệm trong đó protein tau hyperphosphoryl hóa được loại bỏ sử dụng kháng thể theo sáng chế, hoạt tính tạo hạt bị triệt tiêu. Bằng việc loại bỏ protein tau hyperphosphoryl hóa từ chất đồng chất, chất đồng chất không còn gây ra việc kết hạt bệnh lý protein tau. Đề xuất rằng việc giảm kết hạt làm giảm sự phát triển của việc hình thành đám rối và sự tiến triển của bệnh do protein tau, bao gồm bệnh Alzheimer. Theo đó, khía cạnh khác theo sáng chế nhắm đến kháng thể theo sáng chế để dùng trong việc làm giảm sự tiến triển của AD hoặc triệu chứng AD.

Đặc biệt hơn là, như mô tả chi tiết ở trên, sáng chế đề cập đến một điểm bất kỳ trong số bốn kháng thể đơn dòng được chọn từ nhóm bao gồm:

Kháng thể D1.2

- (a) CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:1;
- (b) CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:2;
- (c) CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:3;
- (d) CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:4;
- (e) CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:5; và
- (f) CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:6.

Kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng có thể bao gồm hoặc gồm vùng biến đổi chuỗi nặng nêu ở SEQ ID NO:8 và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu ở SEQ ID NO:7.

Theo phương án liên quan, kháng thể D1.2 hoặc đoạn liên kết epitop của chúng có thể bao gồm hoặc gồm chuỗi nặng nêu ở SEQ ID NO 8 và/hoặc chuỗi nhẹ nêu ở SEQ ID NO:34.

Kháng thể C10-2

- (a) CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:9;
- (b) CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:10;
- (c) CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:11;
- (d) CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:12;
- (e) CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:13; và
- (f) CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:14.

Kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng có thể bao gồm hoặc gồm vùng biến đổi chuỗi nặng nêu ở SEQ ID NO:15 và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu ở SEQ ID NO:16.

Trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể C10-2 người hóa như được thể hiện ở SEQ ID NO:35. Trình tự axit amin nêu ở chuỗi nhẹ nêu ở kháng thể C10-2 người hóa như được thể hiện ở SEQ ID NO:36.

Cùng với nhau, các Ví dụ thể hiện rằng các kháng thể theo sáng chế, bao gồm C10-2, liên kết hiệu quả với các tấm MSD được phủ kháng nguyên AD-P3. Để so sánh, các kháng thể bán trên thị trường như PHF-13, có hoạt tính liên kết thấp. Ngoài ra PHF-13 chứng minh mức không liên kết đặc hiệu cơ bản cao hơn so với các kháng thể theo sáng chế (xem Bảng 6 A-Bảng 6D). Bảng 6 thể hiện rằng sự ức chế pha lỏng mC10-2 của bắt kháng nguyên Ptau trong tấm được phủ C10-2 hiệu quả (IC_{50} = 10-20 nM) trong khi đó mD1.2 không hiệu quả (IC_{50} = 500-1000 nM). Sự ức chế pha lỏng mC10-2 của bắt kháng nguyên p-tau trong tấm được phủ mC10-2 hiệu quả với IC_{50} = 10-20 nM) trong khi đó PHF-13 không hiệu quả (IC_{50} = 500-1000 nM).

Một khía cạnh theo sáng chế nhắm đến kháng thể bao gồm

- (a) CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:9;
- (b) CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:10;
- (c) CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:11.

Khía cạnh khác theo sáng chế nhắm đến kháng thể bao gồm

- (d) CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:12;

- (e) CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:13; và
- (f) CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:14.

Khía cạnh khác theo sáng chế nhằm đến kháng thể bao gồm

- (d) CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:12;
- (e) CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:13; và
- (f) CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:14 and

một, hai hoặc ba trong số

- (a) CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:9;
- (b) CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:10; và
- (c) CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:11.

Kháng thể C5.2

- (a) CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:17;
- (b) CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:18;
- (c) CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:19;
- (d) CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:20;
- (e) CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:21; và
- (f) CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:22.

Kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng có thể bao gồm hoặc gồm vùng biến đổi chuỗi nặng nêu ở SEQ ID NO:23 và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu ở SEQ ID NO:24.

Như thấy từ cấu trúc tinh thể trên Hình 10, epitop liên kết chéo chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của C5.2. Theo đó, theo một phương án liên quan, kháng thể theo sáng chế hoặc đoạn liên kết epitop của chúng bao gồm

- (a) CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:17; hoặc
- (b) CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:18; hoặc
- (c) CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:19; và

- (d) CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:20; hoặc
- (e) CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:21; hoặc
- (f) CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:22.

Kháng thể C8.3

- (a) CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:25;
- (b) CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:26
- (c) CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:27;
- (d) CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:28;
- (e) CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:29; và
- (f) CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:30.

Kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng có thể bao gồm hoặc gồm vùng biến đổi chuỗi nặng nêu ở SEQ ID NO:31 và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu ở SEQ ID NO:32.

Kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng tốt hơn là kháng thể của người hoặc người hóa.

Các kháng thể và đoạn liên kết epitop của chúng nêu trên có thể, theo một phương án, còn bao gồm biến thể của CDR1, CDR2 hoặc CDR3 chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng này (với không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin).

Như thấy từ Hình 11, HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3 và LC CDR3 là, theo ít nhất một phương án, quan trọng, để liên kết với vùng 392-398 của Tau. Theo một phương án theo sáng chế, kháng thể theo sáng chế, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng bao gồm:

- a) CDR1 chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:20, và SEQ ID NO:28;
- b) CDR2 chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:21, và SEQ ID NO:29; và

c) CDR3 chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:22, và SEQ ID NO:30; và

d) CDR3 chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:19, và SEQ ID NO:27.

Kháng thể theo sáng chế, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng may comprise

- a) CDR1 chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:20;
- b) CDR2 chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:21;
- c) CDR3 chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:22; và
- d) CDR3 chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:19.

Theo một khía cạnh của sáng chế, sáng chế nhắm đến kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, mà tạo thành túi kỵ nước tạo thành bởi L3:H3, L3:F8*, H1:H13, H2:Y1, H2:Y3 với Y394 của peptit protein tau. Theo một phương án, sáng chế nhắm đến kháng thể mà cạnh tranh với kháng thể còn được mô tả ở đây để tạo thành mạng liên kết hydro giữa ^(p)S396 solvat hóa và L3:T4, H1:R10, H1:T11, H3:R1, H3:T3; (*) L3:F8 là gốc khung kẹp sườn đầu C của CDR L3 (xem Hình 11).

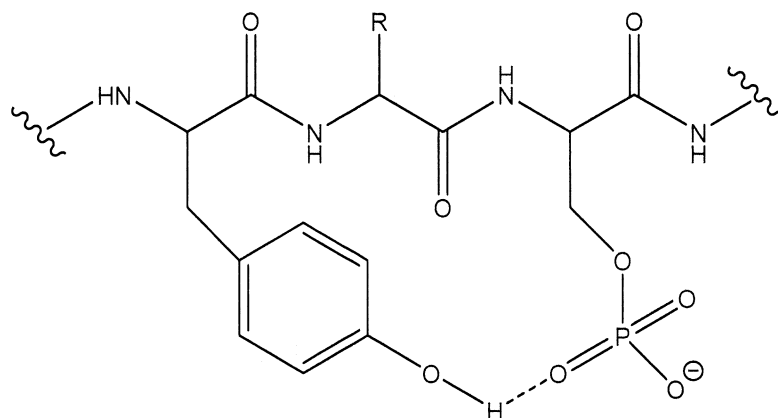
Như thấy từ cấu trúc tinh thể tia x, kháng thể theo sáng chế liên kết với hai mức tính lựa chọn. Mức tính lựa chọn thứ nhất là lựa chọn đối với protein tau, hyperphosphoryl hóa bệnh lý, và mức tính lựa chọn lọc thứ hai là tính lựa chọn đối với gốc serin phosphoryl hóa trong đó phosphat của serin phosphoryl hóa là hydro liên kết với chuỗi bên của hai gốc tyrosin loại ra từ serin phosphoryl hóa này. Theo đó, khía cạnh có lợi theo sáng chế nhắm đến kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng chọn lọc cho mô típ axit amin của protein tau hyperphosphoryl hóa bao gồm hai gốc serin phosphoryl hóa loại ra từ gốc tyrosin. Thông thường, mô típ axit amin có trình tự:

Y - X - S(phosphoryl hóa) - P -

trong đó Y là tyrosin, X là axit amin có trong tự nhiên, P là prolin và S(phosphoryl hóa) là serin với chuỗi bên hydroxyl phosphoryl hóa.

Trương tự, khía cạnh có lợi theo sáng chế nhắm đến kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng mà liên kết với tau phosphoryl hóa, tốt hơn là tau hyperphosphoryl hóa, trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết epitop của chúng chọn lọc cho mô típ

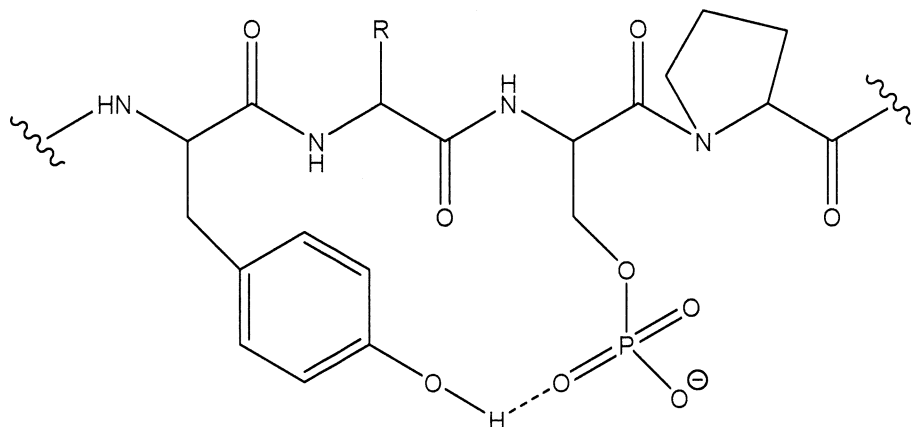
gốc axit amin IA, trong đó R là chuỗi bên của axit amin có trong tự nhiên.



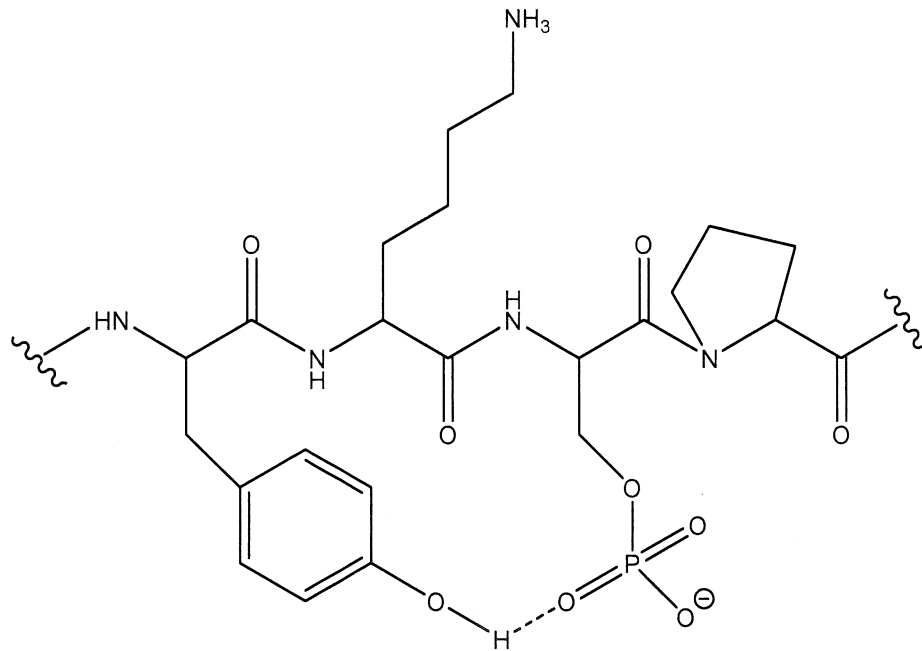
IA

Không bị ràng buộc bởi lý thuyết cụ thể, tin rằng kháng thể theo sáng chế chọn lọc cho mô típ axit amin IA khi mô típ này là cấu hình chấp nhận bởi tau bệnh lý. Theo đó, mô típ axit amin IA thường là trình tự được nhận diện chọn lọc bởi kháng thể theo sáng chế. Theo đó, khía cạnh có lợi theo sáng chế nhắm đến kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng mà liên kết với tau phosphoryl hóa, tốt hơn là tau hyperphosphoryl hóa, trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết epitop của chúng chọn lọc cho mô típ gốc axit amin IB, trong đó R là chuỗi bên của axit amin có trong tự nhiên.

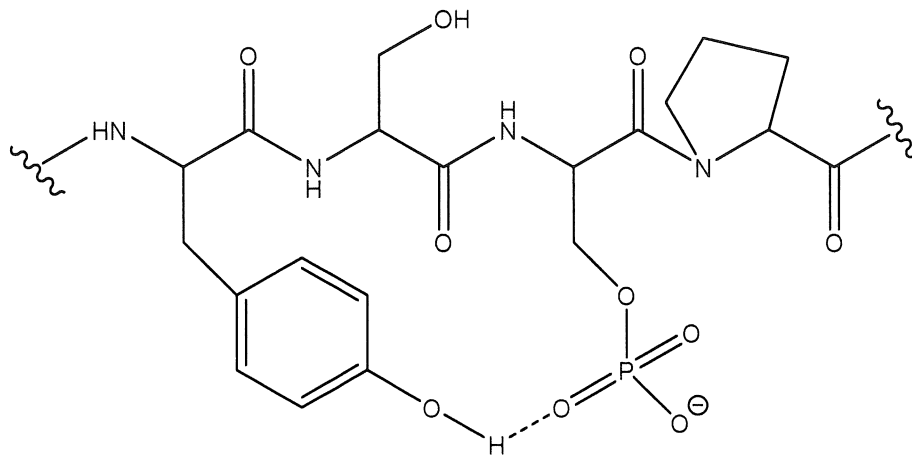
Theo phương án cơ bản của khía cạnh này của sáng chế, sáng chế nhắm đến kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng mà liên kết với tau phosphoryl hóa, tốt hơn là tau hyperphosphoryl hóa, trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết epitop của chúng chọn lọc cho mô típ gốc axit amin IB, trong đó R là chuỗi bên của axit amin có trong tự nhiên như, nhưng không giới hạn ở IC or ID.



IB



IC



ID

Sáng chế còn đề xuất phương pháp làm giảm hình thành đám rối protein tau ở bệnh nhân, bao gồm việc dùng cho bệnh nhân cần điều trị này, lượng có hiệu quả chữa bệnh của kháng thể theo sáng chế, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng.

Một khía cạnh theo sáng chế nhằm đến phương pháp điều trị bệnh do protein tau bằng cách sử dụng kháng thể theo sáng chế, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng. Cơ bản là, bệnh do protein tau được chọn từ nhóm bao gồm bệnh Alzheimer, Bệnh hạt ưa bạc (AGD), Chứng rối loạn tâm thần, cụ thể là Chứng rối loạn tâm thần do AD hoặc Chứng rối loạn tâm thần ở bệnh nhân mắc AD, hội chứng tâm thần của bệnh nhân mắc chứng mất trí thể Levwy, Liệt trên nhân tiền triền (PSP), Sa sút trí tuệ trán-thái dương

(FTD hoặc biến thể của chúng), TBI (trấn thương sọ não, cấp hoặc mạn tính), Thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), Bệnh Pick, Bệnh do protein tau liên quan đến tuổi tác sơ cấp (PART), Chứng mất trí do tuổi già đám rối sợi thần kinh chiếm ưu thế, Chứng mất trí do chấn thương đầu lặp lại, Tổn thương não mạn tính do chấn thương, đột quy, phục hồi sau đột quy, thoái hóa thần kinh liên quan đến bệnh Parkinson, Hội chứng liệt rung Parkinson liên kết với nhiễm sắc thể, Bệnh Lytico-Bodig (Hội chứng Parkinson – sa sút trí tuệ phức hợp Guam), U hạch thần kinh đệm và u tế bào hạch, Dị dạng màng mềm, Hội chứng parkinson sau viêm não, Viêm não toàn bộ xơ hóa bán cấp, Bệnh Huntington, bệnh não chi, bệnh xơ cứng não củ, Bệnh Hallervorden-Spatz và rối loạn thoái hóa thần kinh do di thừa sắc tố nâu nhuộm với một số thuốc nhuộm chất béo. Cơ bản hơn là, bệnh do protein tau được chọn từ nhóm bao gồm bệnh Alzheimer, Bệnh hạt ưa bạc (AGD), Chứng rối loạn tâm thần, cụ thể là Chứng rối loạn tâm thần do AD hoặc Chứng rối loạn tâm thần ở bệnh nhân mắc AD, hội chứng tâm thần của bệnh nhân mắc chứng mất trí thể Levwy, Liệt trên nhân tiến triển (PSP), Sa sút trí tuệ trán-thái dương (FTD hoặc biến thể của chúng), TBI (trấn thương sọ não, cấp hoặc mạn tính), Thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), và Bệnh Pick. Cụ thể là, bệnh do protein tau có thể được chọn từ bệnh Alzheimer, Bệnh hạt ưa bạc (AGD), Chứng rối loạn tâm thần do AD hoặc Chứng rối loạn tâm thần ở bệnh nhân mắc AD, và hội chứng tâm thần của bệnh nhân mắc chứng mất trí thể Levwy.

Theo đó, khía cạnh khác theo sáng chế nhằm đến kháng thể theo sáng chế hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, để dùng trong điều trị bệnh do protein tau. Cơ bản là, bệnh do protein tau được chọn từ nhóm bao gồm bệnh Alzheimer, Bệnh hạt ưa bạc (AGD), Chứng rối loạn tâm thần, cụ thể là Chứng rối loạn tâm thần do AD hoặc Chứng rối loạn tâm thần ở bệnh nhân mắc AD, hội chứng tâm thần của bệnh nhân mắc chứng mất trí thể Levwy, Liệt trên nhân tiến triển (PSP), Sa sút trí tuệ trán-thái dương (FTD hoặc biến thể của chúng), TBI (trấn thương sọ não, cấp hoặc mạn tính), Thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), Bệnh Pick, Bệnh do protein tau liên quan đến tuổi tác sơ cấp (PART), Chứng mất trí do tuổi già đám rối sợi thần kinh chiếm ưu thế, Chứng mất trí do chấn thương đầu lặp lại, Tổn thương não mạn tính do chấn thương, đột quy, phục hồi sau đột quy, thoái hóa thần kinh liên quan đến bệnh Parkinson, Hội chứng liệt rung Parkinson liên kết với nhiễm sắc thể, Bệnh Lytico-Bodig (Hội chứng Parkinson – sa sút trí tuệ phức hợp Guam), U hạch thần kinh đệm và u tế bào hạch, Dị dạng màng mềm,

Hội chứng parkinson sau viêm não, Viêm não toàn bộ xơ hóa bán cấp, Bệnh Huntington, bệnh não chi, bệnh xơ cứng não củ, Bệnh Hallervorden-Spatz và rối loạn thoái hóa thần kinh do di thừa sắc tố nâu nhuộm với một số thuốc nhuộm chất béo. Cơ bản hơn là, bệnh do protein tau được chọn từ nhóm bao gồm bệnh Alzheimer, Bệnh hạt ưa bạc (AGD), Chứng rối loạn tâm thần, cụ thể là Chứng rối loạn tâm thần do AD hoặc Chứng rối loạn tâm thần ở bệnh nhân mắc AD, hội chứng tâm thần của bệnh nhân mắc chứng mất trí thể Levwy, Liệt trên nhân tiến triển (PSP), Sa sút trí tuệ trán-thái dương (FTD hoặc biến thể của chúng), TBI (trấn thương sọ não, cấp hoặc mạn tính), Thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), và Bệnh Pick. Cụ thể là, bệnh do protein tau có thể được chọn từ bệnh Alzheimer, Bệnh hạt ưa bạc (AGD), Chứng rối loạn tâm thần do AD hoặc Chứng rối loạn tâm thần ở bệnh nhân mắc AD, và hội chứng tâm thần của bệnh nhân mắc chứng mất trí thể Levwy.

Khía cạnh khác theo sáng chế nhằm đến kháng thể theo sáng chế hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, kết hợp cùng với nhau với chất mang, chất pha loãng, tá dược và/hoặc chất ổn định được dùng. Các kháng thể theo sáng chế, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, có thể được sử dụng trong liệu pháp để điều trị bệnh do protein tau. Cơ bản là, bệnh do protein tau được chọn từ nhóm bao gồm bệnh Alzheimer, Bệnh hạt ưa bạc (AGD), Chứng rối loạn tâm thần, cụ thể là Chứng rối loạn tâm thần do AD hoặc Chứng rối loạn tâm thần ở bệnh nhân mắc AD, hội chứng tâm thần của bệnh nhân mắc chứng mất trí thể Levwy, Liệt trên nhân tiến triển (PSP), Sa sút trí tuệ trán-thái dương (FTD hoặc biến thể của chúng), TBI (trấn thương sọ não, cấp hoặc mạn tính), Thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), Bệnh Pick, Bệnh do protein tau liên quan đến tuổi tác sơ cấp (PART), Chứng mất trí do tuổi già đám rối sợi thần kinh chiếm ưu thế, Chứng mất trí do chấn thương đầu lặp lại, Tổn thương não mạn tính do chấn thương, đột quỵ, phục hồi sau đột quỵ, thoái hóa thần kinh liên quan đến bệnh Parkinson, Hội chứng liệt rung Parkinson liên kết với nhiễm sắc thể, Bệnh Lytico-Bodig (Hội chứng Parkinson – sa sút trí tuệ phức hợp Guam), U hạch thần kinh đệm và u tế bào hạch, Dị dạng màng mềm, Hội chứng parkinson sau viêm não, Viêm não toàn bộ xơ hóa bán cấp, Bệnh Huntington, bệnh não chi, bệnh xơ cứng não củ, Bệnh Hallervorden-Spatz và rối loạn thoái hóa thần kinh do di thừa sắc tố nâu nhuộm với một số thuốc nhuộm chất béo. Cơ bản hơn là, bệnh do protein tau được chọn từ nhóm bao gồm bệnh Alzheimer, Bệnh hạt ưa bạc (AGD), Chứng rối loạn tâm thần, cụ thể là Chứng rối loạn tâm thần do AD hoặc Chứng

rối loạn tâm thần ở bệnh nhân mắc AD, hội chứng tâm thần của bệnh nhân mắc chứng mất trí thể Levwy, Liệt trên nhân tiến triển (PSP), Sa sút trí tuệ trán-thái dương (FTD hoặc biến thể của chúng), TBI (trấn thương sọ não, cấp hoặc mạn tính), Thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), và Bệnh Pick. Cụ thể là, bệnh do protein tau có thể được chọn từ bệnh Alzheimer, Bệnh hạt ưa bạc (AGD), Chứng rối loạn tâm thần do AD hoặc Chứng rối loạn tâm thần ở bệnh nhân mắc AD, và hội chứng tâm thần của bệnh nhân mắc chứng mất trí thể Levwy.

Điều trị được đề xuất bởi sáng chế có thể là mạn tính và bệnh nhân có thể được điều trị ít nhất 2 tuần, như ít nhất trong 1 tháng, 6, tháng, 1 năm hoặc hơn.

Các kháng thể theo sáng chế có thể, ví dụ, là các kháng thể đơn dòng được tạo ra bởi phương pháp khối tế bào lai được mô tả lần đầu tiên bởi Kohler và cộng sự, Nature 256, 495 (1975), hoặc có thể là các kháng thể đơn dòng được tạo ra bởi phương pháp ADN tái tổ hợp hoặc phương pháp khác, hoặc hơn tốt hơn là có thể được tạo ra bằng phương pháp mới được bộc lộ ở đây (Hình 9). Các kháng thể đơn dòng có thể còn được phân lập từ thư viện kháng thể thể thực khuẩn sử dụng kỹ thuật được mô tả trong, ví dụ, Clackson và cộng sự, Nature 352, 624-628 (1991) và Marks và cộng sự, J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991). Các kháng thể đơn dòng có thể thu được từ nguồn thích hợp bất kỳ. Do đó, ví dụ, các kháng thể đơn dòng có thể thu được từ khối tế bào lai được điều chế từ tế bào lympho B lá lách của chuột thu được từ chuột được gây miễn dịch bằng kháng nguyên có lợi, ví dụ, dưới dạng tế bào biểu hiện kháng nguyên trên bề mặt, hoặc axit nucleic mã hóa kháng nguyên có lợi. Các kháng thể đơn dòng có thể còn thu được từ khối tế bào lai dẫn xuất từ tế bào biểu hiện kháng thể của người được gây miễn dịch hoặc từ động vật có vú không phải người như chuột cống, thỏ, chó, cừu, dê, động vật linh trưởng, v.v.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế là kháng thể người hóa. Kháng thể người hóa đơn dòng nhắm đến protein tau có thể được tạo ra bằng cách sử dụng chuột chuyển gen hoặc chuyển nhiễm sắc thể mang các phần của hệ miễn dịch của người hơn là hệ của chuột. Chuột chuyển gen và chuyển nhiễm sắc thể này bao gồm chuột được đề cập ở đây là chuột HuMAb (Kháng thể đơn dòng người hóa) và chuột KM, tương ứng, và ở đây gọi chung là "chuột chuyển gen".

Chuột HuMAb chứa vị trí nhỏ gen immunoglobulin của người mà mã hóa trình

tự immunoglobulin vùng biến đổi và vùng hằng định chuỗi nặng (μ và γ) vùng biến đổi và vùng hằng định chuỗi nhẹ không được sắp xếp lại của người (κ), cùng với đột biến nhắm đích mà bất hoạt vị trí chuỗi μ và κ nội sinh (Lonberg, N. và cộng sự, *Nature* 368, 856-859 (1994)). Theo đó, chuột thể hiện giảm biểu hiện IgM hoặc K của chuột và đáp ứng chủng ngừa, gen chuyển chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người được đưa vào, trải qua việc chuyển đổi nhóm và đột biến xoma để tạo ra các kháng thể IgG, κ đơn dòng ái lực cao của người (Lonberg, N. và cộng sự (1994), trước đây; xem ở Lonberg, N., *Handbook of Experimental Pharmacology* 113, 49-101 (1994), Lonberg, N. và Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* Tập 13 65-93 (1995) và Harding, F. và Lonberg, N., *Ann. N. Y. Acad. Sci* 764 536-546 (1995)). Chế phẩm của chuột HuMAb được mô tả cụ thể trong Taylor, L. và cộng sự, *Nucleic Acids Research* 20, 6287-6295 (1992), Chen, J. và cộng sự, *International Immunology* 5, 647-656 (1993), Tuaillon và cộng sự, *J. Immunol.* 152, 2912-2920 (1994), Taylor, L. và cộng sự, *International Immunology* 6, 579-591 (1994), Fishwild, D. và cộng sự, *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996). Cũng xem Mỹ 5,545,806, Mỹ 5,569,825, Mỹ 5,625,126, Mỹ 5,633,425, Mỹ 5,789,650, Mỹ 5,877,397, Mỹ 5,661,016, Mỹ 5,814,318, Mỹ 5,874,299, Mỹ 5,770,429, Mỹ 5,545,807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 và WO 01/09187.

Chuột HCo7, HCo12, HCo17 và HCo20 có sự phá vỡ JKD trong gen chuỗi nhẹ (κ) nội sinh của chúng (như được mô tả trong Chen và cộng sự, *EMBO J.* 12, 811-820 (1993)), sự phá vỡ CMD trong gen chuỗi nặng nội sinh của chúng (như được mô tả trong Ví dụ 1 của WO 01/14424), và gen chuyển chuỗi nhẹ KCo5 κ của người (như được mô tả trong Fishwild và cộng sự, *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996)). Ngoài ra, chuột HCo7 có gen chuyển chuỗi nặng của người HCo7 (như được mô tả trong Mỹ 5,770,429), chuột HCo12 có gen chuyển chuỗi nặng của người HCo12 (như được mô tả trong Ví dụ 2 của WO 01/14424), chuột HCo17 có gen chuyển chuỗi nặng của người HCo17 (như được mô tả trong Ví dụ 2 của WO 01/09187) và chuột HCo20 có gen chuyển chuỗi nặng của người HCo20. Chuột thu được biểu hiện gen chuyển chuỗi nặng immunoglobulin và chuỗi nhẹ κ của người trong nền đồng hợp để phá vỡ vị trí chuỗi nặng và chuỗi nhẹ κ của chuột.

Trong chủng chuột KM, gen chuỗi nhẹ κ của chuột nội sinh được phá vỡ đồng hợp như được mô tả trong Chen và cộng sự, *EMBO J.* 12, 811-820 (1993) và gen chuỗi nặng nội sinh của chuột được phá vỡ đồng hợp như được mô tả trong Ví dụ 1 của

WO 01/09187. Chủng chuột này mang gen chuyển chuỗi nhẹ kappa của người, KCo5, như được mô tả trong Fishwild và cộng sự, Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996). Chủng chuột này cũng mang chuyển nhiễm sắc thể chuỗi nặng của người bao gồm đoạn nhiễm sắc thể 14 hCF (SC20) như được mô tả trong WO 02/43478. Chuột HCo12-Balb/c, HCo17-Balb/c và HCo20-Balb/c có thể được tạo ra bằng cách lai HCo12, HCo17 và HCo20 đến KCo5[J/K](Balb) như được mô tả trong WO 09/097006.

Chuột rTg4510 là mô hình bệnh do protein tau tạo ra kiểm soát thời gian và không gian đối với biểu hiện gen chuyển protein tau đột biến. Trong chủng chuột KM, gen chuỗi nhẹ kappa nội sinh của chuột được phá vỡ đồng hợp như được mô tả trong Chen và cộng sự, EMBO J. 12, 811-820 (1993) và gen chuỗi nhẹ nặng nội sinh của chuột được phá vỡ đồng hợp như được mô tả trong Ví dụ 1 của WO 01/09187. Chủng chuột này mang gen chuyển chuỗi nhẹ kappa của người, KCo5, như được mô tả trong Fishwild và cộng sự, Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996). Chủng chuột này còn mang chuyển nhiễm sắc thể chuỗi nặng của người bao gồm đoạn nhiễm sắc thể 14 liên kết epitop hCF (SC20) như được mô tả trong WO 02/43478.

Tế bào lách từ các chuột chuyển gen này có thể được sử dụng để tạo ra khối tế bào lai mà tiết ra kháng thể người hóa đơn dòng theo kỹ thuật đã biết. Các kháng thể đơn dòng hoặc đa dòng người hóa theo sáng chế, hoặc kháng thể, theo sáng chế có nguồn gốc từ các loài khác mà có thể còn được tạo ra chuyển gen thông qua tạo ra động vật có vú không phải người hoặc cây khác mà chuyển gen đối với trình tự chuỗi nặng immunoglobulin và chuỗi nhẹ có lợi và tạo ra kháng thể ở dạng tái tạo được từ đó. Liên quan đến việc sản xuất gen chuyển ở động vật, các kháng thể có thể tạo ra trong, và tái sinh từ, sữa của dê, bò, hoặc động vật có vú khác. Xem ví dụ Mỹ 5,827,690; Mỹ 5,756,687; Mỹ 5,750,172 và Mỹ 5,741,957.

Kháng thể theo sáng chế có thể là của isotyp bất kỳ. Việc chọn isotyp thường được hướng dẫn bởi chức năng hiệu lực mong muốn, như đưa vào ADCC. Các isotyp ví dụ là IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4. Hoặc là vùng hằng định chuỗi nhẹ của người, kappa hoặc lambda, có thể được sử dụng. Nếu muốn, nhóm kháng thể kháng protein tau theo sáng chế có thể được chuyển đổi bằng phương pháp đã biết. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế mà ban đầu là IgM có thể là nhóm được chuyển đổi thành kháng thể IgG theo sáng chế. Hơn nữa, kỹ thuật chuyển đổi nhóm có thể được sử dụng để chuyển đổi một nhóm phụ IgG sang nhóm khác, ví dụ từ IgG1 sang IgG2. Do đó, chức năng hiệu lực của các

kháng thể theo sáng chế có thể thay đổi bằng cách chuyển đổi isotyp thành, ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, hoặc IgM kháng thể để dùng cho chữa bệnh khác nhau. Theo một phương án kháng thể theo sáng chế là kháng thể IgG1, ví dụ IgG1, κ . Kháng thể được nói là của isotyp cụ thể nếu trình tự axit amin hầu như tương đồng với isotyp đó, so với isotyp khác.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế là kháng thể chiều dài đầy đủ, tốt hơn là kháng thể IgG, cụ thể là kháng thể IgG1, κ . Theo phương án khác, kháng thể theo sáng chế là kháng thể đoạn liên kết epitop hoặc kháng thể chuỗi đơn.

Các kháng thể và đoạn liên kết epitop của chúng có thể thu được ví dụ bằng việc phân đoạn liên kết epitop sử dụng kỹ thuật thông thường, và phân đoạn liên kết epitop được sàng lọc đối với tính hữu ích theo cách giống như được mô tả ở đây cho toàn bộ kháng thể. Ví dụ, đoạn liên kết epitop $F(ab')_2$ có thể được tạo ra bằng cách xử lý kháng thể bằng pepsin. Đoạn liên kết epitop $F(ab')_2$ tạo thành có thể được xử lý để làm giảm cầu disulfua để tạo ra đoạn liên kết epitop Fab'. Đoạn liên kết epitop Fab có thể thu được bằng cách xử lý kháng thể IgG bằng papain; đoạn liên kết epitop Fab' thể thu được bằng cách tiêu hóa pepsin của kháng thể IgG. Đoạn liên kết epitop $F(ab')$ còn có thể được tạo ra bằng cách liên kết Fab' được mô tả dưới đây thông qua liên kết thioete hoặc liên kết disulfua. Đoạn liên kết epitop Fab' là đoạn liên kết epitop của kháng thể thể thu được bằng cách cắt liên kết disulfua của vùng bản lề của $F(ab')_2$. Đoạn liên kết epitop Fab' thể thu được bằng cách xử lý đoạn liên kết epitop $F(ab')_2$ với tác nhân khử, như dithiothreitol. Đoạn liên kết epitop của kháng thể còn có thể được tạo ra bằng cách biểu hiện axit nucleic mã hóa đoạn liên kết epitop này trong tế bào tái tổ hợp (xem ví dụ Evans và cộng sự, J. Immunol. Meth. 184, 123-38 (1995)). Ví dụ, gen khảm mã hóa một phần đoạn liên kết epitop an $F(ab')_2$ có thể bao gồm trình tự ADN mã hóa vùng CH1 vùng bản lề của chuỗi H, sau đó codon chặn dịch mã để tạo ra phân tử đoạn liên kết epitop của kháng thể cắt cụ thể này.

Theo một phương án, kháng thể kháng-tau là kháng thể hóa trị một, tốt hơn là kháng thể hóa trị một như được mô tả trong WO2007059782 (được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn toàn bộ) có sự xóa bỏ vùng bản lề. Theo đó, theo một phương án, kháng thể là kháng thể hóa trị một, trong đó kháng thể kháng protein tau được tạo thành bằng phương pháp bao gồm: i) tạo ra cấu trúc axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ nêu ở kháng thể hóa trị một, cấu trúc này bao gồm trình tự nucleotit mã hóa vùng VL của kháng thể

kháng protein tau đặc hiệu kháng nguyên được chọn và trình tự nucleotit mã hóa vùng CL hằng định của Ig, trong đó trình tự nucleotit mã hóa vùng VL của kháng thể đặc hiệu kháng nguyên được chọn và trình tự nucleotit mã hóa vùng CL của Ig liên kết hoạt động với nhau, và trong đó, trong trường hợp kiểu phụ IgG1, trình tự nucleotit mã hóa vùng CL được biến đổi sao cho vùng CL không chứa bất kỳ any axit amin có khả năng tạo thành liên kết disulfua hoặc liên kết cộng hóa trị với peptit khác bao gồm trình tự axit amin tương đồng của vùng CL với sự có mặt của polyclonal human IgG hoặc khi dùng cho động vật hoặc con người; ii) tạo ra cấu trúc axit nucleic mã hóa chuỗi nặng nêu ở kháng thể hóa trị một này, cấu trúc này bao gồm trình tự nucleotit mã hóa vùng VH của kháng thể đặc hiệu kháng nguyên được chọn và trình tự nucleotit mã hóa vùng CH hằng định của Ig của người, trong đó trình tự nucleotit mã hóa vùng CH được biến đổi sao cho vùng tương ứng với vùng bản lề và, khi được yêu cầu bởi kiểu phụ Ig, các vùng khác của vùng CH, như vùng CH3, không bao gồm bất kỳ gốc axit amin mà tham gia vào việc hình thành liên kết disulphua hoặc liên kết giữa chuỗi nặng ổn định không cộng hóa trị với các peptit khác bao gồm trình tự axit amin tương đồng của vùng CH của Ig của người với sự có mặt của IgG đa dòng của người hoặc khi dùng cho động vật con người, trong đó trình tự nucleotit mã hóa vùng VH của kháng thể đặc hiệu kháng nguyên được chọn và trình tự nucleotit mã hóa vùng CH của Ig liên kết hoạt động với nhau; iii) tạo ra hệ biểu hiện tế bào để tạo ra kháng thể hóa trị một này; iv) tạo ra kháng thể hóa trị một bằng cách đồng biểu hiện cấu trúc axit nucleic của (i) và (ii) trong tế bào của hệ biểu hiện tế bào của (iii).

Tương tự, theo một phương án, kháng thể kháng-tau theo sáng chế là kháng thể hóa trị một, mà bao gồm:

(i) vùng biến đổi của kháng thể theo sáng chế như được mô tả ở đây hoặc phần liên kết epitop của vùng này, và

(ii) vùng CH của immunoglobulin hoặc vùng của nó bao gồm vùng CH2 và CH3, trong đó vùng CH hoặc vùng của nó được biến đổi sao cho sao cho vùng tương ứng với vùng bản lề và, nếu immunoglobulin không phải là kiểu phụ IgG4, vùng khác của vùng CH, như vùng CH3, không bao gồm gốc axit amin bất kỳ, mà có khả năng tạo thành liên kết disulfua với vùng CH tương đồng hoặc liên kết giữa chuỗi nặng cộng hóa trị hoặc ổn định không cộng hóa trị khác với vùng CH tương đồng với sự có mặt của IgG đa dòng của người.

Theo phương án khác, chuỗi nặng nêu ở kháng thể đơn dòng theo sáng chế được biến đổi sao cho toàn bộ vùng bản lề được xóa bỏ.

Theo phương án khác nữa, trình tự kháng thể hóa trị một được biến đổi sao cho nó không bao gồm bất kỳ vị trí nhận đối với glycosyl hóa liên kết N.

Sáng chế còn bao gồm "Kháng thể hai đặc hiệu", trong đó vùng liên kết kháng-tau (ví dụ, vùng liên kết kháng-tau của kháng thể đơn dòng kháng tau) là một phần của khung hai đặc hiệu hóa trị hai hoặc đa hóa trị nhằm nhắm đích nhiều hơn một epitop, (ví dụ epitop thứ hai có thể bao gồm epitop của phần nhận chuyển hoạt tính, sao cho Kháng thể hai đặc hiệu có thể thể hiện tăng cường chuyển bào qua hàng rào sinh học, hàng rào máu não). Do đó, theo phương án khác nữa, Fab hóa trị một của kháng thể kháng protein tau có thể được nối với Fab hoặc scfv bổ sung mà nhắm đích protein khác để tạo ra kháng thể hai đặc hiệu. Kháng thể hai đặc hiệu có thể có chức năng kép, ví dụ chức năng chữa bệnh tạo ra bởi vùng liên kết kháng tau và chức năng vận chuyển mà có thể liên kết với phân tử nhận để tăng cường vận chuyển qua hàng rào sinh học, như hàng rào máu não.

Các kháng thể và đoạn liên kết epitop của chúng theo sáng chế, còn bao gồm kháng thể chuỗi đơn. Các kháng thể chuỗi đơn là peptit trong đó vùng Fv chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được nối. Theo một phương án, sáng chế đề xuất Fv chuỗi đơn (scFv) trong đó chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trong Fv của kháng thể kháng protein tau theo sáng chế được nối với liên kết peptit linh hoạt (thường bằng khoảng 10, 12, 15 hoặc hơn gốc axit amin) trong chuỗi peptit đơn. Phương pháp tạo ra các kháng thể này được mô tả trong ví dụ Mỹ 4,946,778, Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, tập 113, Rosenberg và Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994), Bird và cộng sự, *Science* 242, 423-426 (1988), Huston và cộng sự, *PNAS USA* 85, 5879-5883 (1988) và McCafferty và cộng sự, *Nature* 348, 552-554 (1990). Kháng thể chuỗi đơn có thể là hóa trị một, nếu chỉ sử dụng VH và VL đơn, hai hóa trị, nếu sử dụng hai VH và VL, hoặc đa hóa trị, nếu sử dụng nhiều hơn hai VH và VL.

Các kháng thể và đoạn liên kết epitop của chúng được mô tả ở đây có thể được biến đổi bằng cách bao gồm có thể được biến đổi bằng cách bao gồm bất kỳ số thích hợp của axit amin cải biến và/hoặc kết hợp với chất thể liên hợp. Tính thích hợp trong bối cảnh này thường được xác định bởi khả năng cơ bản duy trì ít nhất tính chọn lọc tau

và/hoặc tính đặc hiệu tau kết hợp với kháng thể kháng protein tau bố mẹ không được dẫn xuất. Việc bao gồm một hoặc nhiều modified axit amin có thể có lợi để, ví dụ, làm tăng chu kỳ bán rã huyết thanh polypeptit, làm giảm tính kháng nguyên polypeptit, hoặc tăng tính ổn định lưu trữ polypeptit. (Các) axit amin được biến đổi, ví dụ, đồng dịch mã hoặc sau dịch mã trong quá trình tạo ra tái tổ hợp (ví dụ, glycosyl hóa liên kết N ở mô típ N-X-S/T trong quá trình biểu hiện trong tế bào động vật có vú) hoặc biến đổi bằng cách tổng hợp. Các ví dụ không giới hạn về axit amin biến đổi bao gồm axit amin glycosyl hóa, axit aminsulfat, axit amin prenyl hóa (ví dụ, farnesyl hóa, geranyl-geranyl hóa), axit amin axetyl hóa, axit amin axyl hóa, axit amin PEGyl hóa, axit amin biotin hóa, axit amin carboxyl hóa, axit amin phosphoryl hóa, và tương tự. Tham khảo thích hợp để hướng dẫn chuyên gia trong lĩnh vực về biến đổi axit amin được cung cấp trong toàn bộ tài liệu. Phương pháp ví dụ được thấy trong Walker (1998) Protein Protocols On CD-Rom, Humana Press, Totowa, NJ. Axit amin biến đổi có thể, ví dụ, được chọn từ axit amin glycosyl hóa, axit amin PEGyl hóa, axit amin farnesyl hóa, axit amin axetyl hóa, axit amin biotin hóa, axit amin liên hợp với gốc lipid, hoặc axit amin liên hợp với tác nhân dẫn xuất hữu cơ.

Các kháng thể và đoạn liên kết epitop của chúng theo sáng chế, có thể còn được biến đổi hóa học bằng cách liên hợp cộng hóa trị với polyme để ví dụ làm tăng chu kỳ bán rã tuần hoàn của chúng. Các polyme ví dụ, và phương pháp gắn chúng vào peptit, được minh họa trong ví dụ Mỹ 4,766,106; Mỹ 4,179,337; Mỹ 4,495,285 và Mỹ 4,609,546. Các polyme minh họa bổ sung bao gồm polyol polyoxyetyl hóa và polyetylen glycol (PEG) (ví dụ, PEG với khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ khoảng 1,000 đến khoảng 40,000, như từ khoảng 2,000 đến khoảng 20,000, ví dụ, khoảng 3,000-12,000 g/mol).

Các kháng thể và đoạn liên kết epitop của chúng theo sáng chế có thể còn được dùng trong phương pháp chẩn đoán hoặc phối tử tạo ảnh chẩn đoán.

Theo một phương án, các kháng thể và đoạn liên kết epitop của chúng theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều axit amin dán nhãn phóng xạ được đề xuất. Kháng thể kháng protein tau dán nhãn phóng xạ có thể được sử dụng nhằm cả mục đích chẩn đoán và chữa bệnh (liên hợp với các phân tử dán nhãn phóng xạ là dấu hiệu có thể khác). Các ví dụ không giới hạn về các nhãn này bao gồm, nhưng không giới hạn ở bismuth (^{213}Bi), cacbon (^{11}C , ^{13}C , ^{14}C), crom (^{51}Cr), coban (^{57}Co , ^{60}Co), đồng (^{64}Cu), dysprosium (^{165}Dy),

erbi (^{169}Er), flo (^{18}F), gadolini (^{153}Gd , ^{159}Gd), gali (^{68}Ga , ^{67}Ga), germani (^{68}Ge), vàng (^{198}Au), holmi (^{166}Ho), hydro (^3H), indi (^{111}In , ^{112}In , ^{113}In , ^{115}In), I ốt (^{121}I , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I), iridi (^{192}Ir), sắt (^{59}Fe), krypton ($^{81\text{m}}\text{Kr}$), lanthan (^{140}La), luteli (^{177}Lu), mangan (^{54}Mn), molybden (^{99}Mo), nito (^{13}N , ^{15}N), oxy (^{15}O), paladi (^{103}Pd), phospho (^{32}P), kali (^{42}K), praseodym (^{142}Pr), promethi (^{149}Pm), rheni (^{186}Re , ^{188}Re), rhodi (^{105}Rh), rubidi (^{81}Rb , ^{82}Rb), rutheni (^{82}Ru , ^{97}Ru), samari (^{153}Sm), scandi (^{47}Sc), seleni (^{75}Se), natri (^{24}Na), stronti (^{85}Sr , ^{89}Sr , ^{92}Sr), lưu huỳnh (^{35}S), techneti (^{99}Tc), thali (^{201}Tl), tin (^{113}Sn , ^{117}Sn), xenon (^{133}Xe), ytterbi (^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{177}Yb), ytri (^{90}Y), kẽm (^{65}Zn) và zircon (^{89}Zr). Zircon (^{89}Zr) là đặc biệt có lợi. Phương pháp để điều chế axit amin dán nhãn phóng xạ và dẫn xuất peptit liên quan là đã biết trong lĩnh vực (xem ví dụ Junghans và cộng sự, in *Cancer Chemotherapy và Biotherapy* 655-686 (2nd edition, Chafner và Longo, eds., Lippincott Raven (1996)) và US 4,681,581; US 4,735,210; US 5,101,827; US 5,102,990 (US RE35,500), US 5,648,471 và US 5,697,902. Ví dụ, đồng vị phóng xạ có thể được liên hợp bằng phương pháp T cloamin (Lindgren, S. và cộng sự. (1998) "Chloramine-T In High-Specific-Activity Radioiodination Of Antibodies Using N-Succinimidyl-3-(Trimethylstannyl)Benzoate As An Intermediate", *Nucl. Med. Biol.* 25(7):659-665; Kurth, M. et al. (1993) "Site-Specific Conjugation Of A Radioiodinated Phenethylamine Derivative To A Monoclonal Antibody Results In Increased Radioactivity Localization In Tumor", *J. Med. Chem.* 36(9):1255-1261; Rea, D.W. et al. (1990) "Site-specifically radioiodinated antibody for targeting tumors", *Cancer Res.* 50(3 Suppl):857s-861s).

Sáng chế còn đề xuất các kháng thể kháng-tau và đoạn liên kết epitop của chúng mà được dán nhãn phát hiện được sử dụng nhãn huỳnh quang (như chelat đất hiếm (ví dụ, chelat europi)), nhãn loại fluorescein (ví dụ, fluorescein, fluorescein isothioxyanat, 5-carboxyfluorescein, 6-carboxy fluorescein, diclotriazinylamin fluorescein), nhãn loại rhodamin (ví dụ, ALEXA FLUOR® 568 (Invitrogen), TAMRA® hoặc dansyl clorua), VIVOTAG 680 XL FLUOROCHROME™ (Perkin Elmer), phycoerythrin; umbelliferon, Lissamin; xanin; phycoerythrin, Texas Red, BODIPY FL-SE® (Invitrogen) hoặc chất tương tự của chúng, tất cả trong số chúng thích hợp để phát hiện quang học. Nhãn phát quang hóa học có thể được dùng (ví dụ, luminol, luxiferaza, luxiferin, và aequorin). Chẩn đoán và phát hiện này có thể còn được thực hiện bằng cách ghép đôi phân tử chẩn đoán theo sáng chế với chất phát hiện được bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các enzym khác nhau, enzym bao gồm, nhưng không giới hạn ở,

horseradish peroxidaza, phosphataza kiềm, beta-galactosidaza, hoặc axetylcholinsteraza, hoặc với phức nhóm prosthetic như, nhưng không giới hạn ở, streptavidin/biotin và avidin/biotin.

Nhãn phát quang hóa học có thể được sử dụng (ví dụ, luminol, luxiferaza, luxiferin, và aequorin). Chẩn đoán và phát hiện này có thể còn được thực hiện bằng cách ghép đôi phân tử chẩn đoán theo sáng chế với chất phát hiện được bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các enzym khác nhau, enzym bao gồm, nhưng không giới hạn ở, horseradish peroxidaza, phosphataza kiềm, beta-galactosidaza, hoặc axetylcholinsteraza, hoặc với phức nhóm prosthetic như, nhưng không giới hạn ở, streptavidin/biotin và avidin/biotin. Nhãn thuận từ cũng có thể được sử dụng, và tốt hơn là được phát hiện sử dụng Chụp positron cắt lớp (PET) hoặc chụp cắt lớp bằng bức xạ đơn photon (SPECT). Nhãn thuận từ này bao gồm, nhưng không giới hạn ở hợp chất chứa ion thuận từ của Nhôm (Al), Bari (Ba), Canxi (Ca), Xeri (Ce), Dysprosi (Dy), Erbi (Er), Europi (Eu), Gandolini (Gd), Holmi (Ho), Iridi (Ir), Lithi (Li), Magiê (Mg), Mangan (Mn), Molybden (M), Neodymi (Nd), Osmi (Os), Oxy (O), Paladi (Pd), Platin (Pt), Rhodi (Rh), Rutheni (Ru), Samari (Sm), Natri (Na), Stronti (Sr), Terbiu (Tb), Thuli (Tm), Tin (Sn), Titan (Ti), Gang (W), và Zircon (Zr), và đặc biệt là, Co^{+2} , Cr^{+2} , Cr^{+3} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} , Ga^{+3} , Mn^{+3} , Ni^{+2} , Ti^{+3} , V^{+3} , và V^{+4} , kim loại truyền positron sử dụng Chụp positron cắt lớp khác nhau, và ion kim loại thuận từ không phóng xạ.

Do đó theo một phương án kháng thể kháng-tau hoặc đoạn liên kết tau của chúng theo sáng chế có thể được dán nhãn với nhãn huỳnh quang, nhãn phát quang hóa học, nhãn thuận từ, nhãn đồng vị phóng xạ hoặc nhãn enzym. Kháng thể dán nhãn của đoạn có thể được sử dụng để phát hiện hoặc đo sự có mặt hoặc lượng của protein tau trong não của đối tượng. Phương pháp này có thể bao gồm việc phát hiện hoặc việc đo sự tạo ảnh trong cơ thể của kháng thể kháng protein tau hoặc đoạn liên kết tau liên kết với protein tau này và có thể bao gồm sự tạo ảnh ngoài cơ thể của kháng thể kháng protein tau hoặc đoạn liên kết tau liên kết với tau.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến vector biểu hiện mã hóa một hoặc nhiều chuỗi polypeptit của kháng thể theo sáng chế hoặc đoạn liên kết tau của chúng. Vector biểu hiện này có thể được dùng để sản xuất tái tổ hợp các kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo sáng chế.

Vector biểu hiện trong bối cảnh của sáng chế có thể là vector ADN hoặc ARN thích hợp bất kỳ, bao gồm vector axit nucleic nhiễm sắc thể, không nhiễm sắc thể, và tổng hợp (trình tự axit nucleic bao gồm bộ thích hợp của các yếu tố kiểm soát biểu hiện). Các ví dụ về vector này bao gồm dẫn xuất của SV40, plasmit vi khuẩn, ADN thể thực khuẩn, baculovirus, plasmit nấm men, vector dẫn xuất từ tổ hợp plasmit và ADN thể thực khuẩn, và vector axit nucleic virus (ARN hoặc ADN). Theo một phương án, kháng thể kháng protein tau-mã hóa axit nucleic chứa trong vector ADN hoặc ARN trần, bao gồm, ví dụ, yếu tố biểu hiện tuyến tính (như được mô tả trong, ví dụ, Sykes và Johnston, *Nat Biotech* 12, 355-59 (1997)), vector axit nucleic nén (như được mô tả trong ví dụ US 6,077,835 và/hoặc WO 00/70087), vector plasmit như pBR322, pUC 19/18, hoặc pUC 118/119, vector axit nucleic kích thước nhỏ "muối" (như được mô tả trong, ví dụ, Schakowski và cộng sự, *Mol Ther* 3, 793-800 (2001)), hoặc làm cấu trúc vector axit nucleic kết tủa, như cấu trúc kết tủa CaPO_4 (như được mô tả trong, ví dụ, WO 00/46147, Benvenisty và Reshef, *PNAS USA* 83, 9551-55 (1986), Wigler và cộng sự, *Cell* 14, 725 (1978), và Coraro và Pearson, *Somatic Cell Genetics* 2, 603 (1981)). Các vector axit nucleic và việc sử dụng chúng là đã biết trong lĩnh vực (xem ví dụ US 5,589,466 và US 5,973,972).

Theo một phương án, vector thích hợp để biểu hiện các kháng thể kháng-tau hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo sáng chế trong tế bào vi khuẩn. Các ví dụ về vector này bao gồm vector biểu hiện như BlueScript (Stratagene), vector pIN (Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 264, 5503-5509 (1989), pET vectors (Novagen, Madison, WI), và tương tự.

Các vector biểu hiện có thể còn hoặc tùy ý là vector thích hợp để biểu hiện trong hệ nấm men. Bất kỳ vector thích hợp để biểu hiện trong hệ nấm men có thể được sử dụng. Các vector thích hợp bao gồm, ví dụ, vector bao gồm gen khởi động cấu thành hoặc quy nạp như yếu tố alpha, oxidaza rượu và PGH (xem trong: F. Ausubel và cộng sự, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing và Wiley InterScience New York (1987), Grant và cộng sự, *Methods in Enzymol* 153, 516-544 (1987), Mattanovich, D. và cộng sự. *Methods Mol. Biol.* 824, 329-358 (2012), Celik, E. và cộng sự. *Biotechnol. Adv.* 30(5), 1108-1118 (2012), Li, P. và cộng sự. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 142(2), 105-124 (2007), Böer, E. và cộng sự. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77(3), 513-523 (2007), van der Vaart, J.M. *Methods Mol. Biol.* 178, 359-366 (2002), và

Holliger, P. *Methods Mol. Biol.* 178, 349-357 (2002)).

Trong vectơ biểu hiện theo sáng chế, kháng thể kháng protein tau-mã hóa axit nucleic có thể bao gồm hoặc kết hợp với gen khởi động, gen tăng cường, và yếu tố giúp biểu hiện khác. Các ví dụ về các yếu tố này bao gồm gen khởi động biểu hiện mạnh (ví dụ, gen khởi động/gen tăng cường CMV IE của người cũng như gen khởi động RSV, SV40, SL3-3, MMTV, và HIV LTR), trình tự kết thúc poly (A) hiệu lực, gốc sao chép cho sản phẩm plasmid trong *E. coli*, gen chịu kháng sinh làm chất đánh dấu chọn lọc, và/hoặc vị trí tách dòng thích hợp (ví dụ, a đa liên kết). Axit nucleic còn có thể bao gồm gen khởi động quy nạp đối diện với gen khởi động cấu thành như CMV IE (chuyên gia trong lĩnh vực hiểu rằng thuật ngữ ngày là mô tả thực tế của mức độ biểu hiện gen dưới điều kiện nhất định).

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến tế bào chủ nhân thực hoặc nhân sơ tái tổ hợp, như transfectoma, mà tạo ra kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo sáng chế như được xác định ở đây hoặc phân tử hai đặc hiệu theo sáng chế như được xác định ở đây. Các ví dụ về tế bào chủ bao gồm tế bào nấm men, vi khuẩn, và tế bào động vật có vú, như tế bào CHO hoặc HEK. Ví dụ, theo một phương án, sáng chế đề xuất tế bào bao gồm axit nucleic tích hợp ổn định vào bộ gen tế bào mà bao gồm trình tự mã hóa để biểu hiện kháng thể kháng -tau kháng thể theo sáng chế hoặc đoạn liên kết epitop của chúng. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất tế bào bao gồm axit nucleic không tích hợp, như plasmid, cosmid, phagemid, hoặc yếu tố biểu hiện tuyến tính, mà bao gồm trình tự mã hóa biểu hiện của kháng thể kháng-tau hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo sáng chế.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra kháng thể kháng protein tau theo sáng chế, phương pháp này bao gồm các bước gồm a) nuôi cấy khối tế bào lai hoặc tế bào chủ theo sáng chế như được mô tả trên đây, và b) tinh chế kháng thể theo sáng chế từ môi trường nuôi cấy.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến chế phẩm mà, như thuật ngữ được sử dụng ở đây, bao gồm kháng thể kháng protein tau như được xác định ở đây, và cơ bản không có kháng thể phát sinh tự nhiên mà hoặc là không có khả năng liên kết với protein tau hoặc không thay đổi về vật chất chức năng kháng protein tau của chế phẩm. Do đó, chế phẩm này không bao gồm huyết thanh phát sinh tự nhiên, hoặc dẫn xuất tinh chế

của huyết thanh này, mà bao gồm hỗn hợp của kháng thể kháng protein tau và kháng thể khác mà không thay đổi chức năng của kháng thể kháng protein tau của chế phẩm, trong đó chức năng này là:

- (i) cơ bản không có khả năng liên kết với protein tau không phosphoryl hóa;
- (ii) cơ bản không có khả năng liên kết với protein tau mà được phosphoryl hóa ở S404 và không được phosphoryl hóa ở S396;
- (iii) khả năng liên kết với protein tau phosphoryl hóa ở S396;
- (iv) khả năng liên kết với protein tau phosphoryl hóa ở cả S396 và ở S404;
- (v) khả năng phân biệt chọn lọc giữa gốc protein tau được phosphoryl hóa S396 và S404 sao cho nó cơ bản không có khả năng liên kết gốc được phosphoryl hóa 404;
- (vi) khả năng liên kết protein tau hyperphosphoryl hóa từ não bệnh Alzheimer của người;
- (vii) khả năng phân biệt giữa protein tau bệnh lý và không bệnh lý của người; và/hoặc
- (viii) khả năng, khi được sử dụng như được mô tả ở đây với chiết xuất rTg4510 nghèo miễn dịch từ chuột chuyển gen, để làm giảm đặc hiệu dải protein tau hyperphosphoryl hóa 64kDa và 70kDa ít nhất 90%, trong khi đó không làm giảm dải protein tau 55 kDa hơn 10% hoặc khả năng, khi được sử dụng như được mô tả ở đây với chiết xuất từ não AD người xét nghiệm tử thi, để làm giảm đặc hiệu dải tau hyperphosphoryl hóa S396 phosphoryl hóa ít nhất 90%, trong khi đó không làm giảm dải protein tau không hyperphosphoryl hóa hơn 10%.

Sáng chế cụ thể là đề cập đến chế phẩm của kháng thể kháng protein tau này có sự thay đổi cấu trúc ở trình tự axit amin (ở bất kỳ trong số CDR của nó, vùng biến đổi, gốc khung và/hoặc vùng hằng định) so với cấu trúc của kháng thể kháng protein tau có trong tự nhiên, trong đó sự thay đổi cấu trúc này tạo ra kháng thể kháng protein tau thể hiện chức năng thay đổi đáng kể (cụ thể là, hơn 20% khác biệt, hơn 40% khác biệt, hơn 60% khác biệt, hơn 80% khác biệt, hơn 100% khác biệt, hơn 150% khác biệt, hơn 2 lần khác biệt, hơn 4 lần khác biệt, hơn 5 lần khác biệt, hoặc hơn 10 lần khác biệt về chức năng) so với chức năng được thể hiện bởi kháng thể kháng protein tau có trong tự nhiên

này; trong đó chức năng này là:

- (i) cơ bản không có khả năng liên kết với protein tau không phosphoryl hóa;
- (ii) cơ bản không có khả năng liên kết với protein tau mà được phosphoryl hóa ở S404 và không được phosphoryl hóa ở S396;
- (iii) khả năng liên kết với protein tau phosphoryl hóa ở S396;
- (iv) khả năng liên kết với protein tau phosphoryl hóa ở cả S396 và ở S404;
- (v) khả năng phân biệt chọn lọc giữa gốc protein tau được phosphoryl hóa S396 và S404 sao cho nó cơ bản không có khả năng liên kết gốc được phosphoryl hóa 404;
- (vi) khả năng liên kết protein tau hyperphosphoryl hóa từ não bệnh Alzheimer của người;
- (vii) khả năng phân biệt giữa protein tau bệnh lý và không bệnh lý của người; và/hoặc
- (viii) khả năng, khi được sử dụng như được mô tả ở đây với chiết xuất rTg4510 nghèo miễn dịch từ chuột chuyển gen, để làm giảm đặc hiệu dải protein tau hyperphosphoryl hóa 64kDa và 70kDa ít nhất 90%, trong khi đó không làm giảm dải protein tau 55 kDa hơn 10%; hoặc khả năng, khi được sử dụng như được mô tả ở đây với chiết xuất từ não AD người xét nghiệm tử thi để làm giảm đặc hiệu dải tau hyperphosphoryl hóa S396 phosphoryl hóa ít nhất 90%, trong khi đó không làm giảm dải protein tau không hyperphosphoryl hóa hơn 10%.

Thuật ngữ "cơ bản không có" kháng thể phát sinh tự nhiên đề cập đến sự vắng mặt hoàn toàn của kháng thể phát sinh tự nhiên này trong chế phẩm, hoặc bao gồm nồng độ của kháng thể phát sinh tự nhiên này trong chế phẩm mà không ảnh hưởng vật chất đến đặc điểm liên kết của chế phẩm. Kháng thể được nói là "được phân lập" nếu nó không có bản sao phát sinh tự nhiên hoặc được phân ntacsh hoặc tinh chế từ nhiều thành phần mà đi kèm nó một cách tự nhiên.

Thuật ngữ "kháng thể phát sinh tự nhiên", như đề cập đến chế phẩm này, đề cập đến các kháng thể (bao gồm kháng thể phát sinh tự nhiên có trong người sống hoặc động vật khác, là trình tự tự nhiên với chức năng của hệ miễn dịch của chúng.

Do đó, chế phẩm theo sáng chế không loại trừ, và thay vào đó rõ ràng bao gồm, chế phẩm này chứa kháng thể kháng protein tau và kháng thể bổ sung được thêm có chủ ý có khả năng liên kết với epitop mà không có trong tau. Chế phẩm này cụ thể là bao gồm phương án của chúng trong đó chế phẩm thể hiện hiệu quả tăng trong việc điều trị bệnh Alzheimer (AD), Bệnh hạt ưa bạc (AGD), Liệt trên nhân tiến triển (PSP), và Thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD). Ngoài ra, sáng chế nhắm đến chế phẩm mà chứa kháng thể kháng kháng thể tau, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, nhằm để dùng trong điều trị Chứng rối loạn tâm thần, cụ thể là Chứng rối loạn tâm thần do AD hoặc Chứng rối loạn tâm thần ở bệnh nhân mắc AD, và hội chứng tâm thần của bệnh nhân mắc chứng mất trí thể Levwy. Ngoài ra, chế phẩm theo sáng chế chứa kháng thể kháng kháng thể tau, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, mà có thể dùng trong điều trị đột quy, phục hồi sau đột quy, thoái hóa thần kinh liên quan đến bệnh Parkinson.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến dược phẩm bao gồm:

- (i) kháng thể protein tau, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, đều được xác định ở đây, hoặc chế phẩm, như thuật ngữ được xác định ở đây, mà bao gồm kháng thể kháng protein tau này hoặc đoạn liên kết epitop của chúng; và
- (ii) chất mang dược dụng.

Dược phẩm có thể được điều chế với chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng cũng như bất kỳ tá dược và phụ gia đã biết khác theo kỹ thuật thông thường như được mô tả trong Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 2013.

Chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng cũng như bất kỳ tá dược và phụ gia đã biết khác có thể thích hợp với hợp chất được chọn theo sáng chế và cách dùng được chọn. Tính thích hợp đối với chất mang và các thành phần khác của dược phẩm được xác định dựa trên việc không có tác dụng phụ đối với đặc điểm sinh học của hợp chất được chọn hoặc dược phẩm theo sáng chế (ví dụ, tác dụng cơ bản ít (10% hoặc ít hơn ức chế tương đối, 5% hoặc ít hơn ức chế tương đối, v.v.)) đối với liên kết epitop.

Dược phẩm theo sáng chế có thể còn bao gồm chất pha loãng, chất đệm, muối, chất đệm, chất phân rã (ví dụ, chất phân rã không ionic, như Tween-20 hoặc Tween-80), chất ổn định (ví dụ, đường hoặc axit amin không protein), chất bảo quản, chất hâm mô, chất hòa tan, và/hoặc vật liệu khác thích hợp để chứa trong dược phẩm. Chất pha

loãng được chọn để không ảnh hưởng hoạt tính sinh học của kết hợp. Các ví dụ về chất pha loãng này là nước chung cất, nước muối đậm phosphat sinh lý, dung dịch Ringer, dung dịch dextroza, và dung dịch Hank. Ngoài ra, dược phẩm hoặc chế phẩm còn có thể bao gồm chất mang khác, hoặc chất ổn định không độc tố, không chứa bneehj, không kháng nguyên và tương tự. Chế phẩm có thể còn bao gồm đại phân tử lớn, chuyển hóa chậm, như protein, polysaccarit giống chitosan, polylactic axit, polyglycolic axit và copolyme (ví dụ, sepharoza chức năng latex, agarosa, xenluloza, và tương tự), axit amin polyme, axit amin copolyme, và kết tụ lipid (ví dụ, giọt nhỏ dầu hoặc liposom).

Mức liều dùng thực tế của thành phần hoạt tính trong dược phẩm theo sáng chế có thể thay đổi sao cho thu được lượng thành phần hoạt tính mà hiệu quả để đạt được đáp ứng chữa bệnh đối với bệnh nhân cụ thể, chế phẩm, và cách dùng. Mức liều dùng được chọn sẽ phụ thuộc vào tính biến đổi của các yếu tố tác động vật lý hóa học bao gồm hoạt tính của chế phẩm cụ thể theo sáng chế được dùng, hoặc amit của chúng, đường dùng, thời gian dùng, tốc độ bài tiết của hợp chất cụ thể được dùng, thời gian điều trị, các thuốc khác, hợp chất và/hoặc vật liệu dùng trong kết hợp với chế phẩm cụ thể được dùng, độ tuổi, giới tính, cân nặng, tình trạng, sức khỏe chung và tiền sử y tế trước đó của bệnh nhân được điều trị, và các yếu tố tương tự đã biết trong lĩnh vực y học.

Dược phẩm có thể được dùng bằng đường dùng và cách dùng thích hợp bất kỳ, bao gồm: dùng ngoài ruột, tiếp xúc, qua đường miệng hoặc trong mũi đối với điều trị phòng bệnh và/hoặc chữa bệnh. Theo một phương án, dược phẩm theo sáng chế được dùng ngoài ruột. Câu "dùng ngoài ruột" và "được dùng ngoài ruột" như được sử dụng ở đây nghĩa là cách dùng khác với cách dùng trong ruột và tiếp xúc, thường bằng cách tiêm, và bao gồm tiêm và truyền biểu bì, trong tĩnh mạch, trong cơ, trong động mạch, nội tủy mạch, trong thượng thận, trong hốc mắt, trong tim, trong da, trong bụng, trong gân, qua khí quản, dưới da, dưới biểu bì, trong khớp, dưới khớp, dưới màng nhện, trong cột sống, nội sọ, trong ngực, ngoài màng cứng và qua xương ứng.

Đường dùng thích hợp khác đối với hợp chất theo sáng chế trong cơ thể và trong ống nghiệm là đã biết trong lĩnh vực và có thể được chọn bởi chuyên gia trong lĩnh vực.

Theo một phương án dược phẩm được dùng bằng cách tiêm hoặc truyền trong tĩnh mạch hoặc dưới da.

Chất mang dược dụng bao gồm bất kỳ và tất cả các dung môi, môi trường phân tán, chất bao, tác nhân kháng khuẩn và kháng nấm, tác nhân đẳng trương, chất chống oxy hóa và tác nhân trì hoãn hấp thụ thích hợp, và tương tự mà thích hợp về sinh lý với hợp chất theo sáng chế.

Ví dụ của chất mang nước và không nước thích hợp có thể được dùng trong dược phẩm theo sáng chế bao gồm nước, nước muối, nước muối đậm phosphat, etanol, dextroza, polyol (như glyxerol, propylen glycol, polyetylen glycol, và tương tự), và hỗn hợp thích hợp của chúng, dầu thực vật, như dầu ô liu, dầu ngô, dầu lạc, dầu hạt bông, và dầu vừng, dung dịch keo carboxymetyl xenluloza, gồm tragacan và este hữu cơ tiêm được, như etyl oleat, và/hoặc nhiều đậm khác. Các chất mang khác là đã biết trong lĩnh vực dược.

Chất mang dược dụng bao gồm dung dịch nước vô trùng hoặc chất phân tán và bột vô trùng cho chế phẩm tùy ứng của dung dịch tiêm vô trùng hoặc chất phân tán. Sử dụng môi trường và tác nhân này đối với các chất hoạt tính dược là đã biết trong lĩnh vực. Trừ trong phạm vi mà bất kỳ môi trường hoặc tác nhân thông thường không thích hợp với hợp chất hoạt tính, việc sử dụng chúng trong dược phẩm theo sáng chế cũng bao gồm.

Tính lỏng chính xác có thể được duy trì, ví dụ, bằng cách sử dụng vật liệu bao, như lexithin, bằng cách duy trì kích thước hạt cần thiết trong trường hợp phân tán, và bằng cách sử dụng chất hoạt động bề mặt.

Dược phẩm theo sáng chế có thể còn bao gồm chất chống oxy hóa dược dụng ví dụ (1) chất chống oxy hóa tan được trong nước, như axit ascorbic, xystein hydroclorua, natri bisulfat, natri metabisulfite, natri sulfite và tương tự; (2) chất chống oxy hóa tan được trong dầu, như ascorbyl palmitat, hydroxyanisol butyl hóa (BHA), hydroxytoluen butyl hóa (BHT), lexithin, propyl galat, alpha- tocopherol, và tương tự; và (3) tác nhân tạo chelat kim loại, như axit xitric, etylendiamin tetraaxetic axit (EDTA), sorbitol, axit tartaric, axit phosphoric, và tương tự.

Dược phẩm theo sáng chế có thể còn bao gồm tác nhân đẳng trương, như đường, polyalcohol, như manitol, sorbitol, glyxerol hoặc natri clorua trong chế phẩm.

Dược phẩm theo sáng chế có thể còn chứa một hoặc nhiều tá dược phụ thích hợp cho đường dùng như chất bảo quản, tác nhân thẩm ướt, tác nhân nhũ hóa, tác nhân phân

tán, chất bảo quản hoặc chất đệm, mà có thể làm tăng tuổi thọ hoặc tính hiệu quả của dược phẩm. Hợp chất theo sáng chế có thể được điều chế với chất mang mà sẽ bảo vệ chế phẩm chống lại giải phóng nhanh, như chế phẩm giải phóng kiểm soát, bao gồm vật cấy, miếng áp da, và hệ phân phối vi nang. Các chất mang này có thể bao gồm gelatin, glyxeryl monostearat, glyxeryl distearat, polyme thoái biến sinh học, thích hợp sinh học như etylen vinyl axetat, polyanhydrit, axit polyglycolic, collagen, polyorthoeste, và riêng axit polylactic hoặc với sáp, hoặc các vật liệu khác đã biết trong lĩnh vực. Phương pháp điều chế các chế phẩm này thường là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực. Xem, ví dụ, Sustained và Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Theo một phương án, hợp chất theo sáng chế có thể được điều chế để đảm bảo sự phân phối đúng trong cơ thể. Chất mang được dùng để dùng ngoài ruột bao gồm dung dịch nước vô trùng hoặc chất phân tán và bột vô trùng cho chế phẩm tùy ý của dung dịch tiêm vô trùng hoặc chất phân tán. Sử dụng môi trường và tác nhân này đối với chất hoạt tính được là đã biết trong lĩnh vực. Trừ trong phạm vi mà bất kỳ môi trường hoặc tác nhân thông thường không thích hợp với hợp chất hoạt tính, việc sử dụng chúng trong dược phẩm theo sáng chế cũng bao gồm. Các hợp chất hoạt tính bổ sung có thể cũng được kết hợp vào chế phẩm.

Dược phẩm để tiêm thường phải là vô trùng và ổn định dưới các điều kiện sản xuất và lưu trữ. Chế phẩm mà có thể được phối chế thành dung dịch, vi nhũ tương, liposom, hoặc cấu trúc được yêu cầu khác thích hợp với nồng độ thuốc cao. Chất mang có thể là dung môi nước hoặc không nước hoặc môi trường phân tán chứa ví dụ nước, etanol, polyol (như glyxerol, propylen glycol, polyetylen glycol, và tương tự), và hỗn hợp thích hợp của chúng, dầu thực vật, như dầu ô liu, và este hữu cơ tiêm được, như etyl oleat. Tính lỏng chính xác có thể được duy trì, ví dụ, bằng cách sử dụng chất bao, như lexithin, bằng cách duy trì kích thước hạt cần thiết trong trường hợp phân tán, và bằng cách sử dụng chất hoạt động bề mặt. Trong nhiều trường hợp, ưu tiên là bao gồm tác nhân đẳng trương, ví dụ, đường, polyalcohol như glyxerol, manitol, sorbitol, hoặc natri clorua trong chế phẩm. Việc hấp thụ kéo dài của chế phẩm tan được có thể mang khoảng bằng cách bao gồm trong chế phẩm tác nhân làm chậm hấp thụ kháng thể ví dụ, muối monostearat và gelatin. Dung dịch tiêm vô trùng có thể được điều chế bằng cách kết hợp hợp chất hoạt tính với lượng cần trong dung môi thích hợp với một hoặc kết hợp của các

thành phần ví dụ như liệt kê ở trên, khi yêu cầu, sau đó bằng cách vi lọc vô trùng. Thông thường, chất phân tán được điều chế bằng cách kết hợp hợp chất hoạt tính vào chất dẫn thuốc vô trùng mà chứa môi trường phân tán bazơ và thành phần cần thiết khác ví dụ từ các loại được liệt kê ở trên. Trong trường hợp bột vô trùng cho chế phẩm của dung dịch tiêm được vô trùng, ví dụ phương pháp điều chế là làm khô trong chân không và đông khô (làm khô lạnh) mà thu được bột của thành phần hoạt tính cộng với thành phần mong muốn bổ sung từ dung dịch lọc vô trùng trước của chúng.

Dung dịch tiêm được vô trùng có thể được điều chế bằng cách kết hợp hợp chất hoạt tính với lượng cần trọng dung môi thích hợp với một hoặc kết hợp các thành phần được liệt kê ở trên, khi cần, sau đó vi lọc vô trùng. Thông thường, chất phân tán được điều chế bằng cách kết hợp hợp chất hoạt tính vào chất dẫn thuốc vô trùng mà chứa môi trường phân tán bazơ và thành phần cần thiết khác ví dụ từ các loại được liệt kê ở trên. Trong trường hợp bột vô trùng cho chế phẩm của dung dịch tiêm được vô trùng, ví dụ phương pháp điều chế là làm khô trong chân không và đông khô (làm khô lạnh) mà thu được bột của thành phần hoạt tính cộng với thành phần mong muốn bổ sung từ dung dịch lọc vô trùng trước của chúng.

Chế độ dùng liều trong phương pháp điều trị trên và sử dụng được mô tả ở đây được điều chỉnh để tạo ra đáp ứng mong muốn tối ưu (ví dụ, đáp ứng chữa bệnh). Ví dụ, viên thuốc đơn có thể được dùng, một vài liều dùng chia nhỏ có thể được cho dùng theo thời gian hoặc liều có thể được giảm hoặc tăng theo tỷ lệ như được chỉ ra theo yêu cầu của tình huống chữa bệnh. Chế phẩm dùng ngoài ruột có thể được điều chế dưới dạng đơn vị liều dùng để dễ dàng sử dụng và đồng nhất liều dùng. Dạng đơn vị liều dùng như được sử dụng ở đây đề cập đến đơn vị riêng biệt về vật lý như liều dùng đơn nhất cho đối tượng được xử lý; mỗi đơn vị chứa lượng định trước của hợp chất hoạt tính được tính để tạo ra hiệu quả chữa bệnh mong muốn liên quan đến chất mang được cần thiết. Mô tả đối với dạng đơn vị liều dùng theo sáng chế được chỉ định bằng và phụ thuộc trực tiếp vào (a) đặc điểm duy nhất của hợp chất hoạt tính và hiệu quả chữa bệnh cụ thể cần đạt được, và (b) giới hạn vốn có trong lĩnh vực tạo ra hợp chất hoạt tính này để điều trị độ nhạy ở cá thể.

Liều dùng hiệu quả và chế độ liều dùng đối với các kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo sáng chế, phụ thuộc bệnh hoặc tình trạng được điều trị và có thể được xác định bởi chuyên gia trong lĩnh vực. Vào ngày bất kỳ được cho liều dùng được

đưa ra, liều dùng có thể nằm trong khoảng từ khoảng 0,0001 đến khoảng 100 mg/kg, và thường xuyên hơn là từ khoảng 0,01 đến khoảng 5 mg/kg, của khối lượng cơ thể chủ. Ví dụ, liều dùng có thể là 1 mg/kg khối lượng cơ thể hoặc 10 mg/kg khối lượng cơ thể hoặc trong khoảng 1-10 mg/kg khối lượng cơ thể. Do đó liều dùng ví dụ bao gồm: từ khoảng 0,1 đến khoảng 10 mg/kg/khối lượng cơ thể, từ khoảng 0,1 đến khoảng 5 mg/kg/khối lượng cơ thể, từ khoảng 0,1 đến khoảng 2 mg/kg/khối lượng cơ thể, từ khoảng 0,1 đến khoảng 1 mg/kg/khối lượng cơ thể, ví dụ khoảng 0,15 mg/kg/khối lượng cơ thể, khoảng 0,2 mg/kg/khối lượng cơ thể, khoảng 0,5 mg/kg/khối lượng cơ thể, khoảng 1 mg/kg/khối lượng cơ thể, khoảng 1,5 mg/kg/khối lượng cơ thể, khoảng 2 mg/kg/khối lượng cơ thể, khoảng 5 mg/kg/khối lượng cơ thể, hoặc khoảng 10 mg/kg/khối lượng cơ thể.

Bác sỹ có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể xác định dễ dàng và quy định lượng hiệu quả của dược phẩm cần thiết. Ví dụ, bác sỹ có thể bắt đầu từ liều kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo sáng chế được dùng trong dược phẩm ở các mức thấp hơn mức yêu cầu nhằm đạt được hiệu quả chữa bệnh mong muốn và tăng dần liều dùng đến khi đạt được hiệu quả mong muốn. Nói chung, liều hàng ngày thích hợp của chế phẩm theo sáng chế có thể là lượng hợp chất mà là liều thấp nhất hiệu quả để tạo ra hiệu quả chữa bệnh. Liều hiệu quả này thường sẽ phụ thuộc vào các yếu tố được mô tả ở trên. Việc dùng có thể ví dụ là trong tĩnh mạch, trong cơ, trong màng bụng, hoặc dưới da. Nếu muốn, liều hàng ngày hiệu quả của dược phẩm có thể được dùng thành hai, ba, bốn, năm, sáu hoặc nhiều liều phụ được dùng tách biệt ở khoảng cách thời gian thích hợp trong ngày, tùy ý, dưới dạng liều dùng đơn vị. Mặc dù có thể dùng riêng hợp chất theo sáng chế, tốt hơn là dùng hợp chất làm dược phẩm như được mô tả ở trên.

Các kháng thể dán nhãn hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo sáng chế có thể được sử dụng nhằm mục đích chẩn đoán để phát hiện, chẩn đoán, hoặc theo dõi bệnh hoặc rối loạn. Sáng chế đề xuất việc phát hiện hoặc chẩn đoán bệnh hoặc rối loạn thoái hóa thần kinh hoặc nhận thức, bao gồm nhưng không giới hạn ở bệnh Alzheimer, Bệnh hạt ưa bạc (AGD), Liệt trên nhân tiến triển (PSP), và Thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), bao gồm: (a) kiểm tra sự tồn tại của đoạn A β pyroglutamat hóa trong mẫu tế bào hoặc mô của đối tượng sử dụng một hoặc nhiều kháng thể mà liên kết đặc hiệu với tau; và (b) so sánh mức kháng nguyên với mức đối chứng, ví dụ mức trong mẫu mô bình thường, nhờ đó việc tăng mức kiểm tra của kháng nguyên so với mức đối chứng của

kháng nguyên chỉ báo bệnh hoặc rối loạn, hoặc chỉ báo mức độ trầm trọng của bệnh hoặc rối loạn.

Các kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo sáng chế có thể được dùng để thử nghiệm protein tau hoặc đoạn của protein tau trong mẫu sinh học sử dụng phương pháp hóa mô miễn dịch đã biết trong lĩnh vực. Phương pháp dựa trên kháng thể khác hữu dụng để phát hiện protein bao gồm xét nghiệm miễn dịch như xét nghiệm miễn dịch liên kết enzym (ELISA) và xét nghiệm miễn dịch đánh dấu phóng xạ (RIA) và thử nghiệm trên cơ sở nền phát hiện cỡ trung bình (MSD). Nhãn kháng thể thích hợp có thể được sử dụng trong bộ kit và phương pháp này, và các nhãn đã biết trong lĩnh vực bao gồm nhãn enzym, như phosphatase kiềm và glucozo oxidaza; nhãn đồng vị phóng xạ, như I ốt (^{125}I , ^{131}I), cacbon (^{14}C), lưu huỳnh (^{35}S), triti (^3H), indi (^{121}In), và techneti ($^{99\text{m}}\text{Tc}$); và nhãn phát quang, như luminol và luciferaza; và nhãn huỳnh quang, như fluorescein và rhodamin.

Sự có mặt của các kháng thể kháng tau dán nhãn hoặc đoạn liên kết tau của chúng có thể được phát hiện trong cơ thể nhằm mục đích chẩn đoán. Theo một phương án, chẩn đoán bao gồm: a) việc dùng cho đối tượng lượng hiệu quả của phân tử dán nhãn này; b) đợi trong khoảng thời gian sau khi dùng để cho phép phân tử dán nhãn tập trung ở vị trí (nếu có) của lắng phủ A β và cho phép phân tử dán nhãn đã liên kết được loại đến mức nền; c) xác định mức nền; và d) phát hiện phân tử dán nhãn ở đối tượng, sao cho việc phát hiện phân tử dán nhãn trên mức nền chỉ ra rằng đối tượng có bệnh hoặc rối loạn, hoặc chỉ ra mức độ trầm trọng của bệnh hoặc rối loạn. Theo phương án này, phân tử được dán nhãn với gốc tạo ảnh thích hợp để phát hiện bằng cách sử dụng hệ tạo ảnh cụ thể đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực. Mức nền có thể được xác định bằng nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực, bao gồm việc so sánh lượng của kháng thể dán nhãn phát hiện được cho giá trị tiêu chuẩn định trước cho hệ tạo ảnh cụ thể. Phương pháp và hệ thống mà có thể dùng trong phương pháp chẩn đoán theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chụp cắt lớp vi tính (CT), quét toàn thân như chụp positron cắt lớp (PET), tạo ảnh cộng hưởng từ (MRI), và chụp siêu âm.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, như được xác định ở đây để dùng trong liệu pháp chữa bệnh.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng, hoặc đoạn liên kết

epitop của chúng, như được xác định ở đây để dùng trong điều trị, chẩn đoán hoặc tạo ảnh bệnh do protein tau.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, như được xác định ở đây để dùng trong điều trị bệnh Alzheimer, Bệnh hạt ưa bạc (AGD), Liệt trên nhân tiến triển (PSP), và Thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, như được xác định ở đây để dùng trong việc sản xuất thuốc để điều trị, chẩn đoán hoặc tạo ảnh bệnh do protein tau.

Tốt hơn là, thuốc là để điều trị bệnh Alzheimer (AD), Bệnh hạt ưa bạc (AGD), Liệt trên nhân tiến triển (PSP), và Thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD) tốt nhất là bệnh Alzheimer (AD). Thuốc tốt hơn là cũng để điều trị Chứng rối loạn tâm thần, cụ thể là Chứng rối loạn tâm thần do AD hoặc Chứng rối loạn tâm thần ở bệnh nhân mắc AD, và hội chứng tâm thần của bệnh nhân mắc chứng mất trí thể Levwy.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị, chẩn đoán hoặc tạo ảnh bệnh Alzheimer hoặc bệnh do protein tau khác ở đối tượng, phương pháp này bao gồm việc dùng thuốc kháng thể đơn dòng hoặc đoạn liên kết epitop của chúng như được xác định ở đây, cho đối tượng với lượng có hiệu quả.

Theo phương án được ưu tiên, việc điều trị là mạn tính, tốt hơn là trong ít nhất 2 tuần, như ít nhất trong 1 tháng, 6, tháng, 1 năm hoặc hơn.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất bộ kit bao gồm kháng thể, hoặc đoạn của chúng, như được xác định ở đây để dùng trong liệu pháp chữa bệnh.

Các phương án

1. Kháng thể đơn dòng, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, có khả năng liên kết đặc hiệu miễn dịch với gốc được phosphoryl hóa 396 của protein tau của người, như gốc phosphoryl hóa 396 nêu ở SEQ ID NO:33.
2. Kháng thể theo phương án 1 gồm có kháng thể nguyên vẹn.
3. Kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo phương án 1 hoặc 2 bao gồm hoặc gồm có đoạn liên kết epitop được chọn từ nhóm bao gồm: đoạn Fv (ví dụ Fv chuỗi đơn và Fv liên kết disulphua); đoạn tương tự Fab (ví dụ đoạn Fab, đoạn

Fab' và đoạn F(ab)₂; vùng (Fv)₂-CH₃ thể nhỏ, và kháng thể vùng (ví dụ vùng biến đổi VH đơn hoặc VL vùng biến đổi).

4. Kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo phương án bất kỳ nêu trên, trong đó kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể của kiểu phụ IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4.

5. Kháng thể đơn dòng hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo bất kỳ trong số các phương án nêu trên mà là của người hoặc được người hóa.

6. Kháng thể đơn dòng, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, theo một phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop thể hiện một hoặc nhiều trong số các đặc tính sau đây

(a) tính chọn lọc và tính đặc hiệu đối với protein tau bệnh lý của người;

(b) ái lực liên kết (KD) đối với p-Tau 386-408 (pS396/pS404) (SEQ ID NO:33) nằm trong khoảng 0,5-10 nM, như 1-5 nM hoặc 1-2 nM

7. Kháng thể đơn dòng, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, theo một phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó kháng thể này cơ bản không liên kết gốc được phosphoryl hóa 404 trên protein tau (SEQ ID NO:33).

8. Kháng thể đơn dòng, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng bao gồm:

(a) CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:1 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin;

(b) CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:2 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin;

(c) CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:3 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin;

(d) CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:4 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin;

(e) CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:5 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin; và

(f) CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:6 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin.

9. Kháng thể đơn dòng theo phương án 8, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng nêu ở SEQ ID NO:8 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu ở SEQ ID NO:7, có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin.

10. Kháng thể đơn dòng, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, bao gồm:

(a) CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:9 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin;

(b) CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:10 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin;

(c) CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:11 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt

axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin;

(d) CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:12 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin;

(e) CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:13 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin; và

(f) CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:14 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin.

11. Kháng thể đơn dòng theo phương án 10, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng nêu ở SEQ ID NO:16 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin và hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu ở SEQ ID NO:15 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin.

12. Kháng thể đơn dòng, trong đó đoạn liên kết epitop bao gồm:

(a) CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:17 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin;

(b) CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:18 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin;

(c) CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:19 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin;

(d) CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:20 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin;

(e) CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:21 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin; và

(f) CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:22 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin.

13. Kháng thể đơn dòng theo phương án 12, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng nêu ở SEQ ID NO:24 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin và hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu ở SEQ ID NO:23 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin.

14. Kháng thể đơn dòng, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng bao gồm:

(a) CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:25 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin;

(b) CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:26 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt

axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin;

(c) CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:27 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin;

(d) CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:28 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin;

(e) CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:29 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin; và

(f) CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:30 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin.

15. Kháng thể đơn dòng theo phương án 14, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng nêu ở SEQ ID NO:32 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin và hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu ở SEQ ID NO:31 hoặc trình tự axit amin có không nhiều hơn 4 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 3 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 2 khác biệt axit amin, hoặc không nhiều hơn 1 khác biệt axit amin.

16. Kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo một trong số các phương án 1 đến 7, trong đó kháng thể này hoặc đoạn của chúng cạnh tranh với kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng được xác định trong Phương án 8-15 để liên kết với protein tau của người .

17. Kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo phương án bất kỳ nêu

trên bao gồm vùng Fc.

18. Kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo phương án bất kỳ nêu trên còn bao gồm gốc để làm tăng chu kỳ bán dẫn trong cơ thể.

19. Kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo Phương án 18, trong đó gốc để làm tăng chu kỳ bán dẫn trong cơ thể được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol (PEG), albumin huyết thanh người, nhóm glycosyl hóa, axit béo và dextran.

20. Kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo phương án bất kỳ nêu trên trong đó kháng thể còn bao gồm gốc phát hiện được.

21. Kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo Phương án 20 trong đó gốc phát hiện được được chọn từ nhóm bao gồm: nhãn huỳnh quang; nhãn phát quang hóa học; nhãn thuận từ; nhãn đồng vị phóng xạ; hoặc nhãn enzym.

22. Kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo các Phương án 20 hoặc 21 trong đó gốc phát hiện được bao gồm hoặc gồm đồng vị phóng xạ.

23. Kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo Phương án 22 trong đó đồng vị phóng xạ được chọn từ nhóm bao gồm ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{89}Zr , ^{123}I và ^{201}Tl .

24. Kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo Phương án 21 trong đó gốc phát hiện được bao gồm hoặc gồm đồng vị thuận từ.

25. Kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo Phương án 24 trong đó đồng vị thuận từ được chọn từ nhóm bao gồm ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{162}Dy , ^{52}Cr và ^{56}Fe .

26. Kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo bất kỳ trong số các Phương án 20 đến 25 trong đó gốc phát hiện được được phát hiện bởi kỹ thuật tạo ảnh như SPECT, PET, MRI, tạo ảnh quang hoặc siêu âm.

27. Kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo bất kỳ trong số các Phương án 20 đến 26 trong đó gốc phát hiện được được nối với kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng một cách gián tiếp, thông qua gốc liên kết.

28. Kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo Phương án 27 trong đó gốc liên kết được chọn từ nhóm bao gồm dẫn xuất của 1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraaxetic axit (DOTA), deferoxamin (DFO), dẫn xuất

của diethyltriaminepentaaxetic axit (DTPA), dẫn xuất của S-2-(4-Isothioxanatobenzyl)-1,4,7-triazaxyclononan-1,4,7-triaxetic axit (NOTA) và dẫn xuất của 1,4,8,11-tetraazaxyclododexan-1,4,8,11-tetraaxetic axit (TETA).

29. Kháng thể đơn dòng, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng trong đó chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:32, và SEQ ID NO:35, và chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, và SEQ ID NO:36.

30. Kháng thể đơn dòng, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng bao gồm

(a) CDR1 chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:20, và SEQ ID NO:28;

(b) CDR2 chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:21, và SEQ ID NO:29; và

(c) CDR3 chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:22, và SEQ ID NO:30; và

(d) CDR3 chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:19, và SEQ ID NO:27.

31. Kháng thể theo sáng chế, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo một phương án bất kỳ trong số các Phương án 1 đến 7 bao gồm

a) CDR1 chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:20;

(b) CDR2 chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:21;

(c) CDR3 chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:22; và

(d) CDR3 chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:19.

32. Phân tử axit nucleic phân lập mã hóa kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng như được xác định theo bất kỳ trong số các Phương án 1 đến 31.

33. Phân tử axit nucleic theo Phương án 32 trong đó phân tử là phân tử cADN.

34. Vector bao gồm phân tử axit nucleic như được xác định theo Phương án 32 hoặc 33.

35. Tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm phân tử axit nucleic như được xác định

theo bất kỳ trong số các Phương án 32 đến 34.

36. Phương pháp tạo ra kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop như được xác định theo bất kỳ trong số các Phương án 1 đến 31, phương pháp bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ như được xác định trong Phương án 35 dưới các điều kiện mà cho phép biểu hiện kháng thể mã hóa hoặc đoạn liên kết epitop của chúng.

37. Chế phẩm bao gồm kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo một điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chế phẩm này cơ bản không có kháng thể phát sinh tự nhiên mà hoặc là không có khả năng liên kết với protein tau hoặc không thay đổi về vật chất chức năng kháng protein tau của chế phẩm, trong đó chức năng này được chọn từ nhóm bao gồm:

- (i) cơ bản không có khả năng liên kết với protein tau không phosphoryl hóa;
- (ii) cơ bản không có khả năng liên kết với protein tau mà được phosphoryl hóa ở S404 và không được phosphoryl hóa ở S396;
- (iii) khả năng liên kết với protein tau phosphoryl hóa ở S396;
- (iv) khả năng liên kết với protein tau phosphoryl hóa ở cả S396 và ở S404;
- (v) khả năng phân biệt chọn lọc giữa gốc protein tau được phosphoryl hóa S396 và S404 sao cho nó cơ bản không có khả năng liên kết gốc được phosphoryl hóa 404;
- (vi) khả năng liên kết protein tau hyperphosphoryl hóa từ não bệnh Alzheimer của người;
- (vii) khả năng phân biệt giữa protein tau bệnh lý và không bệnh lý của người; và/hoặc
- (viii) khả năng, khi được sử dụng như được mô tả ở đây với chiết xuất rTg4510 nghèo miễn dịch từ chuột chuyển gen, để làm giảm đặc hiệu dải protein tau hyperphosphoryl hóa 64kDa và 70kDa ít nhất 90%, trong khi đó không làm giảm dải protein tau 55 kDa hơn 10% %; hoặc khả năng, khi được sử dụng như được mô tả ở đây với các chiết xuất từ não AD khám nghiệm tử thi của người, để làm giảm đặc hiệu dải protein tau S396 phosphoryl hóa hyperphosphoryl hóa ít nhất 90%, trong khi đó không làm giảm dải protein tau không hyperphosphoryl hóa hơn 10%.

38. Chế phẩm bao gồm kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng theo một điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết epitop của chúng có sự thay đổi cấu trúc trong trình tự axit amin, so với cấu trúc của kháng thể kháng protein tau có trong tự nhiên, trong đó sự thay đổi cấu trúc này khiến kháng thể này hoặc đoạn này thể hiện chức năng thay đổi so với chức năng được thể hiện bằng kháng thể kháng protein tau có trong tự nhiên này, trong đó chức năng này được chọn từ nhóm bao gồm:

- (i) cơ bản không có khả năng liên kết với protein tau không phosphoryl hóa;
- (ii) cơ bản không có khả năng liên kết với protein tau mà được phosphoryl hóa ở S404 và không được phosphoryl hóa ở S396;
- (iii) khả năng liên kết với protein tau phosphoryl hóa ở S396;
- (iv) khả năng liên kết với protein tau phosphoryl hóa ở cả S396 và ở S404;
- (v) khả năng phân biệt chọn lọc giữa gốc protein tau được phosphoryl hóa S396 và S404 sao cho nó cơ bản không có khả năng liên kết gốc được phosphoryl hóa 404;
- (vi) khả năng liên kết protein tau hyperphosphoryl hóa từ não bệnh Alzheimer của người;
- (vii) khả năng phân biệt giữa protein tau bệnh lý và không bệnh lý của người; và/hoặc
- (viii) khả năng, khi được sử dụng như được mô tả ở đây với chiết xuất rTg4510 nghèo miễn dịch từ chuột chuyển gen, để làm giảm đặc hiệu dải protein tau hyperphosphoryl hóa 64kDa và 70kDa ít nhất 90%, trong khi đó không làm giảm dải protein tau 55 kDa hơn 10%; hoặc khả năng, khi được sử dụng như được mô tả ở đây với chiết xuất từ não AD khám nghiệm tử thi của người, để làm giảm đặc hiệu dải protein tau S396 phosphoryl hóa hyperphosphoryl hóa ít nhất 90%, trong khi đó không làm giảm dải protein tau không hyperphosphoryl hóa hơn 10%.

39. Dược phẩm bao gồm kháng thể đơn dòng hoặc đoạn liên kết epitop của chúng như được xác định theo bất kỳ trong số các Phương án 1 đến 31, hoặc chế phẩm như được xác định theo bất kỳ trong số các Phương án 37-38; và chất mang dược dụng.

40. Kháng thể đơn dòng, hoặc đoạn của chúng, theo bất kỳ trong số các

phương án 1-31, chế phẩm theo bất kỳ trong số các Phương án 37-38, hoặc được phẩm theo phương án 39, để dùng trong y học.

41. Kháng thể đơn dòng, hoặc đoạn của chúng, theo bất kỳ trong số các phương án 1-31, chế phẩm theo bất kỳ trong số các Phương án 37-38, hoặc được phẩm theo phương án 39, để dùng trong điều trị bệnh do protein tau.

42. Kháng thể đơn dòng, hoặc đoạn của chúng, chế phẩm, hoặc được phẩm, theo phương án 41 trong đó bệnh do protein tau được chọn từ nhóm bao gồm bệnh Alzheimer, Bệnh hạt u bạc (AGD), Liệt trên nhân tiến triển (PSP), Thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), Chứng rối loạn tâm thần, cụ thể là Chứng rối loạn tâm thần do AD hoặc Chứng rối loạn tâm thần ở bệnh nhân mắc AD, và hội chứng tâm thần của bệnh nhân mắc chứng mất trí thể Levwy.

43. Sử dụng kháng thể đơn dòng, hoặc đoạn của chúng, theo bất kỳ trong số các phương án 1-31, chế phẩm theo bất kỳ trong số các Phương án 37-38, hoặc được phẩm theo phương án 39 trong sản xuất thuốc để điều trị bệnh do protein tau.

44. Sử dụng kháng thể đơn dòng, hoặc đoạn của chúng, chế phẩm, hoặc được phẩm theo phương án 43 trong đó bệnh do protein tau được chọn từ nhóm bao gồm bệnh Alzheimer, Bệnh hạt u bạc (AGD), Liệt trên nhân tiến triển (PSP), Thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD, Chứng rối loạn tâm thần do AD hoặc Chứng rối loạn tâm thần ở bệnh nhân mắc AD, và hội chứng tâm thần của bệnh nhân mắc chứng mất trí thể Levwy.

45. Phương pháp điều trị bệnh Alzheimer hoặc bệnh do protein tau khác ở đối tượng, phương pháp này bao gồm việc dùng kháng thể đơn dòng, hoặc đoạn của chúng, theo bất kỳ trong số các Phương án 1-31, chế phẩm theo bất kỳ trong số các Phương án 37-38, hoặc được phẩm theo phương án 39 cho đối tượng với lượng có hiệu quả.

46. Phương pháp theo phương án 45, trong đó việc điều trị là mạn tính.

47. Phương pháp theo phương án 46, trong đó điều trị mạn tính là trong ít nhất 2 tuần, như ít nhất trong 1 tháng, 6, tháng, 1 năm hoặc hơn.

48. Phương pháp theo một phương án bất kỳ trong số các Phương án 45 đến 47, trong đó đối tượng là người.

49. Bộ kit bao gồm kháng thể đơn dòng, hoặc đoạn của chúng, theo bất kỳ trong số các phương án 1-31, chế phẩm theo bất kỳ trong số các Phương án 37-38, hoặc

được phẩm theo phương án 39 để dùng trong y học.

50. Kháng thể đơn dòng, hoặc đoạn của chúng, theo bất kỳ trong số các Phương án 1-31, chế phẩm of bất kỳ trong số các Phương án 37-38, hoặc được phẩm theo phương án 39 để dùng trong việc phát hiện hoặc đo sự có mặt hoặc lượng của protein tau này trong não của đối tượng.

51. Kháng thể đơn dòng, hoặc đoạn của chúng, chế phẩm hoặc được phẩm theo phương án 50, trong đó việc phát hiện hoặc đo này bao gồm sự tạo ảnh trong cơ thể của kháng thể kháng protein tau này liên kết với protein tau này.

52. Kháng thể đơn dòng, hoặc đoạn của chúng, chế phẩm hoặc được phẩm theo phương án 50, trong đó việc phát hiện hoặc đo này bao gồm sự tạo ảnh ngoài cơ thể của kháng thể kháng protein tau hoặc đoạn của chúng, liên kết với protein tau này.

53. Kháng thể đơn dòng, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, có khả năng liên kết đặc hiệu miễn dịch với gốc được phosphoryl hóa 396 của protein tau của người (SEQ ID NO:33) với sự có mặt của protein tau của người phosphoryl hóa at residue 404 but không được phosphoryl hóa ở residue 396.

54. Kháng thể đơn dòng hoặc đoạn liên kết epitop của chúng mà thể hiện liên kết đặc hiệu miễn dịch với protein tau của người bao gồm gốc phosphoryl hóa 396 theo tiêu chí kiểm tra: i) kháng thể cơ bản không liên kết với protein tau không phosphoryl hóa; ii) kháng thể cơ bản không liên kết với protein tau phosphoryl hóa ở 404 khi 396 is không được phosphoryl hóa; iii) kháng thể liên kết với protein tau phosphoryl hóa ở 396; và iv) kháng thể liên kết với protein tau khi cả 396 và 404 được phosphoryl hóa.

55. Kháng thể đơn dòng, phát sinh lại peptit phosphoryl hóa hai lần: TDHGAIEIVYK^(p)SPVVSGDT^(p)SPRHL (SEQ ID NO:37) bao phủ các gốc 386-410 của protein tau 2N4R, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, có khả năng liên kết đặc hiệu miễn dịch với gốc được phosphoryl hóa 396 của protein tau của người (SEQ ID NO:33).

56. Kháng thể đơn dòng theo phương án 55, trong đó khối tế bào lai được sàng lọc với protein tau bệnh lý và không bệnh lý của người để phân lập các dòng vô tính mà đều i) đặc hiệu miễn dịch đối với mỗi phospho-epitop S396 và ii) nhận diện đặc hiệu protein tau hyperphosphoryl hóa từ não bệnh Alzheimer của người, trong đó các kháng

thể này có khả năng phân biệt giữa protein tau bệnh lý và không bệnh lý của người.

57. Phương pháp loại bỏ protein tau hyperphosphoryl hóa từ đám rối đám rối này bao gồm protein tau hyperphosphoryl hóa phương pháp này bao gồm việc cho protein tau hyperphosphoryl hóa tiếp xúc với kháng thể, kháng thể này chọn lọc cho protein tau có gốc 396 phosphoryl hóa, để tạo ra đám rối được làm nghèo 90% của protein tau hyperphosphoryl hóa.

58. Phương pháp trì hoãn sự tiến triển của bệnh Alzheimer ở bệnh nhân phương pháp này bao gồm việc làm giảm hoặc việc bớt đi sự tích tụ protein tau bệnh lý ở bệnh nhân này, phương pháp này bao gồm việc dùng kháng thể mà loại bỏ protein tau với gốc 396 phosphoryl hóa.

59. Phương pháp trì hoãn sự tiến triển của bệnh Alzheimer ở bệnh nhân phương pháp này bao gồm loại bỏ protein tau mà tạo hạt cho protein tau bệnh lý, trong đó protein tau có gốc 396 phosphoryl hóa được loại bỏ.

60. Phương pháp điều trị bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer bao gồm việc loại bỏ protein tau hyperphosphoryl hóa từ đám rối đám rối này bao gồm protein tau hyperphosphoryl hóa và protein tau bình thường bằng cách cho protein tau hyperphosphoryl hóa tiếp xúc với kháng thể chọn lọc cho protein tau có gốc 396 phosphoryl hóa.

61. Phương pháp theo bất kỳ trong số các Phương án 57 đến 59 bao gồm việc sử dụng kháng thể như được xác định theo một phương án bất kỳ trong số các Phương án 1 đến 31, 40-42 hoặc 50 đến 56.

62. Kháng thể đơn dòng phân lập, hoặc đoạn liên kết epitop phân lập của chúng, có khả năng liên kết đặc hiệu miễn dịch với gốc được phosphoryl hóa 396 của protein tau của người (SEQ ID NO:33).

63. Kháng thể đơn dòng tái tổ hợp của người hoặc tái tổ hợp người hóa, hoặc đoạn liên kết epitop phân lập của chúng, có khả năng liên kết đặc hiệu miễn dịch với gốc được phosphoryl hóa 396 của protein tau của người (SEQ ID NO:33).

64. Kháng thể đơn dòng tái tổ hợp, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, phát sinh đối với peptit phosphoryl hóa hai lần: TDHGAEIVYK{p}SPVVS GDT{p}SPRHL (SEQ ID NO:37) bao phủ các gốc 386-410 của protein tau 2N4R, trong đó kháng thể

đơn dòng tái tổ hợp này, hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, có khả năng liên kết đặc hiệu miễn dịch với gốc được phosphoryl hóa 396 của protein tau của người (SEQ ID NO:33).

65. Được phẩm bao gồm kháng thể đơn dòng phân lập, hoặc đoạn liên kết epitop phân lập của chúng, trong đó kháng thể đơn dòng phân lập này, hoặc đoạn liên kết epitop phân lập của chúng là như được xác định theo một phương án bất kỳ trong số các phương án trên.

66. Kháng thể khảm đơn dòng hoặc đoạn liên kết epitop phân lập của chúng, có khả năng liên kết đặc hiệu miễn dịch với gốc được phosphoryl hóa 396 của protein tau của người (SEQ ID NO:33).

67. Kháng thể, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của chúng, như được xác định theo bất kỳ trong số các Phương án 1-31 và 51-56 mà được tạo ra hoặc sản xuất trong dòng tế bào như dòng tế bào của người, dòng tế bào của động vật có vú không phải người, dòng tế bào côn trùng, nấm men hoặc vi khuẩn.

68. Kháng thể, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của chúng, theo phương án 67 được tạo ra trong dòng tế bào CHO, dòng tế bào HEK, dòng tế bào BHK-21, dòng tế bào của chuột (như dòng tế bào u tủy), dòng tế bào sarcoma xơ, dòng tế bào PER.C6, dòng tế bào HKB-11, dòng tế bào CAP và dòng tế bào HuH-7 của người.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Chứng ngừa cho chuột bằng phospho-peptit 396/404

Chuột C56/BL6 và FVB được chủng ngừa bằng 10 µg tau 386-408 phosphoryl hóa (pS396/pS404) được liên hợp bằng P30 (SEQ ID NO:37) được điều chế trong chất bổ trợ TiterMax.

Chuột (chủng C56/BL6 và FVB, cái và đực. Chuột 2 đến 3 tháng tuổi được chủng ngừa bằng tau phosphoryl hóa 386-408 được liên hợp với epitop peptit P30.

Peptit tau 386-408 phosphoryl hóa (pS396/pS404) được liên hợp với P30 sinh miễn dịch được điều chế trong TiterMax (400 µg/ml peptit được trộn 1:1 thể tích:thể tích) theo hướng dẫn của TiterMax/nhà cung cấp và chuột được tiêm dưới da bằng 20 µg peptit (100 µl) của kháng nguyên. Chuột đối chứng được tiêm chỉ bằng chất bổ trợ. Tất cả chuột được chủng ngừa bằng peptit được tăng cường bằng 0,5 µg

peptit/Titermax (10 µg/ml peptit được điều chế như được mô tả ở trên và tiêm) cách tháng. Chuột cuối cùng được tăng cường bằng Tau 386-408 phosphoryl hóa (pS396/pS404) được liên hợp với P30 mà không có Titermax 3 ngày trước khi dung hợp tế bào lách với các tế bào SP-2. Khối tế bào lai được chọn lọc cho các chu kỳ tạo dòng lại sau khi biểu hiện sự liên kết dương tính với đĩa ELISA mà đã được phủ bằng 1 µg/ml tau 386-408 phosphoryl hóa (pS396/pS404), và có hoạt tính liên kết ưu tiên với các kháng nguyên S1 và P3 từ dịch ly giải não AD và TG4510 (được mô tả dưới đây trong Ví dụ 3). Liên kết này được so sánh với hoạt tính liên kết activity của các kháng thể này với dịch ly giải não từ chuột đối chứng, sử dụng phương pháp thẩm tách khe và các đĩa ELISA hoặc MSD được phủ bằng dịch ly giải não.

Ví dụ 2: Tạo thể lai

Chuột được tăng cường bằng Tau 386-408 phosphoryl hóa (pS396/pS404) được liên hợp với P30 mà không có Titermax 3 ngày trước khi dung hợp tế bào lách với các tế bào SP-2. Khối tế bào lai được chọn lọc cho các chu kỳ tạo dòng lại sau khi liên kết dương tính với đĩa ELISA mà đã được phủ bằng 1 µg/ml tau 386-408 phosphoryl hóa (pS396/pS404), và hoạt tính liên kết ưu tiên với các kháng nguyên S1 và P3 từ dịch ly giải não AD và TG4510 khi so sánh với dịch ly giải não từ chuột đối chứng sử dụng phương pháp thẩm tách khe và các đĩa ELISA hoặc MSD được phủ bằng dịch ly giải não.

Ví dụ 3: Phân tích thẩm tách Western và thẩm tách khe các kháng thể đặc hiệu

Phân đoạn sinh hóa Tau

Các mô não từ người hoặc chuột rTg4510 chuột biểu hiện quá mức tau của P301L đột biến của người được đồng nhất trong 10 thể tích nước muối được đệm Tris chứa các chất ức chế proteaza và phosphatasa như sau: 50 mM Tris/HCl (pH 7,4); 274 mM NaCl; 5 mM KCl; 1% hỗn hợp chất ức chế proteaza (Roche); 1% hỗn hợp chất ức chế phosphatasa I & II (Sigma); và 1 mM phenylmethylsulfonyl florua (PMSF; Sigma). Dịch đồng nhất được ly tâm ở 27,000 x g trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C để thu được các phân đoạn dịch nổi (S1) và viên vón. Các viên vón được đồng nhất lại trong 5 thể tích đệm muối cao/sucroza (0,8 M NaCl, 10% sucroza, 10 mM Tris/HCl, [pH 7,4], 1 mM EGTA, 1 mM PMSF) và ly tâm như trên. Phần nổi được thu nhận và ủ với sarkosyl (nồng độ cuối 1%; Sigma) trong một giờ ở 37°C, sau khi ly tâm ở 150,000 x g trong một giờ ở

4°C thu được viên mún không tan trong sarkosyl, gọi là phân đoạn P3. Viên vón P3 được huyền phù lại trong đệm TE (10 mM Tris/HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA) đến thể tích tương đương với một nửa thể tích ban đầu được sử dụng cho dịch đồng nhất não.

Thẩm tách Western và khe

Chiết xuất mô phân đoạn S1 và P3 được hòa tan trong dung dịch đệm mẫu SDS chứa 0,1 M DTT. Các mẫu được xử lý nhiệt (95°C trong 10 phút) được tách bằng điện di trên gel trên gel 4-12% Bis-Tris SDS-PAGE (Invitrogen) và chuyển lên màng PVDF (BioRad Laboratories, Hercules, CA). Các mẫu thẩm tách khe được chấm trực tiếp lên màng nitroxenluloza (Amersham, Pittsburgh, PA) ở nồng độ đã biết trên các mẫu. Cả màng thẩm tách Western và khe được phong bế trong 5% sữa khô không béo trong TBS-Tween (0,5%) pH 7,4, sau khi ủ trong 1 µg/ml D1.2 hoặc C10-2 qua đêm ở 4 °C. Các màng được rửa và ủ với IgG kháng chuột được liên hợp với peroxidaza (1:5000; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Các kháng thể liên kết được phát hiện nhờ sử dụng hệ phát quang hóa học tăng cường (ECL PLUS kit; PerkinElmer). Phân tích định lượng và bằng mắt phản ứng miễn dịch thẩm tách Western và khe được thực hiện bằng hệ phân tích LAS-4000 BioImaging kết nối với máy tính (Fujifilm, Tokyo, Nhật) và phần mềm Multi Gauge v3.1 (Fujifilm). Tải trọng protein được điều chỉnh bằng thể tích các phân đoạn ban đầu và có thể được chuyển đổi thành trọng lượng ướt mô ban đầu. Các kết quả như được thể hiện trên Hình 1 và Hình 2.

Ví dụ 4: Sàng lọc và chọn lọc các kháng thể 396/404 nhờ sử dụng vật liệu bệnh lý người được làm bất động

Phần nổi thể lai được sàng lọc liên kết kháng thể trên các đĩa nunc phủ bằng 1 µg/ml peptit tau phosphoryl hóa 386-408 (pS396/pS404) nhờ sử dụng 0,1 M đệm cacbonat pH 9.

Phần nổi dương tính sau đó được pha loãng 1:50 -1:800 trong PBS, 0,1 % BSA và 0,1 NP40 để liên kết trên các đĩa ELISA hoặc MSD phủ bằng kháng nguyên ly giải não (viên vón P3, xem Ví dụ 3) lần lượt từ AD và chuột đối chứng khỏe mạnh (HC). Kháng nguyên dịch ly giải não được pha loãng 1500 lần trong Đệm carbonat 0,1 M pH9 trước khi ủ/phủ các đĩa ELISA hoặc MSD. Các lỗ sau đó được phong bế trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng (PBS, 3 mg/ml BSA, 0,1% NP-40) và hoạt tính liên kết kháng thể được phát hiện bằng IgG kháng chuột được liên hợp với HRP (DAKO) và sulfotag (MSD,

sản phẩm #) theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Việc chọn lọc các kháng thể (D1-2, C5-2, C8-3 và C10-2) pha loãng trong PBS với 0,1% BSA được mô tả bằng đáp ứng liều và hoạt tính liên kết phân tử nano – phân tử dưới nano được thể hiện với các đĩa phủ kháng nguyên AD-P3 còn được mô tả đối với hoạt tính liên kết để chọn lọc peptit đối chứng và đặc hiệu. Các kết quả như được thể hiện ở Hình 3.

Ví dụ 5: Tính đặc hiệu peptit và ái lực liên kết

Các kháng thể dương tính với liên kết với tau bệnh lý còn được mô tả đối với ái lực biểu kiến (IC_{50}) và tính chọn lọc/đặc hiệu với khoảng epitop phospho-peptit (p). Các đĩa MSD được phủ bằng 100 ng/ml tau 386-408 phosphoryl hóa (pS396/pS404) như được mô tả ở trên. Các kháng thể kháng tau phosphoryl hóa được phân tích trong các thử nghiệm đáp ứng liều để nhận biết các nồng độ kháng thể tạo ra mức tín hiệu phân tích thích hợp (thường là 5.000-20.000 RU trong MSD tương ứng với 0,5-2% tín hiệu thiết bị tối đa hoặc tín hiệu OD là 1,0 – 1,5 ở 450 nm trong ELISA. Việc chọn lọc các kháng thể được ủ với các nồng độ được phân cấp (0-1000 nM) tau 386-408 phosphoryl hóa (pS396/404) trong 2 giờ/nhiệt độ phòng. Các phản ứng sau đó được áp dụng cho các đĩa MSD được phủ peptit phủ bằng 100 ng/ml peptit tau 386-408 phosphoryl hóa (pS396/pS404) như được mô tả ở trên và đo hoạt tính liên kết. Giá trị IC_{50} từ các thử nghiệm ức chế tương ứng với ái lực biểu kiến (apparent affinities -KD) giữa 10 -100 nM.

Tính đặc hiệu và tính chọn lọc phospho: Nồng độ thích hợp của kháng thể đơn dòng được ủ với 100 nM tau 386-408 phosphoryl hóa, phosphoryl hóa kép (pS396/pS404), không phosphoryl hóa hoặc monophosphoryl hóa (pS396 hoặc pS404) và phân tích về hoạt tính liên kết (thử nghiệm ức chế). Peptit tau phosphoryl hóa đối chứng (tau phosphoryl hóa 260-270 (pS262) hoặc tau phosphoryl hóa 240-270 (pS262) và tau tái tổ hợp, protein không phosphoryl hóa được phân tích để so sánh. Tất cả các kháng thể dương tính với kháng nguyên AD-P3 thể hiện sự ưu tiên mạnh peptit tau 386-408 phosphoryl hóa (pS396/pS404) và tau phosphoryl hóa peptit monophosphoryl hóa 386-408 (pS396) và không có hoạt tính liên kết đối với peptit mono-phosphoryl hóa tau phosphoryl hóa 386-408 (pS404) và peptit tau không phosphoryl hóa 386-408. Peptit tau phosphoryl hóa 240-270 và tau phosphoryl hóa đối chứng. Các kết quả như được thể hiện ở Hình 4 và Hình 32.

Ví dụ 6: Xác định đặc tính mô học của các kháng thể bằng hóa mô miễn dịch

Mô não chuột được thu nhận từ chuột rTg4510 8 tháng tuổi (quá biểu hiện P301L-tau của người dưới gen khởi động CamKII) và chuột cùng lứa không chuyển gen (không-Tg), được cố định trong paraformaldehyt 4% và nhúng trong parafin. Các mẫu vỏ não trước của não người nhúng trong parafin được nhận từ Tissue Solutions (Glasgow, Anh). Mô từ người cho được chẩn đoán bệnh Alzheimer giai đoạn cuối được so sánh với người cho đối chứng không bị loạn trí cùng tuổi. Các đoạn dày bốn um được khử parafin và đưa vào tìm kiếm kháng nguyên bằng cách chiếu vi song các đoạn này trong dung dịch đệm Xitrat 10 mM, pH 6, trong 10 phút. Peroxidaza nội sinh được phong bế bằng hydro peroxidaza 1% sau đó bằng huyết thanh lợn bình thường 5% trong PBS/1%BSA/0,3%Triton X-100 (PBS-BT). Các đoạn được ủ qua đêm ở 4 °C với các kháng thể D1.2 và C10-2 pha loãng trong PBS-BT ở một loạt các nồng độ. Các đoạn được rửa trong PBS, 0,25% BSA, 0,1% Triton X-100, trước khi được ủ với kháng thể kháng chuột thứ cấp của lợn được biotin hóa (E0464; DAKO, Glostrup, Đan Mạch) ở 1:500 trong 1 giờ. Sau khi rửa thêm, kit phức hợp StreptAvidin-Biotin (Vector Laboratories, Burlingame, Canada) được dùng và hoạt tính miễn dịch được hiển thị bằng diaminobenzidin. Các đoạn được phản chất nhuộm bằng hematoxylin. Kết quả như được thể hiện ở Hình 5.

Ví dụ 7: Tính chọn lọc của các kháng thể đối với tau bệnh lý

Các đĩa MSD được phủ bằng kháng nguyên P3 được hòa tan từ não AD (pha loãng 1:1500) hoặc não TG4510 (pha loãng 1:3000). Các kết quả như được thể hiện ở Hình 6.

Việc phát hiện được thực hiện như được mô tả trong Ví dụ 4 ở trên.

Ví dụ 8: Thử nghiệm kết hạt tế bào HEK

Các tế bào HEK293 được chuyển nhiễm nhanh bằng tau của người -P301L-FLAG trong các đĩa 6 lỗ 24 giờ sau khi cấy, tiếp theo là 24 giờ ủ bằng dịch đồng thể não trong 24 nữa, sau đó phân cắt và cấy lại các tế bào và thu gom sau 24 giờ nữa. Các tế bào được ly giải và nghiền bằng sóng siêu âm trong PBS, bổ sung 1% triton X, Phos-stop và đệm chất ức chế phosphatase và protease hoàn toàn (Roche) và siêu ly tâm ở 100,000 x g trong 30 phút. Viên vón được huyền phù lại trong SDS, nghiền bằng sóng siêu âm và siêu ly tâm trong 30 phút ở 100,000 x g. Phần nổi được phân tích bằng thẩm

tách western. Các tế bào biểu hiện tau của người -P301L thể hiện tau không tan (phân đoạn SDS, phát hiện bằng E1/FLAG), quá phosphoryl hóa (phát hiện bằng D1.2}pS396) khi kết hạt với dịch đồng thể não tổng từ chuột chuyển gen bằng tau rTg4510. Các tế bào được xử lý bằng dịch đồng thể não đối chứng từ chuột thể hiện sự không có mặt của tau hyperphosphoryl hóa kết tụ của người. Ngoài ra, dịch ly giải tế bào tổng của các tế bào HEK293 nhờ sử dụng thử nghiệm kết tụ tau từ Cisbio. Thử nghiệm này được dựa trên huỳnh quang phân giải theo thời gian nhờ sử dụng cùng kháng thể cho cả kháng thể người cho (liên hợp Tb3+) và kháng thể người nhận (liên hợp d2) trong FRET. Mẫu 10 μ l được trộn với 10 μ l hỗn hợp kháng thể và ủ trong 20 giờ. Đã được đọc trên máy đọc đĩa Pherastar để đánh giá huỳnh quang phân giải theo thời gian (tín hiệu FRET được đo/tích hợp sau khi chuyển ánh sáng kích thích). Thử nghiệm này đánh giá tau kết tụ ở cả vật liệu mô xẻ từ người, chuột rTg4510 và ở các tế bào HEK được kết hạt với tính đặc hiệu và độ nhạy cao. Các kết quả như được thể hiện ở Hình 7 và thể hiện rằng hiệu quả kết hạt không bị suy giảm bởi việc xử lý bằng HEL, nhưng bị đảo ngược một phần bởi việc xử lý bằng các kháng thể tau (C10-2>D1.2>hACI36-2B6-Ab1).

Ví dụ 9: Đảo ngược đáp ứng chức năng (điện sinh lý học (elphys)) in-vivo đối với D1.2 và C10-2

Đánh giá điện sinh lý học in vivo của quá trình truyền qua sinap và tính mềm dẻo ở vùng CA1 của hồi hải mã ở chuột đối chứng rTg4510 và tTA 4,5 đến 5,5 tháng cho thấy rằng i) việc truyền qua sinap nền bị ảnh hưởng đáng kể ở chuột rTg4510 so với chuột tTA, và ii) sự thuận lợi của xung bắt cặp bị giảm đáng kể ở chuột rTg4510 so với chuột tTA.

Tất cả các thử nghiệm được tiến hành theo Hướng dẫn của Hội đồng Cộng đồng chung châu Âu (86/609/EEC) đối với việc chăm sóc và sử dụng động vật thí nghiệm và luật pháp Đan Mạch quy định về việc thử nghiệm trên động vật.

Chuột rTg4510 và tTA đực (Taconic Europe A/S) 5 đến 5,5 tháng tuổi được sử dụng trong nghiên cứu này vào thời điểm của hồ sơ. Chuột được nhốt theo nhóm ở nhiệt độ được kiểm soát ($22 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$) và điều kiện ẩm (55-65%) và giữ trong chu kỳ sáng/tối 12:12 (sáng lúc 06:00h). Thức ăn và nước được cho theo nhu cầu.

Các động vật được gây tê bằng cách tiêm trong bụng (i.p.) uretan (1,2 g/kg). Chuột sau đó được treo lên khung định vị, thân nhiệt được điều chỉnh đến $37,5^{\circ}\text{C}$ nhờ

đệm làm ẩm, và sọ được lộ ra. Dây bạch kim được đặt trong xương trán để dùng làm đối chứng, và một lỗ khác được khoan để lồng điện cực ghi và kích thích vào hồi hải mã, ở các tọa độ sau theo bản đồ Paxinos và Franklin (Paxinos and Franklin, 2001): ghi, 1,5-1,7 mm sau thóp, 1,0-1,2 mm bên cạnh đường trung tâm, 1,4-1,7 mm dưới bề mặt não; kích thích, 1,8-2,0 mm sau thóp, 1,5-1,7 mm bên cạnh đường trung tâm, 1,3-1,7 mm dưới bề mặt não. Các con vật được để trên khung định vị suốt toàn bộ quá trình ghi và mức độ gây tê của chúng được kiểm tra đều đặn.

Thế trường (fEPSP) được tạo ra ở CA1 bằng cách kích thích điện phần bên Schaffer mỗi 30 giây, và độ sâu của điện cực ghi được điều chỉnh cho đến khi fEPSP âm được ghi đáp lại xung vuông đơn cực. Độ dốc của fEPSP được tạo ra thường được đo giữa 30 và 70% biên độ tối đa của fEPSP.

Khi fEPSP tối ưu được tạo ra, sự truyền synap cơ sở được đánh giá bằng mối quan hệ giữa cường độ kích thích và độ dốc fEPSP gọi ra (mối quan hệ đầu vào-đầu ra). Cường độ kích thích khác nhau là 0, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, và 500 μ A, và được áp dụng liên tục theo thứ tự tăng dần, với 2 đến 3 lần lặp ở mỗi cường độ. Sự truyền synap cơ sở được phát hiện là bị suy giảm đáng kể ở chuột rTg4510 so với chuột tTA.

Sự thuận tiện bắt cặp xung, tính mềm dẻo synap ngắn hạn được cho là phụ thuộc vào cơ chế trước khớp thần kinh, được đánh giá thêm ở chuột rTg4510 và tTA. Vấn đề là, một cặp kích thích với khoảng cách giữa kích thích (ISI) thay đổi từ 25 đến 1000 ms được áp dụng cho phần bên Schaffer, và độ dốc của fEPSP thứ hai được so sánh với độ dốc của fEPSP thứ nhất. Sự thuận lợi được quan sát ở tất cả ISI, với sự thuận lợi tối đa ở các ISI 50 và 75 ms. Thú vị là, quan sát được PPF thấp hơn đáng kể ở chuột rTg4510 khi so với chuột tTA.

Các suy giảm được nhận biết ở sự truyền synap cơ sở và sự thuận lợi bắt cặp xung ở chuột rTg4510 còn được sử dụng làm chỉ báo để kiểm tra hiệu lực kháng thể.

Các biên bản được thực hiện ở tất cả các thử nghiệm 2 đến 4 ngày sau khi dùng 4 liều kháng thể hai lần một tuần trong 2 tuần, theo đường bụng. Sự truyền synap cơ sở và sự thuận lợi bắt cặp xung được ghi ở cả hai hồi hải mã ở mỗi chuột khi có thể, và được sử dụng thêm dưới dạng thử nghiệm riêng. Các kết quả như được thể hiện ở Hình 8 và cho thấy sự đảo ngược thuận lợi bắt cặp xung sự dẫn truyền synap cơ sở của kháng

thể giảm ở thể trường được tạo ra ở CA1.

Ví dụ 10: Tiêu miễn dịch tau từ phần chiết não rTg4510

60 µg kháng thể C10-2 của chuột và người hóa được làm bất động vào 300 µl dịch huyền phù Dynabead từ tính (Kit kết tủa miễn dịch Dynabeads Protein G Novex, Lô số 10007D). Sau khi rửa kỹ, các hạt được trộn với 60 µl phần chiết não rTg4510 và ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Các hạt từ được tách ra từ phần chiết này và các phần chiết được phân tích bằng thấm tách western. Sự tiêu bằng mC10-2 và hC10-2 loại bỏ các cụm tau lần lượt là 99 và 99,5%. Các kết quả như được thể hiện ở Hình 12.

Ví dụ 11: Thử nghiệm kết hạt tế bào HEK sử dụng các phần chiết tiêu miễn dịch

Các tế bào HEK293 được chuyển nhiễm nhanh bằng tau-P301L-FLAG của người trong các đĩa 6 lỗ. Sau 24 giờ các tế bào được ủ trong dịch đồng thể não mà đã được tiêu miễn dịch nhờ sử dụng C10-2 người hóa hoặc của chuột. Sau 24 giờ các tế bào được cấy lại và thu gom sau 24 giờ nữa. Các tế bào được ly giải và nghiền bằng siêu âm trong TBS, bổ sung 1% triton X, chất ức chế phosphatase và protease (Roche) và siêu ly tâm ở 100.000 x g trong 30 phút. Viên vón được huyền phù lại trong 1% SDS, nghiền bằng siêu âm và siêu ly tâm trong 30 phút ở 100.000 x g. Phần nổi được phân tích bằng thấm tách western. Các tế bào biểu hiện tau -P301L của người cho thấy tau không tan (phân đoạn SDS, phát hiện bằng E1/FLAG), quá phosphoryl hóa (tau D1.2/pS396, chạy ở trọng lượng phân tử cao hơn) khi kết hạt với dịch đồng thể não tổng từ chuột chuyển gen tau rTg4510. Các tế bào được xử lý bằng dịch đồng thể não đối chứng từ chuột tTA cho thấy sự không có mặt của tau kết tụ hyperphosphoryl hóa của người. Ngoài ra, dịch ly giải tế bào tổng của các tế bào HEK293 được phân tích nhờ sử dụng thử nghiệm kết tụ tau từ Cisbio. Việc tiêu bằng các kháng thể HEL và hHEL không ảnh hưởng đến việc kết hạt, trong khi tiêu bằng kháng thể mC10-2 và hC10-2 ngăn chặn sự kết tụ 88 và 96% và tau không tan 97 và 100%. Các kết quả như được thể hiện ở Hình 13.

Ví dụ 11: Tiêu miễn dịch tau từ phần chiết não rTg4510

100 µg kháng thể C10-2, D1.2 và Tau5 của chuột (Invitrogen) được làm bất động vào 500 µl huyền phù Dynabead từ tính (Kit kết tủa miễn dịch Dynabeads Protein G Novex, lô số 10007D). Sau khi rửa kỹ, các hạt được trộn với 100 µl rTg4510 phần chiết não rTg4510 và ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Các hạt từ được tách ra từ phần chiết này và các phần chiết được phân tích bằng thấm tách western. C10-2 và D1.2 không loại

bỏ tau bình thường từ các dịch đồng thể, như kháng thể Tau5 có bán trên thị trường làm được. Trái lại, hai kháng thể theo sáng chế loại bỏ đặc hiệu tau quá phosphoryl hóa (64kDa) khoảng 95%, tức là tau phosphoryl hóa ở serin 396. Các kết quả như được thể hiện ở Hình 14.

Ví dụ 12: Tiêu miễn dịch tau từ dịch chiết não của người bị bệnh Alzheimer

100 μ g kháng thể C10-2 và D1 của chuột được làm bất động trong 500 μ l huyền phù Dynabead từ tính (Kit kết tủa miễn dịch Dynabeads Protein G Novex, Lô số 10007D). Sau khi rửa kỹ, các hạt được trộn với 100 μ l phần chiết não người bệnh Alzheimer và ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Các hạt từ được tách ra từ phần chiết này và các phần chiết được phân tích bằng thấm tách western. D1.2 và C10-2 chỉ loại bỏ một phần rất nhỏ tau tổng trong dịch đồng thể não (8%). Các kháng thể do tuy nhiên loại bỏ đặc hiệu tau quá phosphoryl hóa (90%), đặc hiệu cho người bệnh AD. Các kết quả như được thể hiện ở Hình 15.

Ví dụ 13: Kết hạt ở chuột rTg4510 nhờ sử dụng phần chiết tiêu miễn dịch

Chuột chuyển gen biểu hiện tau đột biến của người (P301L 0N4R) dưới yếu tố đáp ứng tet-off ở các nơ ron dương tính CamK2 (rTg4510) được sử dụng. Mô hình này bình thường bắt đầu phát triển bệnh lý tau ở 3 tháng tuổi, nhưng bằng cách cho chuột mẹ ăn doxyxycilin trong quá trình mang thai và trong ba tuần đầu của chuột con, bệnh phát triển ở giai đoạn sau (bắt đầu sau 6 tháng tuổi). Chuột được xử lý trước bằng doxyxycilin được sử dụng trong các nghiên cứu là 2,5 tháng tuổi ở thời điểm tiêm. Chuột được gây tê bằng cách xông isoflouran được cố định trên khung định vị. Sọ được lộ ra và điều chỉnh cho đến khi thóp và lambda đúng vị trí. Lỗ được khoan cạnh sọ 2 mm (bên phải) và 2,4 mm sau thóp. Dầu vát của xylanh 10 μ l (SGE) được sử dụng để tiêm vật liệu kết hạt 1,4 mm từ nhân bụng đến bề mặt não ở các tọa độ nêu trên. 2 μ l phần chiết tiêu miễn dịch, được mô tả trong Các ví dụ 11 và 12, truyền chậm tại chỗ (1 μ l/phút) và xylanh được để trong 5 phút trước khi lấy ra. Vết thương được đóng bằng miếng dán và chuột được làm ấm khi tỉnh dậy. Chuột được nhốt trong 3 tháng và sau đó giết và được ngâm cố định bằng 4% PFA.

Hóa mô miễn dịch: Não cố định được cắt thành các đoạn vòng 35 μ m ở NSA và mỗi đoạn thứ 6 được nhuộm đối với mớ rối tau (nhuộm bạc Gallyas) và đối với tau quá phosphoryl hóa (AT8). Nơ ron nhuộm dương tính (soma) được đếm ở các mặt cùng bên

và đối bên của hồi hải mã của não. Tất cả các vùng phụ của hồi hải mã được bao gồm. Tám vùng được đếm trên mỗi não. Các kết quả phản ánh tổng nồng độ nhuộm dương tính từ 8 vùng. Tín hiệu nền được xác định ở hai chuột không được tiêm. Nhờ việc loại bỏ tau quá phosphoryl hóa từ dịch đồng thể, dịch đồng thể không còn gây ra sự kết hạt bệnh lý tau nữa. Các kết quả như được thể hiện ở Hình 16. Định lượng bệnh lý tau ở não rTg4510 được kết hạt bằng dịch đồng thể não rTg4510 (A) hoặc AD (B). Trước khi kết hạt, tau quá phosphoryl hóa, chứ không phải Tau bình thường, đã được làm giảm ở dịch đồng thể khoảng 90-95% nhờ sử dụng C10-2 hoặc D1.2. Nhờ việc loại bỏ tau quá phosphoryl hóa từ dịch đồng thể, dịch đồng thể không còn gây ra sự kết hạt bệnh lý tau nữa,

Dịch đồng thể từ não rTg4510 hoặc Alzheimer có thể kết hạt bệnh lý tau ở chuột rTg4510 ở giai đoạn bệnh lý tau nội sinh chưa phát triển. Nhờ việc loại bỏ tau quá phosphoryl hóa từ dịch đồng thể nhờ sử dụng D1.2 hoặc C10-2, như được mô tả trong Các ví dụ 11 và 12. Hoạt tính kết hạt được loại bỏ.

Ví dụ 14: Điều trị bằng kháng thể ở chuột rTg4510 kết hạt

Chuột rTg4510 được điều trị bằng doxyxycyclin (như được mô tả trong Ví dụ 13) được điều trị mạn tính bằng kháng thể D1.2 của chuột hoặc kháng thể đối chứng, bắt đầu bằng 15 mg/kg/tuần lúc 2 tháng tuổi. Ở 2,5 tháng, mô não rTg4510 được dung hợp vào hồi hải mã (như được mô tả trong Ví dụ 13). Chuột được giết 1, 2 và 3 tháng sau khi dung hợp não và hóa mô miễn dịch và phân tích sau được thực hiện như được mô tả trong Ví dụ 13. Việc điều trị bằng D1.2 giảm đáng kể bệnh lý tau 2 và 3 tháng sau khi bắt đầu kết hạt. Các kết quả như được thể hiện ở Hình 17.

Định lượng mới rồi sinh nơon ở hồi hải mã của chuột rTg4510 kết hạt. Bệnh lý tăng theo thời gian và nhờ việc điều trị chuột bằng D1.2 bệnh lý giảm đáng kể sau 2 và 3 tháng kết hạt. Định lượng mới rồi sinh nơon ở hồi hải mã của chuột rTg4510 kết hạt. Bệnh lý tăng theo thời gian và nhờ việc điều trị chuột bằng D1.2 bệnh lý giảm đáng kể sau 2 và 3 tháng kết hạt.

Dịch đồng thể từ não rTg4510 hoặc người bệnh Alzheimer có thể kết hạt bệnh lý tau ở chuột rTg4510 ở giai đoạn khi bệnh lý tau nội sinh chưa phát triển. Bằng cách điều trị toàn thân chuột bằng D1.2 sự phát triển bệnh lý của tau có thể được giảm đáng kể.

Ví dụ 15: Tiêu miễn dịch tau từ phần chiết não người bệnh Alzheimer sử dụng kháng

thể tau người hóa

100 μ g C10-2 chuột và người hóa cũng như các kháng thể 2.10.3 và HJ8.5 kháng thể đã biết (nguồn) được làm bất động trong 500 μ l huyền phù Dynabead từ (Kit kết tủa miễn dịch Dynabeads Protein G Novex, Lô số 10007D). Sau khi rửa kỹ, các hạt được trộn với 100 μ l phần chiết não người bệnh Alzheimer và ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Các hạt từ được tách ra khỏi phần chiết và các phần chiết được phân tích bằng thấm tách western và thử nghiệm CisBio. C10-2 của chuột và người hóa loại bỏ một cách hiệu quả 93 và 97 % tau phosphoryl hóa pS396, nhưng chỉ 22 và 17% tau tổng so với kháng thể đối chứng hHel. Kháng thể 2.10.3 loại bỏ 91% tau phosphoryl hóa ở Serin 396 và 10% tau tổng. Có vẻ 2.10.3 kém hiệu quả hơn trong việc loại bỏ một trong các băng quá phosphoryl hóa so với kháng thể C10-2 (băng giữa 64kDa). Kháng thể HJ8.5 có đặc điểm khác biệt hơn so với cả hai kháng thể C10-2 và 2.10.3, bởi việc loại bỏ phần lớn tau, 89% tổng tau và 88% tau pS396. Các kết quả như được thể hiện ở hình 23-24.

Ví dụ 16: Tiêu miễn dịch tau kết tụ từ phần chiết não người bệnh Alzheimer sử dụng kháng thể tau người hóa

Các phần chiết AD tiêu miễn dịch được mô tả trong Ví dụ 13 cũng được phân tích bằng cách sử dụng thử nghiệm kết tụ tau được mô tả trong ví dụ 10. Các kháng thể C10-2 và HJ8.5 hiệu quả hơn trong việc loại bỏ tau kết tụ ra khỏi vật liệu AD sau đó là kháng thể 2.10.3. Theo thứ tự hiệu lực: HJ8.5 (99%), hC10-2 (98%), mC10-2 (96%) và 2.10.3 (90%) đều so sánh với kháng thể hHel. Các kết quả như được thể hiện ở Hình 25.

Ví dụ 17: Tiêu miễn dịch Tau

25 μ g kháng thể (người hóa C10-2 hoặc 2.10.3) được làm bất động trong 125 μ l huyền phù Dynabead từ (Kit kết tủa miễn dịch Dynabeads Protein G Novex, Lô số 10007D). Sau khi rửa kỹ, các hạt được phủ được trộn với các lượng thay đổi của hạt được rửa, không được phủ. Bắt đầu từ hạt phủ kháng thể 100%, tương ứng với 5 μ g kháng thể, xuống các hạt 100% không được phủ. Tổng lượng hạt là giống nhau ở tất cả mẫu. Các hạt được trộn với 20 μ l phần chiết AD và ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Các hạt từ được tách từ phần chiết và các phần chiết này được chia nhỏ, đóng băng nhanh và giữ ở -80 C đến khi sử dụng.

Phân tích tiêu sử dụng thấm tách western

Các mẫu được đun sôi trong đệm tải 1x LDS và 100 mM DTT. Thể tích tương đương với 3 μ l phần chiết được tải lên gel 4-12% Bis-Tris NuPAGE (LifeTech Novex). Sau khi điện di, protein được thấm tách trên màng Immobilon-FL PVDF (0,45 μ m, IPFL10100, Millipore). Màng này được phong bế bằng đệm phong bế SEA (Prod#37527, Thermo). Các mức Tau và P-tau được đánh giá trong các mẫu nhờ sử dụng Tau5 (Abcam ab80579, 1:2000) C10-2 của chuột (1 μ g/ml), P-S199/202 (Invitrogen 44768 G, 1:1000), P-S422 (Abcam ab79415, 1:750), IPN của người (1 μ g/ml). Gapdh và actin được sử dụng làm đối chứng tải (Abcam ab9484, 1:2000, Sigma A5441, 1:20000). Các kháng thể IgG thứ cấp liên hợp với flophore được sử dụng (IRDye 800CW dê kháng người, IRDye 800CW, dê kháng thỏ, IRDye 680 dê kháng chuột, LI-COR biosciences) và tín hiệu được định lượng nhờ sử dụng Odyssey CLx và phần mềm Image studio (LI-COR biosciences).

Việc định lượng từng băng cũng như tín hiệu ở toàn bộ các hàng được thực hiện và từ đó đường cong đáp ứng liều xich ma được vẽ và khi có thể, tác dụng tối đa và giá trị EC50 được ước tính.

Kết quả

Cả hai kháng thể loại bỏ phần nhỏ tau từ dịch não người bệnh Alzheimer. 2.10.3, được thiết kế có tính đặc hiệu đối với tau P-S422 loại bỏ lên đến 24% lượng tau tổng, trong khi C10-2 loại bỏ lên đến 15% tau tổng (xem Hình 26).

Cả 2.10.3 và C10-2 loại bỏ hơn 90% tau phosphoryl hóa ở serin 422 mặc dù lượng kháng thể cần thiết để giảm 50% tau P-S422 khác biệt, đối với 2.10.3, cần 0,42 μ g kháng thể và đối với C10-2, cần 0,27 μ g cho cùng tác dụng (xem Hình 27).

C10-2 loại bỏ có hiệu quả tau bị phosphoryl hóa ở serin 396 (Tác dụng tối đa: 88% và một nửa tác dụng này đạt được khi sử dụng 0,30 μ g kháng thể). 2.10.3 loại bỏ các phần nhỏ tau bị phosphoryl hóa ở serin 396 (Tác dụng tối đa: 60% và một nửa tác dụng này đạt được khi sử dụng 0,63 μ g kháng thể)(xem Hình 28). Điều này chỉ ra rằng tất cả tau bị phosphoryl hóa ở serin 422, cũng bị phosphoryl hóa ở serin 396, nhưng có một phần tau quá phosphoryl hóa bị phosphoryl hóa ở serin 396 trong khi không có mặt serin phosphoryl hóa ở vị trí 422.

Phần lớn của tau, được loại bỏ bởi C10-2, cũng được phosphoryl hóa ở Serin 199/202, vì 69% tau có quá trình phosphoryl hóa này bị ảnh hưởng bởi sự tiêu miễn dịch

(50% bị ảnh hưởng khi sử dụng 0,34 μg)(xem hình 29). Sự tiêu miễn dịch 2.10.3 không tạo ra đáp ứng liều xích ma lên tau P-S199/202 mặc dù sự giảm tín hiệu được thấy với sự tăng lượng tăng của kháng thể (giảm tối đa 52% khi sử dụng lượng tối đa kháng thể (5 μg)(xem Hình 29).

Dữ liệu này chỉ ra rằng kháng thể C10-2 hướng đích đến serin 396 phosphoryl hóa liên kết tập hợp lớn hơn của tau quá phosphoryl hóa sau đó kháng thể 2.10.3 hướng đích serin phosphoryl hóa ở vị trí 422.

Ví dụ 18: Sự ức chế trung gian bởi kháng thể sự bắt giữ kháng nguyên tau bệnh lý đặc hiệu mC10-2 trong dịch ly giải não AD

Vật liệu và phương pháp

Vật liệu

Đệm bao: Đệm carbonat pH 8,5, 150 mM NaCL. Đệm chặn: 3% BSA (phân đoạn V), 0,1% NP40 trong PBS pH7,4. Đệm rửa: 0,1 % BSA (phân đoạn V), 0,1 % NP40 trong PBS, pH 7,4. Kháng thể tau người hóa tổng của dê được gắn đuôi sulfo (MSD D221LA-1, 50 $\mu\text{g/ml}$)

Phương pháp hỗ trợ để đo sự bắt giữ tau bệnh lý của kháng nguyên của người từ não AD sử dụng các đĩa C10-2 (bước A) sau khi ủ kháng nguyên tau với các nồng độ tăng của các kháng thể đặc hiệu pS396 (bước B). Sự bắt giữ kháng nguyên tau và sự ức chế trung gian bởi kháng thể được phát hiện nhờ sử dụng kháng thể tau (tổng) kháng người được gắn đuôi sulfo từ MSD

A: Các đĩa MSD được phủ (qua đêm ở 4C) bằng 0,5 $\mu\text{g/ml}$ mC10-2 (kháng thể bắt) trong đệm bao và sau đó phong bế trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng) rửa 3 lần. (Hình 30)

B: Các mẫu dịch ly giải P3 (1:1000 = 2-4 $\mu\text{g/ml}$ protein tổng) và/hoặc S1(p) (1:300=20-40 ng/ml protein tổng) từ AD (gom từ 3 người bệnh) được trộn với các nồng độ từng bậc của kháng thể đặc hiệu epitop peptit pS396 và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Các dịch phản ứng sau đó được ủ trong 2 giờ trên đĩa được chuẩn bị trong bước A. (Hình 31)

C: Tau được bắt bằng C10-2 được phát hiện bằng tau của người được gắn đuôi sulfo. Kháng thể tau (1:50) từ MSD theo hướng dẫn nhà sản xuất. Các đĩa được phân

tích trên MSD SECTOR® S 600. AD P3 và AD S1(p) được thử nghiệm trong các thiết kế giống nhau. (Hình 33/34)

Bảng 6A

chuột C10-2,

+ peptit tau, 10 μ M

	trung bình		
	Tín hiệu	tín hiệu	tín hiệu
PBS/0,1%BSA	388	403	373
C10-2 3ng/ml	366	384	348
C10-2 10ng/ml	383	398	367
C10-2 30ng/ml	345	384	306
C10-2 100ng/ml	357	401	313
C10-2 300ng/ml	407	434	379
C10-2 1000ng/ml	451	462	439
C10-2 10000ng/ml	870	920	820

Bảng 6B

chuột C10-2,

+ PBS/ 0,1% BSA

trung bình

	Tín hiệu	tín hiệu	tín hiệu
PBS/0,1%BSA + PBS	303	293	312
C10-2 3ng/ml+ PBS	1881	1890	1871
C10-2 10ng/ml+ PBS	5721	5863	5579
C10-2 30ng/ml+ PBS	11922	12044	11799
C10-2 100ng/ml+ PBS	21833	21925	21741
C10-2 300ng/ml+ PBS	30410	30311	30508
C10-2 1000ng/ml+ PBS	38524	38233	38814
C10-2 10000ng/ml+ PBS	51171	51253	51089

Bảng 6C

dòng vô tính của chuột PHF 13,

+ peptit tau, 10 μ M

	trung bình		
	Tín hiệu	tín hiệu	tín hiệu
PBS/0,1%BSA	287	286	287
PHF 13 1000000	280	284	276
PHF 13 300000	299	305	292
PHF 13 100000	355	370	340
PHF 13 30000	481	472	490
PHF 13 10000M	953	1019	886
PHF 13 3000	2182	2279	2084
PHF 13 1000	6896	7542	6249

Bảng 6D

dòng vô tính của chuột PHF 13,

 $\pm$ PBS/ 0,1% BSA

	trung bình		
	Tín hiệu	tín hiệu	tín hiệu
PBS/0,1%BSA + PBS	281	282	280
PHF 13 1000000+ PBS	335	358	312
PHF 13 300000+ PBS	560	568	551
PHF 13 100000+ PBS	852	856	847
PHF 13 30000+ PBS	1579	1661	1496
PHF 13 10000+ PBS	2882	2899	2864
PHF 13 3000+ PBS	5792	6126	5458
PHF 13 1000+ PBS	12639	13654	11624

Bảng 6A-6D:Ức chế bất kháng nguyên Tau

Viện dẫn đến danh mục trình tự

Đơn này bao gồm một hoặc nhiều Danh mục trình tự theo Điều 37 C.F.R. 1.821 và tiếp theo, được bộc lộ ở phương tiện đọc được bằng máy tính (tên tập tin: 0995.txt, tạo ngày 23 tháng sáu 2016, và có kích thước bằng 40 kB), tập tin này được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử globulin miễn dịch có khả năng liên kết đặc hiệu miễn dịch với biến thể được hyperphosphoryl hóa của protein tau của người (SEQ ID NO:33), trong đó phosphoserin ở vị trí 396 của tau là cần thiết cho sự liên kết, trong đó phân tử globulin miễn dịch này là kháng thể đơn dòng hoặc đoạn liên kết epitop của nó, và trong đó sự phosphoryl hóa S₄₀₄ của tau về cơ bản là không gia tăng sự liên kết, trong đó kháng thể đơn dòng hoặc đoạn liên kết epitop của nó bao gồm:
 - (a) CDR1 chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:9;
 - (b) CDR2 chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:10;
 - (c) CDR3 chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:11;
 - (d) CDR1 chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:12;
 - (e) CDR2 chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:13; và
 - (f) CDR3 chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:14.
2. Phân tử globulin miễn dịch theo điểm 1, trong đó phân tử globulin miễn dịch này là kháng thể đơn dòng hoặc kháng thể đặc hiệu kép, có vùng Fc.
3. Phân tử globulin miễn dịch theo điểm 1, trong đó phân tử globulin miễn dịch này là đoạn liên kết epitop của kháng thể đơn dòng được chọn từ nhóm bao gồm: đoạn Fv, đoạn Fv được dung hợp với vùng Fc, đoạn Fab, đoạn Fab', đoạn F(ab)₂, vùng biến đổi V_H đơn và vùng biến đổi V_L đơn.
4. Phân tử globulin miễn dịch theo điểm 1, trong đó kháng thể được người hóa.
5. Phân tử globulin miễn dịch theo điểm 1, trong đó kháng thể bao gồm:
 - (1) chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:15; hoặc
 - (2) chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:16; hoặc
 - (3) chuỗi nặng và chuỗi nhẹ này.
6. Phân tử globulin miễn dịch theo điểm 1, trong đó phân tử globulin miễn dịch có khả năng liên kết đặc hiệu miễn dịch với biến thể được hyperphosphoryl hóa của protein tau của người (SEQ ID NO:33) này có tính chọn lọc với mô típ axit amin của protein tau được hyperphosphoryl hóa có trình tự:

-Y - K - S(được phosphoryl hóa) - P -

trong đó Y là tyrosin, K là lysin, P là prolin và S(được phosphoryl hóa) là serin với chuỗi bên hydroxyl được phosphoryl hóa.

7. Phân tử globulin miễn dịch theo điểm 1, trong đó phân tử này còn bao gồm gốc để làm tăng chu kỳ bán rã in vivo của phân tử này.

8. Phân tử globulin miễn dịch theo điểm 1, trong đó kháng thể được làm cho kháng đoạn peptit được phosphoryl hóa hai lần của biến thể được hyperphosphoryl hóa của protein tau của người (SEQ ID NO: 33) bao gồm ít nhất 18 gốc axit amin liên tiếp của peptit:

TDHGAEIVYK^(p)SPVVS GDT^(p)SPRHL (SEQ ID NO:37).

9. Phân tử globulin miễn dịch theo điểm 1, trong đó kháng thể biểu hiện tính đặc hiệu đối với protein tau được hyperphosphoryl hóa từ bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer hoặc tau bệnh Alzheimer ít nhất lớn hơn 50 lần so với tau từ đối chứng khỏe mạnh ngang tuổi.

10. Phân tử globulin miễn dịch theo điểm 1, trong đó kháng thể là kháng thể đơn dòng được biểu hiện bằng khối tế bào lai mà được phân lập bằng cách sàng lọc khối tế bào lai với protein tau bệnh lý và không bệnh lý của người để phân lập dòng vô tính mà:

i) đặc hiệu miễn dịch đối với phospho-epitop S396; và

ii) nhận diện đặc hiệu tau được hyperphosphoryl hóa từ não của người mắc bệnh Alzheimer;

trong đó kháng thể đơn dòng hoặc đoạn liên kết epitop của nó có khả năng phân biệt giữa protein tau bệnh lý và không bệnh lý của người.

11. Phân tử globulin miễn dịch theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của nó được dán nhãn phát hiện được.

12. Phân tử globulin miễn dịch theo điểm 11, trong đó nhãn phát hiện được là nhãn huỳnh quang, nhãn phát quang hóa học, nhãn thuận từ, nhãn đồng vị phóng xạ hoặc nhãn enzym.

13. Dược phẩm bao gồm phân tử globulin miễn dịch theo điểm 1 và chất mang được dùng.

14. Axit nucleic mã hóa phân tử globulin miễn dịch theo điểm 1.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> H. Lundbeck A/S
 <120> PHÂN TỬ GLOBULIN MIỄN DỊCH CÓ KHẢ NĂNG LIÊN KẾT ĐẶC HIỆU MIỄN DỊCH VỚI BIỂN THỂ ĐƯỢC HYPERPHOSPHORYL HÓA CỦA PROTEIN TAU CỦA NGƯỜI VÀ ĐƯỢC PHÂN CHỨA PHÂN TỬ GLOBULIN MIỄN DỊCH NÀY
 <130> 0995-WO-PCT
 <160> 37
 <170> PatentIn phiên bản 3.5
 <210> 1
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> CDR 1 Chuỗi nhẹ D1.2
 <400> 1
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15
 <210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> CDR 2 Chuỗi nhẹ D1.2
 <400> 2
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5
 <210> 3
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> CDR 3 Chuỗi nhẹ D1.2
 <400> 3
 Ser Gln Ser Thr His Val Pro
 1 5
 <210> 4
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> CDR 1 Chuỗi nặng D1.2
 <400> 4
 Lys Ala Ser Gly Asn Thr Phe Thr Asp Tyr Glu Ile His
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> CDR 2 Chuỗi nặng D1.2
 <400> 5
 Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> CDR 3 Chuỗi nặng D1.2
 <400> 6

Ser Arg Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 7

<211> 219

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ D1.2

<400> 7

Asp Val Met Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp His Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Phe Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
180 185 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215

<210> 8

<211> 451

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng D1.2

<400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Asn Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Glu Ile His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Arg Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Ser Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser
 145 150 155 160
 Leu Ser Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser Gly Leu
 165 170 175
 Tyr Thr Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser
 180 185 190
 Gln Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Thr Val
 195 200 205
 Asp Lys Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Pro Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu
 260 265 270
 Asp Asp Pro Asp Val Arg Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val
 275 280 285
 His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile
 325 330 335
 Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Ile Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu
 370 375 380
 Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asp Ile
 405 410 415
 Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg
 420 425 430
 His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 450
 <210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> CDR 1 Chuỗi nhẹ C10.2
 <400> 9
 Gln Ala Ser Gln Gly Thr Ser Ile Asn Leu Asn
 1 5 10
 <210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> CDR 2 Chuỗi nhẹ C10.2
 <400> 10
 Gly Ala Ser Asn Leu Glu Asp
 1 5

```

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> CDR 3 Chuỗi nhẹ C10.2
<400> 11
Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro
1 5
<210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> CDR1 chuỗi nặng C10.2
<400> 12
Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg Thr Ile His
1 5 10
<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> CDR 2 Chuỗi nặng C10.2
<400> 13
Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> CDR 3 Chuỗi nặng C10.2
<400> 14
Arg Gly Ala Met Asp Tyr
1 5
<210> 15
<211> 214
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> Chuỗi nhẹ C10.2
<400> 15
Asp Val Gln Met Ile Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Ile Val Thr Met Thr Cys Gln Ala Ser Gln Gly Thr Ser Ile Asn
20 25 30
Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Asp
65 70 75 80
Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110
Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
115 120 125

```

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
 130 135 140
 Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
 145 150 155 160
 Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
 180 185 190
 Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210
 <210> 16
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nặng C10.2
 <400> 16
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg
 20 25 30
 Thr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser
 145 150 155 160
 Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu
 165 170 175
 Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser
 180 185 190
 Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val
 195 200 205
 Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys
 210 215 220
 Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 225 230 235 240
 Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val
 245 250 255
 Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp
 260 265 270
 Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 275 280 285
 Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp
 290 295 300
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe
 305 310 315 320
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys

```

          325          330          335
Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys
          340          345          350
Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp
          355          360          365
Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys
          370          375          380
Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser
385          390          395          400
Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr
          405          410          415
Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser
          420          425          430
Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
          435
<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> CDR 1 Chuỗi nhẹ C5.2
<400> 17
Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Asn Leu Asn
1          5          10
<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> CDR 2 Chuỗi nhẹ C5.2
<400> 18
Gly Ala Ser Asn Leu Glu Asp
1          5
<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> CDR 3 Chuỗi nhẹ C5.2
<400> 19
Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro
1          5
<210> 20
<211> 13
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> CDR1 chuỗi nặng C5.2
<400> 20
Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg Thr Ile His
1          5          10
<210> 21
<211> 17
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> CDR 2 Chuỗi nặng C5.2
<400> 21
Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Asn Asp Asn Phe Lys
1          5          10          15

```

Gly
 <210> 22
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> CDR 3 Chuỗi nặng C5.2
 <400> 22
 Arg Gly Thr Met Asp Tyr
 1 5
 <210> 23
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nhẹ C5.2
 <400> 23
 Asp Val Gln Met Ile Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Ile Val Thr Met Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Asn
 20 25 30
 Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Asp
 65 70 75 80
 Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
 100 105 110
 Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
 115 120 125
 Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
 130 135 140
 Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
 145 150 155 160
 Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
 180 185 190
 Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210
 <210> 24
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nặng C5.2
 <400> 24
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg
 20 25 30
 Thr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Asn Asp Met Phe
 50 55 60

Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser
 145 150 155 160
 Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu
 165 170 175
 Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser
 180 185 190
 Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val
 195 200 205
 Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys
 210 215 220
 Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 225 230 235 240
 Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val
 245 250 255
 Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp
 260 265 270
 Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 275 280 285
 Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp
 290 295 300
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe
 305 310 315 320
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys
 325 330 335
 Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys
 340 345 350
 Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp
 355 360 365
 Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys
 370 375 380
 Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser
 385 390 395 400
 Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr
 405 410 415
 Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser
 420 425 430
 Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435
 <210> 25
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> CDR 1 Chuỗi nhẹ C8.3
 <400> 25
 Gln Ala Ser Gln Gly Thr Ser Ile Asn Leu Asn
 1 5 10
 <210> 26
 <211> 7
 <212> PRT

```

<213> Nhân tạo
<220>
<223> CDR 2 Chuỗi nhẹ C8.3
<400> 26
Gly Ser Ser Asn Leu Glu Asp
1 5
<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> CDR 3 Chuỗi nhẹ C8.3
<400> 27
Leu Gln His Ser Tyr Leu Pro
1 5
<210> 28
<211> 13
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> CDR1 chuỗi nặng C8.3
<400> 28
Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg Thr Ile His
1 5 10
<210> 29
<211> 17
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> CDR 2 Chuỗi nặng C8.3
<400> 29
Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 30
<211> 6
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> CDR 3 Chuỗi nặng C8.3
<400> 30
Arg Gly Ala Met Asp Tyr
1 5
<210> 31
<211> 214
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> Chuỗi nhẹ C8.3
<400> 31
Asp Val Gln Met Ile Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Ile Val Thr Met Thr Cys Gln Ala Ser Gln Gly Thr Ser Ile Asn
20 25 30
Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Ser Ser Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Asp
65 70 75 80

```

Glu	Asp	Met	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Leu	Gln	His	Ser	Tyr	Leu	Pro	Phe
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Asp	Ala	Ala
			100					105					110		
Pro	Thr	Val	Ser	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Gln	Leu	Thr	Ser	Gly
		115					120					125			
Gly	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Phe	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Lys	Asp	Ile
	130					135					140				
Asn	Val	Lys	Trp	Lys	Ile	Asp	Gly	Ser	Glu	Arg	Gln	Asn	Gly	Val	Leu
145				150						155					160
Asn	Ser	Trp	Thr	Asp	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Met	Ser
				165					170					175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Lys	Asp	Glu	Tyr	Glu	Arg	His	Asn	Ser	Tyr
			180					185					190		
Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	His	Lys	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro	Ile	Val	Lys	Ser
		195					200					205			
Phe	Asn	Arg	Asn	Glu	Cys										
	210														
<210>	32														
<211>	439														
<212>	PRT														
<213>	Nhân tạo														
<220>															
<223>	Chuỗi nặng C8.3														
<400>	32														
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Asp	Ala	Glu	Leu	Val	Asn	Pro	Gly	Ala
1			5						10					15	
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Arg
			20					25					30		
Thr	Ile	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Glu	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Asn	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
65				70					75						80
Met	Gln	Leu	Asn	Ser	Leu	Ala	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
			85						90					95	
Ala	Arg	Arg	Gly	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr
			100					105					110		
Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro
		115					120					125			
Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn	Ser	Met	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val
	130					135					140				
Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser
145				150						155					160
Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser		

```

      275      280      285
Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp
 290      295      300
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe
305      310      315      320
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys
      325      330      335
Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys
      340      345      350
Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp
      355      360      365
Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys
      370      375      380
Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser
385      390      395      400
Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr
      405      410      415
Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser
      420      425      430
Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
      435
<210> 33
<211> 441
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> Tau No 33 của người
<400> 33
Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1      5      10      15
Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
      20      25      30
Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
      35      40      45
Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
      50      55      60
Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65      70      75      80
Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
      85      90      95
Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
      100      105      110
Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
      115      120      125
Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
      130      135      140
Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
145      150      155      160
Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
      165      170      175
Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
      180      185      190
Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
      195      200      205
Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
      210      215      220
Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
225      230      235      240
Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
      245      250      255

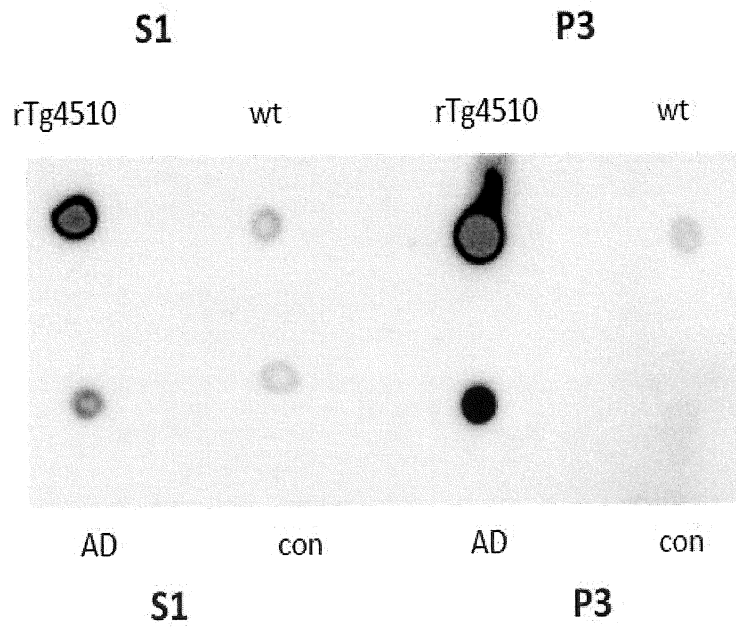
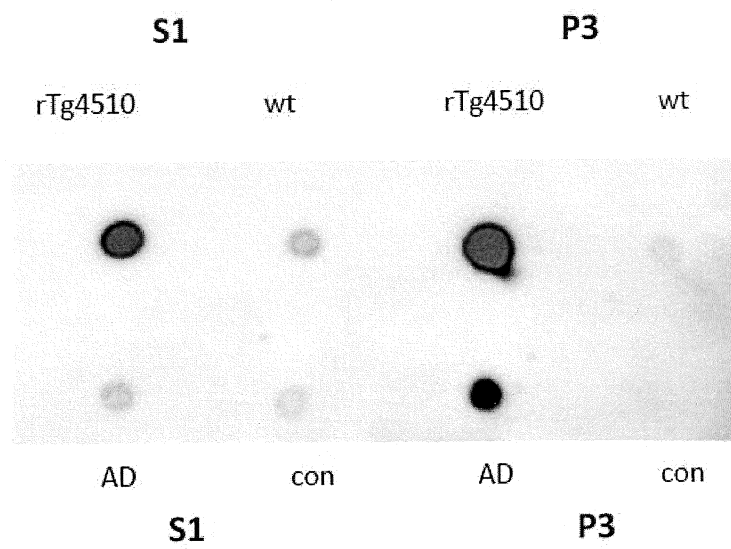
```

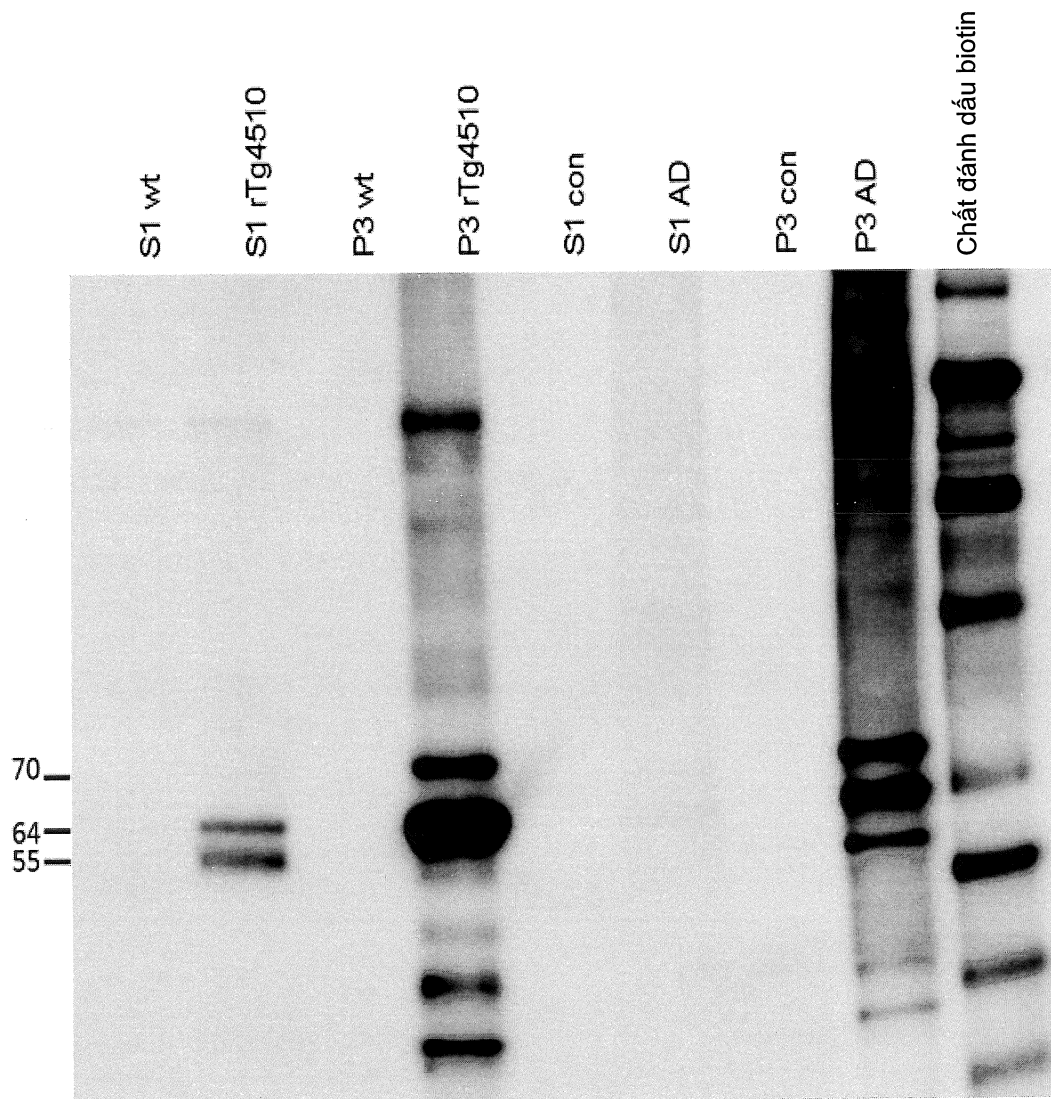
Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
 260 265 270
 Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
 275 280 285
 Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
 290 295 300
 Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
 305 310 315 320
 Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
 325 330 335
 Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
 340 345 350
 Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 355 360 365
 Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
 370 375 380
 Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
 385 390 395 400
 Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
 405 410 415
 Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
 420 425 430
 Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 435 440
 <210> 34
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nhẹ D1.2*
 <400> 34
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp His Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Phe Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125
 Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 145 150 155 160
 Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
 180 185 190
 Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
 195 200 205
 Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215
 <210> 35

<211> 444
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nặng hC10.2
 <400> 35

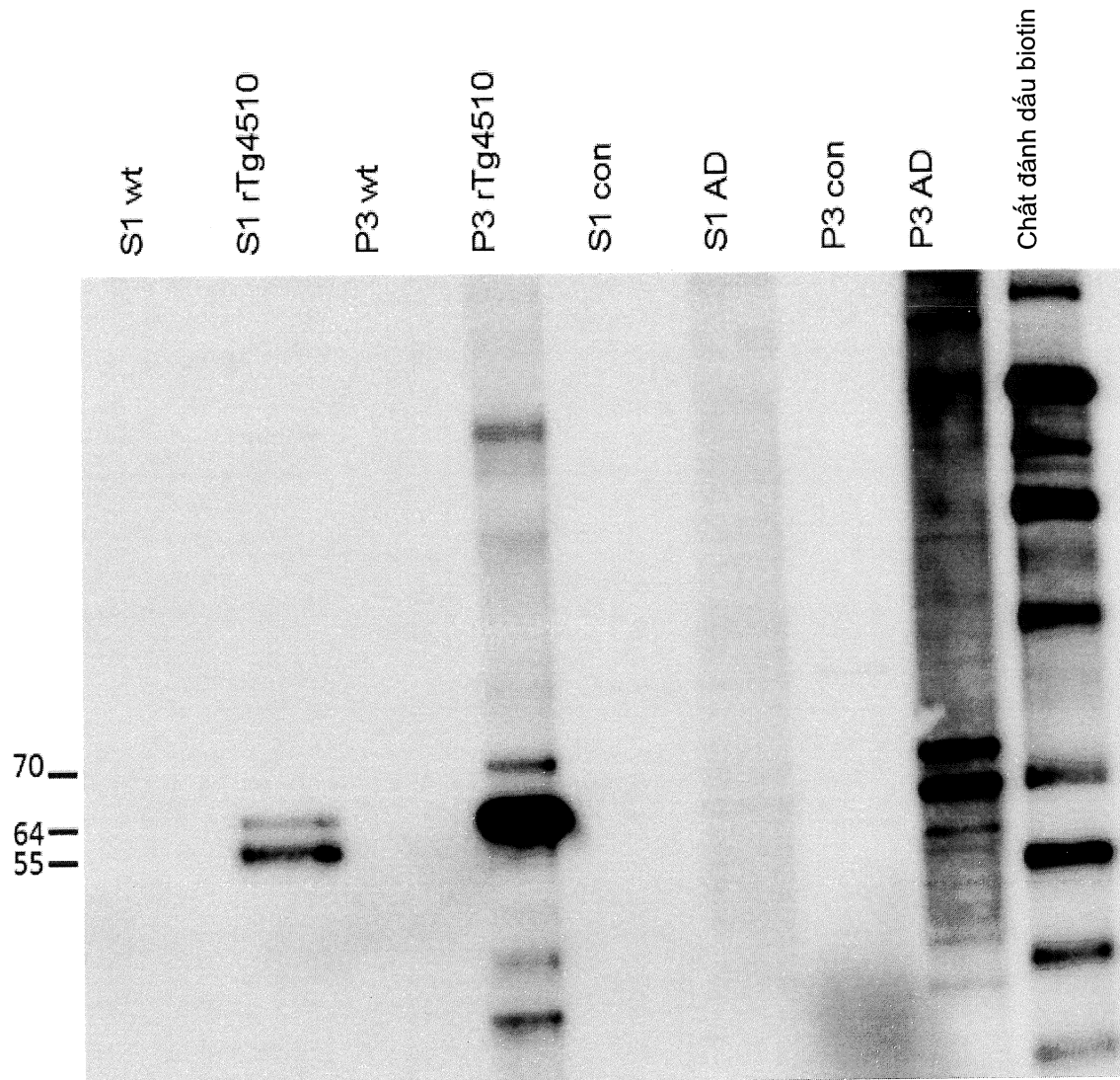
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	1	5	10	15
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Arg	20	25	30	
Thr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	35	40	45	
Gly	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Ser	Gln	Lys	Phe	50	55	60	
Gln	Gly	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Arg	Gly	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	100	105	110	
Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	115	120	125	
Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	130	135	140	
Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	145	150	155	160
Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	165	170	175	
Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	180	185	190	
Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	195	200	205	
Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	210	215	220	
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	225	230	235	240
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	245	250	255	
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	260	265	270	
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	275	280	285	
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	290	295	300	
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	305	310	315	320
Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	325	330	335	
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	340	345	350	
Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	355	360	365	
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	370	375	380	
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	385	390	395	400
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	405	410	415	
Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	420	425	430	

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440
 <210> 36
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> hC10.2 LC
 <400> 36
 Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Asn
 20 25 30
 Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Met Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 37
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Tau 386-408 với S396 và S404 được Phosphoryl hóa
 <400> 37
 Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly
 1 5 10 15
 Asp Thr Ser Pro Arg His Leu
 20

A**B****Hình 1**

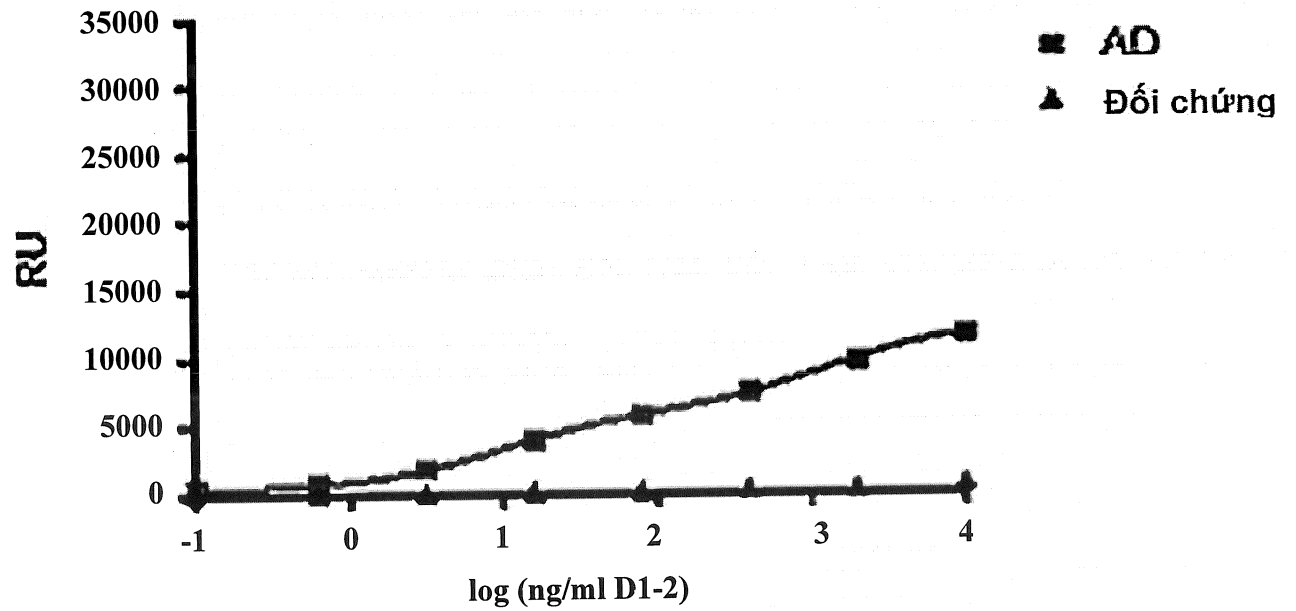


Hình 2A

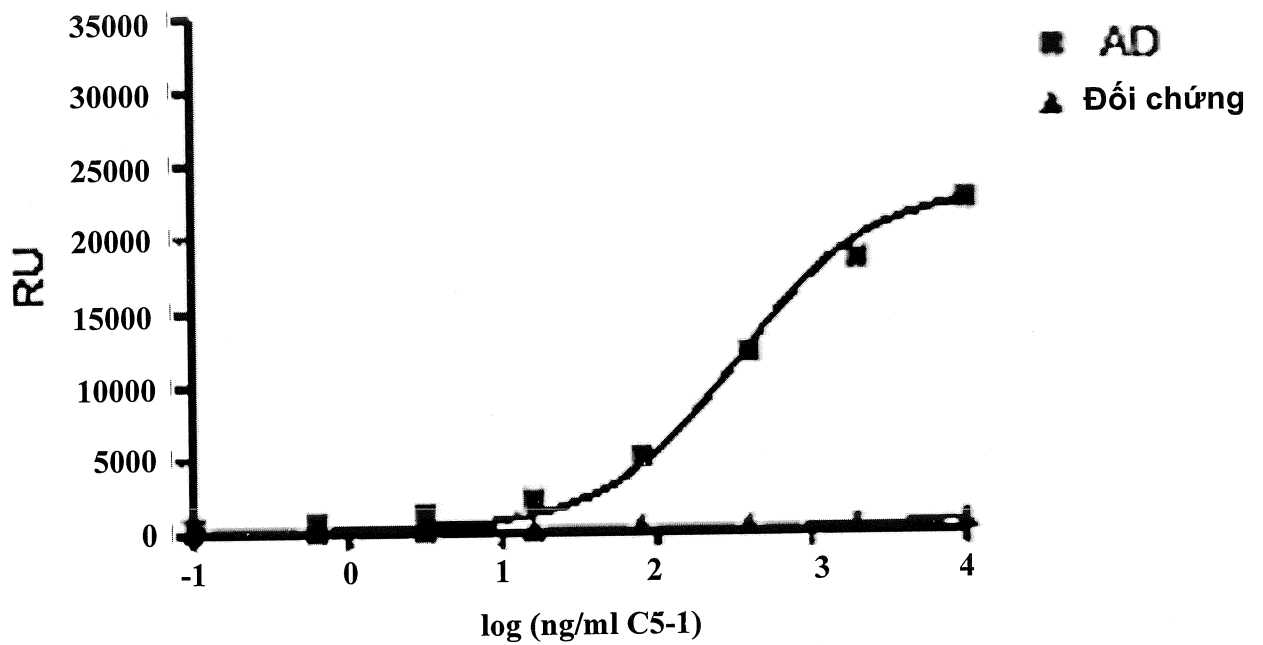


Hình 2B

A

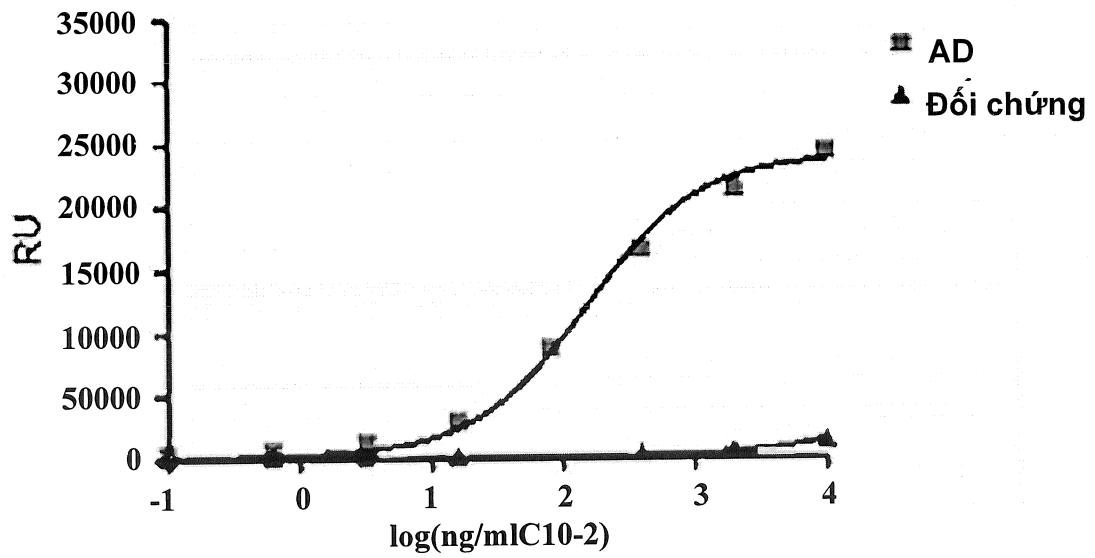


B

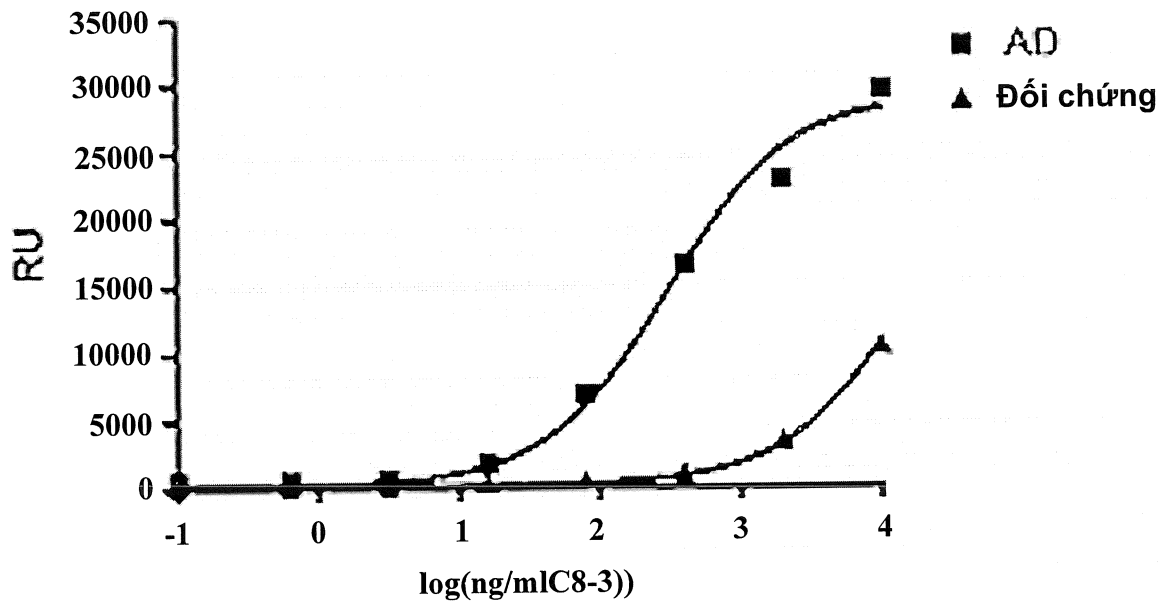


Hình 3A và 3B

C

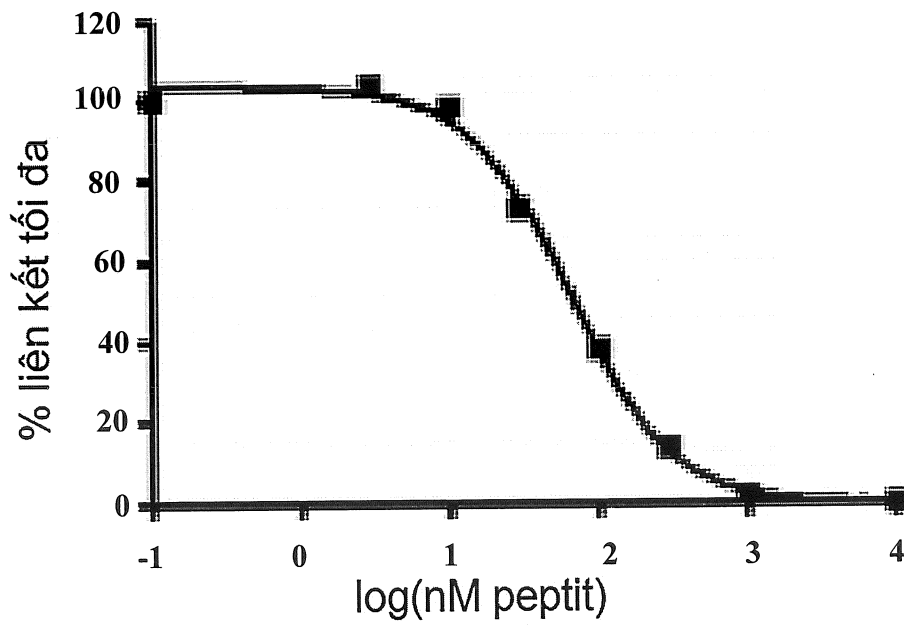


D

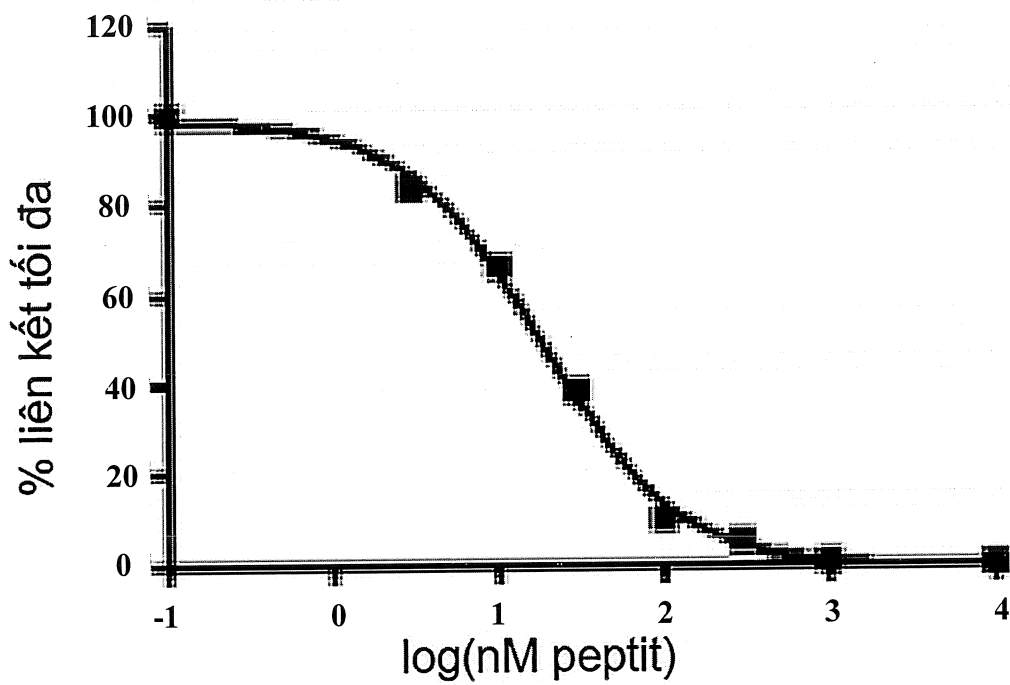


Hình 3C và 3D

A

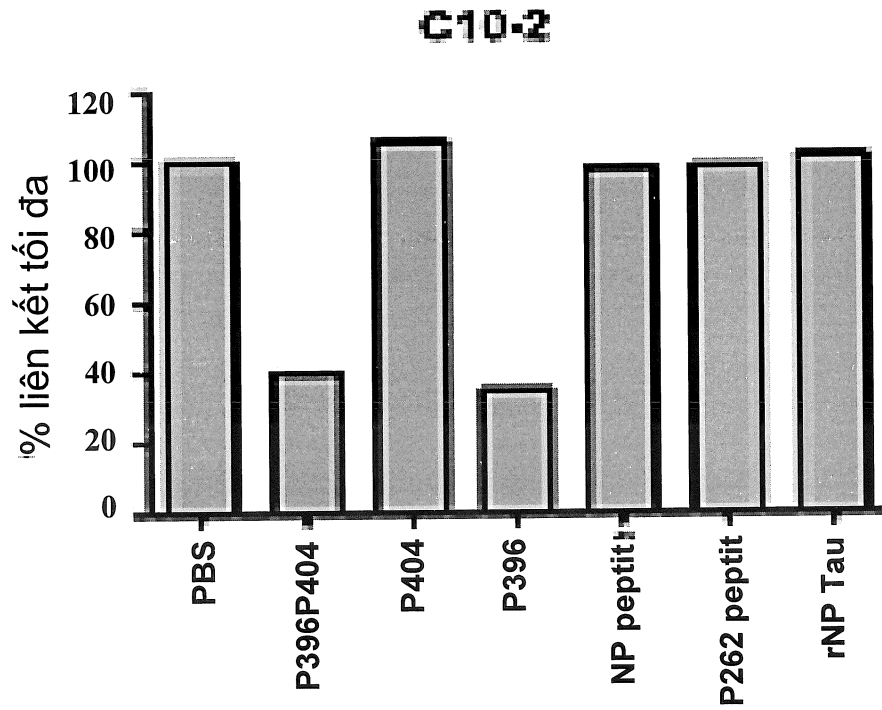


B



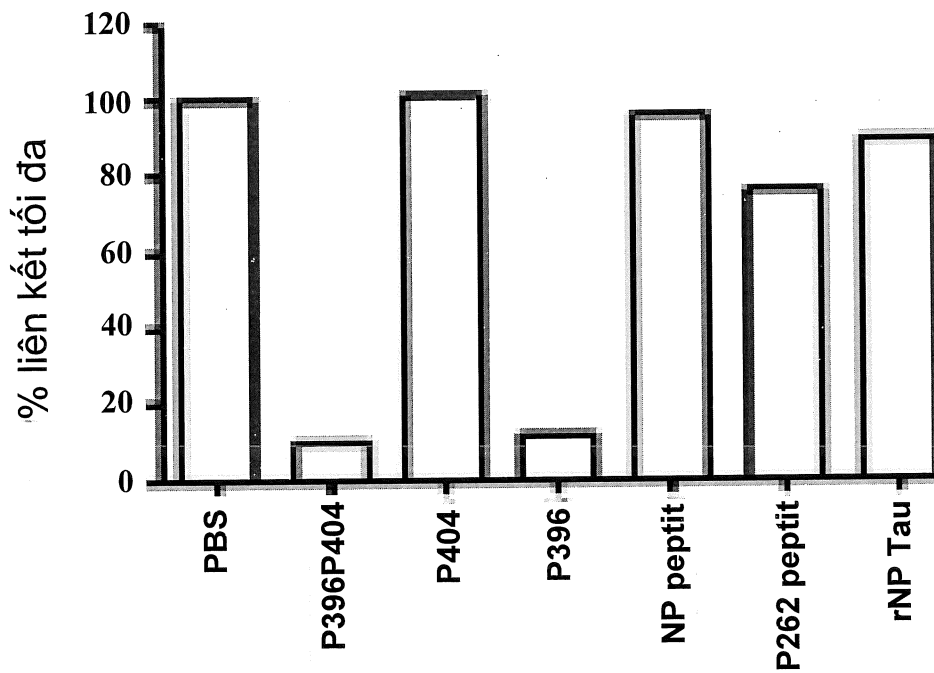
Hình 4A và 4B

C

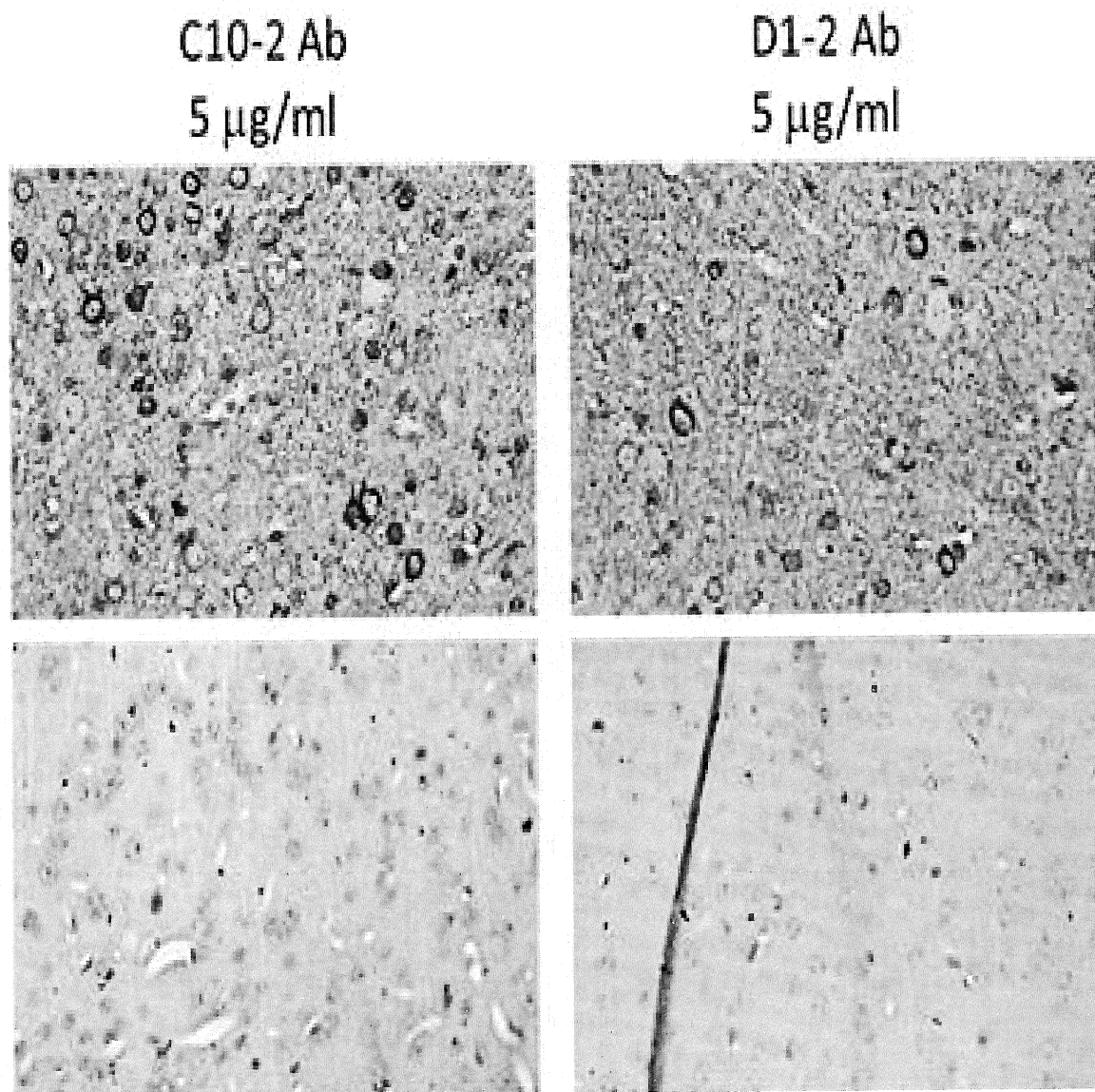


D

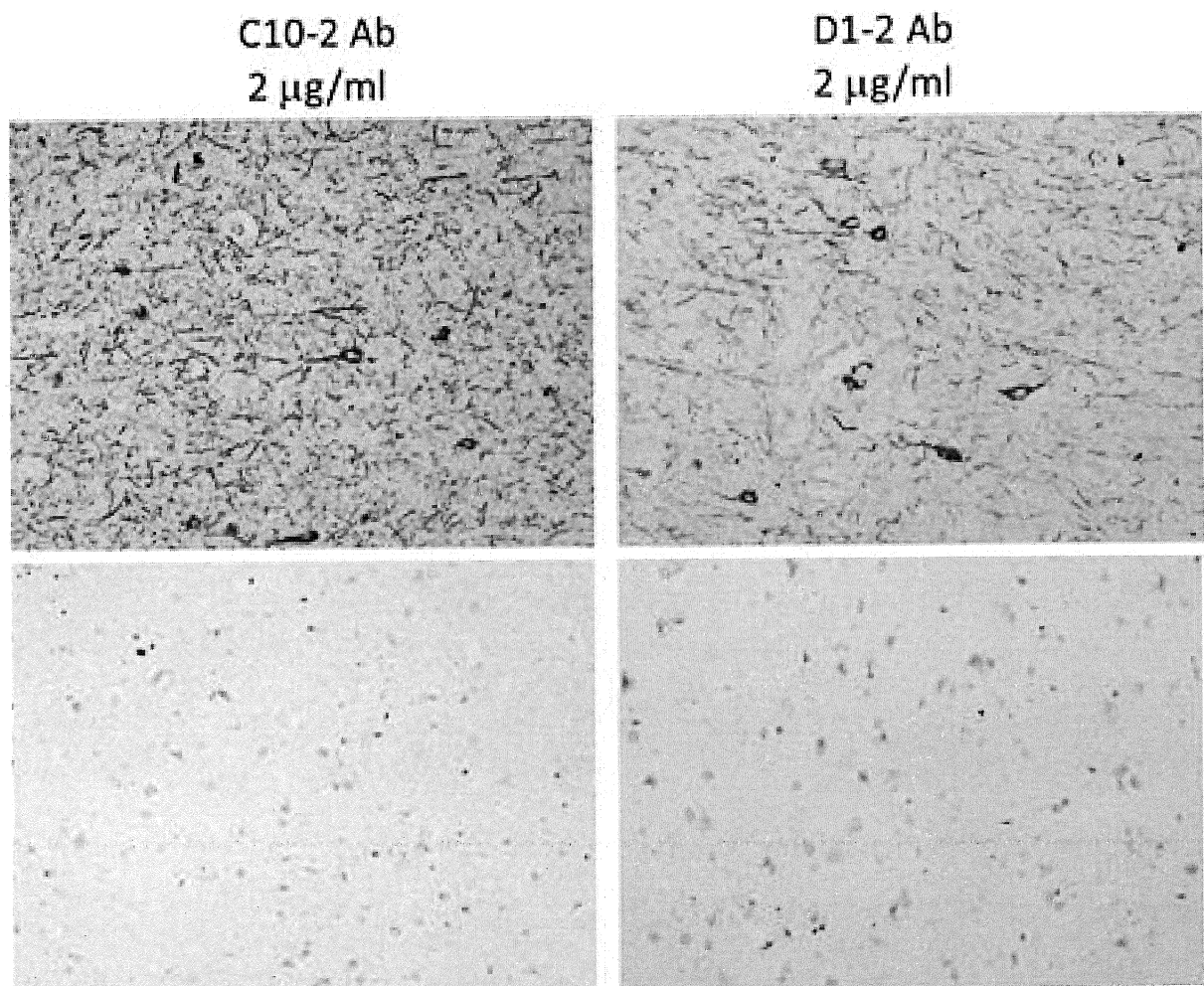
Peptit ức chế (100nM)



Hình 4C và 4D

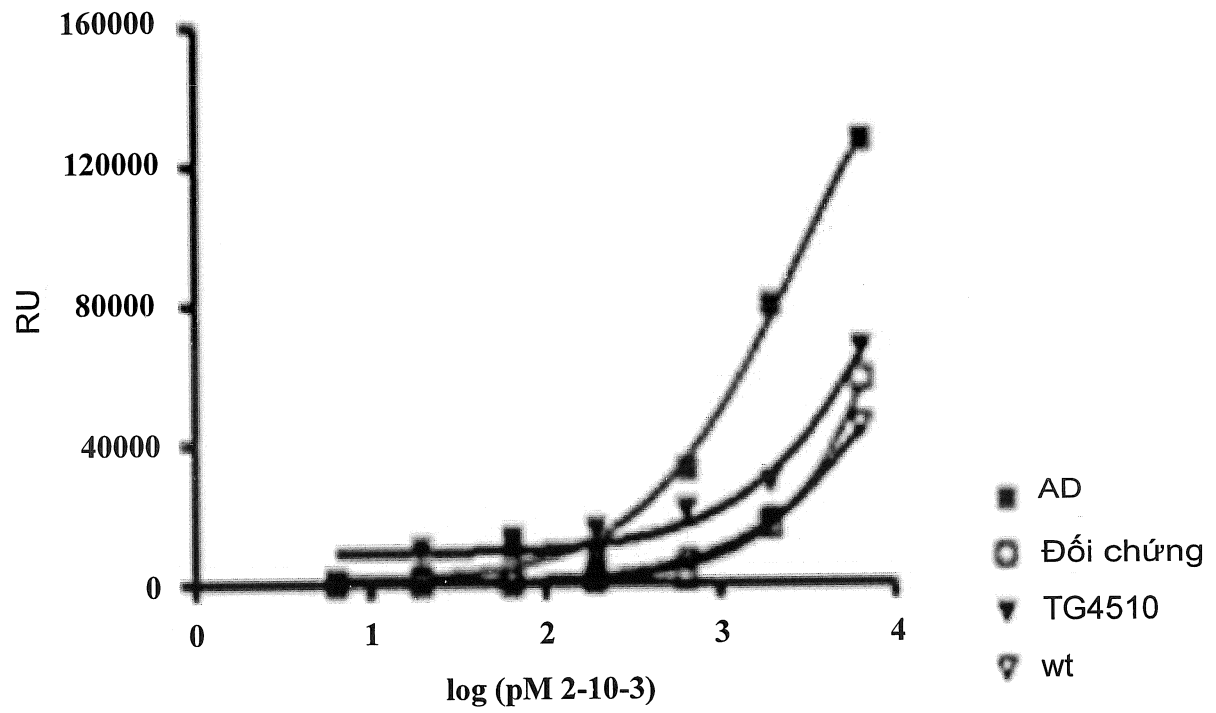


Hình 5A

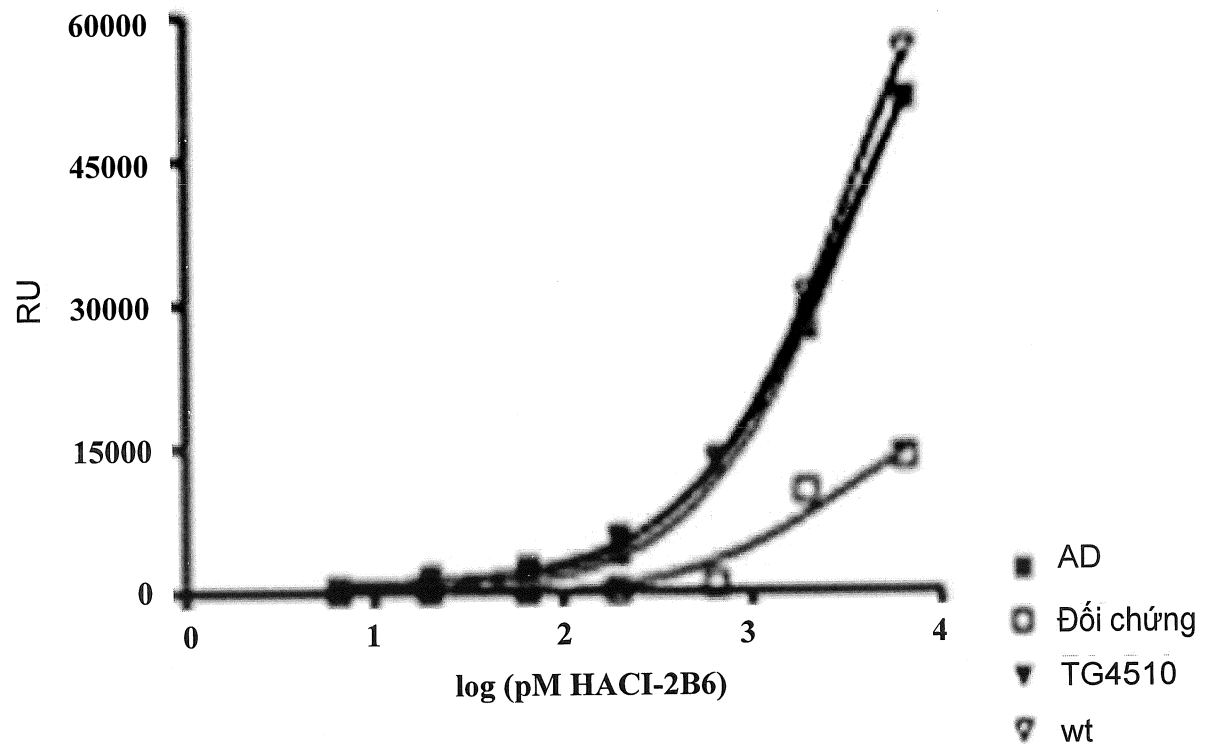


Hình 5B

A

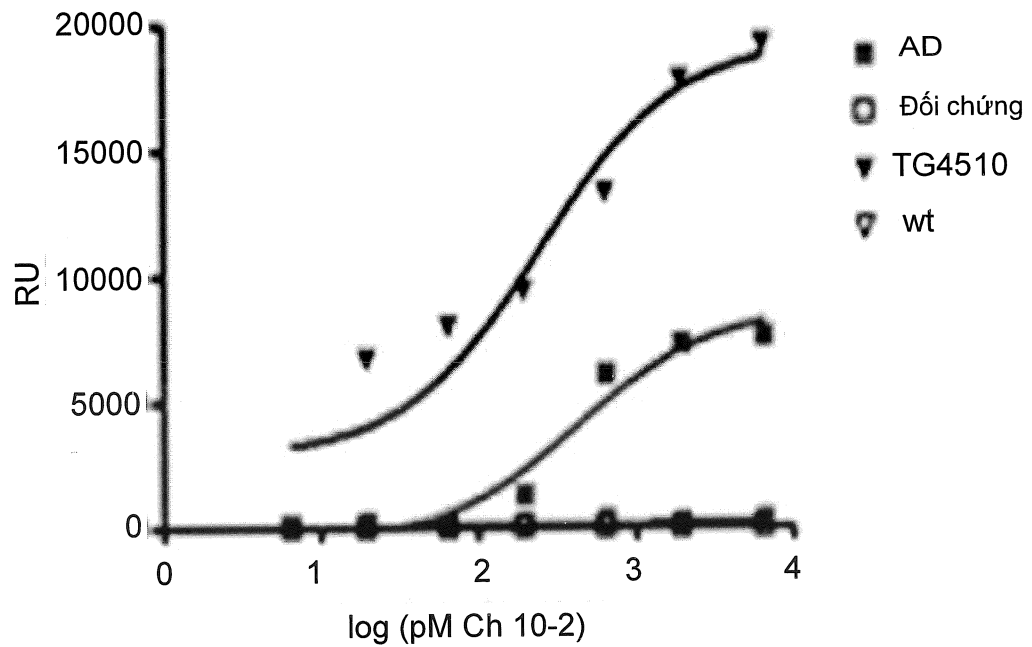


Hình 6A

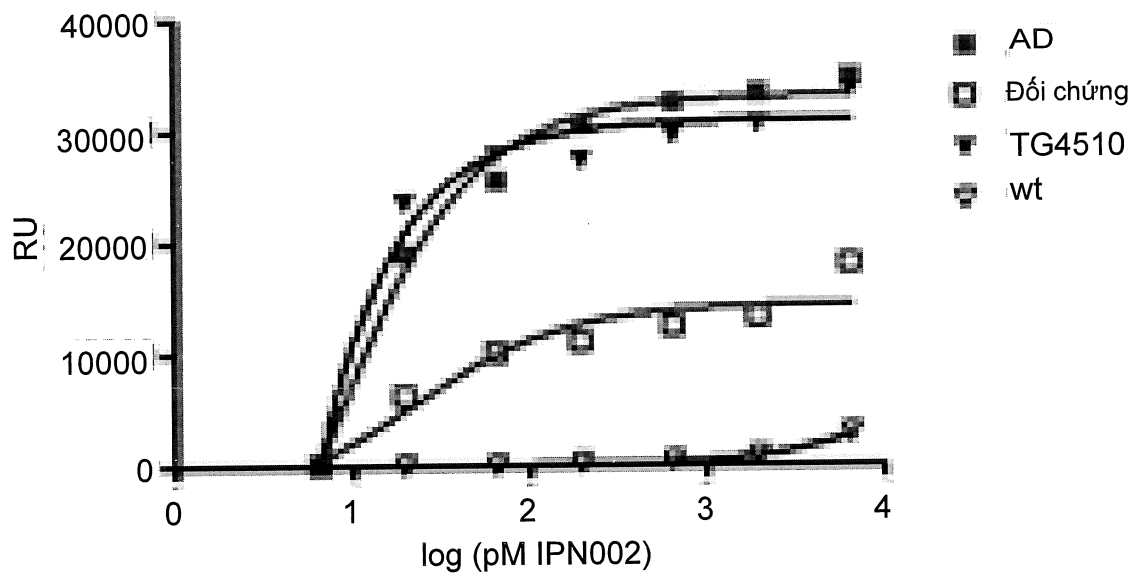


Hình 6B

C

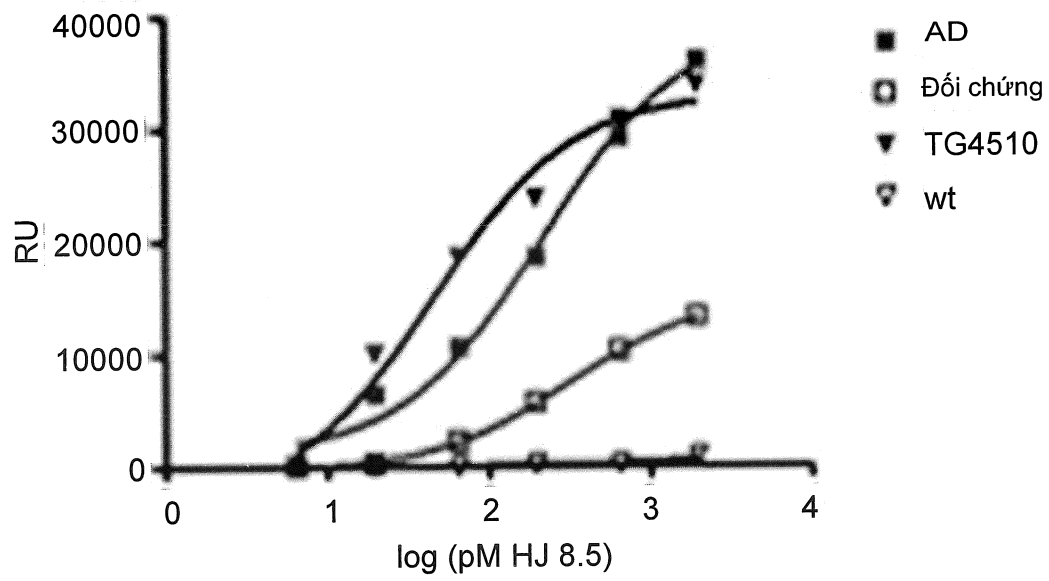


D



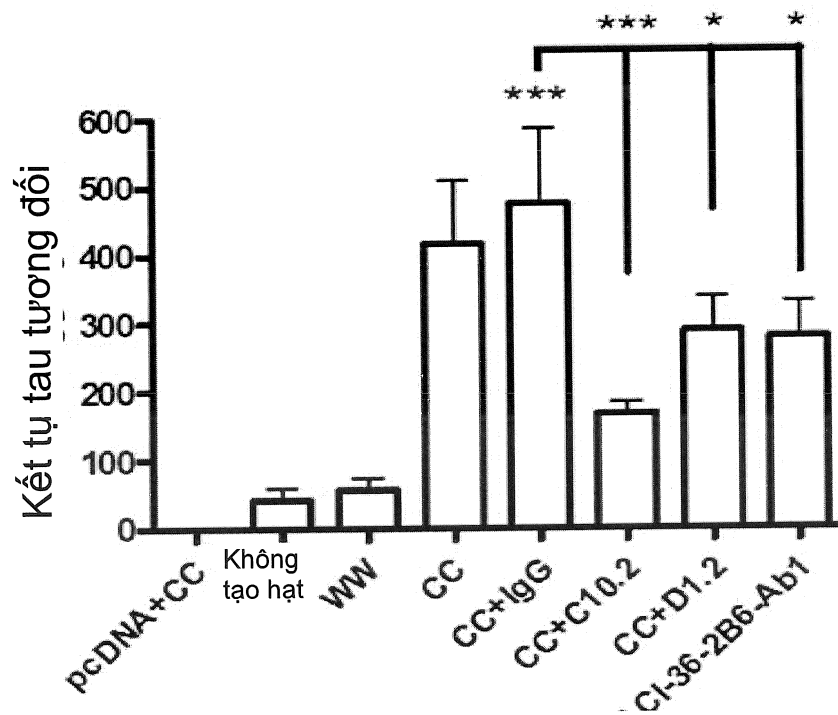
Hình 6C và 6D

E

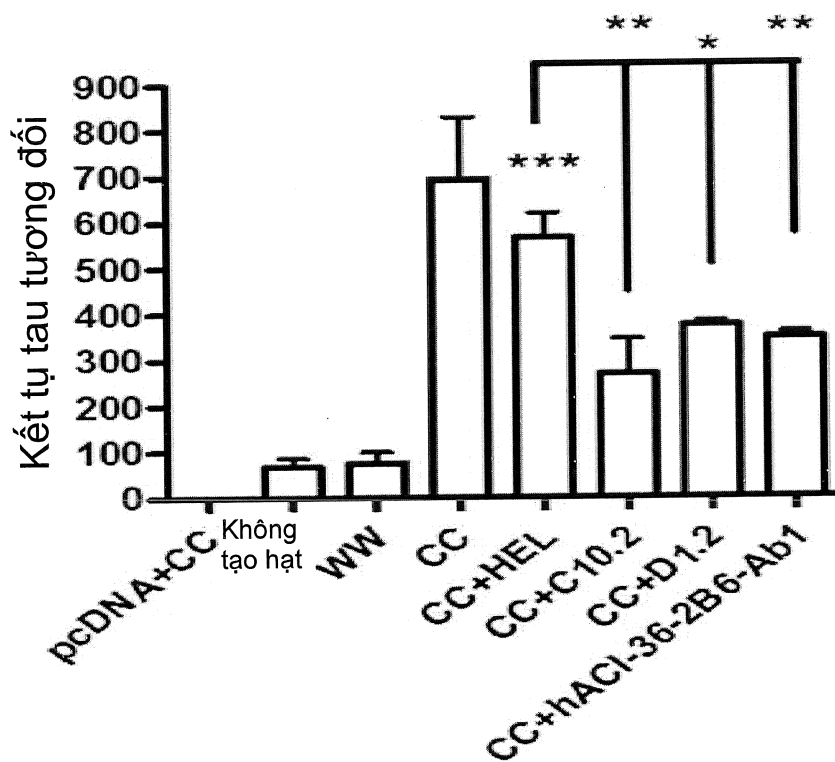


Hình 6E

A

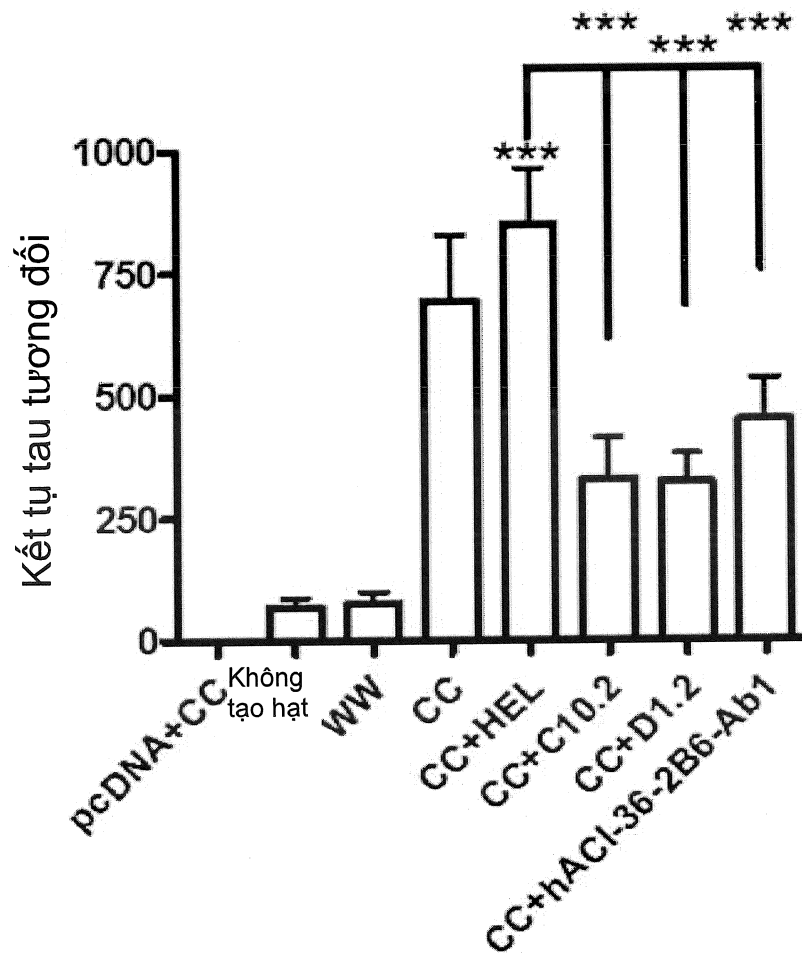


B



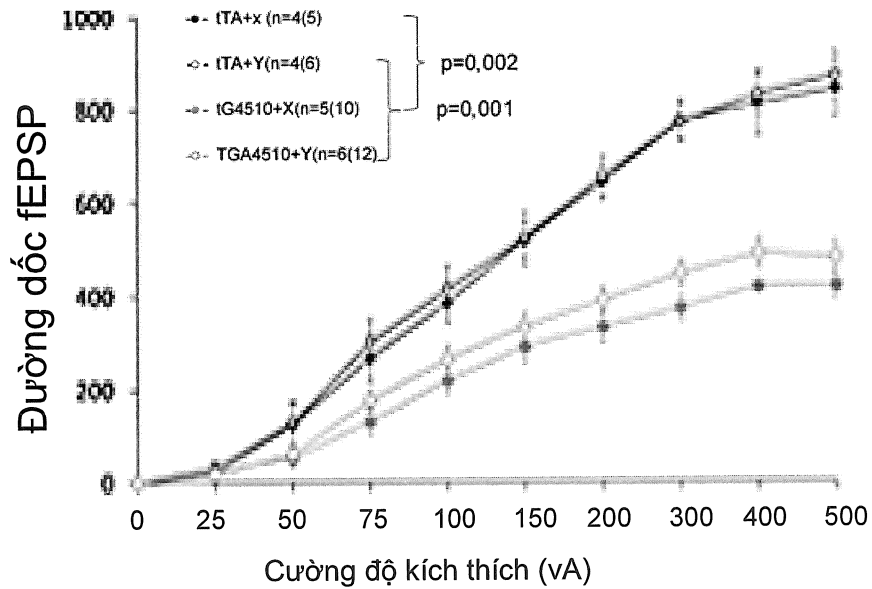
Hình 7A và 7B

C

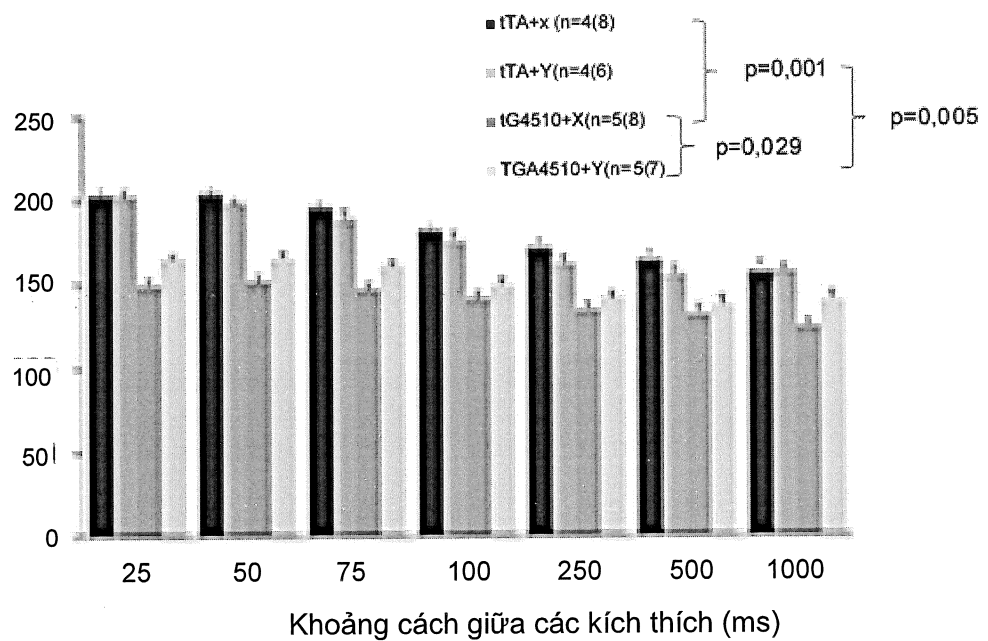


Hình 7C

A

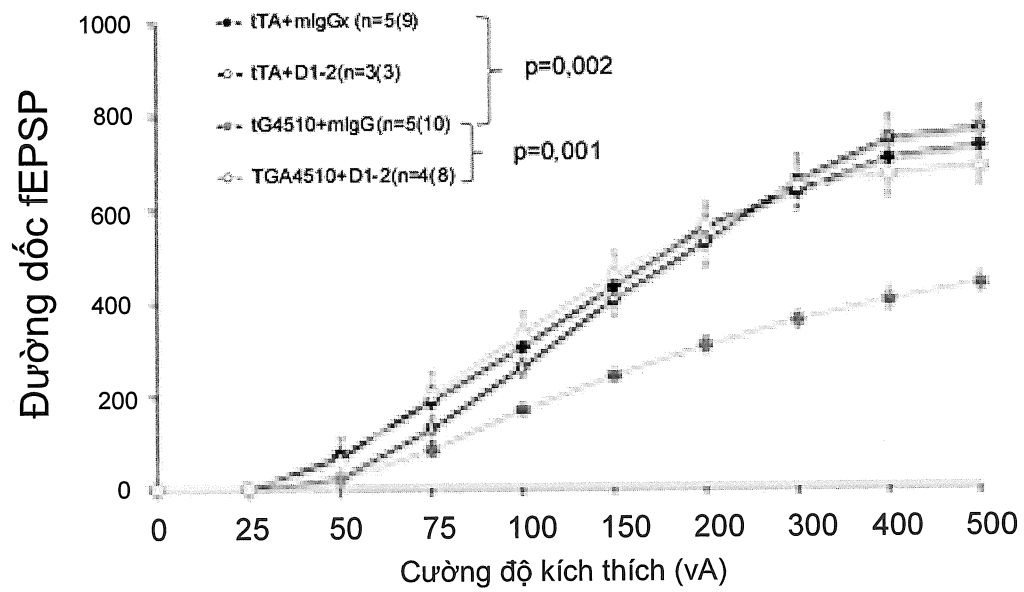


B

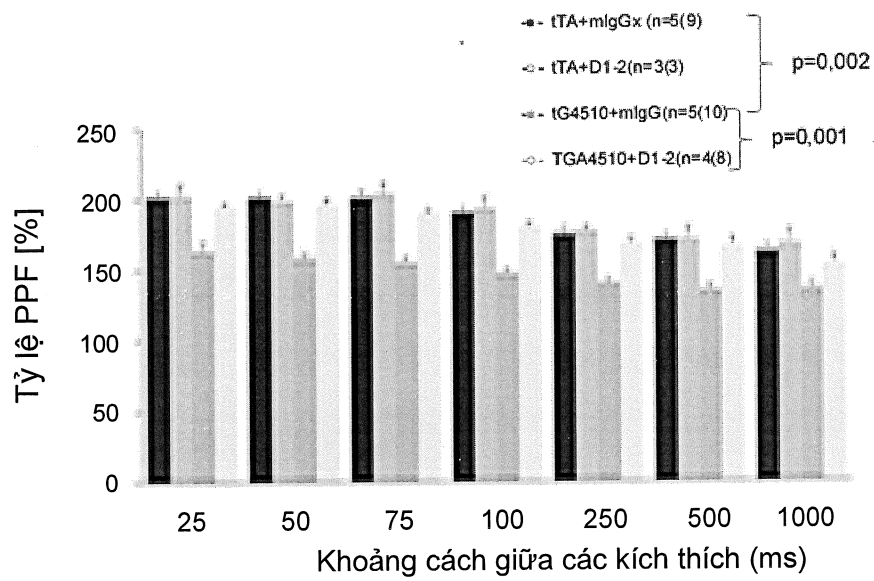


Hình 8A và 8B

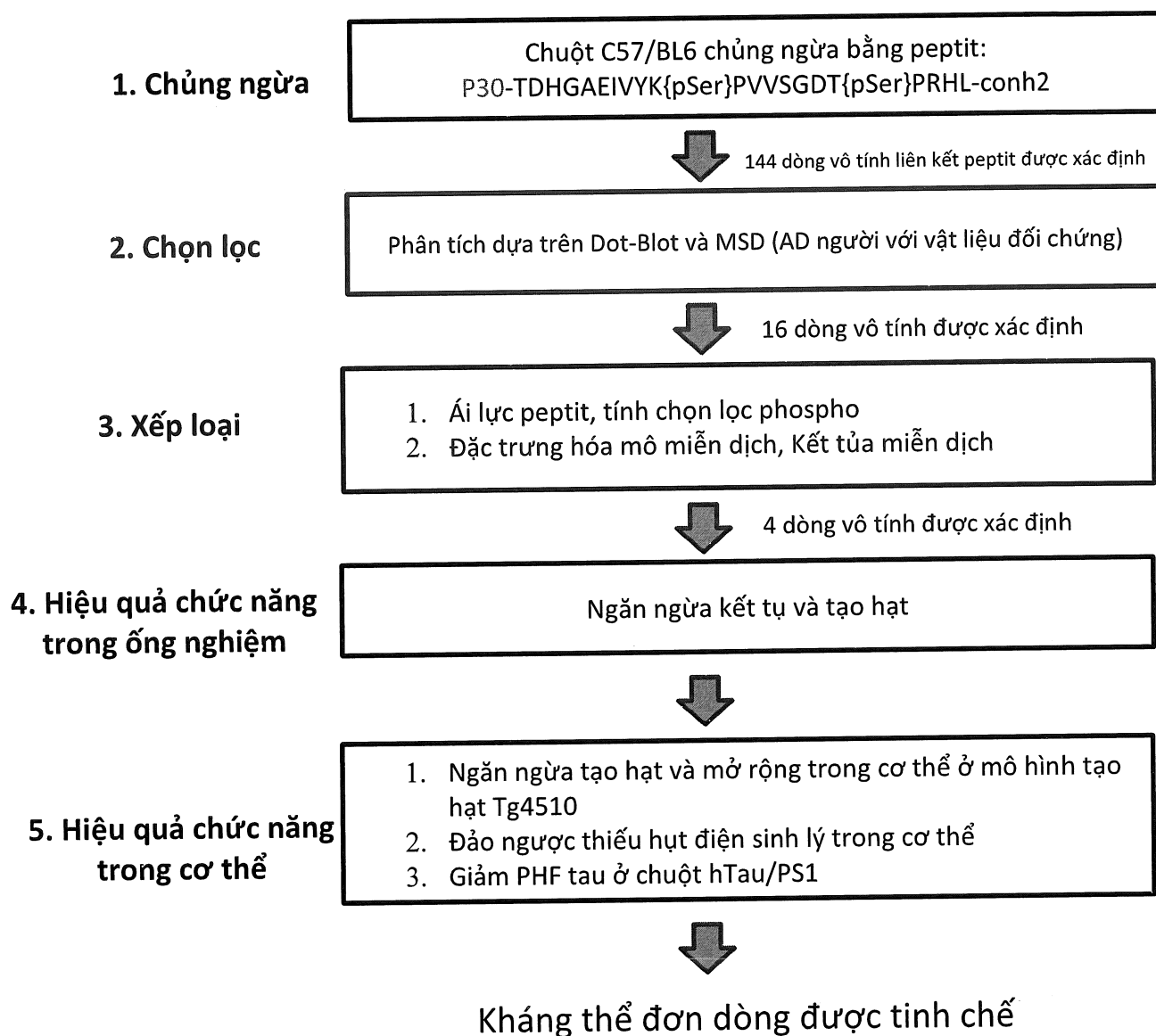
C



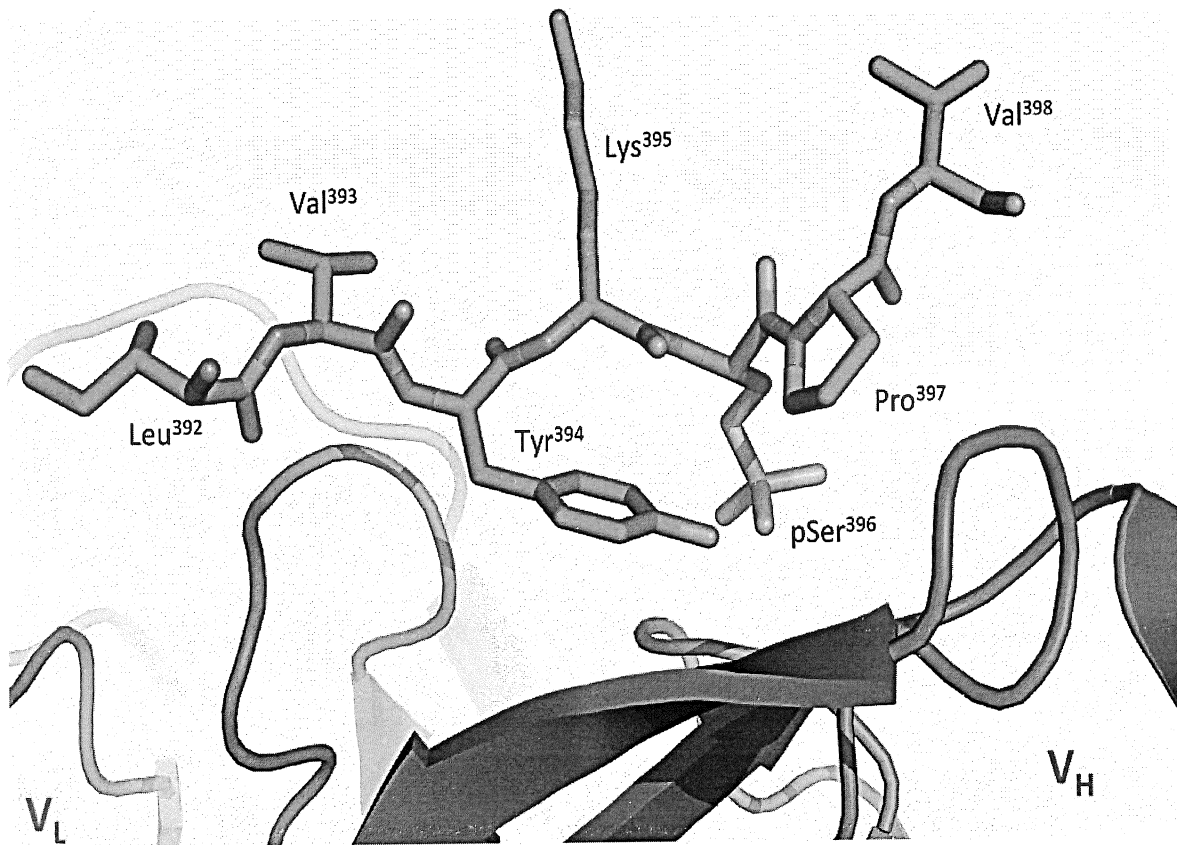
D



Hình 8C và 8D

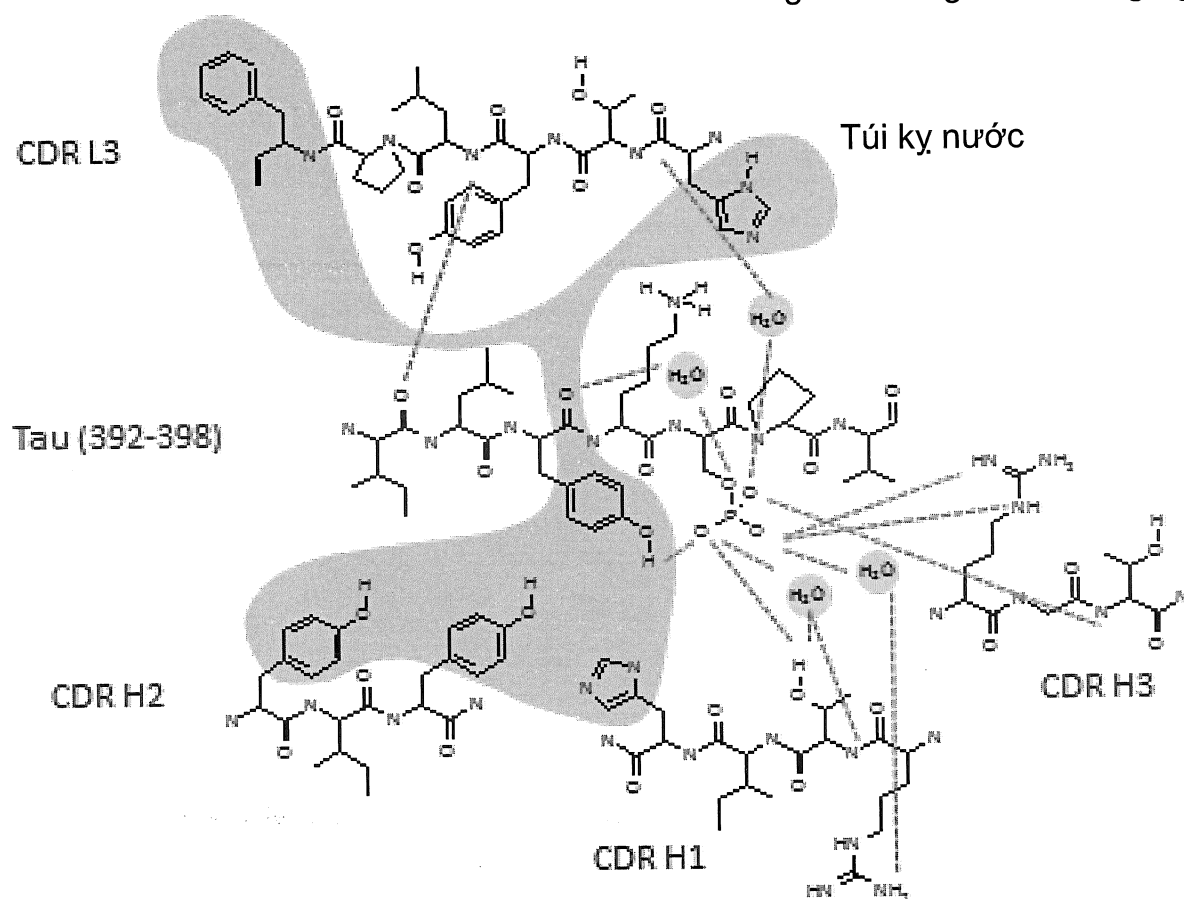


Hình 9



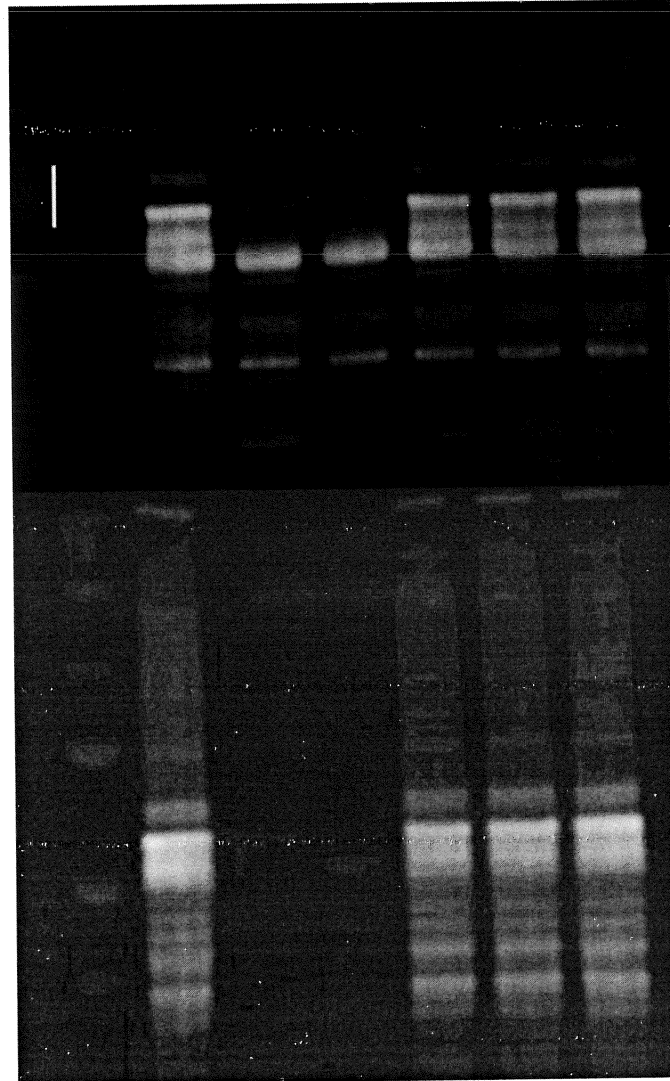
Hình 10

Tương tác kháng thể - kháng nguyên



Hình 11

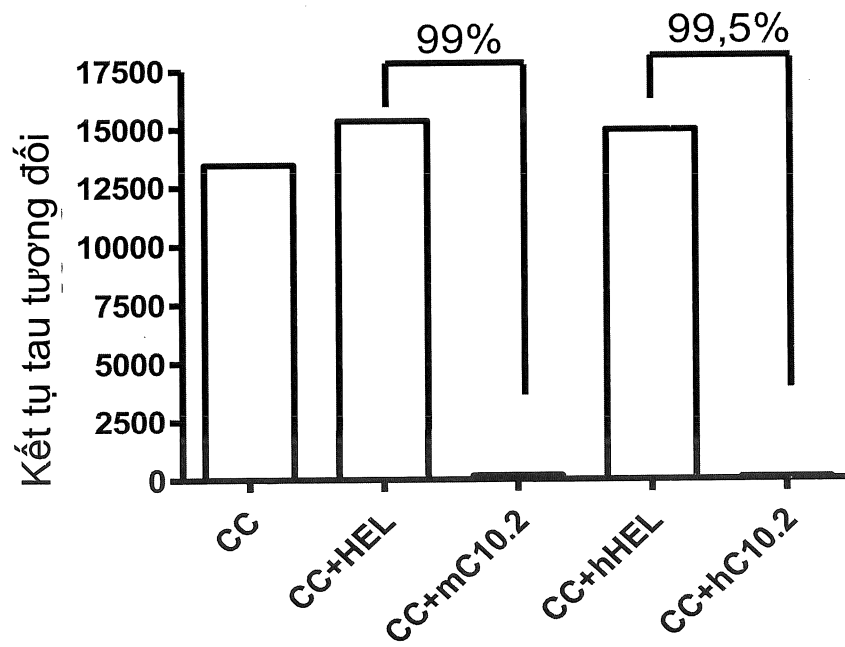
Chất đánh dấu	Đầu vào	Làm nghèo hC10.2	Làm nghèo hC10.2	Làm nghèo hHEL	Làm nghèo mHEL	Đầu vào xử lý như mẫu làm nghèo



A

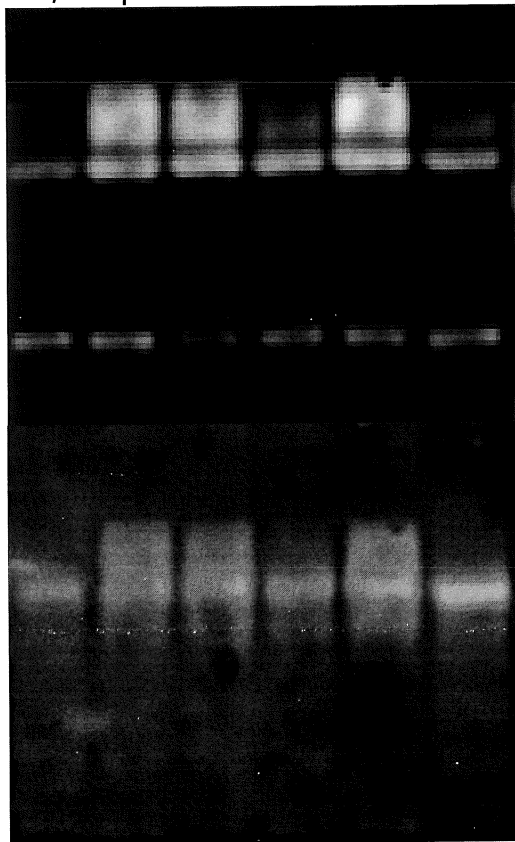
Hình 12A

B



Hình 12B

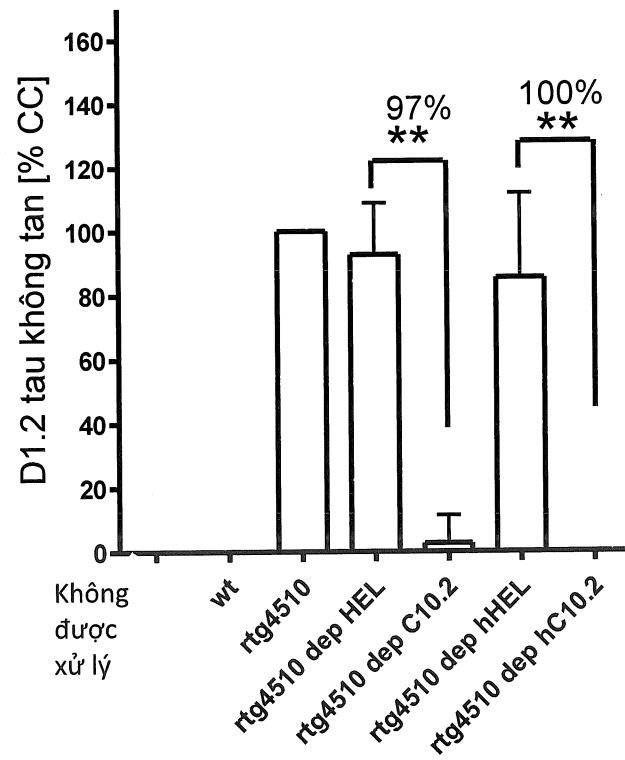
		rtg4		rtg4	
		510	rtg4	rtg4	510
	rtg4	depl	510	510	dep
Không	510	mC1	dep	deph	hC10
được	dep	0.2	HEL	HEL	.2
xử lý					



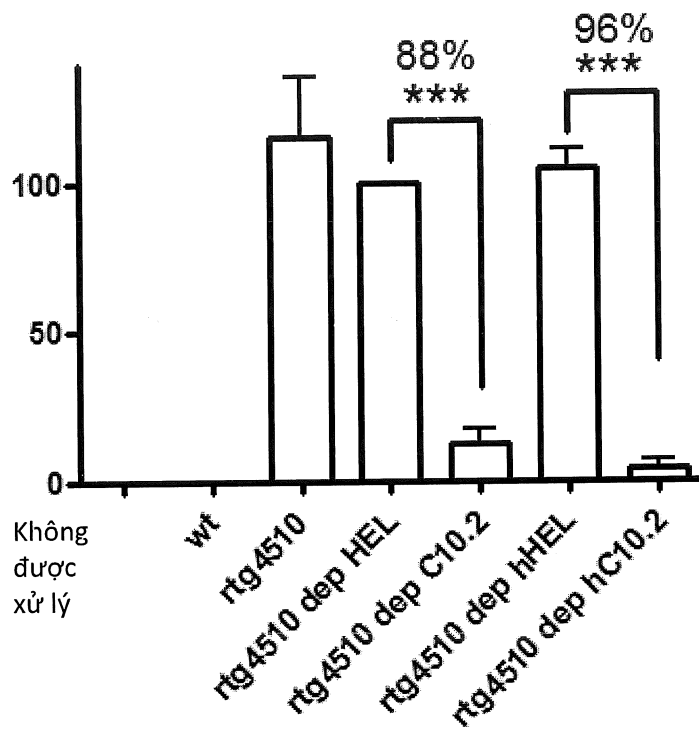
A

Hình 13A

B

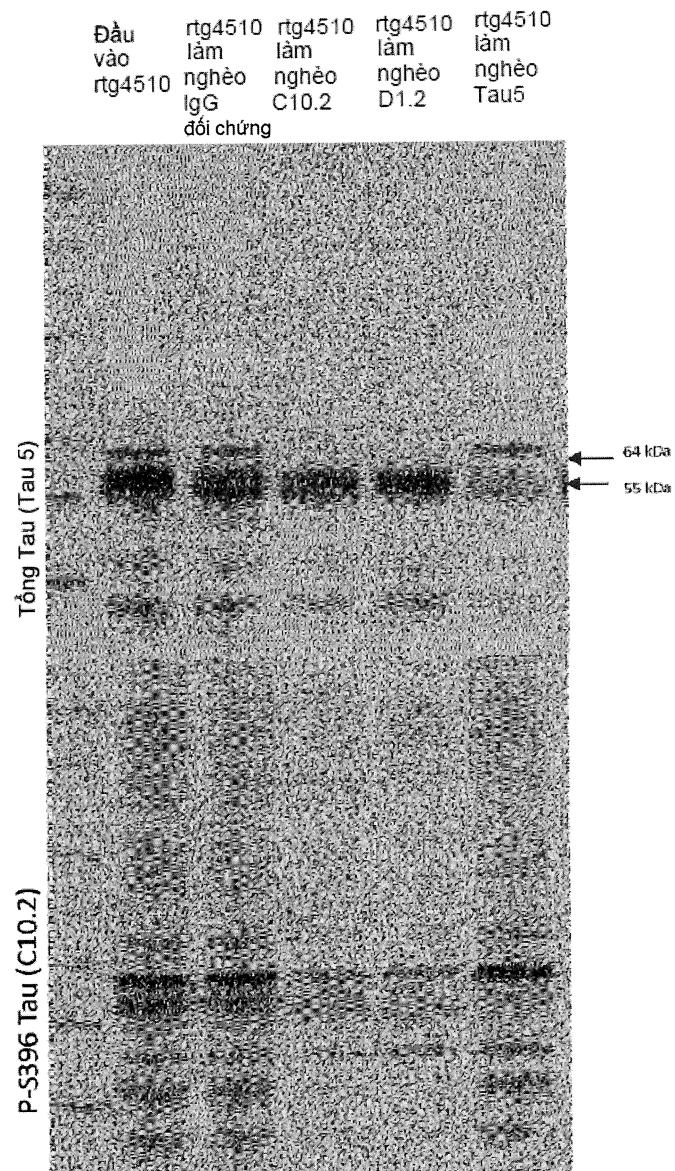


C



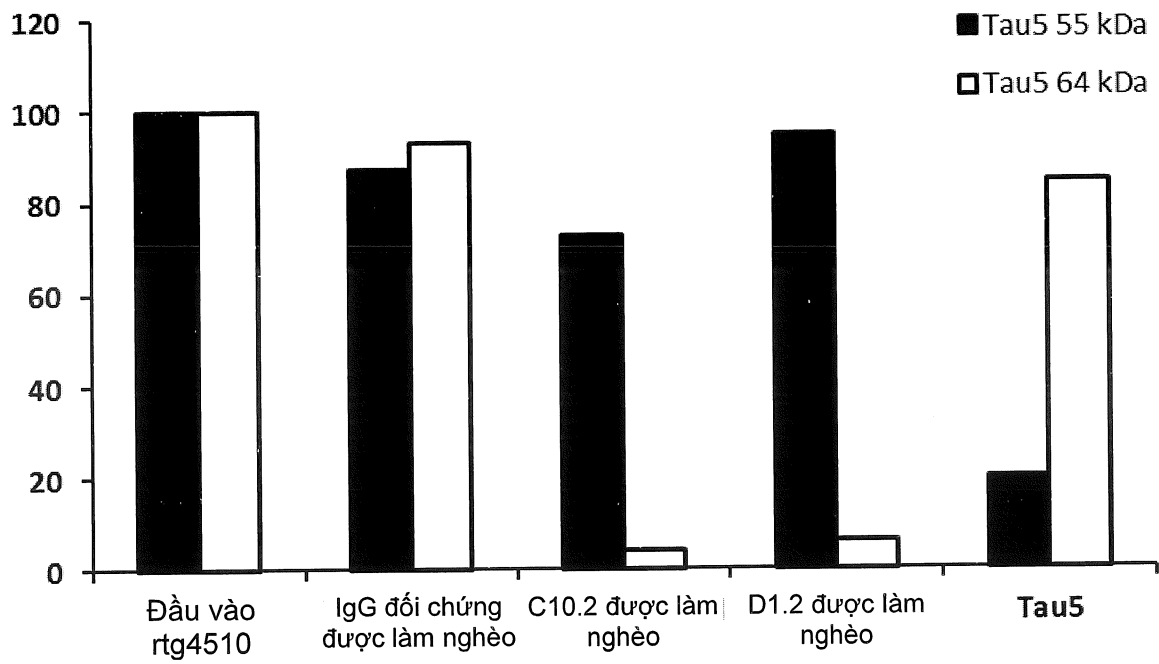
Hình 13B và 13C

A

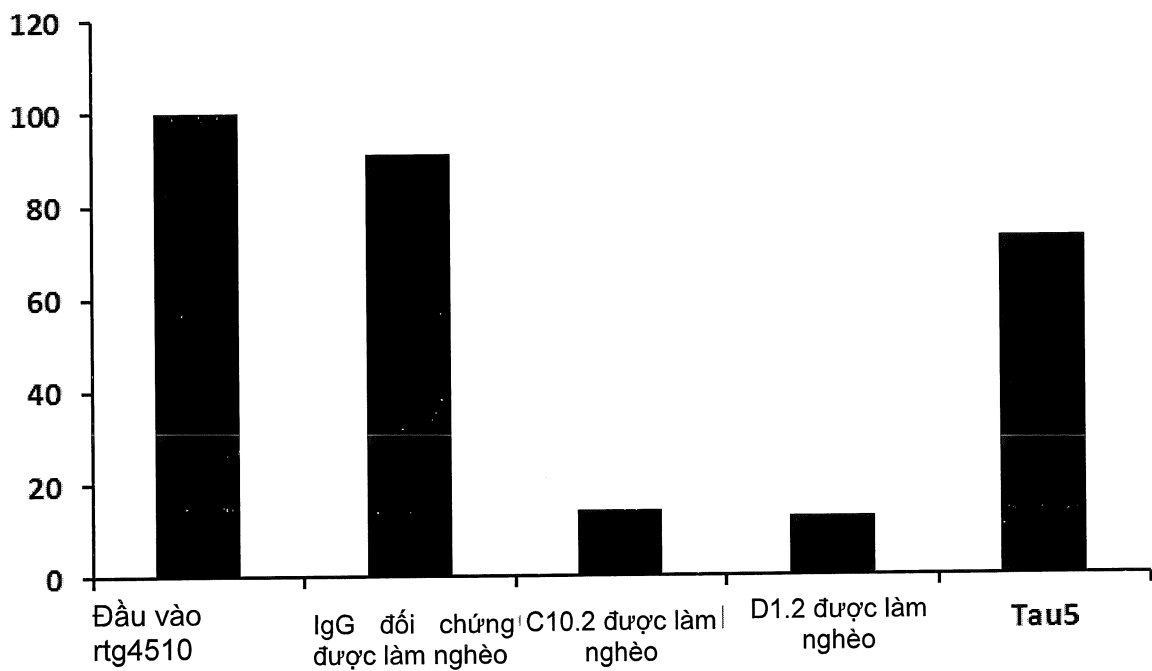


Hình 14A

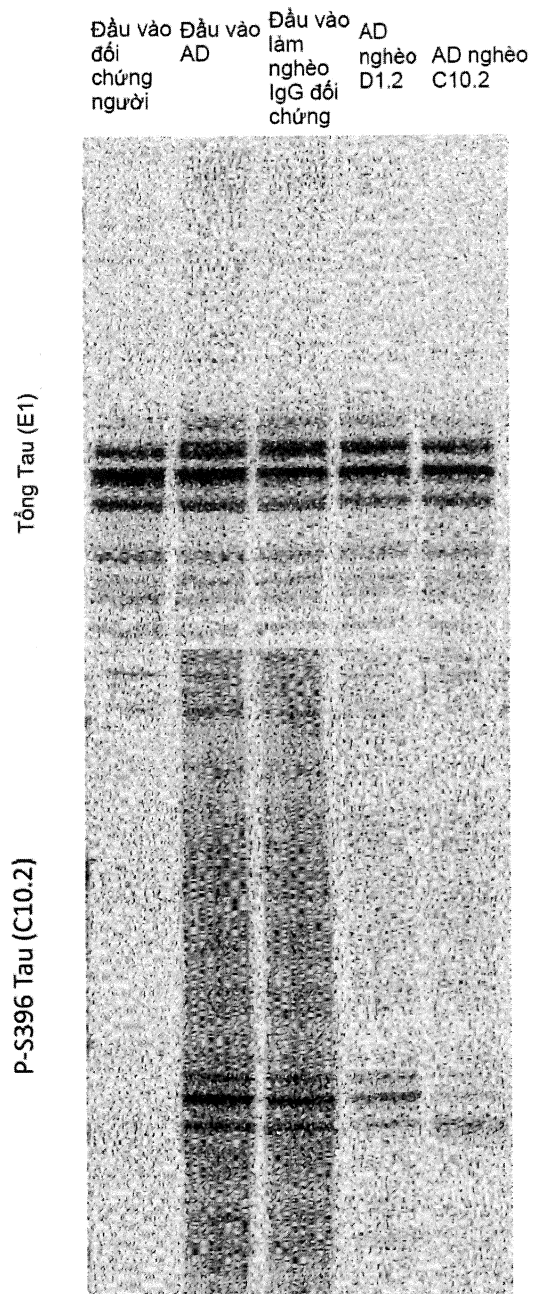
B



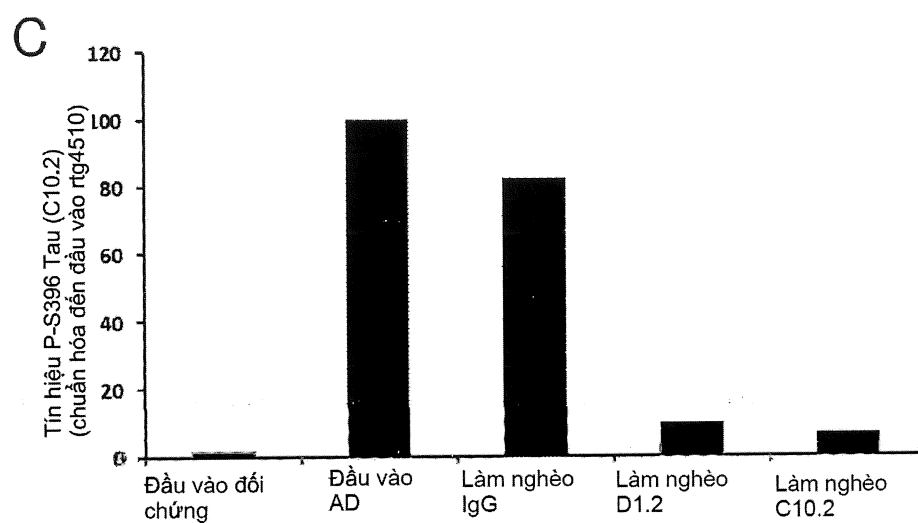
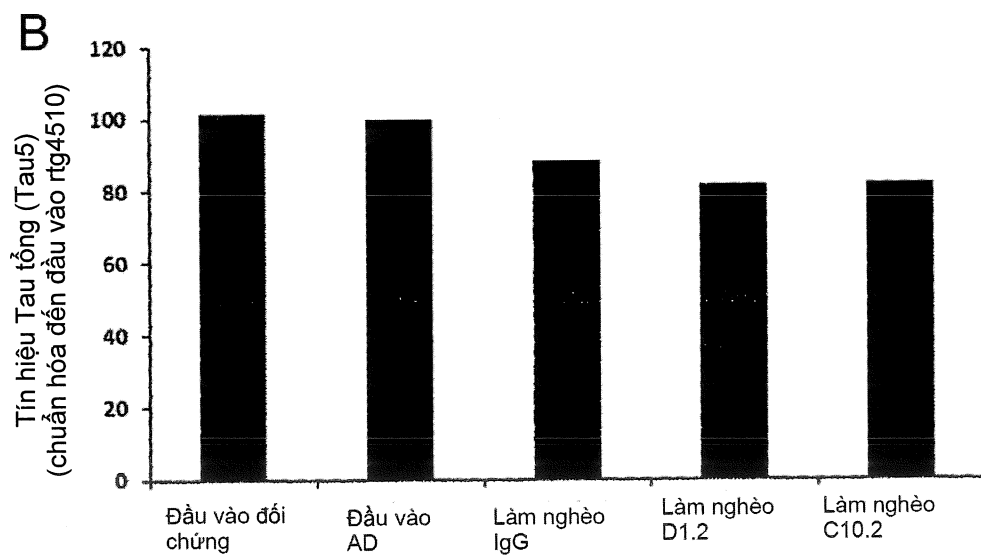
C



Hình 14B và 14C

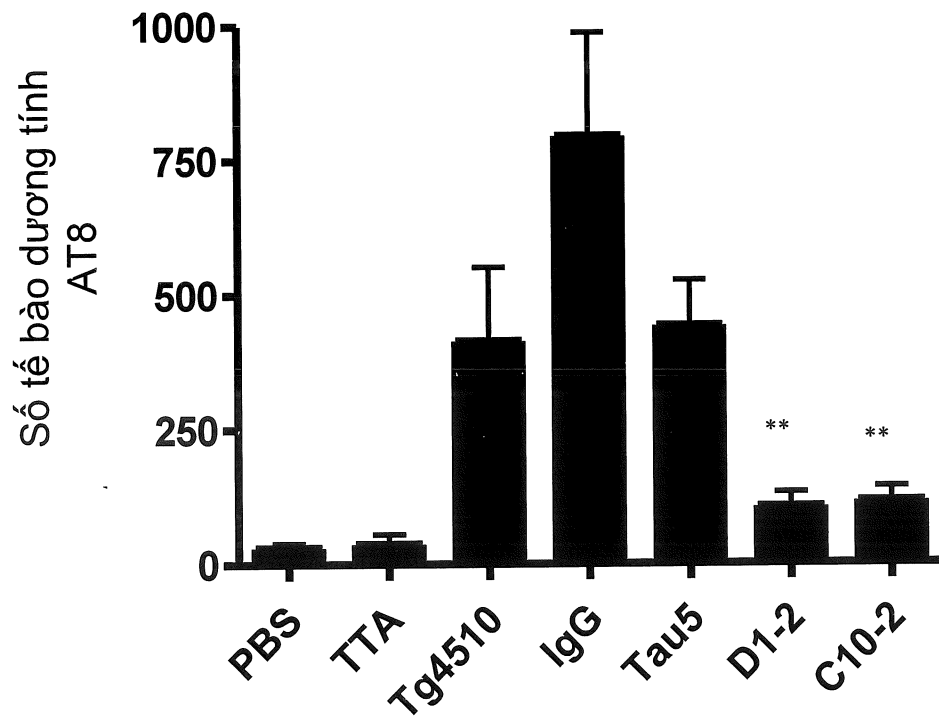
A

Hình 15A

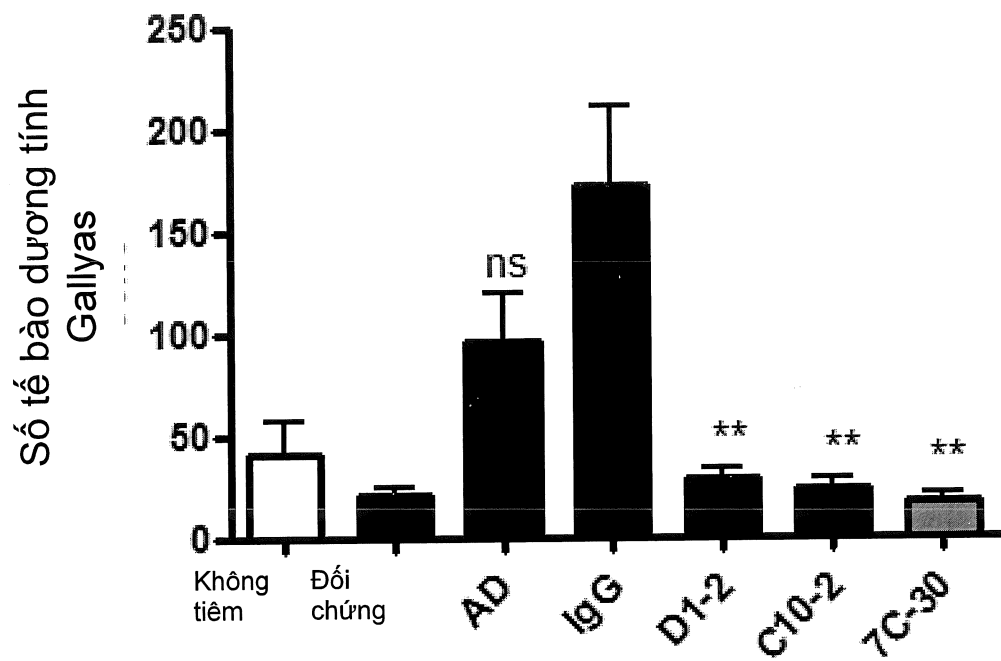


Hình 15B và 15C

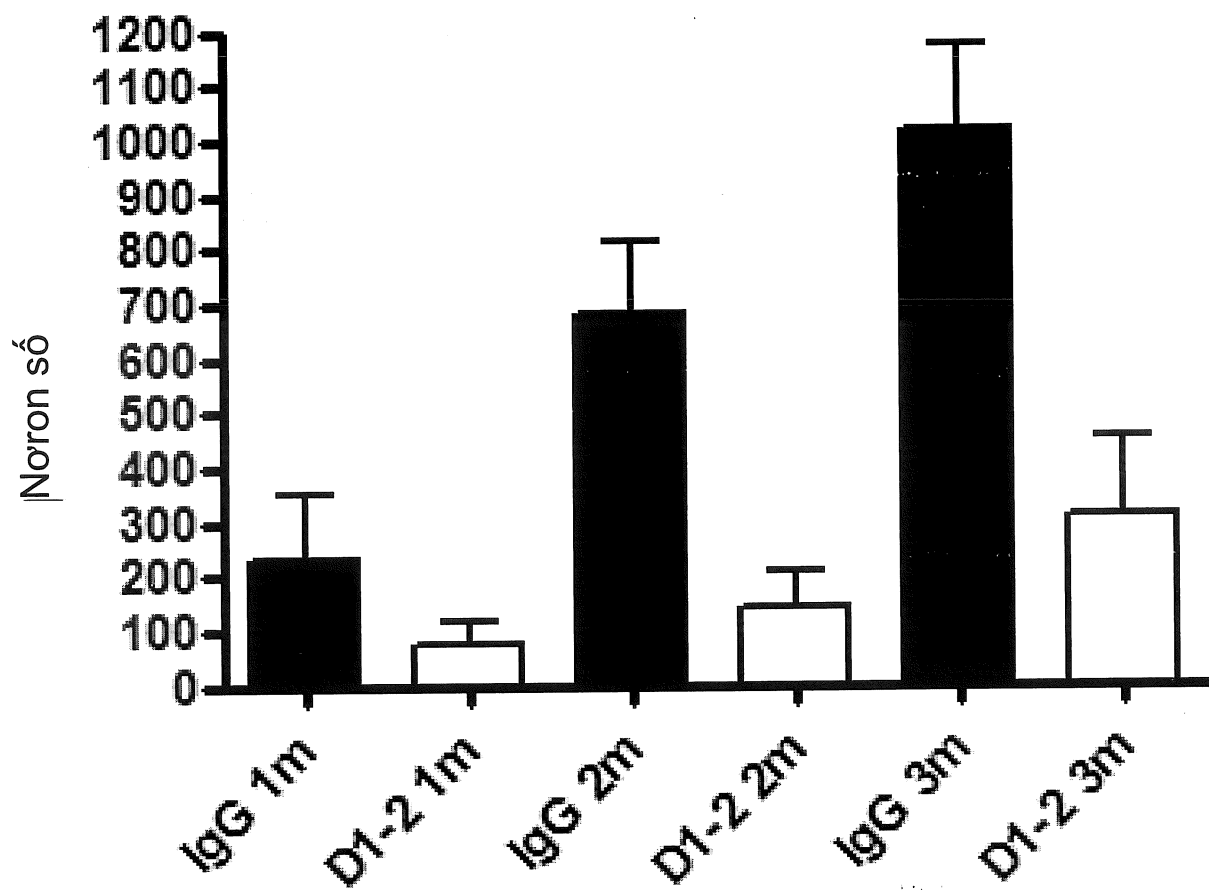
A



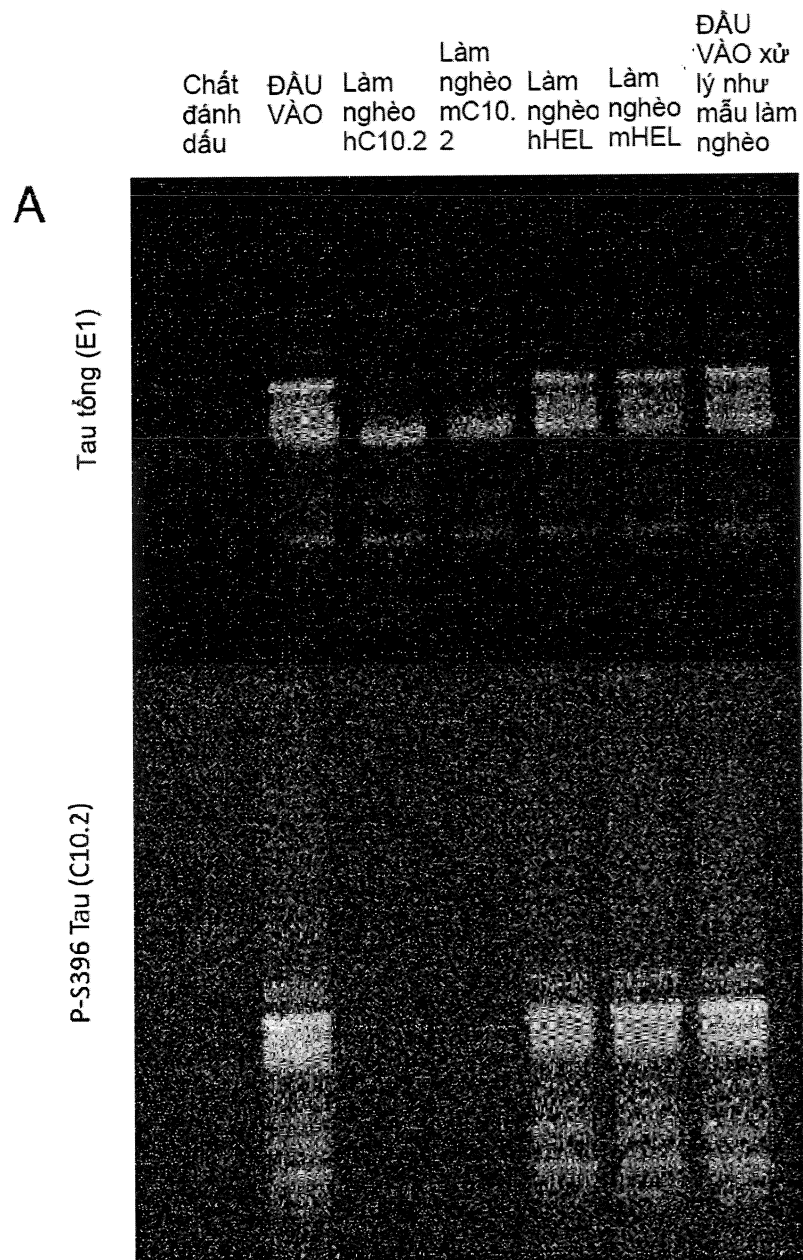
B



Hình 16A và 16B

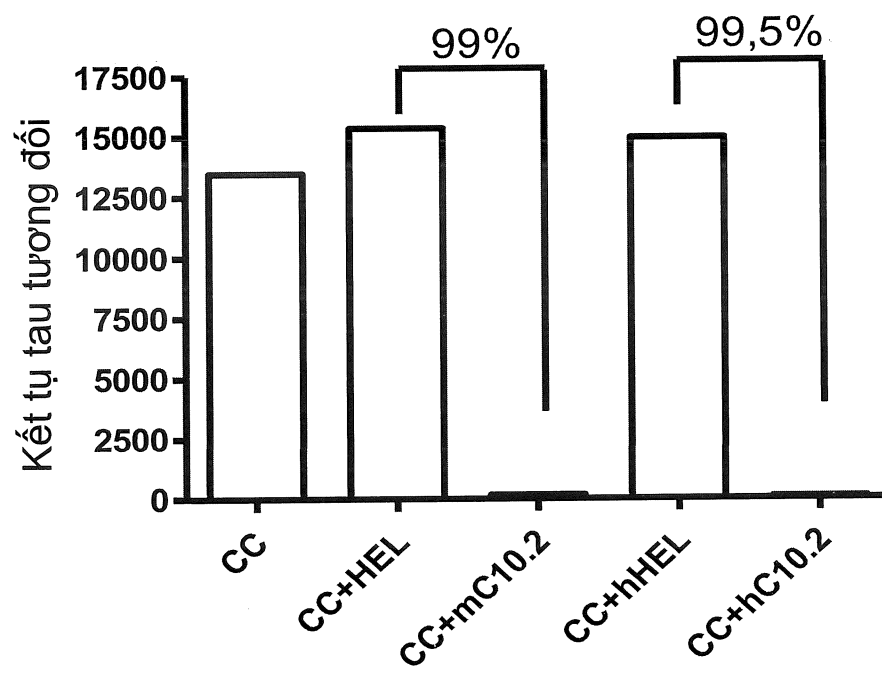


Hình 17

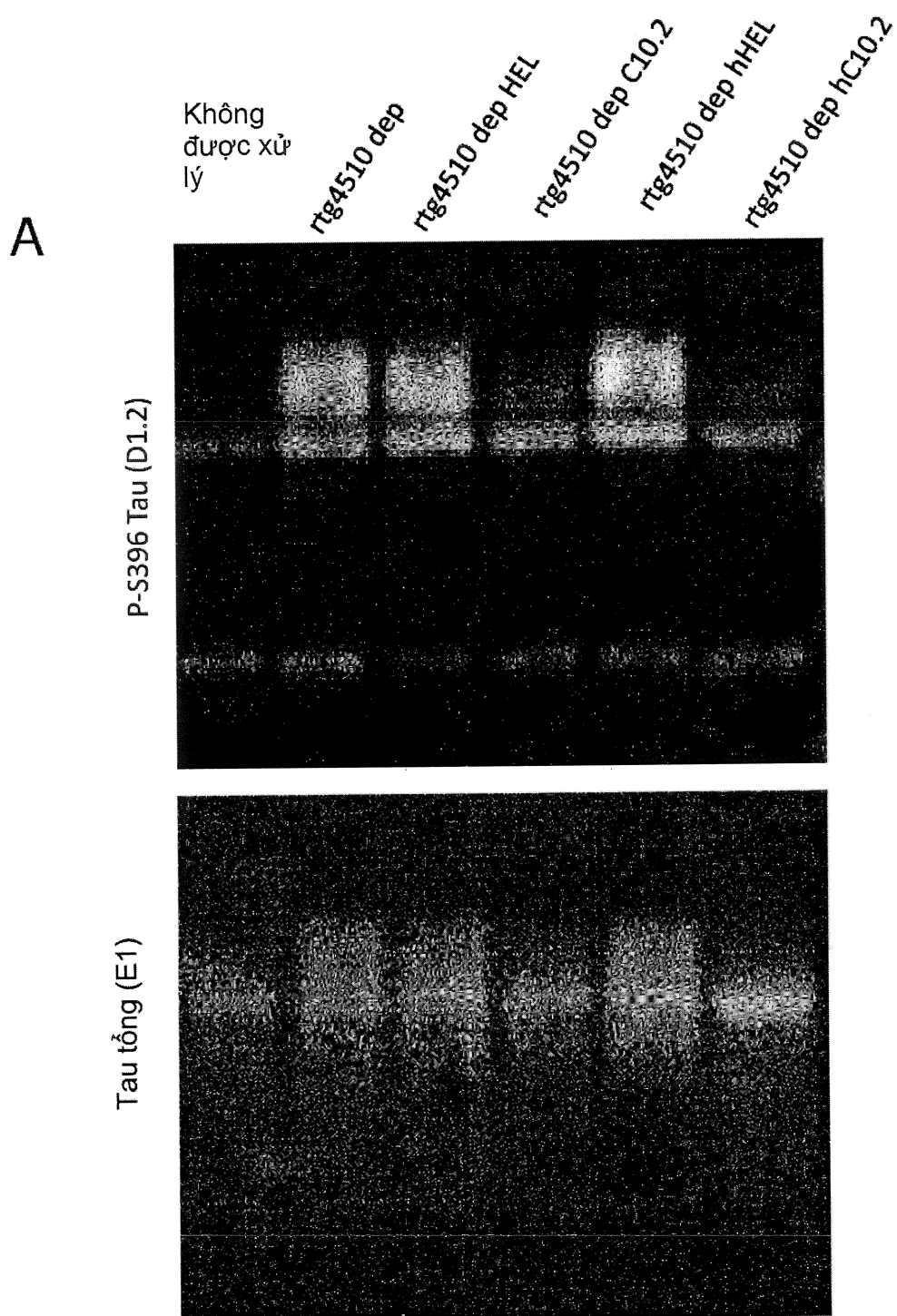


Hình 18A

B

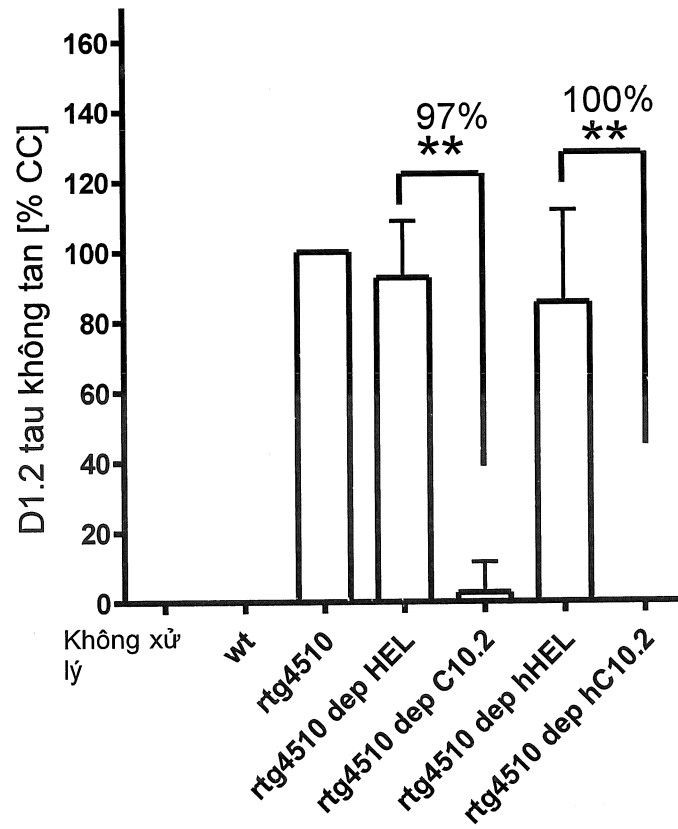


Hình 18B

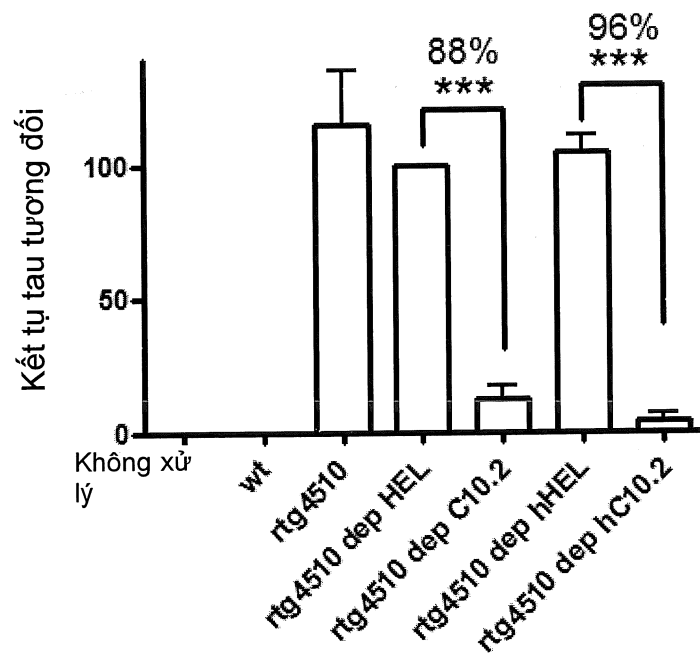


Hình 19A

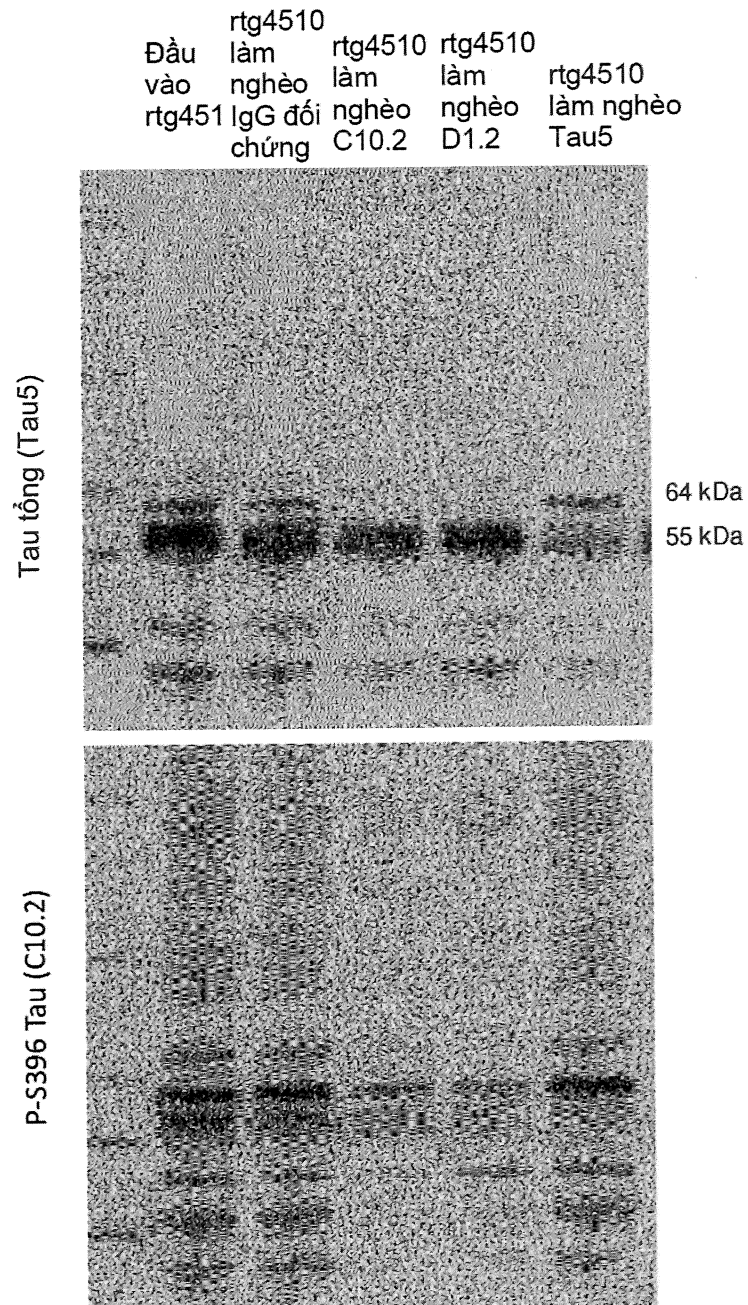
B



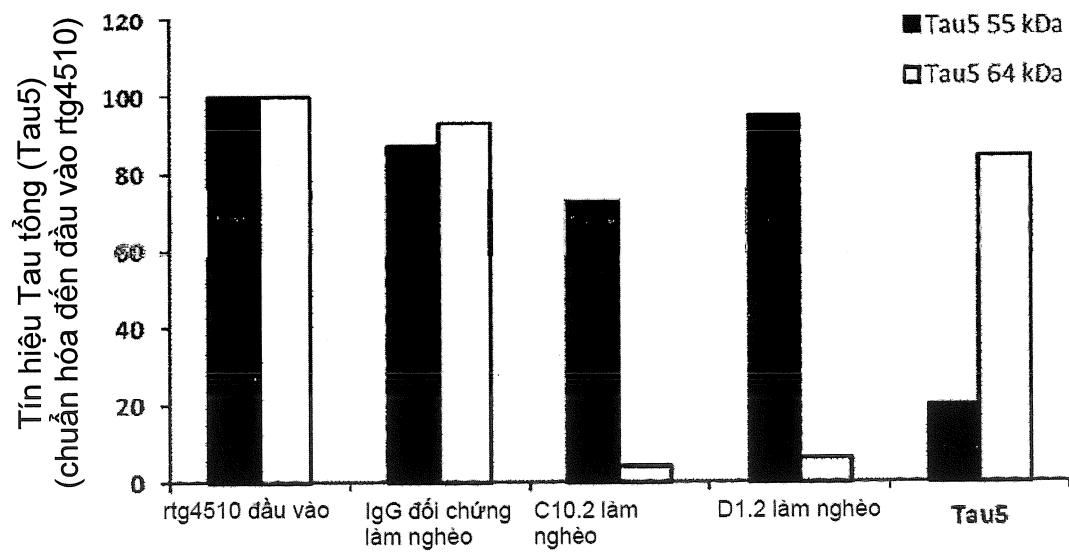
C



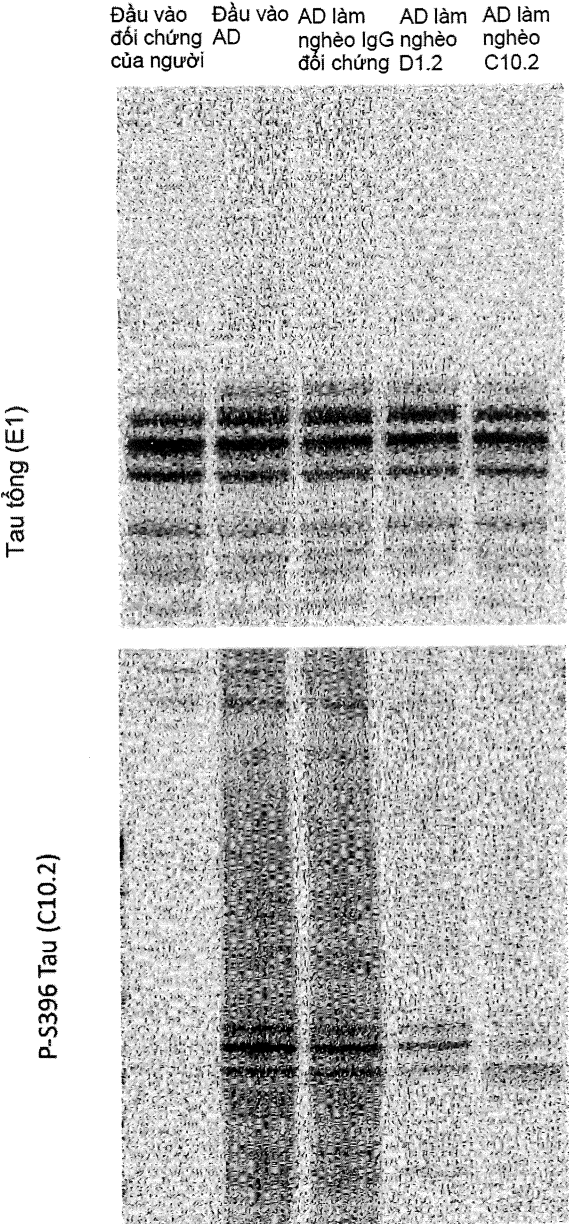
Hình 19B và 19C



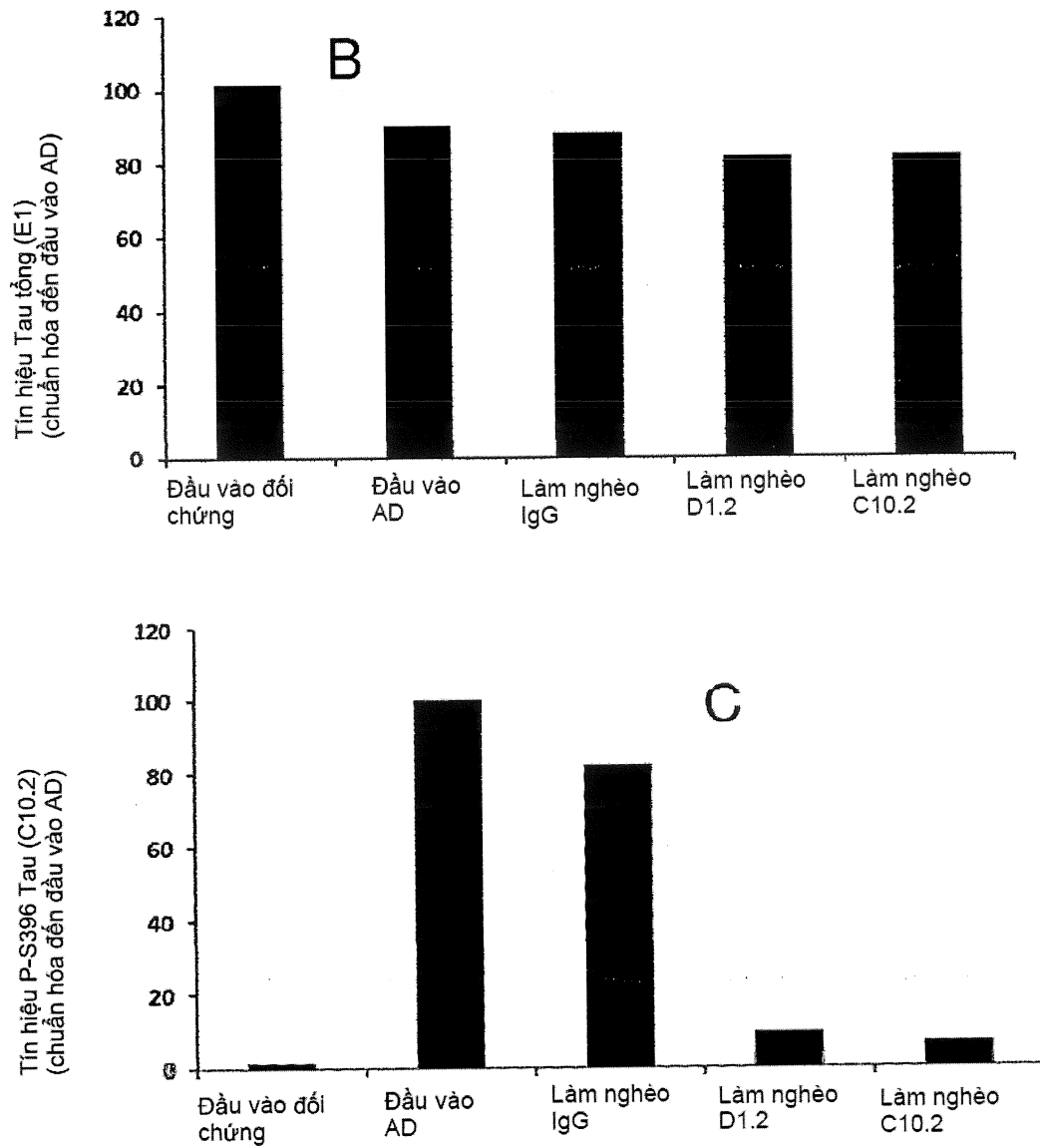
Hình 20A



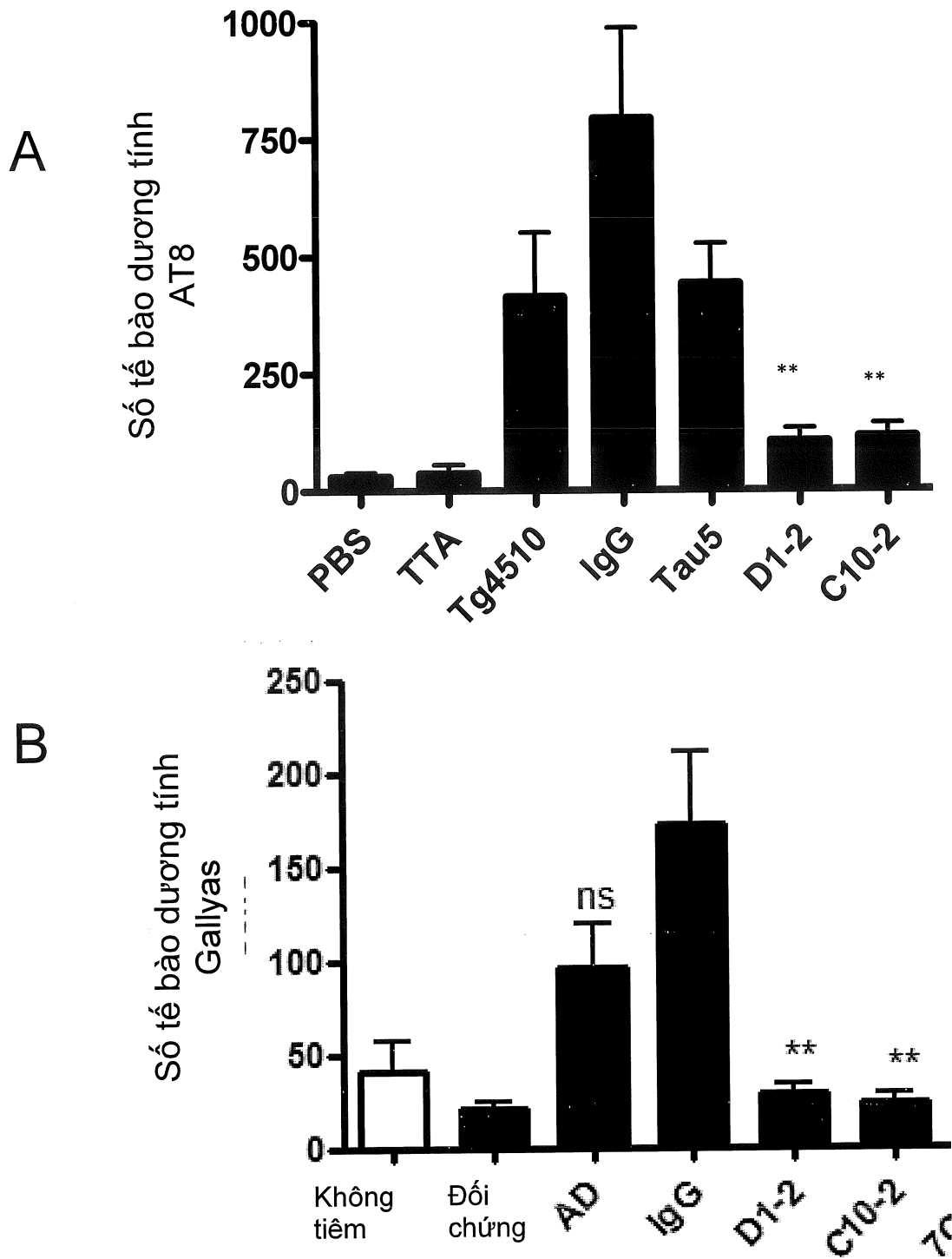
Hình 20B



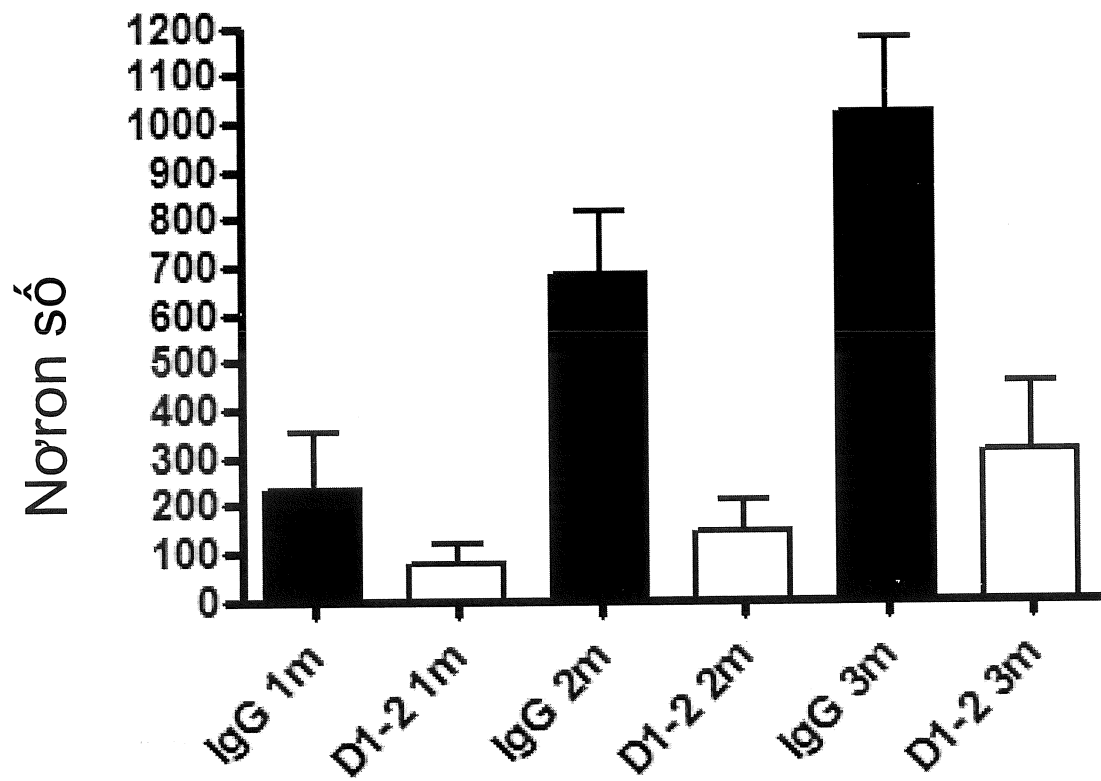
Hình 21A



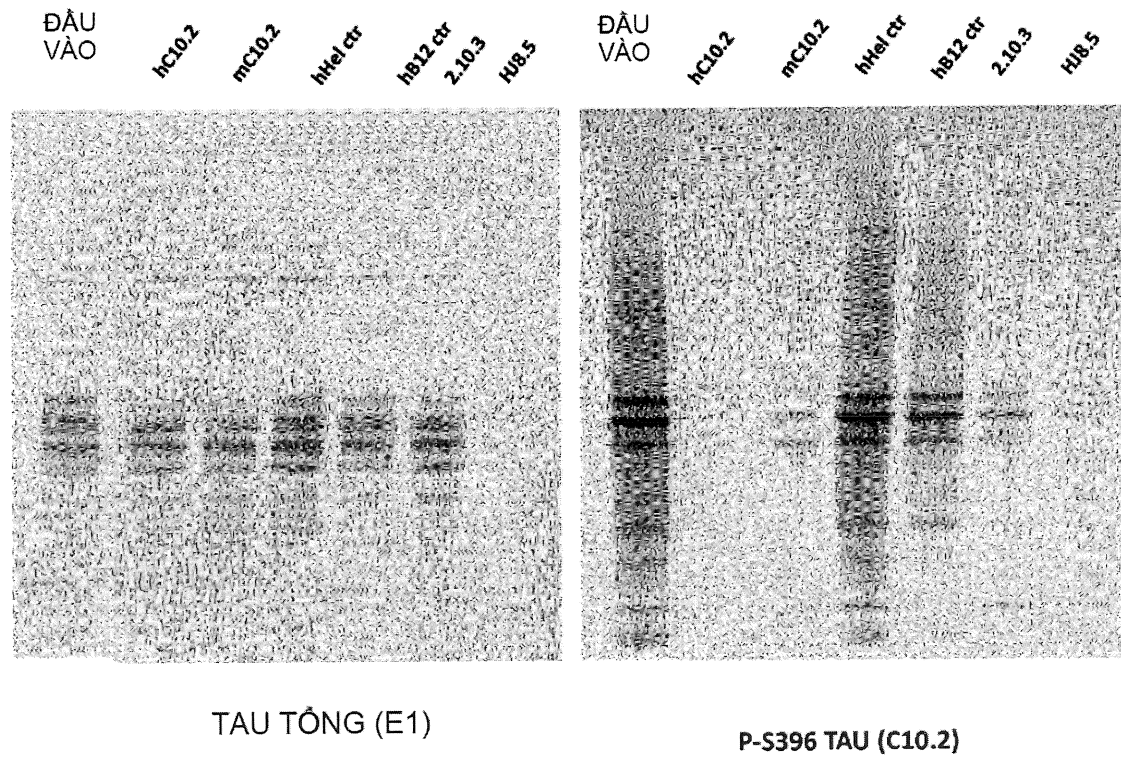
Hình 21B và 21C



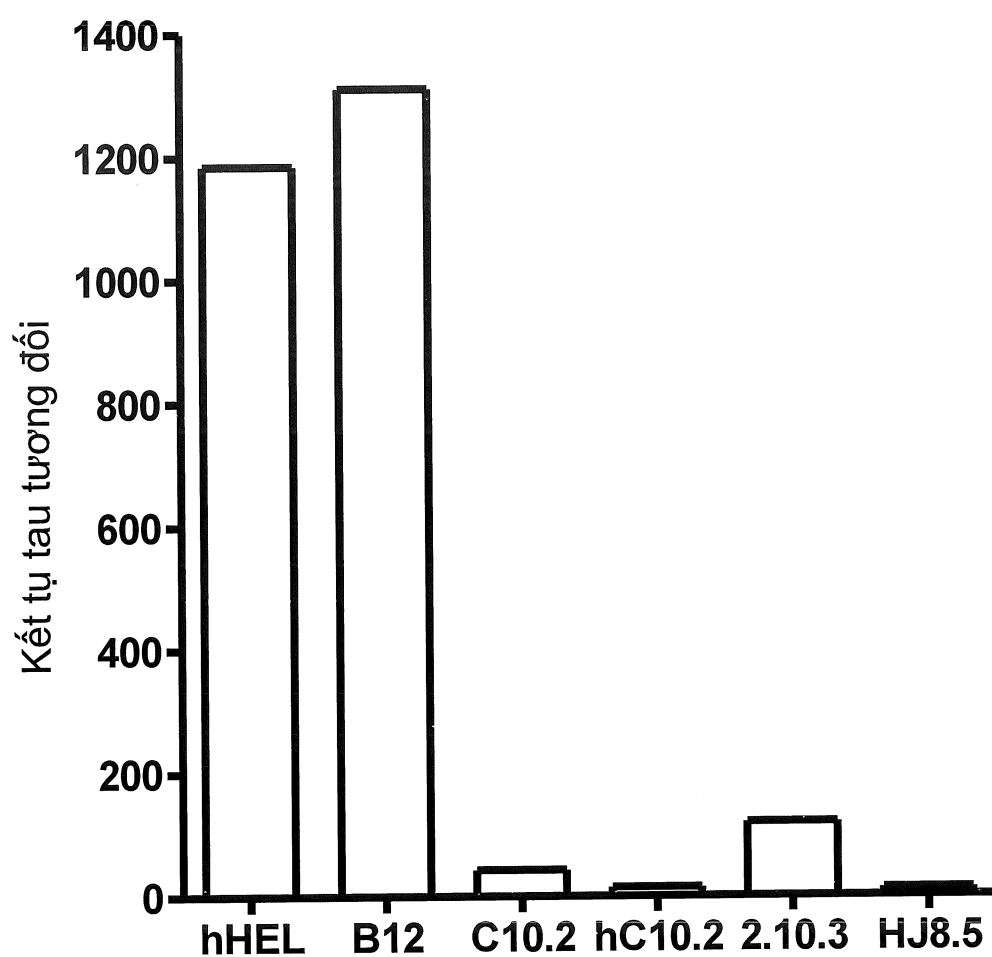
Hình 22A và 22B



Hình 23

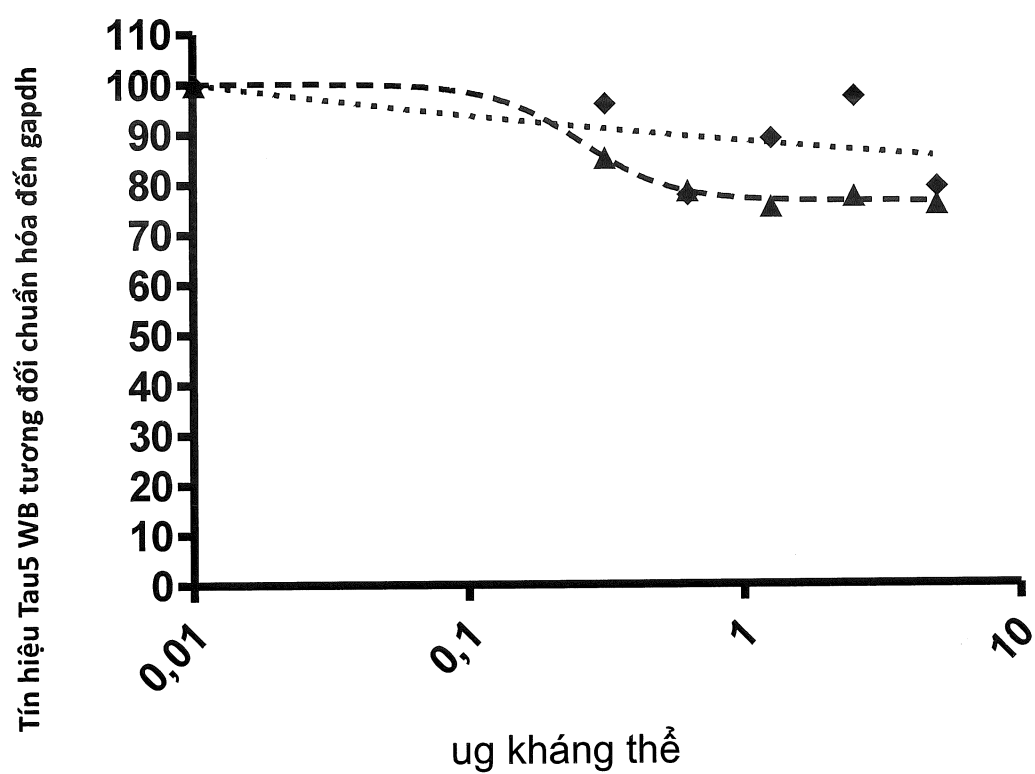


Hình 24



Hình 25

Tau5 sau khi làm nghèo hC10.2 và 2.10.3



Hình 26

C10.2 45 kDa

C10.2 55 kDa

C10.2 64 kDa

C10.2 toàn bộ hàng

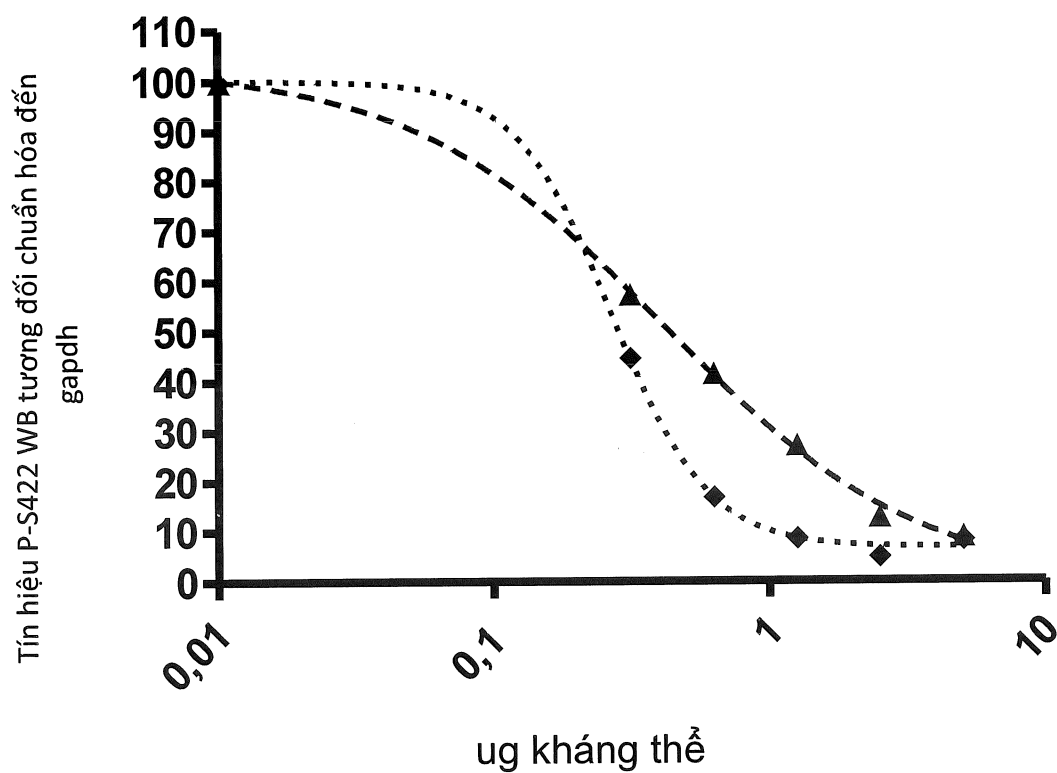
2.10.3 45 kDa

2.10.3 55 kDa

2.10.3 64 kDa

2.10.3 toàn bộ hàng

Tín hiệu P-S422 sau khi làm nghèo hC10.2 và 2.10.3

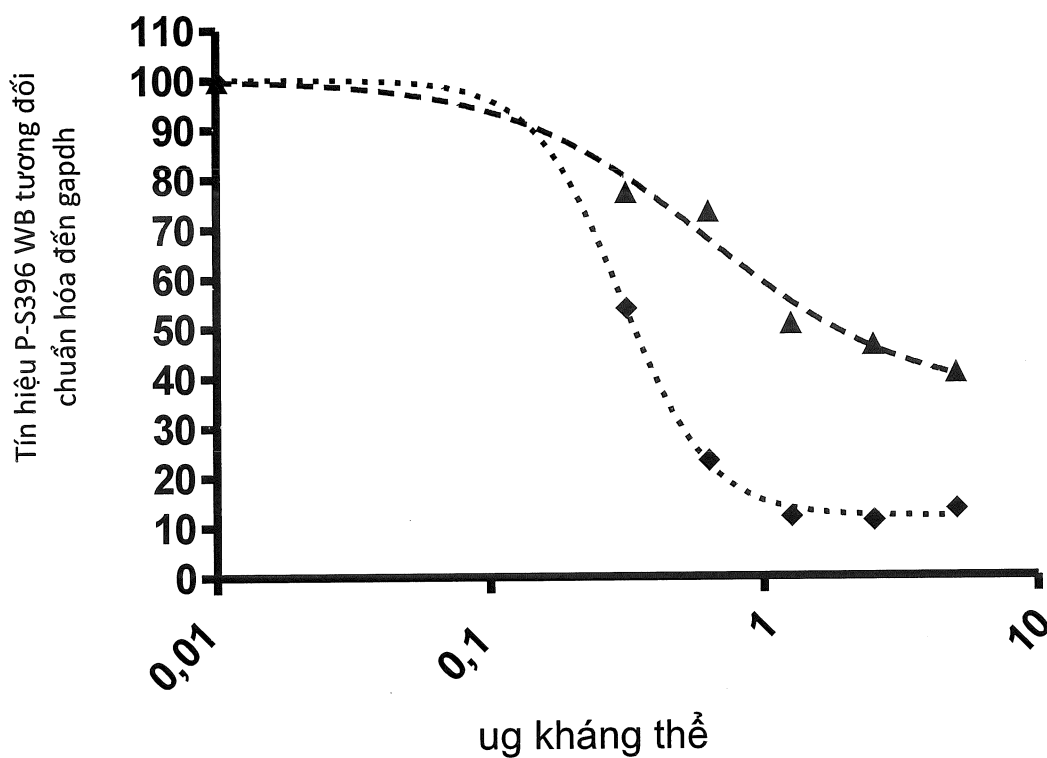


C10.2 HyperP 54kDa
 C10.2 HyperP 64 kDa
 C10.2 Hyper 69 kDa
 C10.2 toàn bộ hàng

Hình 27

2.10.3 HyperP 54kDa
 2.10.3 HyperP 64 kDa
 2.10.3 Hyper 69 kDa
 2.10.3 toàn bộ hàng

Tín hiệu P-S396 sau khi làm nghèo hC10.2 và 2.10.3



Hình 28

C10.2 HyperP 54kDa

C10.2 HyperP 64 kDa

C10.2 Hyper 69 kDa

C10.2 toàn bộ hàng

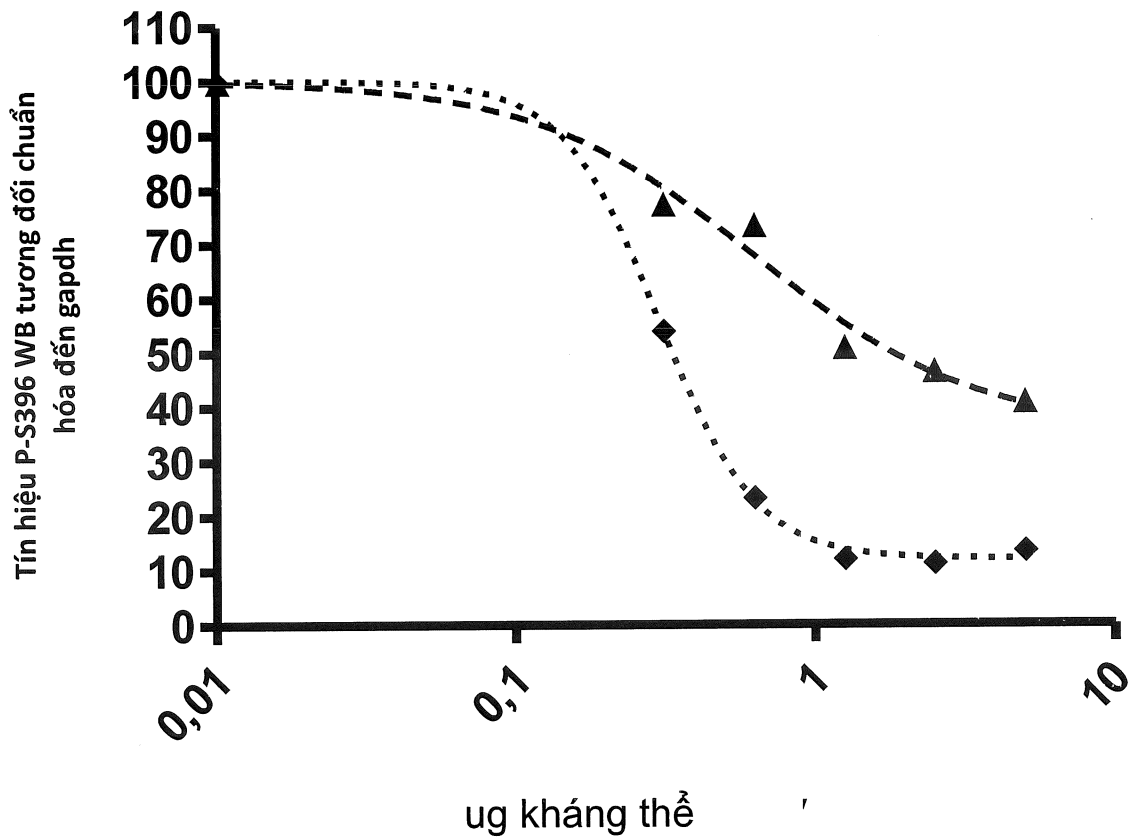
2.10.3 HyperP 54kDa

2.10.3 HyperP 64 kDa

2.10.3 Hyper 69 kDa

2.10.3 toàn bộ hàng

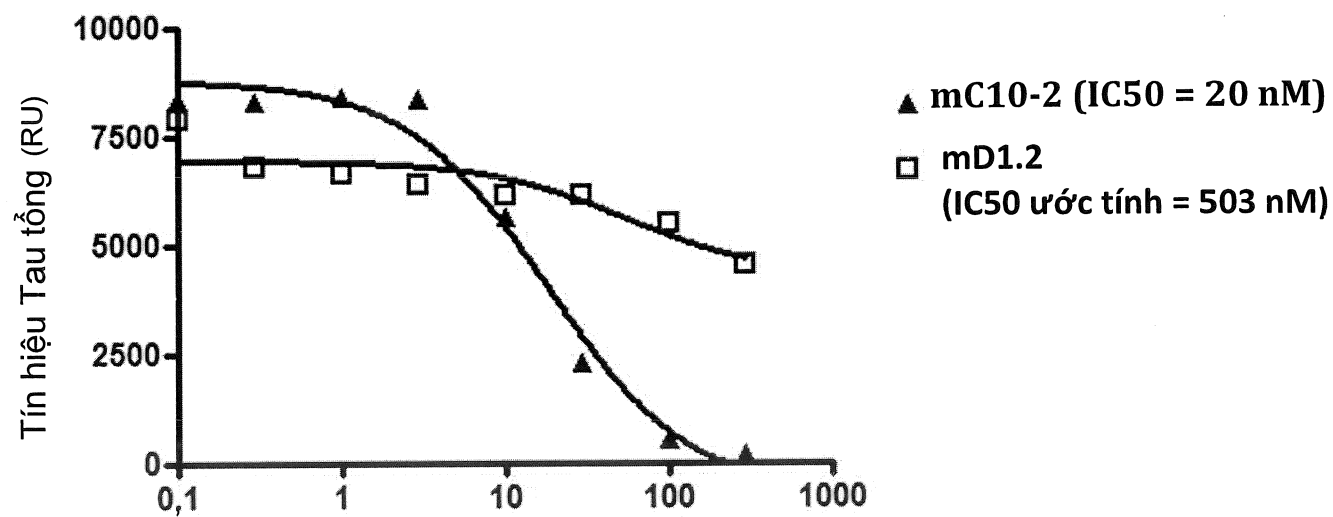
Tín hiệu P-S396 sau khi làm nghèo bằng hC10.2 và 2.10.3



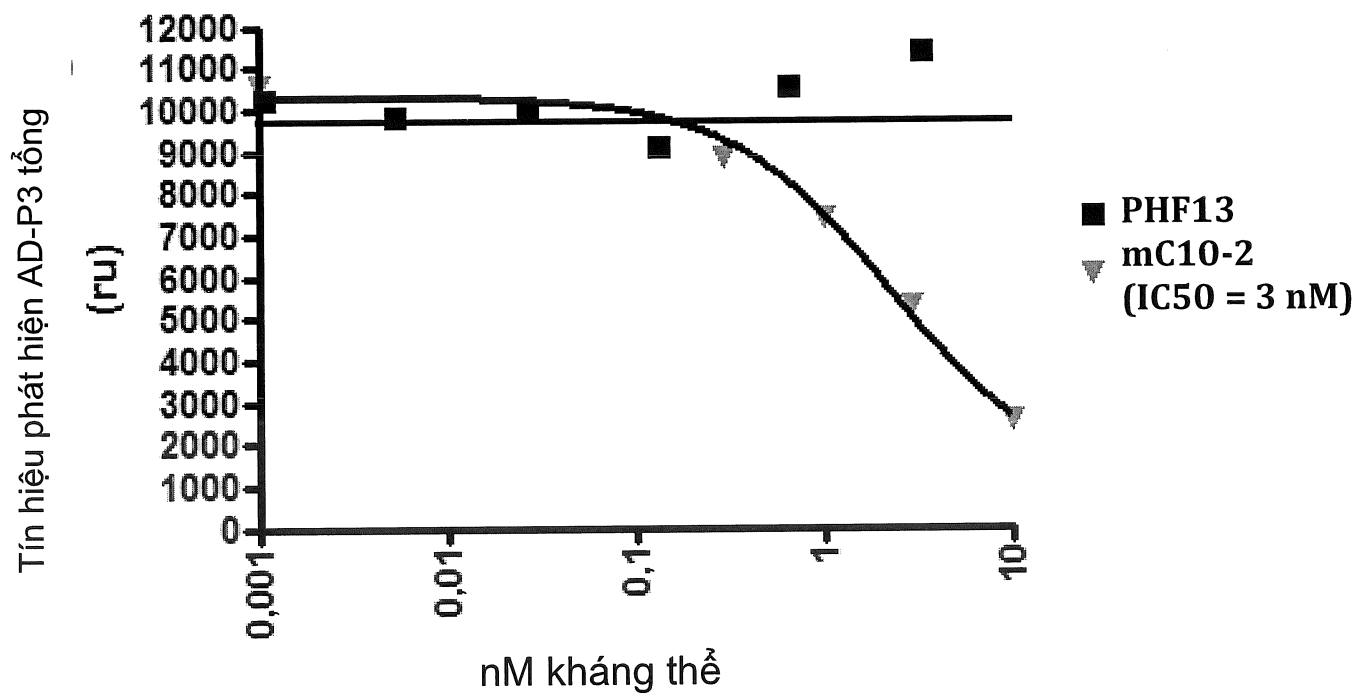
Hình 29

C10.2 HyperP 54kDa
 C10.2 HyperP 64 kDa
 C10.2 Hyper 69 kDa
 C10.2 toàn bộ hàng

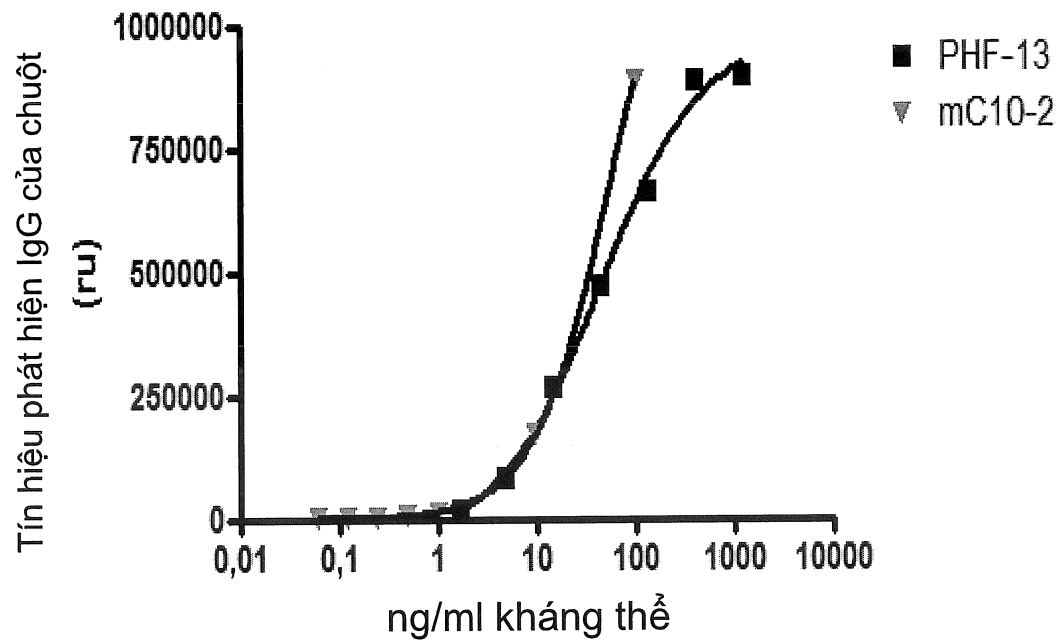
2.10.3 HyperP 54kDa
 2.10.3 HyperP 64 kDa
 2.10.3 Hyper 69 kDa
 2.10.3 toàn bộ hàng



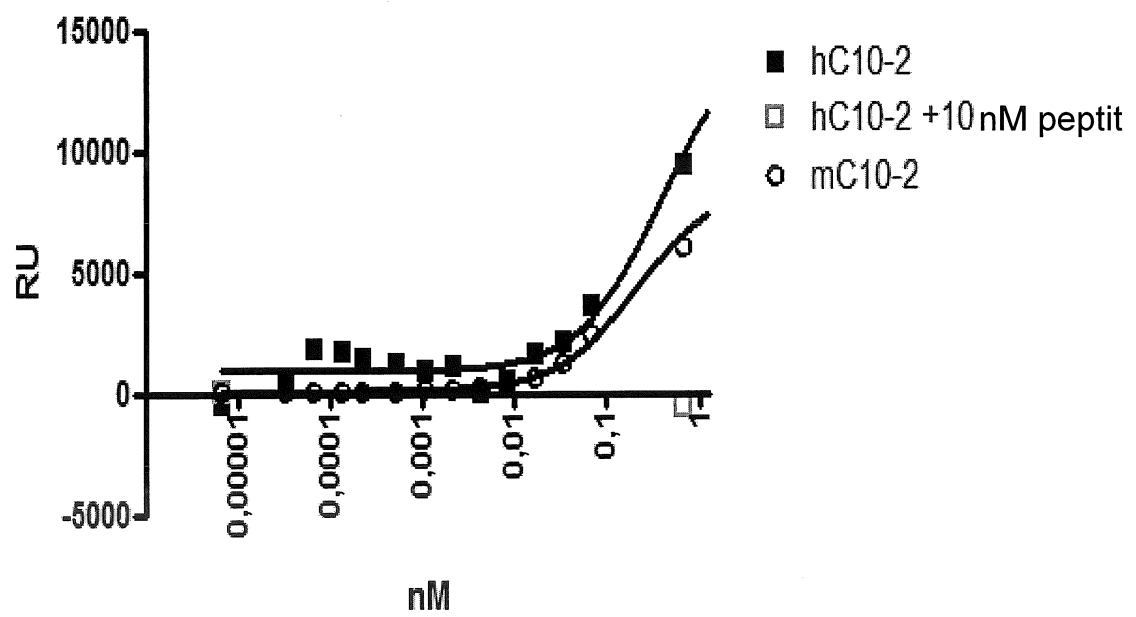
Hình 30



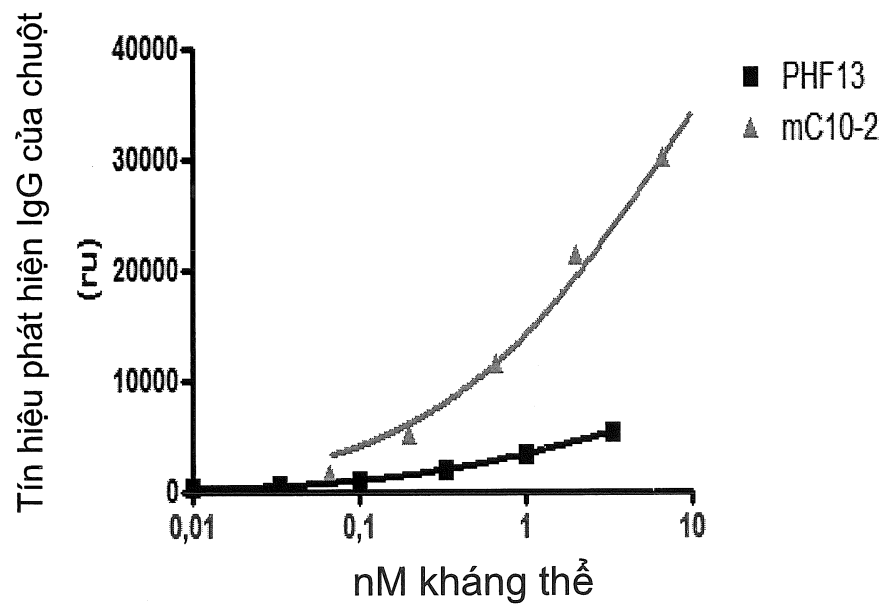
Hình 31



Hình 32



Hình 33



Hình 34