



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)⁷ A61K 39/395; C12P 21/08; C07K 16/46; (13) B
C12N 15/02; A61P 25/28; C07K 16/18



1-0048921

-
- (21) 1-2014-04381 (22) 30/05/2013
(86) PCT/JP2013/065090 30/05/2013 (87) WO/2013/180238 A1 05/12/2013
(30) 2012-124336 31/05/2012 JP
(45) 25/07/2025 448 (43) 25/03/2015 324A
(73) 1. OSAKA CITY UNIVERSITY (JP)
3-138, Sugimoto 3-chome, Sumiyoshi-ku, Osaka-shi, Osaka 5588585, Japan
2. TEIJIN PHARMA LIMITED (JP)
2-1, Kasumigaseki 3-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 1000013, Japan
(72) MORI, Hiroshi (JP); TOMIYAMA, Takami (JP); MATSUMOTO, Yoichi (JP);
EGUCHI, Hiroshi (JP); KUNORI, Yuichi (JP).
(74) Văn phòng Luật sư MINERVAS (MINERVAS)
-

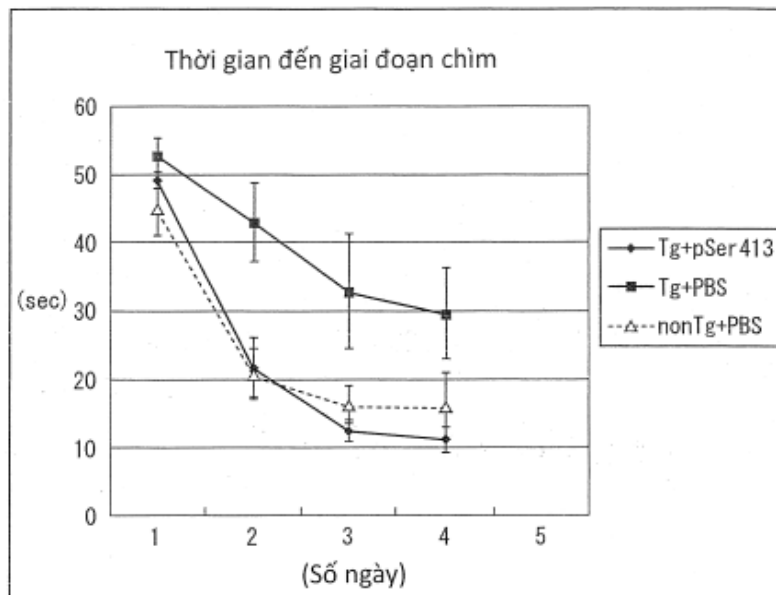
- (54) TÁC NHÂN ĐIỀU TRỊ HOẶC PHÒNG NGỪA BỆNH LÝ TAU, KHÁNG THỂ
ĐƠN DÒNG VÀ PEPTIT

(21) 1-2014-04381

(57) Sáng chế đề xuất tác nhân mới điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức. Sáng chế đề xuất kháng thể tham gia vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể cụ thể là với protein tau mà đã được phosphoryl hóa trong vùng phụ cận của Ser413 của SEQ ID NO: 1, và tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức chứa peptit làm thành phần hoạt tính mà đã được phosphoryl hóa trong vùng phụ cận của Ser413.

FIG. 4

(1-1) Thử nghiệm so sánh



Sự khác biệt đáng kể

Không Tg với Tg: $p=0,0071$

Tg với Tg được chủng ngừa: $p=0,0029$

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa chứng rối loạn nhận thức. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến protein mới chống sự phosphoryl hóa hoặc kháng thể peptit có tác dụng tuyệt vời cải thiện chức năng nhận thức, và đề cập đến tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa chứng rối loạn nhận thức chứa kháng thể kháng tau bị phosphoryl hóa hoặc kháng nguyên mà kích thích tạo kháng thể kháng tau bị phosphoryl hóa.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Rối loạn nhận thức là tình trạng trong đó trí óc đã phát triển bị suy giảm do một số nguyên nhân mắc phải, gây trở ngại cho sự thích ứng xã hội. Rối loạn nhận thức được phân loại thành các bệnh thoái hóa thần kinh, rối loạn nhận thức do mạch máu, bệnh prion, bệnh nhiễm trùng, rối loạn chuyển hóa/nội tiết, chấn thương và rối loạn não bộ, và rối loạn nhiễm độc (Tài liệu phi sáng chế 1). Đến năm 2010, hiện có khoảng 2,1 triệu bệnh nhân rối loạn nhận thức ở Nhật Bản, với tỷ lệ nhiễm bệnh khoảng 8-10%, hay thậm chí nhiều hơn 10%, trong số những người cao tuổi trên 65 tuổi, và điều này được công nhận là một vấn đề nghiêm trọng trong xã hội đang già hóa toàn cầu (Tài liệu phi sáng chế 2). Dữ liệu về các bệnh cơ bản của rối loạn nhận thức chỉ ra rằng phần lớn là các bệnh thoái hóa thần kinh như AD và FTLT, với tỷ lệ khoảng 35% bệnh Alzheimer (AD), khoảng 15% kết hợp của AD và bệnh mạch máu não, và 5% bệnh thoái hóa thần kinh như suy thoái thùy trán (FTLT) (Tài liệu phi sáng chế 2). Rối loạn nhận thức do thoái hóa

thần kinh được đặc trưng bằng sự tấn công âm thầm của việc suy giảm trí nhớ và/hoặc thay đổi tính cách tiến triển trong một khoảng thời gian ít nhất là 6 tháng hoặc dài hơn. Một yếu tố nhất quán trong quá trình thoái hóa thần kinh biểu hiện độ tương quan cao với mức độ suy giảm chức năng nhận thức là sự hiện diện của đám rối sợi thần kinh (NFT) (Tài liệu phi sáng chế 3).

Tau (protein) là một protein được mã hóa bằng gen MAPT nằm trên nhiễm sắc thể 17 (17q21) ở người, và nó là một trong những protein liên kết vi ống hiện diện nhiều trong hệ thần kinh trung ương. Tau được phát hiện là một protein cấu thành chính trong các cặp sợi xoắn và sợi thẳng tạo thành NFT ở AD, một trong những bệnh thoái hóa thần kinh nổi bật nhất, và sự tích tụ nội bào của nó đã được chứng minh trong nhiều điều kiện bệnh học thần kinh. Các bệnh gây nên bởi sự tích tụ nội bào của tau được gọi chung là các “bệnh lý tau” (“tauopathies”) (Tài liệu phi sáng chế 4). Các bệnh thoái hóa thần kinh bao gồm trong số các “bệnh lý tau” là bệnh Alzheimer (AD), thoái hóa hạch nền - vỏ não (CBD hoặc CBS), liệt trên nhân tiến triển, bệnh Pick, sa sút trí tuệ do các hạt ưa bạc (bệnh hạt argyrophilic), bệnh lý tau đa hệ thống với chứng mất trí (MSTD), sa sút trí tuệ trán-thái dương liên kết nhiễm sắc thể 17 với bệnh Parkinson (FTDP-17), sa sút trí tuệ do đám rối sợi thần kinh, đám rối sợi thần kinh khuếch tán và vôi hóa (DNTC), bệnh lý tau do chất trắng và chất vùi thần kinh đệm hình cầu (WMT-GGI) và thoái hóa thùy trán-thái dương và với thể vùi dương tính tau (FTLD-tau), nhưng bệnh không thoái hóa thần kinh bao gồm các bệnh truyền nhiễm chẳng hạn như hội chứng Parkinson của Von Economo và viêm não xơ hóa bán cấp tiến triển, và các tình trạng chấn thương gây ra như bệnh não của võ sĩ quyền Anh, cũng được bao gồm trong bệnh lý tau (Tài liệu phi sáng chế 4).

Cấu trúc của gen MAPT trên hệ gen được tìm thấy là một protein chứa 13 exon cùng với nhiều đồng dạng do quá trình cắt nối có chọn lọc (Tài liệu phi sáng chế 4). Một tính năng của cấu trúc của tau là nó bao gồm một vùng có tính axit tậm cùng đầu N chứa các chuỗi 0-2 lặp (N) của 29 amino axit phụ thuộc vào sự cắt nối có chọn lọc của exon 2 và exon 3 (N0-N2), miền trung gian giàu prolin, và miền liên kết vi ống đầu cuối C (được mã hóa bằng các exon 9-12) chứa 3 (3R) hoặc 4 (4R) chuỗi lặp (R) mà đóng góp vào liên kết vi ống (Tài liệu phi sáng chế 3 và 4). Do đó, tau có 6 đồng dạng tiêu biểu, 3R0N (352 axit amin) · 3R1N (381 axit amin) · 3R2N (410 axit amin) · 4R0N (383 axit amin) · 4R1N (412 axit amin) và 4R2N (441 axit amin), phụ thuộc vào số lượng của 29 chuỗi lặp axit amin (N) và chuỗi lặp liên kết vi ống (R) mà nó chứa đựng. Trong số các isotyp này, chỉ 3R0N là hiện diện trong não phôi thai, trong khi tất cả 6 isotyp hiện diện trong não người trưởng thành, cùng với loại 4R là nhiều nhất (Tài liệu phi sáng chế 3). Sự khác biệt giữa isotyp 3R và 4R là hoặc exon 10 được loại bỏ bằng cắt nối lựa chọn (3R) hoặc là hiện diện (4R). Do đó, nhiều đồng dạng của tau tồn tại, nhưng số axit amin (1-441) của đồng dạng dài nhất 4R2N (SEQ ID NO: 1) mới được đại diện để nhận biết số lượng axit amin ở các vị trí tương ứng. Ví dụ, chỉ định “Ser413” chỉ ra serin là gốc axit amin thứ 413 trong 4R2N (SEQ ID NO: 1), mặc dù serin này là gốc axit amin thứ 384 trong 4R1N (SEQ ID NO: 2), thứ 355 trong 4R0N (SEQ ID NO: 3), thứ 382 trong 3R2N (SEQ ID NO: 4), thứ 353 trong 3R1N (SEQ ID NO: 5), và thứ 324 trong 3R0N (SEQ ID NO: 6).

Liên quan đến vai trò của tau trong các bệnh thoái hóa thần kinh, lần đầu tiên khám phá được rằng mối quan hệ tồn tại giữa các đột biến của gen MAPT và tích tụ của tau ở nhiễm sắc thể 17 liên quan đến sa sút trí tuệ trán-thái dương với bệnh Parkinson (FTDF-17), với hơn 40 đột biến gen khác nhau trong gen MAPT đã

được báo cáo trong FTDP-17 (Tài liệu phi sáng chế 4). Đã có giả thuyết đưa ra rằng những đột biến gen như vậy có thể dẫn đến những thay đổi trong tỷ lệ các đồng dạng tau và thay đổi sự tương tác của tau đột biến với các vi ống, do đó góp phần vào việc hình thành bệnh lý. Tuy nhiên, không giống như bệnh thoái hóa thần kinh có yếu tố gia đình, đột biến trong MAPT thường không được tìm thấy trong các bệnh thoái hóa thần kinh đơn phát như AD. Hơn nữa, một trong những đặc điểm của sự tích tụ tau trong các bệnh thoái hóa thần kinh là mức độ biến thể cao do sự phosphoryl hóa. Hơn nữa, ở những bệnh nhân biểu hiện suy giảm chức năng nhận thức nhẹ (MCI), một mối tương quan được nhận thấy giữa các cấp của tau đã được phosphoryl hóa trong dịch não tủy và chứng teo tuyến yên, giả định tau đã được phosphoryl hóa là một dấu ấn sinh học có độ tin cậy đối với bệnh nhân thoái hóa thần kinh với các bệnh lý tau (Tài liệu phi sáng chế 5). Vì lý do này, các chất ức chế enzym đã được cố gắng sử dụng để chống lại kinaza và đặc biệt là GSK-3 beta, là các enzym được tham gia vào quá trình phosphoryl hóa để ức chế sự phosphoryl hóa quá mức của tau và sự cải thiện đã đạt được ở vùng này (Tài liệu phi sáng chế 5). Tuy nhiên, do các kinaza như GSK-3 beta là các enzym không chỉ liên quan đến bệnh mà còn liên quan đến việc kiểm soát chức năng trong quá trình sinh lý bình thường do đó các tác dụng phụ của nó cũng là một vấn đề cần quan tâm. Thực tế, do một vài vị trí nơi mà tau bị phosphoryl hóa bằng GSK-3 beta trùng với các vị trí của sự phosphoryl hóa tau được nhận thấy trong não thai nhi và não người (Tài liệu phi sáng chế 3) có khả năng ảnh hưởng đến chức năng bình thường của tau.

Theo nhận thức thông thường tau ngoại bào thoát ra khỏi tế bào là hệ quả của cái chết tế bào của tế bào thần kinh bị thoái hóa, nhưng nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng tiếp sau sự phosphoryl hóa nội bào quá mức, tau được xử lý và tích

cực được tiết ra khỏi tế bào. Tau bị photphoryl hóa được tiết ra khỏi tế bào được cho là bị khử photpho tại các vị trí photphoryl hóa nhất định, sau đó tác động lên các thụ thể muscarin M1 và M3 của các tế bào phụ cận và do đó thúc đẩy sự photphoryl hóa tau nội bào và góp phần khơi gợi sự chết tế bào (Tài liệu phi sáng chế 6, Tài liệu phi sáng chế 7). Do có xu hướng đồng thuận rằng tau hoạt động như một nhân tố có hoạt động ngoại bào, người ta ngày càng tập trung vào khả năng của nó trong các tác nhân trị liệu, việc sử dụng các thành phần thuốc là các đại phân tử như các kháng thể mà không thể dễ dàng được tạo ra để biểu hiện hoạt động nội bào. Tuy nhiên, như được đề cập ở trên, tau được tiết ra ngoài tế bào có thể được xử lý một phần và có thể bị khử photpho, có thể bị biến đổi vượt thông tin cấu trúc đối với tau bị photphoryl hóa quá mức mà là mục tiêu trước đó. Thuốc mà tác dụng lên các phần của tau bị photphoryl hóa cũng được biết đến là có thể tác động lên chức năng của tau bình thường. Khi tau liên quan đến bệnh lý là mục tiêu đối với các kháng thể hoặc các chất tương tự, việc chọn thực thể sẽ tác dụng lên vị trí bệnh lý cụ thể mà chính là epitop photphoryl hóa tau thậm chí còn quan trọng hơn, và việc lựa chọn epitop trở nên khó khăn hơn do sự phức tạp của các thông tin này.

Sáng chế đề cập đến miễn dịch trị liệu đối với bệnh lý tau mà mục tiêu là protein tau đã được báo cáo, nhằm mục đích tiến hành các hành động cụ thể chống lại tau (Tài liệu phi sáng chế 5, Tài liệu sáng chế 1, Tài liệu sáng chế 2, Tài liệu sáng chế 3). Miễn dịch trị liệu được tiến hành với mục đích thúc đẩy việc sản xuất các kháng thể đặc trị bằng việc cung ứng các vắc-xin peptit và các chất tương tự, và nó được mong đợi giảm tác các dụng phụ do độ đặc hiệu cao của nó là nhắm đến các protein hoặc peptit. Đã có báo cáo về việc chức năng vận động được cải thiện ở các động vật thử nghiệm bộc lộ tau đột biến bằng việc tiêm vào các động

vật thử nghiệm vắc-xin sử dụng từng phần peptit của tau được phosphoryl hóa (có gốc axit amin tương ứng với Ser396 và Ser404 đã được phosphoryl hóa, và có gốc axit amin tương ứng với Ser262 đã được phosphoryl hóa). Tuy nhiên, những báo cáo này được nghiên cứu qua việc sử dụng chuột chuyển gen (chuột Tg) với đột biến gen được tạo ra như P301L (sự biến đổi từ prolin thành leuxin tại gốc axit amin thứ 301 của tau), và mặc dù những con chuột Tg này đáp ứng là vật mẫu chuyển gen cho FTDP-17, một loại bệnh thoái hóa thần kinh gia đình, chúng không đại diện cho hầu hết các bệnh thoái hóa thần kinh trong số các bệnh lý tau mà không kèm theo các đột biến gen tau, và đặc biệt là các bệnh thoái hóa thần kinh đơn phát. Ngoài ra, vì chuột P301Ltg là các vật mẫu cho sự suy giảm chức năng vận động và không phải là vật mẫu đại diện cho sự suy giảm chức năng nhận thức mà là vấn đề đối với rối loạn nhận thức (Tài liệu phi sáng chế 8), khó để biết liệu các kết quả ở những động vật làm mẫu này có thể được áp dụng để điều trị rối loạn nhận thức ở người hay không. Trong Tài liệu sáng chế 4, hiệu quả điều trị bệnh lý tau được kiểm chứng, cung ứng một kháng thể mà tham gia vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể với peptit tau có Ser409 đã được phosphoryl hóa. Tuy nhiên, các vắc-xin peptit là đắt tiền, cần liều cao và thời gian dài để phát huy tác dụng của nó. Hơn nữa, hiệu quả của các vắc-xin peptit và hoạt tính của phản ứng miễn dịch ở người và động vật được cung ứng vắc-xin là khác nhau theo nền tảng di truyền, và việc sản sinh kháng thể hiệu quả không thể luôn luôn được xảy ra ở từng cá nhân. Do đó, trong khi miễn dịch trị liệu bằng miễn dịch thụ động bằng các kháng thể là có khả năng, một số lượng lớn vị trí trong tau bị phosphoryl hóa, và hầu như không có thông tin liên quan đến các kháng thể mà đối với nó các vị trí phosphoryl hóa có ảnh hưởng để sử dụng. Ngoài ra, các kháng thể hiện sẵn

có không thể cùng được xem xét để có chức năng đủ để sử dụng trong trị liệu dựa trên tác dụng của chúng ở các động vật thí nghiệm.

Hơn nữa, khi kháng thể được sử dụng làm hợp chất nền cho tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa, lượng kháng thể sử dụng cho việc điều trị cũng phải cần thiết được xem xét để tránh các tác dụng phụ và giảm thiểu các vấn đề về chi phí y tế, và điều này đặc biệt quan trọng đối với liều lượng cho các bệnh mạn tính hoặc các bệnh di truyền. Ví dụ, liều lượng để điều trị với ActemraR (tocilizumab) là kháng thể kháng IL-6R người là 8 mg trên 1 kg khối lượng cơ thể trong 1 đến 4 tuần, và liều lượng để điều trị cùng với SolirisR (eculizumab) là kháng thể kháng bổ thể C5 được nhân hóa là 600-900 mg đối với một người trưởng thành cho một liều dùng trong 2 đến 4 tuần. Đó là những kháng thể ưu việt được khai thác bằng việc tuyển chọn từ số lượng lớn các kháng thể, nhưng liều lượng của chúng là cao khi so sánh tương đối với các thuốc kháng thể hiện có được sử dụng. Do đó, hiệu quả của các thuốc kháng thể mà sẽ được phát triển trong tương lai phải được bộc lộ ở liều lượng ngang bằng hoặc ít hơn liều lượng này. Ngoài ra, trong khi bộ não là cơ quan được điều trị các bệnh rối loạn nhận thức như AD, đưa thuốc vào cơ thể bằng đường tĩnh mạch hoặc dưới da thường được cho là mang lại hiệu quả thấp trong tỷ suất di chuyển của kháng thể từ máu lên não do sự hiện diện của hàng rào máu não, và vì vậy các kháng thể được sử dụng để điều trị rối loạn nhận thức được mong đợi có tác dụng dược lý thấp hơn so với việc điều trị bệnh liên quan đến các cơ quan khác, và điều này tạo ra một vấn đề nghiêm trọng.

Các triệu chứng chính trong rối loạn nhận thức là suy giảm trí nhớ và suy giảm chức năng nhận thức, và do chức năng nhận thức là cực kỳ quan trọng đối với biểu lộ những quyết định dựa trên ký ức, thông tin và hiệu suất, triệu chứng rối loạn nhận thức có tầm quan trọng chủ yếu. Chức năng vận động, mặt khác,

trong khi là một triệu chứng được phát hiện trong sa sút trí tuệ trán-thái dương liên kết nhiễm sắc thể 17 với bệnh Parkinson (FTDP-17) và giai đoạn cuối của bệnh Alzheimer, không nhất thiết là triệu chứng nghiêm trọng được bộc lộ trong rối loạn nhận thức. Do đó, vấn đề chính cần xem xét để điều trị rối loạn nhận thức là cải thiện chức năng nhận thức. Tuy nhiên, ở thời điểm hiện tại không có phương pháp để thu được tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức mà bộc lộ sự cải thiện ưu việt trong chức năng nhận thức, sử dụng động vật làm mẫu phù hợp cho suy giảm chức năng nhận thức liên quan đến bệnh lý tau mà cần thiết để giải quyết vấn đề được đề cập ở trên, cũng như không có tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức mà bộc lộ hiệu quả đặc trị hoặc vượt trội chống lại rối loạn nhận thức.

Vì những lý do đó, vì vậy yêu cầu cần có tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa mà có hiệu quả mạnh mẽ cải thiện rối loạn nhận thức.

Danh sách trích dẫn

Tài liệu sáng chế

[Tài liệu sáng chế 1] US8012936

[Tài liệu sáng chế 2] WO2010/142423

[Tài liệu sáng chế 3] WO2010/144711

Tài liệu phi sáng chế

[Tài liệu phi sáng chế 1] Kishimoto, T., Takahashi, S., STEP Series Seishinka, tái bản lần thứ 2, trang 103-104, Kaibashobo, 2008

[Tài liệu phi sáng chế 2] Asada, T., Igaku no Ayumi, bản bổ sung, “Suy giảm nhận thức”, trang 5-10, Nhà xuất bản Ishiyaku, 2011

[Tài liệu phi sáng chế 3] Alistair Burns, John O'Brien and David Ames, Dementia. tái bản lần thứ 3, trang 408-464, 2005

[Tài liệu phi sáng chế 4] Arai, T., Shinkei Naika, tập 72, số đặc biệt, (bản bổ sung 6), trang 46-51, 2010

[Tài liệu phi sáng chế 5] Wendy Noble và các tác giả khác, Chuyên gia Opin. Drug Discov., tập 6, số 8, trang 797-810, 2011

[Tài liệu phi sáng chế 6] Miguel Diaz-Hernandes và các tác giả khác, Tạp chí hóa sinh tập 285, trang 32539-32548, 2010

[Tài liệu phi sáng chế 7] Venessa Plouffe và các tác giả khác, PLoS ONE tập 7, trang 36873, 2012

[Tài liệu phi sáng chế 8] Alistair Burns, John O'Brien và David Ames, Dementia. tái bản lần thứ 3, trang 459, 2005

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức, tập trung vào sự phosphoryl hóa tau trong các bệnh lý tau.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức bao gồm kháng thể làm hoạt chất mà tham gia vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể cho tau bị phosphoryl hóa trên gốc axit amin tương ứng với vùng phụ cận của Ser413 hoặc peptit có trình tự axit amin ở vùng phụ cận của Ser413 và bị phosphoryl hóa tại ít nhất một gốc axit amin.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất kháng thể đơn dòng có hiệu quả cải thiện chức năng nhận thức cao và phương pháp điều chế kháng thể mà thậm chí

còn phù hợp hơn để điều trị suy giảm nhận thức như kháng thể nhân hóa dựa trên sự phân tích cấu trúc của kháng thể đơn dòng.

Giải pháp cho vấn đề

Sáng chế được mô tả sau đây. Protein tau của sáng chế không chỉ gồm 4R2N mà còn gồm tất cả 6 loại đồng dạng. Để thuận tiện, vị trí của các gốc axit amin theo sáng chế được xác định dựa trên SEQ ID NO: 1, và ví dụ, nếu gốc axit amin tương ứng với Ser413 của SEQ ID NO: 1 được đề cập, nó tương ứng với serin thứ 413 của SEQ ID NO: 1 (4R2N), hoặc serin là gốc axit amin thứ 384 của SEQ ID NO: 2 (4R1N), thứ 355 của SEQ ID NO: 3 (4R0N), thứ 382 của SEQ ID NO: 4 (3R2N), thứ 353 của SEQ ID NO: 5 (3R1N) hoặc thứ 324 của SEQ ID NO: 6 (3R0N).

(1) Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức gồm kháng thể làm hoạt chất tham gia vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể với protein tau bị phosphoryl hóa tại ít nhất một gốc axit amin tương ứng với các vị trí 410 đến 421 của protein tau được biểu thị bằng SEQ ID NO: là 1.

(2) Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức theo điểm (1) trong đó kháng thể là kháng thể tham gia vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể với đặc trưng là protein tau bị phosphoryl hóa trong rối loạn nhận thức.

(3) Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức theo điểm (1) hoặc (2) trong đó kháng thể tham gia vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể với protein tau bị phosphoryl hóa tại một hoặc nhiều vị trí được chọn từ Ser412, Ser413, Thr414 và Ser416.

(4) Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức theo điểm bất kỳ từ (1) đến (3) trong đó kháng thể là kháng thể mà trong liên kết với protein tau,

liên kết cạnh tranh với kháng thể gồm VH gồm trình tự axit amin được liệt kê như SEQ ID NO: 20 và VL gồm trình tự axit amin được liệt kê như SEQ ID NO: 26.

(5) Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức theo điểm bất kỳ từ (1) đến (3) trong đó kháng thể là kháng thể gồm VH gồm trình tự axit amin được liệt kê như SEQ ID NO: 20 và VL gồm trình tự axit amin được liệt kê như SEQ ID NO: 26.

(6) Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức theo điểm bất kỳ từ (1) đến (4) trong đó kháng thể là kháng thể tham gia vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể với protein tau bị phosphoryl hóa tại gốc axit amin tương ứng với vị trí Ser413.

(7) Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức theo điểm bất kỳ từ (1) đến (6) trong đó kháng thể là kháng thể gồm trình tự CDR trên chuỗi H được biểu thị bằng SEQ ID NO: 7 đến 13, trình tự CDR trên chuỗi H có ít nhất 85% đồng đẳng với ít nhất một trình tự CDR trên chuỗi H được biểu thị bằng SEQ ID NO: 7 đến 13, và/hoặc trình tự CDR trên chuỗi L được biểu thị bằng SEQ ID NO: 14 đến 17, trình tự CDR trên chuỗi L được biểu thị bằng ít nhất một trong các SEQ ID NO: 14 đến 17 hoặc trình tự CDR trên chuỗi L có ít nhất 85% đồng đẳng với ít nhất một trình tự CDR trên chuỗi L được biểu thị bằng SEQ ID NO: 14 đến 17.

(8) Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức theo điểm bất kỳ từ (1) đến (7) trong đó kháng thể là kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi H được biểu thị bằng một trong các SEQ ID NO: 18 đến 24 hoặc vùng biến đổi chuỗi H gồm trình tự có ít nhất 85% đồng đẳng với một trong các SEQ ID NO: 18 đến 24, và/hoặc vùng biến đổi chuỗi L được biểu thị bằng một trong các SEQ ID NO:

25 đến 30 hoặc vùng biến đổi chuỗi L gồm trình tự có ít nhất 85% đồng đẳng với một trong các SEQ ID NO: 25 đến 30.

(9) Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức theo điểm bất kỳ từ (1) đến (8) trong đó kháng thể là kháng thể nhân hóa hoặc kháng thể lai.

(10) Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức chứa peptit làm hoạt chất mà bao gồm trình tự của ít nhất 8 axit amin liên kế từ trình tự axit amin gồm các gốc axit amin tương ứng với axit amin số 410-421 của SEQ ID NO: 1, ít nhất một trong các gốc axit amin trong peptit bị photphoryl hóa.

(11) Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức theo điểm (10) trong đó ít nhất một trong các gốc axit amin bị photphoryl hóa trong peptit tương ứng với gốc axit amin Ser412, Ser413, Thr414 hoặc Ser416 của SEQ ID NO: 1.

(12) Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức theo điểm (10) hoặc (11) trong đó các gốc axit amin bị photphoryl hóa trong peptit bao gồm ít nhất gốc axit amin tương ứng với Ser413 của SEQ ID NO: 1.

(13) Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức theo điểm bất kỳ từ (1) đến (12) trong đó rối loạn nhận thức là bệnh lý tau.

(14) Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức theo điểm (13) trong đó bệnh lý tau là bệnh Alzheimer, thoái hóa hạch nền - vỏ não, liệt trên nhân tiền triền, bệnh Pick, sa sút trí tuệ do các hạt ưa bạc (bệnh hạt argyrophilic), bệnh lý tau đa hệ thống với sa sút trí tuệ (MSTD), sa sút trí tuệ trán-thái dương liên quan đến nhiễm sắc thể 17 với bệnh Parkinson (FTDP-17), sa sút trí tuệ do đám rối sợi thần kinh, đám rối sợi thần kinh khuếch tán và vôi hóa (DNTC), bệnh lý tau do chất trắng và chất vùi thần kinh đệm hình cầu (WMT-GGI) hoặc thoái hóa thùy trán-thái dương với thể vùi dương tính tau (FTLD-tau).

(15) Kháng thể đơn dòng tham gia vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể với peptit gồm trình tự của ít nhất 8 axit amin liền kề từ trình tự axit amin bao gồm axit amin số 410-421 của SEQ ID NO: 1, gốc axit amin tương ứng với Ser413 của SEQ ID NO: 1 trong peptit bị phosphoryl hóa.

(16) Kháng thể cho protein tau bị phosphoryl hóa, kháng thể này là kháng thể có liên kết với kháng nguyên là liên kết cạnh tranh lại kháng thể gồm VH gồm trình tự axit amin được liệt kê như SEQ ID NO: 20 và VL gồm trình tự axit amin được liệt kê như SEQ ID NO: 26.

(17) Kháng thể cho protein tau bị phosphoryl hóa, kháng thể này là kháng thể bao gồm VH gồm trình tự axit amin được liệt kê như SEQ ID NO: 20 và VL gồm trình tự axit amin được liệt kê như SEQ ID NO: 26.

(18) Kháng thể đơn dòng có trình tự CDR trên chuỗi H biểu thị bởi SEQ ID NO: 7 đến 13, trình tự CDR trên chuỗi H biểu thị bởi ít nhất một trong các SEQ ID NO: 7 đến 13, hoặc chuỗi H bao gồm trình tự CDR có ít nhất 85% đồng đẳng với ít nhất một trình tự CDR trên chuỗi H biểu thị bởi SEQ ID NO: 7 đến 13, và/hoặc trình tự CDR trên chuỗi L biểu thị bởi SEQ ID NO: 14 đến 17, trình tự CDR trên chuỗi L biểu thị bởi ít nhất một trong các SEQ ID NO: 14 đến 17, hoặc chuỗi L bao gồm trình tự CDR có ít nhất 85% đồng đẳng với ít nhất một trình tự CDR trên chuỗi L biểu thị bởi SEQ ID NO: 14 đến 17.

(19) Kháng thể đơn dòng bao gồm vùng biến đổi chuỗi H biểu thị bởi một trong các SEQ ID NO: 18 đến 24 hoặc vùng biến động chuỗi H có ít nhất 85% đồng đẳng cùng với một trong các SEQ ID NO: 18 đến 24, và/hoặc vùng biến động chuỗi L biểu thị bởi một trong các SEQ ID NO: 25 đến 30 hoặc vùng biến động chuỗi L có ít nhất 85% đồng đẳng với một trong các SEQ ID NO: 25 đến 30.

(20) Kháng thể đơn dòng theo điểm bất kỳ từ (15) đến (19) trong đó kháng thể là kháng thể nhân hóa hoặc kháng thể lai.

(21) Peptit bao gồm trình tự của ít nhất 8 axit amin liền kề từ trình tự axit amin gồm các gốc axit amin tương ứng với axit amin số 410-421 của SEQ ID NO: 1, ít nhất một trong các gốc axit amin trong peptit bị photphoryl hóa.

(22) Peptit theo điểm (21) trong đó ít nhất một trong các gốc axit amin tương ứng với các axit amin Ser412, Ser413, Thr414 và Ser416 của SEQ ID NO: 1 bị photphoryl hóa.

(23) Peptit theo điểm (21) hoặc (22) trong đó gốc axit amin bị photphoryl hóa là gốc axit amin tương ứng với Ser413 của SEQ ID NO: 1.

Hiệu quả của sáng chế

Sáng chế có thể đề xuất tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức bằng việc chứa kháng thể làm hoạt chất mà tham gia vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể đặc biệt với tau bị photphoryl hóa ở vùng phụ cận của gốc axit amin tương ứng với Ser413 của trình tự liệt kê với số nhận dạng là 1, hoặc peptit bao gồm trình tự axit amin ở vùng phụ cận của Ser413 của SEQ ID NO: 1, ít nhất một trong các gốc axit amin bị photphoryl hóa. Sáng chế cũng đề xuất kháng thể đơn dòng có hiệu quả cải thiện chức năng nhận thức cao và phương pháp điều chế kháng thể mà thậm chí phù hợp hơn để điều trị rối loạn nhận thức như kháng thể nhân hóa trên cơ sở phân tích cấu trúc của kháng thể đơn dòng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là danh sách các đoạn khởi đầu của các trình tự axit amin của các đồng dạng của protein tau người, được sắp thẳng hàng bằng việc dùng ClustalW.

Fig. 2 là danh sách các đoạn cuối của các trình tự axit amin của các đồng dạng của protein tau người, được sắp thẳng hàng bằng việc dùng ClustalW.

Fig. 3 là biểu đồ cho thấy tính đặc hiệu của kháng thể đa dòng của thỏ đối với peptit pSer413.

Fig. 4 là biểu đồ cho thấy kết quả của phép thử sơ bộ ở chuột thí nghiệm được cung ứng kháng thể đa dòng của thỏ nhận diện pSer413.

Fig. 5 là biểu đồ cho thấy kết quả của thử nghiệm thăm dò ở chuột thí nghiệm được cung ứng kháng thể đa dòng của thỏ nhận diện pSer413.

Fig. 6 là biểu đồ đường cho thấy kết quả của thử nghiệm môi trường mở ở chuột thí nghiệm được cung ứng kháng thể đa dòng của thỏ nhận diện pSer413.

Fig. 7 là biểu đồ cột cho thấy kết quả của thử nghiệm môi trường mở ở chuột thí nghiệm được cung ứng kháng thể đa dòng của thỏ nhận diện pSer413.

Fig. 8 là biểu đồ cho thấy kết quả của phép thử sơ bộ ở chuột thí nghiệm được cung ứng kháng thể đơn dòng của chuột nhận diện pSer413 (Ta1505).

Fig. 9 là biểu đồ cho thấy kết quả của thử nghiệm thăm dò ở chuột thí nghiệm được cung ứng kháng thể đơn dòng của chuột nhận diện pSer413 (Ta1505).

Fig. 10 là biểu đồ đường cho thấy kết quả của thử nghiệm môi trường mở ở chuột thí nghiệm được cung ứng kháng thể đơn dòng của chuột nhận diện pSer413 (Ta1505).

Fig. 11 là biểu đồ đường cho thấy kết quả của thử nghiệm môi trường mở ở chuột thí nghiệm được cung ứng kháng thể đơn dòng của chuột nhận diện pSer413 (Ta1505).

Fig. 12 là biểu đồ cho thấy kết quả của thử nghiệm sơ bộ ở chuột thí nghiệm được cung ứng kháng thể đơn dòng của chuột nhận diện pSer396 (Ta9).

Fig. 13 là biểu đồ cho thấy kết quả của thử nghiệm thăm dò ở chuột thí nghiệm được cung ứng kháng thể đơn dòng của chuột nhận diện pSer396 (Ta9).

Fig. 14 là biểu đồ đường cho thấy kết quả của thử nghiệm môi trường mở ở chuột thí nghiệm được cung ứng kháng thể đơn dòng của chuột nhận diện pSer396 (Ta9).

Fig. 15 là biểu đồ cột cho thấy kết quả của thử nghiệm môi trường mở ở chuột thí nghiệm được cung ứng kháng thể đơn dòng của chuột nhận diện pSer396 (Ta9).

Fig. 16 là biểu đồ cột cho thấy mức synaptophysin ở chuột thí nghiệm được cung ứng kháng thể Ta1505.

Fig. 17 là sơ đồ biểu thị đoạn gen chứa gen tau.

Fig. 18 là biểu đồ cho thấy kết quả của thử nghiệm sơ bộ mê cung nước ở chuột bị suy giảm trí nhớ và nhận thức (Tau-Tg) được cung ứng kháng thể Ta1505.

Fig. 19 là biểu đồ cho thấy kết quả của thử nghiệm thăm dò mê cung nước ở chuột bị suy giảm trí nhớ và nhận thức (Tau-Tg) được cung ứng kháng thể Ta1505.

Fig. 20 là biểu đồ cho thấy kết quả của thử nghiệm thăm dò mê cung nước ở chuột bị suy giảm trí nhớ và nhận thức (Tau-Tg) được cung ứng kháng thể Ta9.

Fig. 21 là biểu đồ cho thấy kết quả của thử nghiệm thăm dò mê cung nước ở chuột bị suy giảm trí nhớ và nhận thức (Tau-Tg) được cung ứng kháng thể Ta9.

Fig. 22 là ảnh chụp cho thấy sự nhuộm mô miễn dịch của vùng hồi hải mã CA3 và CA23 với kháng thể Ta1505 ở chuột bị suy giảm trí nhớ và nhận thức (Tau-Tg) được cung ứng kháng thể tiêu chuẩn so sánh IgG (1mg/con) hoặc kháng thể Ta1505 (1mg/con).

Fig. 23 là ảnh chụp cho thấy sự nhuộm mô miễn dịch của vùng hồi cận hải mã với Ta1505 ở chuột bị suy giảm trí nhớ và nhận thức (Tau-Tg) được cung ứng kháng thể tiêu chuẩn so sánh IgG (1mg/con).

Fig. 24 là ảnh chụp cho thấy sự nhuộm mô miễn dịch của vùng hồi cận hải mã với kháng thể Ta1505 ở chuột bị suy giảm trí nhớ và nhận thức (Tau-Tg) được cung ứng kháng thể Ta1505 (1mg/con).

Fig. 25 là ảnh chụp cho thấy sự nhuộm mô miễn dịch của vùng hồi hải mã CA3 và CA23 bằng AT8 ở chuột bị suy giảm trí nhớ và nhận thức (Tau-Tg) được cung ứng kháng thể tiêu chuẩn so sánh IgG (1mg/con) hoặc Ta1505 (1mg/con).

Fig. 26 là ảnh chụp cho thấy sự nhuộm mô miễn dịch của vùng hồi hải mã bằng AT8 ở chuột bị suy giảm trí nhớ và nhận thức (Tau-Tg) được cung ứng kháng thể tiêu chuẩn so sánh IgG (1mg/con).

Fig. 27 là ảnh chụp cho thấy sự nhuộm mô miễn dịch của vùng hồi hải mã bằng AT8 ở chuột bị suy giảm trí nhớ và nhận thức (Tau-Tg) được cung ứng Ta1505 (1mg/con).

Fig. 28 là biểu đồ cho thấy số lượng tau phản ứng G2, AT8, PHF1 và Ta1505 trong phần tan được TBS của não ở chuột bị suy giảm trí nhớ và nhận thức (Tau-Tg) được cung ứng Ta1505 (1mg/con).

Fig. 29 là biểu đồ cho thấy số lượng tau phản ứng G2, AT8, PHF1 và Ta1505 trong phần tan được sarkosyl của não của chuột bị suy giảm trí nhớ và nhận thức (Tau-Tg) được cung ứng Ta1505 (1mg/con).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể mà tham gia vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể đặc biệt cùng với tau bị photphoryl hóa tại gốc axit amin tương ứng với Ser413

của SEQ ID NO: 1 là vị trí bị photphoryl hóa một cách đặc biệt trong bệnh AD, cung ứng kháng thể này cho chuột Tg bộc lộ suy giảm chức năng nhận thức kết hợp với mưng mủ, và đã phát hiện ra rằng chức năng nhận thức có thể được phục hồi xấp xỉ đến mức độ giống với nhóm tiêu chuẩn. Mặt khác, không nhận thấy sự cải thiện đầy đủ chức năng nhận thức bằng việc dùng, để so sánh, nồng độ có thể so sánh được của kháng thể cho tau mà bị photphoryl hóa tại gốc axit amin tương ứng với Ser396 của SEQ ID NO: 1 mà có ái lực cao hơn đối với kháng nguyên tương đương so với kháng thể của sáng chế. Đoạn ở vùng phụ cận của gốc axit amin tương ứng với Ser413 của SEQ ID NO: 1 là vùng mà chưa có thông tin cụ thể nào về mối quan hệ giữa cấu trúc và chức năng của tau được biết đến, và là điều bất ngờ khi khám phá ra rằng kháng thể mà tham gia vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể đặc biệt với vùng này có khả năng cải thiện hiệu quả chức năng nhận thức. Do đó, vị trí ở vùng phụ cận của gốc axit amin tương ứng với Ser413 của SEQ ID NO: 1 mà cho đến nay chưa được chú trọng quan tâm lần đầu tiên được làm sáng tỏ bởi sáng chế là vị trí quan trọng để bắt đầu cải thiện chức năng nhận thức trong các bệnh lý tau, và trên cơ sở đó sáng chế được hoàn thiện.

[Kháng thể kháng tau bị photphoryl hóa]

Tau (protein) phục vụ mục đích của sáng chế không chỉ gồm protein tau người như được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1 đến 6 mà còn bao gồm các đột biến di truyền của chúng. Như được giải thích trong tình trạng kỹ thuật của sáng chế ở trên, hơn 40 đột biến được biết đến trong FTDP-17, bệnh thoái hóa thần kinh gia đình liên quan suy giảm nhận thức, nhưng các vị trí đột biến không nhất thiết bị giới hạn trong phạm vi này. Hơn nữa, protein có đột biến tại các axit amin ở vị trí từ 1 đến 50, tốt nhất là các vị trí từ 1 đến 30 và tốt hơn nữa là các vị trí từ 1 đến 10 như số lượng đột biến trong SEQ ID NO: 1 đến 6 cũng được coi là tau cho mục

đích của sáng chế. Ngoài ra, còn bao gồm các protein có ít nhất 80% đồng đẳng với protein tau người được liệt kê như SEQ ID NO: 1 theo phương pháp BLAST (các điều kiện mặc định cho NCBI PBLAST) và các đồng dạng của chúng. Những protein này cũng bao gồm tau của các loài động vật khác như tinh tinh, khỉ nâu, ngựa, lợn, chó, chuột, thỏ và thú giống chuột có thể được sử dụng để điều chế tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa nhằm đến những protein tau đó cho mục đích cải thiện chức năng nhận thức ở những loài động vật đó.

Số lượng axit amin theo sáng chế mà chính là vị trí của các gốc axit amin, để thuận tiện được chỉ định dựa trên trình tự được liệt kê như SEQ ID NO: 1. Do đó, ví dụ, nếu gốc axit amin tương ứng với Ser413 của SEQ ID NO: 1 được đề cập, tức là chỉ serin là gốc axit amin thứ 413 của SEQ ID NO: 1 (4R2N), thứ 384 của SEQ ID NO: 2 (4R1N), thứ 355 của SEQ ID NO: 3 (4R0N), thứ 382 của SEQ ID NO: 4 (3R2N), thứ 353 của SEQ ID NO: 5 (3R1N) hoặc 324 của SEQ ID NO: 6 (3R0N). Bảng 1 cho thấy vị trí của các gốc axit amin mà có chung vị trí đối với từng đồng dạng. Trong Bảng 1, vị trí của các gốc axit amin đối với từng đồng dạng được biểu thị tương ứng từ 410-421 của SEQ ID NO: 1, và mối quan hệ lẫn nhau về vị trí của các gốc axit amin và các vị trí khác sẽ dễ dàng được hiểu ví dụ dựa vào Fig. 1 và Fig. 2.

Bảng 1

Đồng dạng	4R2N	4R1N	4R0N	3R2N	3R1N	3R0N
SEQ ID NO:	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
Gốc axit amin	Vị trí của gốc axit amin					
Asn	410	381	352	379	350	321
Val	411	382	353	380	351	322
Ser	412	383	354	381	352	323
Ser	413	384	355	382	353	324
Thr	414	385	356	383	354	325
Gly	415	386	357	384	355	326
Ser	416	387	358	385	356	327
Ile	417	388	359	386	357	328
Asp	418	389	360	387	358	329
Met	419	390	361	388	359	330

Val	420	391	362	389	360	331
Asp	421	392	363	390	361	332

Thuật ngữ “kháng thể kháng tau bị phosphoryl hóa” chỉ kháng thể mà tham gia vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể với tau bị phosphoryl hóa tại gốc axit amin ở một hay nhiều vị trí trên trình tự axit amin của tau được đề cập ở trên. Gốc axit amin bị phosphoryl hóa có thể là serin (Ser), threonin (Thr), tyrosin (Tyr) hoặc các gốc axit amin tương tự. Ngoài ra, vị trí tại tau bị phosphoryl hóa mà tại đó kháng thể kháng tau bị phosphoryl hóa của sáng chế tham gia vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể tốt nhất là vị trí mà bị phosphoryl hóa đặc biệt ở bệnh thoái hóa thần kinh như AD. Ngoài ra, một loại hình được ưu tiên khác đối với vị trí của tau bị phosphoryl hóa nơi mà kháng thể kháng tau bị phosphoryl hóa của sáng chế tham gia vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể tốt nhất là kháng thể mà tham gia vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể với tau bị phosphoryl hóa ở một hay nhiều vị trí được chọn từ nhóm các gốc axit amin tương ứng với Ser412, Ser413, Thr414 và Ser416 của SEQ ID NO: 1, tốt hơn nữa là kháng thể tham gia vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể với tau bị phosphoryl hóa tại gốc axit amin tương ứng với Ser412 hoặc Ser413 của SEQ ID NO: 1, hoặc cả hai vị trí, và thậm chí còn tốt hơn nữa là kháng thể tham gia vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể với tau bị phosphoryl hóa tại vị trí của gốc axit amin tương ứng với Ser413 của SEQ ID NO: 1. Ở đây, gốc axit amin tương ứng với Ser412, Ser413, Thr414 hoặc Ser416 của SEQ ID NO: 1 chỉ vị trí tương ứng với số lượng axit amin ở tau 4R2N của người (SEQ ID NO: 1) và như được giải thích ở phần Tình trạng kỹ thuật của sáng chế, vị trí tương ứng ở các đồng dạng hoặc vị trí tương ứng ở các đồng đẳng không phải của người được xử lý cùng một cách bất kể số lượng axit amin được chuyển từ trình tự axit amin đó. Các vị trí tương ứng ở các đồng dạng hoặc đồng

đăng có thể được xác định bằng người có trình độ kỹ thuật thông qua các phân tích phù hợp bằng phương pháp sắp thành từng cặp trình tự như phương pháp Needleman-Wunsch hoặc phương pháp Smith-Waterman, hoặc phương pháp sắp hàng đa trình tự như phương pháp ClustalW hoặc phương pháp PRRP. Một ví dụ cho phương pháp phân tích vị trí tương ứng được thể hiện trong Fig. 1 và Fig. 2 cùng với các trình tự axit amin (biểu thị bằng một chữ cái) của 6 đồng dạng khác nhau ở người được sắp thẳng hàng bằng việc dùng phương pháp ClustalW. Như được thấy ở đây, cấu trúc trong vùng phụ cận của các gốc axit amin tương ứng với Ser412, Ser413, Thr416 của SEQ ID NO: 1 được bảo toàn trong 6 đồng dạng và cái nào tương ứng với các axit amin có thể được nhận biết dễ dàng.

Kháng thể kháng tau bị phosphoryl hóa mà có thể được sử dụng làm tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa theo sáng chế là kháng thể tham gia vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể đặc biệt với protein tau bị phosphoryl hóa tại ít nhất một gốc axit amin từ vị trí 410 đến vị trí 421 của protein tau của SEQ ID NO: 1, tốt nhất kháng thể mà tham gia vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể đặc biệt với protein tau bị phosphoryl hóa tại một hay nhiều vị trí được chọn từ các gốc axit amin tương ứng với Ser412, Ser413, Thr414 và Ser416 của SEQ ID NO: 1, tốt hơn nữa là kháng thể liên kết cạnh tranh lại kháng thể mà có trình tự axit amin VH là SEQ ID NO: 20 và trình tự axit amin VL là SEQ ID NO: 26 (từ đây về sau gọi là “kháng thể 1505”) và thậm chí tốt hơn nữa là kháng thể tham gia vào phản ứng đặc biệt với protein tau bị phosphoryl hóa tại vị trí Ser413. Protein tau bị phosphoryl hóa tại ít nhất một gốc axit amin tương ứng với các vị trí từ 410 đến 421 của SEQ ID NO: 1, hoặc protein tau bị phosphoryl hóa tại vị trí của gốc axit amin tương ứng với Ser413 của SEQ ID NO: 1 là protein tau bị phosphoryl hóa tại vị trí tương ứng bao gồm các lớp kháng thể của người hoặc của các loài khác như được đề cập ở

trên nhưng tốt hơn nữa là protein của người và thậm chí tốt hơn nữa là một trong 6 đồng dạng của người.

Liên quan đến protein tau bị phosphoryl hóa tại ít nhất một gốc axit amin tương ứng với các vị trí 410 đến 421 của SEQ ID NO: 1 của sáng chế, protein tau bị phosphoryl hóa tại một hay nhiều vị trí được chọn từ các gốc axit amin tương ứng với Ser412, Ser413, Thr414 và Ser416 của SEQ ID NO: 1, hoặc protein tau bị phosphoryl hóa tại vị trí của gốc axit amin tương ứng với Ser413 của SEQ ID NO: 1, những protein tau bị phosphoryl hóa này bao gồm các peptit có đồng đẳng hoàn chỉnh với các đoạn của các trình tự axit amin tương ứng với các vị trí từ 410 đến 421 của protein tau, hoặc đồng đẳng với ít nhất 80% của trình tự và bị phosphoryl hóa tại những gốc axit amin này và kháng thể mà tham gia vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể riêng với peptit đó cũng là kháng thể kháng tau bị phosphoryl hóa theo sáng chế.

Theo sáng chế, “tham gia vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể” có nghĩa là sự liên kết với protein tau bị phosphoryl hóa tại ít nhất một gốc axit amin tương ứng với các vị trí 410 đến 421 của SEQ ID NO: 1, protein tau bị phosphoryl hóa tại ít nhất một hoặc nhiều vị trí được chọn từ các gốc axit amin tương ứng với Ser412, Ser413, Thr414 và Ser416 của SEQ ID NO: 1 và/hoặc protein tau bị phosphoryl hóa tại vị trí của gốc axit amin tương ứng với Ser413 của SEQ ID NO: 1, bằng ái lực được biểu thị bằng hằng số cân bằng phân ly (KD) của ít nhất 1×10^{-6} M, tốt hơn là liên kết bằng ái lực được biểu thị bằng hằng số cân bằng phân ly của ít nhất 1×10^{-7} M và thậm chí tốt hơn nữa là liên kết bằng ái lực được biểu thị bởi hằng số cân bằng phân ly của ít nhất 1×10^{-8} M.

Thuật ngữ “đặc biệt” có nghĩa là liên kết với protein tau bị phosphoryl hóa tại ít nhất một gốc axit amin tương ứng với các vị trí 410 đến 421 của SEQ ID

NO: 1, protein tau bị phosphoryl hóa tại ít nhất một hay nhiều vị trí được chọn từ các gốc axit amin tương ứng với Ser412, Ser413, Thr414 và Ser416 của t SEQ ID NO: 1 và/hoặc protein tau bị phosphoryl hóa tại vị trí của gốc axit amin tương ứng với Ser413 của SEQ ID NO: 1 ở trạng thái mà ít nhất mạnh gấp 10 lần, tốt hơn là mạnh hơn ít nhất 30 lần và thậm chí tốt hơn nữa là mạnh hơn 100 lần so với liên kết với protein tau không bị phosphoryl hóa tại vị trí đó (bao gồm các peptit có đồng đẳng hoàn chỉnh với đoạn trình tự axit amin của protein tau hoặc có đồng đẳng với ít nhất 80% của trình tự đó).

Ngoài ra, “liên kết cạnh tranh” với kháng thể có trình tự axit amin VH là SEQ ID NO: 20 và có trình tự axit amin VL là SEQ ID NO: 26 (kháng thể 1505) là hiện tượng mà trong đó, khi một kháng thể khác đồng hiện diện với kháng thể đơn dòng trong quá trình liên kết với kháng nguyên, liên kết của kháng thể đơn dòng bị chặn, và theo cách nói thông thường, điều này có thể được đo bằng việc đo lượng chất thêm vào (nồng độ) tại đó lượng liên kết của kháng thể đơn dòng với kháng nguyên bị giảm khi một kháng thể khác được thêm vào với lượng khác nhau (nồng độ) đối với lượng được trộn lẫn (nồng độ) của kháng thể đơn dòng, mức độ ngăn cản được biểu thị bằng giá trị IC_{50} hoặc K_i . Kháng thể liên kết cạnh tranh với kháng thể có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 20 và có trình tự VL là SEQ ID NO: 26 (kháng thể 1505) theo sáng chế là kháng thể có giá trị IC_{50} thấp hơn 1 μM , tốt nhất là thấp hơn 100 nM và thậm chí tốt hơn nữa là thấp hơn 10 nM, khi liên kết kháng nguyên-kháng thể bị phát hiện bằng việc dùng 10 nM kháng thể đơn dòng.

Liên kết kháng thể-kháng nguyên của những kháng thể đó với protein tau bị phosphoryl hóa có thể được xác định bằng phép đo sự liên kết phù hợp bởi người có trình độ kỹ thuật bằng việc dùng hệ thống pha rắn hoặc pha lỏng với phương

pháp như là ELISA, EIA, cộng hưởng Plasmon bề mặt, FRET, LRET hoặc các phương pháp tương tự mặc dù không giới hạn bởi các phương pháp đó. Khi đo lường liên kết kháng nguyên-kháng thể đó kháng thể và/hoặc kháng nguyên (protein tau bị phosphoryl hóa hoặc protein tau) được đánh dấu bằng enzym, chất huỳnh quang, chất phát quang, chất đồng vị phóng xạ hoặc các chất tương tự, và phương pháp đo lường thích hợp đối với các tính chất vật lý và/hoặc hóa học của các chất đánh dấu được sử dụng để cho phép phát hiện phản ứng kháng nguyên-kháng thể.

Kháng thể kháng tau bị phosphoryl hóa của sáng chế cũng bao gồm kháng thể trong đó vùng biến đổi chuỗi H chứa các trình tự axit amin CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 bao gồm tổ hợp SEQ ID NO: 7 hoặc 8 như trình tự axit amin CDR-H1, một trình tự được chọn từ các SEQ ID NO: 9, 10, 11 và 12 như trình tự axit amin CDRH-H2 và SEQ ID NO: 13 như trình tự axit amin CDRH-H3, và vùng biến đổi chuỗi L chứa các trình tự axit amin CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 gồm tổ hợp của SEQ ID NO: 14 hoặc 15 như trình tự axit amin CDR-L1, SEQ ID NO: 16 như trình tự axit amin CDR-L2 và SEQ ID NO: 17 như trình tự axit amin CDR-L3. Kháng thể tốt nhất là kháng thể trong đó tập hợp CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 ở vùng biến đổi chuỗi H được chọn bất kỳ từ các tổ hợp SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12 và SEQ ID NO: 13; và SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 13, bộ CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 ở vùng biến đổi chuỗi L là SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 17; hoặc SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 17 và tốt hơn nữa là kháng thể trong đó tổ hợp của bộ CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 ở vùng biến đổi chuỗi H và bộ CDR-L1, CDR-L2 và

CDR-L3 ở vùng biến đổi chuỗi L được chọn từ các tổ hợp SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 8, và SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 17; và SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 17. Kháng thể của sáng chế cũng bao gồm những kháng thể mà trong đó ít nhất một trong các trình tự CDR tương ứng trong các trình tự axit amin CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 là trình tự biểu hiện ít nhất 85% đồng đẳng và tốt nhất là ít nhất 90% đồng đẳng với SEQ ID bất kỳ từ NO 7 đến 17 theo phương pháp BLAST (điều kiện mặc định cho NCBI PBLAST).

Phương pháp xác định trình tự CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 hoặc CDR-L3 ở kháng thể có thể là, ví dụ, phương pháp của Kabat hoặc phương pháp của Chothia và người có trình độ kỹ thuật có thể xác định trình tự của đoạn tương ứng với mỗi CDR, các phương pháp Kabat (Kabat, E.A. và Wu, T.T., J. Immunol., 147, 1709-1719, 1991) và Chothia (Al-Lazikani, B., Lesk, A.M. và Chothia, C., J. Mol. Biol., 273, 927-948, 1997) là các kiến thức công nghệ phổ biến đối với những người có hiểu biết về các lĩnh vực liên quan và tóm lược của chúng có thể được tìm thấy ví dụ trên trang web của Dr. Andrew C.R. Martin's Group (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>).

Là một dạng khác của kháng thể của sáng chế, nó có thể là kháng thể mà trong đó trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi H (VH) được chọn từ SEQ ID NOs: 18 đến 24 và trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi L (VL) được chọn từ SEQ ID NOs: 25 đến 30 và tốt nhất là kháng thể trong đó tổ hợp của các trình tự

axit amin VH và VL được chọn từ các tổ hợp SEQ ID NO: 18 và SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 20 và SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 21 và SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 22 và SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 29, và SEQ ID NO: 24 và SEQ ID NO: 30. Kháng thể của sáng chế bao gồm kháng thể mà trong đó ít nhất một trình tự được chọn từ các trình tự axit amin VH và VL là trình tự axit amin VH bất kỳ được liệt kê như SEQ ID NO: 18 đến 24 hoặc trình tự axit amin VL bất kỳ được liệt kê như SEQ ID NO: 25 đến 30 và các trình tự biểu hiện ít nhất 85% đồng đẳng (giống nhau) và tốt nhất là ít nhất 90% đồng đẳng với SEQ ID NO: 18 đến 30 dựa vào phương pháp BLAST (các điều kiện chuẩn cho NCBI PBLAST).

Các trình tự axit amin của các vùng ổn định trong các kháng thể đó được chọn từ kiểu phụ của loài động vật có vú IgG, IgA, IgM, IgE và IgD hoặc các biến thể của chúng.

Người có trình độ kỹ thuật có thể tạo thể tái kết hợp của các kháng thể phù hợp cho việc dùng thuốc nhằm điều trị bệnh lý như các kháng thể nhân hóa dựa trên thông tin đối với các trình tự axit amin của CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 và/hoặc các trình tự nucleotit của việc mã hóa gen đối với chúng hoặc các trình tự axit amin của CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 và/hoặc các trình tự nucleotit của việc mã hóa gen đối với chúng và người có trình độ kỹ thuật cũng có thể tạo các kháng thể lai theo mục đích đó dựa vào thông tin đối với trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi H và/hoặc trình tự nucleotit của việc mã hóa gen cho nó. Hơn nữa, người có trình độ kỹ thuật có thể sử dụng công nghệ đã biết đến một cách phù hợp để tạo ra các kháng thể hạ phân tử hoặc các kháng thể scaffold dựa vào thông tin đối với các trình tự axit amin của CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 và/hoặc các trình tự nucleotit của việc mã hóa gen đối với chúng hoặc các trình tự

axit amin của CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 và/hoặc các trình tự nucleotit của việc mã hóa gen đối với chúng hoặc dựa vào thông tin cho trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi H và/hoặc trình tự nucleotit của việc mã hóa gen đối với nó hoặc trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi L và/hoặc trình tự nucleotit của việc mã hóa gen đối với nó.

Kháng thể của sáng chế có thể là kháng thể gồm 2 chuỗi H và 2 chuỗi L hoặc có thể là kháng thể chỉ gồm 2 chuỗi H. Tương tự, kháng thể của sáng chế có thể là đoạn kháng thể ví dụ như các đoạn kháng thể gồm $F(ab')_2$, Fab và các cấu trúc Fv.

Kháng thể của sáng chế có thể thu được bởi những người có trình độ kỹ thuật bằng việc dùng các kỹ thuật đã được biết đến. Kháng thể của sáng chế có thể là kháng thể đa dòng hoặc kháng thể đơn dòng (Milstein và các tác giả khác, Nature (Anh Quốc), 06/10/1983, tập 305, số 55934, trang 537-540). Ví dụ, kháng thể đa dòng có thể thu được bằng việc dùng protein tau kháng nguyên bị phosphoryl hóa tại ít nhất một dư lượng axit amin tương ứng với các vị trí 410 đến 421 của SEQ ID NO: 1, protein tau bị phosphoryl hóa tại ít nhất một hoặc nhiều vị trí được chọn từ Ser412, Ser413, Thr414 và Ser416 của SEQ ID NO: 1, protein tau bị phosphoryl hóa tại vị trí Ser413 của SEQ ID NO: 1 hoặc peptit có đồng đẳng hoàn chỉnh với ít nhất một đoạn của trình tự axit amin từ các vị trí 410 đến 421 của protein tau của SEQ ID NO: 1 hoặc đồng đẳng với ít nhất 80% trình tự và bị phosphoryl hóa tại các gốc axit amin này để làm nhạy hóa động vật có vú và kháng thể được thu lại từ huyết thanh của động vật. Khi peptit được sử dụng làm kháng nguyên, kháng nguyên này có thể được sử dụng ở dạng tiếp hợp với một protein mang như BSA hoặc KLH hoặc với polylysine. Ví dụ cụ thể của các peptit được sử dụng làm các kháng thể bao gồm các peptit của SEQ ID NO: 31 hoặc 32 bị phosphoryl hóa tại

vị trí tương ứng với Ser413 của SEQ ID NO: 1 như được mô tả trong Ví dụ 1 và 2, nhưng không giới hạn trong những chất này. Đối với kháng thể đơn dòng theo sáng chế, tế bào lai được tạo ra bằng việc sử dụng các tế bào bạch cầu có khả năng tạo kháng thể (immunocytes) từ động vật có vú đã được làm nhạy hóa với kháng nguyên và hợp nhất chúng lại với các tế bào u tủy myeloma hoặc các tế bào tương tự có thể được nhân bản vô tính và kháng thể thu lại từ chất nuôi cấy. Phương pháp để thu được các kháng thể đơn dòng đó được mô tả trong Ví dụ 2 và các kháng thể đơn dòng thu được bằng cách đó có thể là các kháng thể đơn dòng gồm các trình tự axit amin VH của SEQ ID NO: 18 đến 24 và các trình tự VL của SEQ ID NO: 25 đến 30 (Ta1501, 1502, 1505-1509) nhưng không giới hạn trong số đó.

Đối với kháng thể đơn dòng thu được, có thể thu được phân tử axit nucleic có trình tự gen mã hóa cho các axit amin của protein kháng thể và có thể chuẩn bị kháng thể bằng các kỹ thuật công nghệ gen sử dụng phân tử axit nucleic đó. Tạo ra sự cải biến để tăng khả năng liên kết hoặc tính đặc hiệu của kháng thể, sử dụng thông tin di truyền của kháng thể đó ví dụ như thông tin cho chuỗi H, chuỗi L hoặc các vùng biến đổi của chúng hoặc các trình tự CDR và điều chế các kháng thể có cấu trúc phù hợp để sử dụng trong việc điều trị bằng việc biến đổi kháng thể của động vật như chuột thành kháng thể của người là các kỹ thuật được biết đến rộng rãi đối với những người có trình độ kỹ thuật. Hơn nữa, bằng việc dùng các động vật chuyển gen không phải người trong đó gen kháng thể người được chuyển đổi, như các loài động vật để làm nhạy hóa bằng kháng nguyên, có thể thu được các kháng thể đơn dòng của người. Ngoài ra, các kỹ thuật trong đó thư viện thực khuẩn thể hiện vùng liên kết kháng nguyên của kháng thể người hoặc một phần của nó (bộc lộ trên thực khuẩn thể kháng thể người) được sử dụng để thu được kháng thể liên kết đặc biệt với kháng nguyên tương ứng hoặc thực khuẩn

thể vô tính bao gồm trình tự axit amin đặc trưng, các kháng thể người được điều chế từ thông tin đó có thể được thực hiện một cách phù hợp bởi người có trình độ kỹ thuật, là phương pháp không yêu cầu sự làm nhạy hóa các động vật có vú (Ví dụ xem Taketo Tanaka và các tác giả khác., Keio J. Med., Tập 60, trang 37-46).

Hơn nữa, như phương pháp sản xuất các kháng thể đơn dòng được đề cập trên đây, tế bào lai sản xuất kháng thể để thu được có thể được nuôi cấy và kháng thể được tinh chế và thu được bằng các phương pháp phổ biến từ kết quả của việc nuôi cấy trên bề mặt. Là một phương pháp sản xuất khác, việc mã hóa gen cho kháng thể và cụ thể hơn là mã hóa gen cho chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ globulin miễn dịch có thể thu được từ tế bào lai sản xuất kháng thể mục tiêu hoặc từ thực khuẩn thể vô tính hoặc loại tương tự thu được bằng bộc lộ trên thực khuẩn thể kháng thể người và vector để biểu thị gen được điều chế và chuyển đến các tế bào chủ (tế bào động vật có vú, tế bào côn trùng, vi khuẩn hoặc các loại tương tự) để sản xuất kháng thể. Trong suốt quá trình này, người có trình độ kỹ thuật có thể thực hiện các kỹ thuật được biết đến rộng rãi để biến đổi gen của việc mã hóa gen đối với chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ globulin miễn dịch, để đưa ra những đặc điểm mong muốn hoặc có thể tạo ra kháng thể của người, protein lai kháng thể, kháng thể hạ phân tử hoặc kháng thể scaffold sử dụng thông tin có cấu trúc đối với vùng biến đổi hoặc CDR của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ globulin miễn dịch. Ngoài ra, để cải thiện hiệu quả của kháng thể hoặc tránh các tác dụng phụ, các kỹ thuật được biết đến rộng rãi mà những người có trình độ kỹ thuật có thể sử dụng một cách phù hợp để tạo ra sự biến đổi trong cấu trúc của vùng ổn định của kháng thể hoặc điều chỉnh các phân chuỗi hợp chất nhóm đường của nó.

[Peptit bị phosphoryl hóa bằng trình tự axit amin bắt nguồn từ tau]

Sáng chế bao gồm các peptit gồm các đoạn của trình tự axit amin của tau và bị phosphoryl hóa tại một hoặc nhiều gốc axit amin. Gốc axit amin “bị phosphoryl hóa” là gốc mà được liên kết este với nhóm photphat tại chuỗi bên của gốc axit amin, các gốc axit amin bị phosphoryl hóa đặc trưng là serin, threonin và tyrosin. Peptit bị phosphoryl hóa là peptit có độ dài ít nhất là 8 axit amin gồm ít nhất 3 axit amin liên kề trong số trình tự axit amin gồm các gốc axit amin tương ứng với các số axit amin 410-421 của SEQ ID NO: 1, tốt nhất là peptit có độ dài ít nhất là 8 axit amin gồm ít nhất 5 axit amin liên kề, và tốt hơn nữa là peptit có độ dài ít nhất là 8 axit amin chứa ít nhất 8 axit amin liên kề. Tương tự, các gốc axit amin bị phosphoryl hóa trong các peptit bị phosphoryl hóa có thể là một trong bất kỳ các gốc axit amin tương ứng với các số axit amin 410-421 của SEQ ID NO: 1, tốt nhất là một trong trong bất kỳ các gốc axit amin tương ứng với các axit amin Ser412, Ser413, Thr414 và Ser416 của SEQ ID NO: 1 và tốt hơn nữa là gốc axit amin tương ứng với Ser413 của SEQ ID NO: 1. Ví dụ tiêu biểu cho peptit bị phosphoryl hóa đó là peptit bị phosphoryl hóa được sử dụng để điều chế kháng thể trong Ví dụ 1 (SEQ ID NO: 31) nhưng không giới hạn trong ví dụ này.

Peptit bị phosphoryl hóa có trình tự axit amin bắt nguồn từ tau theo sáng chế có thể được sử dụng trong tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức mà bao gồm kháng nguyên để điều chế kháng thể kháng tau bị phosphoryl hóa theo sáng chế hoặc bản thân peptit đó. Peptit bị phosphoryl hóa cũng có thể được biến đổi cùng với các chất mang chức năng khác, theo mục tiêu của sáng chế, tại các đầu cuối N và/hoặc các đầu cuối C của trình tự đó. Ví dụ, có thể có gốc methionin, axetyl hoặc axit pyroglutamic được thêm vào đầu cuối N của peptit bị phosphoryl hóa hoặc nó có thể được biến đổi với chất huỳnh quang hoặc các chất tương tự. Các chất được sử dụng để biến đổi các đầu cuối N và/hoặc các đầu cuối

C của peptit bị photphoryl hóa cũng có thể là các peptit hoặc các protein, các ví dụ trong đó bao gồm các peptit với các trình tự axit amin của các thẻ trình tự (thường là thẻ histidin hoặc thẻ FLAG), trình tự nhận diện của thụ thể tế bào T (TCR) hoặc các kháng nguyên tương thích mô chính (MHC) và các protein virus hoặc vi khuẩn, hoặc các peptit với các trình tự bắt nguồn từ chúng được thêm vào các đầu cuối N và các đầu cuối C. Việc biến đổi peptit bị photphoryl hóa đó có thể hoàn thành bằng việc dùng các phương pháp đã được những người có trình độ kỹ thuật biết đến như phương pháp được mô tả bởi Hermanson và các tác giả khác (Các kỹ thuật phân tử sinh học, Hoa Kỳ, 1996, Academic Press).

Peptit bị photphoryl hóa của sáng chế có thể được sản xuất bởi người có trình độ kỹ thuật bằng việc dùng các phương pháp kỹ thuật di truyền hoặc phương pháp tổng hợp phù hợp. Ví dụ của các phương pháp sản xuất các peptit bị photphoryl hóa bằng phương pháp tổng hợp gồm các phương pháp Boc (Wakamiya T. và các tác giả khác, Ký hiệu hóa học, tập 22 trang 1401, 1993), các phương pháp Fmoc (PERICH, J. W., Tạp chí quốc tế về nghiên cứu peptit và protein, tập 40, trang 134-140, 1992) và phương pháp được mô tả trong Sáng chế Nhật Bản số 3587390, mặc dù các phương pháp phù hợp khác có thể được áp dụng bởi người có trình độ kỹ thuật. Tương tự, các phương pháp sản xuất bằng kỹ thuật di truyền có thể bao gồm việc điều chế vật liệu di truyền (DNA, RNA) có trình tự nucleotit mã hóa cho peptit được sản xuất hoặc tiền chất của nó và chèn vào vector biểu hiện thích hợp cùng với việc thêm trình tự vùng khởi động và các chất tương tự để đưa vào chất chính để biểu hiện, hoặc dùng hệ thống tổng hợp protein ngoài tế bào. Trong trường hợp này, peptit bị photphoryl hóa tại vị trí thích hợp có thể được sản xuất bằng phản ứng photphoryl hóa thích hợp tại chất chính bằng kinaza ở trong chất chủ hoặc được tạo ra bằng quá trình biến đổi gen hoặc peptit thích hợp có thể

được thu thập trước và sau đó được phản ứng bằng kinaza hoặc các chất tương tự trong vitro cho phản ứng photphoryl hóa. Đối với chất trong phản ứng photphoryl hóa, enzym được sử dụng có thể là enzym có vai trò trong phản ứng photphoryl hóa tau đối với các peptit thích hợp đã được biết đến như GSK3 hoặc CDK5. Để thu được peptit với dư lượng axit amin bị photphoryl hóa, trong số các peptit bị photphoryl hóa theo cách trên ở chất chính hoặc trong vitro, có phương pháp được sử dụng để thu hồi peptit bị photphoryl hóa được liên kết đặc biệt với kháng thể trong phản ứng kháng nguyên-kháng thể sử dụng kháng thể kháng tau bị photphoryl hóa được đề cập ở trên.

[Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức gồm kháng thể kháng tau bị photphoryl hóa hoặc peptit tau bị photphoryl hóa]

Thuật ngữ “rối loạn nhận thức” đối với người có nghĩa là tình trạng suy giảm chức năng trí tuệ mà bị tiến triển hoặc mắc phải và nó được coi như một loại rối loạn trí tuệ (Kamijima, K., Niwa, S., Nankodo's Essential Well - Advanced Series, New Seishin Igaku, trang 69-70, 2008) và ở nghĩa rộng hơn chúng được coi là các bệnh biểu hiện rối loạn trí tuệ và/hoặc suy giảm trí nhớ. Trong các bệnh thoái hóa thần kinh như AD, “thoái hóa thần kinh” có thể được xác định bằng việc xác nhận sự hiện diện của các đám rối sợi thần kinh (NFT) bằng việc phân tích mô học, nhưng bác sỹ có thể tiến hành chẩn đoán bệnh thoái hóa thần kinh bằng thang đánh giá sa sút trí tuệ Hasegawa đã hiệu chỉnh (HDS-R) hoặc thang đánh giá tâm thần tối thiểu (MMSE) dựa trên sự chắc chắn là một phần của việc kiểm tra bệnh học thần kinh, bằng thang điểm sa sút trí tuệ lâm sàng (CDR) hoặc thang đánh giá chức năng (FAST) dựa trên việc quan sát, bằng việc gia tăng sự phong phú của tau hoặc tau bị photphoryl hóa hoặc gia tăng sự phong phú của A β trong dịch não tủy là phép kiểm tra hóa sinh, hoặc dựa trên thông tin thu được từ sọ CT, sọ MRI,

SPECT hoặc PET là phép kiểm tra hình ảnh, để chẩn đoán rối loạn nhận thức và đặc biệt là thoái hóa thần kinh. Do đó, tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức của sáng chế được cung ứng cho bệnh nhân được bác sĩ chẩn đoán bị rối loạn nhận thức và nó đã có hiệu quả cải thiện so với trước khi dùng thuốc đối với ít nhất một mục chẩn đoán của bệnh thoái hóa thần kinh hoặc tác dụng ức chế sự tiến triển của các triệu chứng hoặc duy trì hoặc hồi phục trạng thái trước khi dùng thuốc.

Các bệnh nhân được cung ứng tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức của sáng chế là các bệnh nhân bị rối loạn nhận thức và đặc biệt là các bệnh nhân bị các bệnh lý tau mà bao gồm cả các bệnh nhân bị bệnh Alzheimer (AD), thoái hóa hạch nền - vỏ não (CBD hoặc CBS), liệt trên nhân tiến triển, bệnh Pick, sa sút trí tuệ do các hạt ưa bạc (bệnh hạt argyrophilic), bệnh lý tau đa hệ thống với chứng mất trí (MSTD), sa sút trí tuệ trán-thái dương liên kết nhiễm sắc thể 17 với bệnh Parkinson (FTDP-17), sa sút trí tuệ do đám rối sợi thần kinh, đám rối sợi thần kinh khuếch tán và vôi hóa (DNTC), bệnh lý tau do chất trắng và chất vùi thần kinh đệm hình cầu (WMT-GGI), thoái hóa thùy trán-thái dương và thể vùi dương tính tau (FTLD-tau), hội chứng Parkinson của Von Economo và viêm não xơ hóa bán cấp tiến triển hoặc bệnh não của võ sĩ quyền Anh. Do đó, tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức của sáng chế là tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa các bệnh lý tau và từ các điểm nhìn khác nhau, nó có thể được coi là tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa bệnh Alzheimer (AD), thoái hóa hạch nền - vỏ não (CBD hoặc CBS), liệt trên nhân tiến triển, bệnh Pick, sa sút trí tuệ do các hạt ưa bạc (bệnh hạt argyrophilic), bệnh lý tau đa hệ thống với chứng mất trí (MSTD), sa sút trí tuệ trán-thái dương liên quan đến nhiễm sắc thể 17 với bệnh Parkinson (FTDP-17), sa sút trí tuệ do đám rối sợi thần kinh, đám rối sợi thần kinh khuếch

tán và vôi hóa (DNTC), bệnh lý tau do chất trắng và chất vùi thần kinh đệm hình cầu (WMT-GGI), thoái hóa thùy trán-thái dương và thể vùi dương tính tau (FTLD-tau), hội chứng Parkinson của Von Economo và viêm não xơ hóa bán cấp tiến triển hoặc bệnh não của võ sĩ quyền Anh.

Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức của sáng chế cũng có thể được coi là có hiệu quả cải thiện chức năng nhận thức hoặc ngăn ngừa sự suy giảm hoặc duy trì chức năng nhận thức ở các động vật không phải con người. Những động vật này bao gồm các loài động vật như tinh tinh, khỉ nâu, ngựa, lợn, chó, chuột, thỏ và thú giống chuột, mèo và các loài tương tự bậc lộ tau có đồng đẳng cao với tau của người và không bị giới hạn trong các loài này.

[Động vật thí nghiệm đối với rối loạn nhận thức]

Các động vật để nghiên cứu tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức của sáng chế bao gồm động vật thí nghiệm đối với rối loạn nhận thức trong đó động vật thí nghiệm bị các bệnh lý tau có thể được đề cập cụ thể. Động vật thí nghiệm cho các bệnh lý tau là các động vật có biểu hiện tau loại bình thường hoặc tau đột biến gen trong não và đặc biệt là các động vật thí nghiệm biểu hiện sự suy giảm chức năng nhận thức. Những động vật này biểu hiện tau bình thường hoặc tau đột biến gen trong não có thể được chuẩn bị bằng kỹ thuật di truyền, một ví dụ điển hình là các con chuột biến đổi gen (chuột Tg). Các động vật thí nghiệm như chuột Tg mà biểu hiện tau đột biến gen có ích là các con vật thí nghiệm bị bệnh lý tau gia đình di truyền, nhưng để kiểm tra hiệu quả của tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa các bệnh lý tau đơn phát mà chiếm đa số ở người, hiệu quả tốt nhất là được bậc lộ ở chuột Tg biểu hiện tau bình thường. Thích hợp nhất là chuột Tg biểu hiện tau bình thường là chuột được chuẩn bị trong các ví dụ sản xuất của sáng chế nhưng cũng có thể dùng chuột Tg như được báo cáo bởi Kambe và các

tác giả khác (Sinh học thần kinh của bệnh, tập 42, trang 404-414, 2011) và Kimura và các tác giả khác (EMBO J. tập 26, trang 5143-5152, 2007). Tuy nhiên mặc dù suy giảm chức năng nhận thức được nhận thấy ở những con chuột của Kambe và các tác giả khác và Kimura và các tác giả khác, suy giảm nhận thức xuất hiện lần lượt sau 14 tháng tuổi và 20 tháng tuổi và do đó sự khởi đầu suy giảm nhận thức là bước vào quá trình lão hóa và tác động lão hóa cũng có thể là yếu tố góp phần, trong khi các tác động và việc nuôi dưỡng dài hạn cũng là vấn đề. Ngược lại, chuột được chuẩn bị trong các ví dụ sản xuất của sáng chế biểu hiện tau người loại bình thường và biểu hiện sự khởi đầu việc suy giảm chức năng nhận thức ở giai đoạn tương đối sớm khoảng 6 tháng tuổi và chúng do đó là động vật thí nghiệm rối loạn nhận thức thích hợp nhất mà yếu tố tuổi già có thể được loại trừ và việc sử dụng các động vật thí nghiệm đó cho phép đánh giá chính xác hơn về tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức mà có hiệu quả cải thiện chức năng nhận thức.

Phương pháp ưu tiên của kiểm chứng hiệu quả của tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức theo sáng chế ở động vật thí nghiệm là phương pháp kiểm tra chức năng nhận thức như kiểm tra trí nhớ và nhận thức. Phương pháp đó có thể là thử nghiệm mê cung nước Morris, thử nghiệm bước qua nhận thức hoặc thử nghiệm nhận ra đối tượng mới, nhưng tốt nhất là kết hợp các thử nghiệm đo lường hành vi như thử nghiệm môi trường mở nhằm mục đích xem xét các điều kiện về số lượng hành vi và sự lo lắng của động vật.

Đối với các phương pháp để kiểm chứng hiệu quả của tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức theo sáng chế, có thể sử dụng các phương pháp kiểm tra mức protein tau hoặc tau bị phosphoryl hóa trong mô não trong quá trình dùng thuốc của động vật thí nghiệm bị rối loạn nhận thức. Trong AD và các bệnh

thoái hóa thần kinh khác, các mức độ biểu hiện của protein tau hoặc sự tăng bất thường tau bị phosphoryl hóa có liên quan đến bệnh lý (Khalid Iqbal và các tác giả khác, Curr. Alzheimer Res., tập 7, trang 654-664, 2010). Việc giảm sự biểu hiện tau và mức độ tau bất thường bị phosphoryl hóa ở một số động vật thí nghiệm bị bệnh lý được biết đến rộng rãi là tạo ra sự cải thiện chức năng nhận thức và chức năng vận động (K. Santa Cruz và các tác giả khác, Khoa học, 30, tập 9, trang 476-481, 2005; Sylvie Le Corre và các tác giả khác, Proc. Nat. Acad. Sci. Hoa Kỳ, 10, tập 3, trang 9673-9678, 2006). Là một phương pháp kiểm tra sự thay đổi ở protein tau hoặc tau bị phosphoryl hóa, nó có thể được thực hiện bằng phương pháp như lai thẩm protein sử dụng đồng chất mô não như được mô tả trong các ví dụ nhưng người có trình độ kỹ thuật có thể sử dụng phương pháp thích hợp khác như ELISA (Xiyun Chai và các tác giả khác, Tạp chí sinh hóa, tập 286, trang 34457-34467, 2011) hoặc phương pháp hóa mô miễn dịch (David J. Irwin và các tác giả khác, Bộ não, tập 135, trang 807-818, 2012).

Hiệu quả của tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức của sáng chế ở động vật thí nghiệm có thể được sử dụng làm dữ liệu về hiệu quả được lý để phát triển tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa ở người.

[Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức]

Một dạng của tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức của sáng chế là tác nhân gồm kháng thể kháng tau bị phosphoryl hóa và tốt nhất là kháng thể tham gia vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể đặc biệt với protein tau bị phosphoryl hóa tại ít nhất một gốc axit amin tương ứng với các vị trí 410 đến 421 của SEQ ID NO: 1 ở protein tau, tốt hơn là kháng thể tham gia vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể với protein tau bị phosphoryl hóa tại một hoặc nhiều vị trí được chọn từ các gốc axit amin tương ứng với Ser412, Ser413, Thr414 và

Ser416 của SEQ ID NO: 1, tốt hơn nữa là kháng thể liên kết so sánh đối với kháng thể mà có trình tự axit amin VH là SEQ ID NO: 20 và có trình tự axit amin VL là SEQ ID NO: 26 (1505) và thậm chí tốt hơn nữa là kháng thể tham gia vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể với protein tau bị phosphoryl hóa tại vị trí của gốc axit amin tương ứng với Ser413 của SEQ ID NO: 1. Các kháng thể đó được làm rõ ở trên trong phần có tiêu đề [Kháng thể kháng tau bị phosphoryl hóa].

Một dạng khác của tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức của sáng chế là tác nhân chứa peptit mà bao gồm đoạn của trình tự tau và bị phosphoryl hóa tại một hay nhiều gốc axit amin, peptit là peptit bị phosphoryl hóa và là peptit có độ dài ít nhất là 8 axit amin chứa ít nhất 3 axit amin liên kề trong trình tự axit amin gồm các gốc axit amin tương ứng với các số axit amin 410-421 của SEQ ID NO: 1, tốt nhất là peptit có độ dài ít nhất là 8 axit amin chứa ít nhất 5 axit amin liên kề và tốt hơn nữa là peptit có độ dài ít nhất là 8 axit amin chứa ít nhất 8 axit amin liên kề. Tương tự, các gốc axit amin bị phosphoryl hóa trong các peptit có thể là một trong bất kỳ gốc axit amin tương ứng với các axit amin Ser412, Ser413, Thr414 và Ser416 của SEQ ID NO: 1, và tốt hơn nữa là gốc axit amin tương ứng với Ser413 của SEQ ID NO: 1. Các peptit đó được làm rõ ở phần có tiêu đề [Peptit bị phosphoryl hóa bằng trình tự axit amin bắt nguồn từ tau].

Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức theo sáng chế cũng có thể bao gồm các chất phụ gia được chấp nhận về mặt dược học. Công thức sử dụng phụ gia được chấp nhận về mặt dược học có thể được chuẩn bị bằng phương pháp được mô tả trong “Remington: Khoa học và thực tiễn nghề dược, tái bản lần thứ 20, Đại học Khoa học Philadelphia, Williams và Wilkins, 15/12/2000”. Một dạng của tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa đó là thuốc dạng lỏng được điều chế bằng việc hòa tan, tạo huyền phù hoặc nhũ tương hóa trong dung dịch vô khuẩn

hoặc dung dịch dầu. Dung môi cho các quy trình đó bao gồm nước cất để tiêm và nước muối sinh lý cho dung dịch nước bổ sung thêm tác nhân điều hòa thẩm thấu (ví dụ D glucoza, D socbitol, D manitol, natri clorua và các chất tương tự) thường xuyên được sử dụng kết hợp với chất hóa tan thích hợp như rượu (ví dụ etanol), rượu đa chức (ví dụ propylen glycol hoặc polyetylen glycol) hoặc hoạt động bề mặt không ion (ví dụ polysobat 80 hoặc dầu thầu dầu 50 đã hydro hóa polyoxyetylen). Dung dịch dầu cũng có thể thỉnh thoảng được sử dụng làm dung môi, ví dụ các dung dịch dầu bao gồm dầu vừng và dầu đậu nành mà thường xuyên được sử dụng kết hợp với benzyl benzoat, rượu benzyl hoặc các chất tương tự như các chất bổ sung hòa tan. Trong các thuốc dung dịch đó, thường xuyên sử dụng các chất phụ gia phù hợp như chất đệm (ví dụ chất đệm photphat và chất đệm axetat), chất làm mềm (ví dụ, benzalkonium clorua và procain hydroclorua), chất ổn định (ví dụ albumin huyết thanh người và polyetylen glycol), chất bảo quản (ví dụ axit ascorbic, axit erythrobic và các muối của chúng), chất tạo màu (ví dụ chất diệp lục sắc đồng β -carotene, Đỏ #2 và Xanh #1), các chất khử trùng (ví dụ các este của axit paraoxybenzoic, phenol, clorua benzalkonium), chất cô đặc (ví dụ hydroproxyl xenluloza, cacboxymetyl xenluloza và các muối của chúng), chất ổn định (ví dụ anbumin huyết thanh người mannitol và sorbitol) và chất điều hòa mùi (ví dụ bạc hà, mùi thơm cam quýt). Các dạng khác nhau của tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa bao gồm các công thức dạng rắn như bột, viên nén, dạng hạt, viên nang, thuốc viên, thuốc đạn, viên ngậm và các dạng tương tự. Đối với công thức dạng rắn được dùng qua đường miệng, có thể sử dụng các chất phụ gia như tá dược (ví dụ, tinh thể xenluloza, lactoza và tinh bột), chất bôi trơn (ví dụ, magie stearat và bột tanco), chất kết dính (hydroxypropyl xenluloza, hydroxypropyl methyl xenluloza, macrogol và các chất tương tự) và chất phân rã (ví dụ tinh bột

và canxi cacboxymetyl xenluloza). Các chất phụ gia như như các chất khử trùng (ví dụ, rượu benzyl, clorobutanol, methyl paraoxybenzoat và propyl paraoxybenzoat), chất chống oxi hóa, chất tạo màu, chất làm ngọt và các chất tương tự có thể được sử dụng nếu cần thiết. Các dạng thay thế khác bao gồm tác nhân điều trị hoặc tác nhân phòng ngừa để gắn lên màng mỏng, công thức này thường xuyên chứa các chất phụ gia như chất kết dính nhạy áp, chất tăng độ nhạy áp, chất điều chỉnh độ nhớt, chất làm đặc và các chất tương tự (ví dụ, dịch nhầy, thạch trắng, gelatin, pectin, carrageenan, natri alginat, bột carob, xanthan gum (chất ổn định và làm đông trong thực phẩm), nhựa tragacan, gôm arabic, chitosan (chất hữu cơ cao phân tử), pullulan, tinh bột sắn, sucralfat, xenluloza và các dẫn xuất của nó (như hydroxypropyl methyl xenluloza), axit polyglycerol este béo, axit acrylic-alkyl (meth) acrilat copolime, hoặc muối và este của axit béo polyglycerol), chủ yếu cho mục đích truyền các đặc tính hấp thụ hoặc giữ lại qua niêm mạc. Tuy nhiên các dạng dung môi và các chất phụ gia cho tác nhân điều trị hoặc tác nhân phòng ngừa để cung ứng cho cơ thể không giới hạn trong số đó và người có trình độ kỹ thuật có thể lựa chọn các chất đó một cách phù hợp.

Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức theo sáng chế cũng bao gồm khái niệm về tác nhân điều trị hoặc tác nhân phòng ngừa bao gồm các chất hiện hữu có tác dụng ức chế sự phát triển của rối loạn nhận thức ngoài kháng thể kháng tau bị phosphoryl hóa hoặc peptit bị phosphoryl hóa được đề cập ở trên. Ngoài ra, tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức theo sáng chế bao gồm bộ để được sử dụng kết hợp với tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa chứa kháng thể kháng tau bị phosphoryl hóa hoặc peptit bị phosphoryl hóa và tác nhân điều trị hoặc tác nhân phòng ngừa chứa chất hiện hữu có tác dụng ức chế sự phát triển của rối loạn nhận thức. Ví dụ về các chất ức chế sự phát triển của rối loạn

nhận thức bao gồm, nhưng không bị giới hạn bởi, donepezil, galantamin, memantin và rivastigmin. Liều lượng của chất này có tác dụng ức chế sự phát triển của rối loạn nhận thức mà được bổ sung vào, hoặc tác nhân điều trị hoặc tác nhân phòng ngừa chứa chất có tác dụng ức chế sự phát triển của rối loạn nhận thức có thể là liều được dùng phổ biến để điều trị mà có lượng khác nhau tùy theo hoàn cảnh.

Ngoài ra, trong khi các kết quả của các ví dụ chứng minh rằng kháng thể được sử dụng để thực hiện sáng chế bộc lộ tác dụng thuốc bằng việc tác động đến não xuyên qua hàng rào máu não ngay cả khi đưa thuốc vào ở vùng ngoại biên bằng việc cung ứng thuốc qua màng bụng, có thể điều chế một công thức mà cung ứng một cách có hiệu quả kháng thể kháng tau bị photphoryl hóa mà có thể được sử dụng như tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức của sáng chế, đến mô não, và các công thức đó cũng được bao gồm bởi tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức theo sáng chế. Các phương pháp để cung ứng một cách có hiệu quả các kháng thể hoặc các peptit đến não xuyên qua hàng rào máu não đã được biết đến ví dụ như các phương pháp bổ sung các chất mục tiêu hoặc các phương pháp gói gọn trong hạt mỡ hoặc hạt nano. Các chất được sử dụng để định mục tiêu bao gồm các chất mà chịu sự thay đổi toàn bộ hoặc một phần đặc tính mang tải bằng việc liên kết với kháng thể hoặc peptit, protein hoặc các hợp chất khác có đặc tính liên kết với một thụ thể hoặc chất chuyên chở đặc hiệu. Ví dụ về peptit, protein hoặc các hợp chất khác có đặc tính liên kết với thụ thể đặc hiệu hoặc protein màng bao gồm các phối tử mà liên kết với phối tử thụ thể hoặc protein màng và các chất tương tự của chúng và các kháng thể, hợp chất chủ vận/hợp chất đối vận/chất điều chỉnh mà liên kết với phối tử thụ thể hoặc protein màng và các hợp chất tương tự của chúng. Các ví dụ về phối tử thụ thể hoặc

protein màng làm mục tiêu cho peptit, protein hoặc các hợp chất khác có đặc tính liên kết với thụ thể đặc hiệu hoặc chất chuyên chở bao gồm thụ thể transferrin (TfR), thụ thể insulin (IR), thụ thể của yếu tố tăng trưởng giống insulin (IGFR), protein liên quan đến thụ thể LDL (LRP) và thụ thể độc tố bạch hầu (HD-EGF) mà không bị giới hạn bởi các chất này (Angela R. Jones và các tác giả khác, *Pharm. Res.*, tập 24, trang 1759-1771, 2007). Chất làm mục tiêu có thể được bổ sung về phương diện hóa học vào kháng thể để được sử dụng như tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn nhận thức theo sáng chế, phương pháp này có thể được thực hiện một cách phù hợp bởi người có trình độ kỹ thuật có tham khảo phương pháp đã được biết đến như mô tả ở trên, ví dụ, Hermanson và các tác giả khác, *Các kỹ thuật phân tử sinh học*, Hoa Kỳ 1996, Academic Press. Chất làm mục tiêu cũng có thể bao gồm trong các hạt mỡ hoặc hạt nano gói gọn kháng thể hoặc peptit (Sonu Bhaskar và các tác giả khác, *Độc chất dạng sợi và hạt*, tập 7, số tháng 3, 2010). Ngoài ra, khi chất làm mục tiêu là peptit hoặc protein, nó có thể được sản xuất thành protein dung hợp thích hợp bởi người có trình độ kỹ thuật bằng việc dùng kỹ thuật công nghệ di truyền, cả việc sản xuất peptit dung hợp bằng hóa chất tổng hợp peptit, hoặc bằng sự kết hợp axit nucleic gồm trình tự nucleotit mã hóa cho trình tự axit amin của peptit hoặc protein có axit nucleic gồm trình tự nucleotit mã hóa cho trình tự axit amin cho kháng thể hoặc peptit cũng được sử dụng.

Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa theo sáng chế có thể được dùng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa cho mục đích cải thiện các triệu chứng. Đối với việc dùng qua đường miệng, dạng bào chế như hạt, bột, viên nén, viên nang, thuốc lỏng, xi-rô, nhũ tương, dung dịch treo hoặc thuốc luyện đan có thể được lựa chọn. Đối với việc dùng ngoài đường tiêu hóa, tác nhân truyền qua mũi có thể được điều chế, và thuốc lỏng, dung dịch treo hoặc công thức dạng rắn có

thể được lựa chọn. Thuốc tiêm cũng có thể được điều chế như một dạng khác của việc dùng thuốc ngoài đường tiêu hóa, việc tiêm được chọn là tiêm dưới da, tiêm tĩnh mạch, tiêm nhỏ giọt, tiêm bắp, tiêm vào não hoặc tiêm bụng. Các công thức khác được sử dụng để dùng thuốc ngoài đường tiêu hóa bao gồm thuốc đạn, thuốc đặt dưới lưỡi, thuốc để dưới da và thuốc dùng qua niêm mạc trừ thuốc qua đường mũi. Ngoài ra, việc dùng thuốc trong mạch là có thể bằng cách bỏ sung hoặc phủ lên stent hoặc bịt mạch.

Liều lượng của tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa theo sáng chế là khác nhau tùy vào tuổi của bệnh nhân, giới tính, trọng lượng cơ thể và các triệu chứng, hiệu quả điều trị, phương pháp dùng thuốc, thời gian điều trị hoặc các loại hoạt chất trong hợp phần y tế nhưng thông thường nó được dùng với liều trong khoảng từ 0,1 mg đến 1 g và tốt nhất là trong khoảng từ 0,5 mg đến 200 mg của hợp chất hoạt tính trên một liều dùng cho người lớn. Tuy nhiên do liều lượng sẽ khác nhau tùy thuộc vào các điều kiện khác nhau, liều lượng thấp hơn so với liều lượng đề cập ở trên có thể thỏa mãn, hoặc liều lượng cần thiết có thể vượt các ngưỡng đó.

Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa theo sáng chế có thể bộc lộ hiệu quả trong thời gian điều trị ngắn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được làm rõ hơn trong các ví dụ thực hiện sáng chế, với điều kiện là các ví dụ này không giới hạn phạm vi sáng chế theo bất kỳ cách nào. Các thí nghiệm được tiến hành với sự chấp thuận của Hội đồng thử nghiệm trên động vật tại trường Đại học thành phố Osaka, Abeno Campus.

[Ví dụ 1] Điều chế kháng thể đa dòng của thỏ cho peptit pSer413

Kháng nguyên được sử dụng để điều chế kháng thể cho peptit pSer413 là một peptit tổng hợp (SEQ ID NO: 31, được tổng hợp bởi Medical & Biological Laboratories Co., Ltd. [MBL]) có Cys được gắn tại vị trí đầu cuối C của trình tự axit amin tương ứng với vùng từ Asn thứ 410 đến Ser thứ 416 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 đối với protein tau người, bị phosphoryl hóa tại Ser tương ứng với vị trí 413 (peptit này từ đây về sau được gọi là peptit pSer413(S)).

Peptit pSer413(S): N-AsnValSer(pSer)ThrGlySerCys-C (SEQ ID NO: 31)

Sau quá trình tổng hợp, peptit pSer413(S) được tinh chế bằng HPLC và được liên kết đồng hóa trị với KLH (Hemocyanin của loài ốc biển). Các liên hợp thu được được sử dụng để tạo chủng ngựa với 0,1 mg trên một liều trên một con thỏ. Đối với lần chủng ngựa đầu tiên, 0,2 mL dung dịch liên hợp (nồng độ chất liên hợp: 0,5 mg/mL) có thể được trộn với tá dược Freund hoàn chỉnh ở lượng tương đương và được tiêm dưới da tại 8 vị trí trên vùng lưng đã được cạo lông của thỏ trắng Nhật Bản với 50 μ L cho mỗi vị trí. Đối với lần chủng ngựa thứ hai và các lần tiếp theo, tá dược Freund chưa hoàn chỉnh được sử dụng trong hơn hai lần chủng ngựa tương tự trong 2 tuần. Ở tuần thứ 2 sau khi kết thúc sự chủng ngựa, mẫu máu được lấy và hiệu giá kháng thể của huyết thanh được kiểm chứng bằng ELISA bằng việc dùng liên hợp peptit được chủng ngựa và động vật bị giết sau 1 tuần và tất cả lượng máu được thu lại. Huyết thanh được điều chế từ máu thu được và các kháng thể được tinh chế từ huyết thanh bằng việc dùng cột ái lực của peptit pSer413 (Af) (SEQ ID NO: 32).

Hiệu giá huyết thanh được xác nhận bằng phương pháp sau đây. Peptit pSer413(S) được pha loãng thành 5 μ g/mL với PBS và sau đó được phân phối vào đĩa với lượng 100 μ L/giếng và được cho phép để yên qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Sau khi loại bỏ dung dịch, dịch đệm kết khối (MBL Co.) được phân phối với

lượng 250 μL /giếng và đĩa được cho phép để yên qua đêm ở nhiệt độ 4°C . Dãy pha loãng đối với huyết thanh thử chưa chủng ngừa và huyết thanh thử đã chủng ngừa là 100, 500, 2.500, 12.500 và 62.500 lần với mẫu PBS được pha loãng được thêm vào ở lượng 100 μL /giếng và phản ứng được tiến hành ở 25°C trong 60 phút. Sau khi rửa, peroxidaza IgG kháng thử (sản phẩm của MBL) được pha loãng 8.000 lần với chất đệm (MBL) được thêm vào ở lượng 100 μL /giếng và phản ứng được tiến hành ở 25°C trong 60 phút. Sau khi rửa, dung dịch tạo màu (MBL) được thêm vào ở lượng 100 μL /giếng để tạo màu trong 3 đến 10 phút và sau đó axit sulfuric 2N được thêm vào ở lượng 100 μL /giếng để ngưng phản ứng. Sau khi phản ứng bị dừng, khả năng hút được đo ở chiều dài bước sóng đo là 450 nm và chiều dài bước sóng tham chiếu là 620 nm.

Khả năng phản ứng kháng thể của kháng thể được tinh chế được xác nhận bằng phương pháp sau. Peptit pSer413(L) [peptit pSer413(S) (được gạch chân) còn được kéo dài theo các hướng đầu cuối N và đầu cuối C (SEQ ID NO: 33, được tổng hợp bởi Biosynthesis Co.): N-ProArgHisLeuSerAsnValSer(pSer)ThrGlySerIleAspMetValAsp-C] hoặc peptit NonP(L) có trình tự axit amin tương tự nhưng không bị phosphoryl hóa ở vị trí tương ứng với Ser413 (SEQ ID NO: 34, được tổng hợp bởi Biosynthesis Co.) được pha loãng thành 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ với PBS và sau đó được phân phối lên đĩa với lượng 50 μL /giếng và được cho phép đứng yên qua đêm ở nhiệt độ 4°C . Sau khi loại bỏ dung dịch, dịch đệm kết khối (3% BSA-PBS) được phân phối ở lượng 250 μL /giếng và hỗn hợp được cho phép để yên ở 37°C trong 1 giờ hoặc lâu hơn. Kháng thể được tinh chế được pha loãng với PBS và theo thứ tự được thêm vào với lượng 50 μL /giếng và phản ứng được tiến hành ở 25°C trong 90 phút. Sau khi rửa, phosphatasa có tính kiềm IgG của dê kháng thử (Bioscience) được pha loãng

2.000 lần với dịch đệm pha loãng (3% BSA-PBS) và được thêm vào với lượng 50 μL /giếng và phản ứng được tiến hành ở 25°C trong 60 phút. Sau khi rửa, dung dịch tạo màu (2.5 mM MgCl_2 - chứa 0,1 M dung dịch chất đệm diethanolamin, với lượng 1 mg/mL PNPP [para-nitrophenyl phosphat] được thêm vào đến độ pH 9,8) được cho thêm với lượng 100 μL /giếng để tạo màu trong 30 phút và khả năng hút được đo ở chiều dài bước sóng đo là 405 nm và chiều dài bước sóng tham chiếu là 550 nm.

<Kết quả>

Như được thể hiện trong Fig. 3, kháng thể được tinh chế có tính đặc hiệu cao đối với peptit pSer413(L) trong khi hầu như không có phản ứng nào được quan sát với peptit nonP(L). Do đó, kháng thể là kháng thể tham gia vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể đặc biệt với pSer413(L) (trong suốt đặc điểm kỹ thuật sáng chế, kháng thể này có thể được gọi là “kháng thể đa dòng của thỏ được đánh dấu pSer413” hoặc “pS413AB”).

[Ví dụ 2] Điều chế kháng thể đơn dòng cho peptit pSer413 (dãy Ta15)

Kháng nguyên được sử dụng là peptit tổng hợp pSer413(Im) (SEQ ID NO: 35) có GlyCysSerGly được gắn vào đoạn cuối N của trình tự tương ứng với vùng từ Thr thứ 403 đến Pro thứ 423, bị phosphoryl hóa tại gốc axit amin tương ứng với Ser tại vị trí 413 của trình tự axit amin của protein tau người được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1. Tiếp sau sự tổng hợp, peptit pSer413(Im) được tinh chế bằng HPLC và được liên kết đồng hóa trị với KLH (Hemocyanin của loài ốc biển). Liên hợp thu được được sử dụng để chủng ngừa với mức 0,04 mg trên một liều trên một con chuột. Chủng ngừa được tiến hành bằng việc tiêm phúc mạc vào 10 con chuột với lượng 200 μL hỗn hợp của 0,4 ml dung dịch liên hợp (1,1 mg/ml đối

với peptit), 0,7 mL dung dịch muối và 1,1 mL tá dược Freund hoàn chỉnh. Thêm hơn 3 chủng ngừa tương tự (cùng địa điểm chủng ngừa và liều lượng kháng nguyên, sử dụng tá dược Freund hoàn chỉnh) được tiến hành mỗi 2 tuần. Một tháng sau lần chủng ngừa cuối cùng, 100 μ L của dung dịch kháng nguyên 0,5 mg/mL (được hòa tan trong dung dịch muối) đối với peptit được tiêm vào tĩnh mạch đuôi của 1 trong số 10 con chuột đã được tăng hiệu giá kháng thể huyết thanh đối với kháng nguyên và trong ngày thứ 3 sau khi các con vật bị giết, lá lách được thu hồi. Hai kim tiêm 18G được sử dụng để phá vỡ lá lách và sau đó lá lách bị phá vỡ được nghiền nhẹ với bề mặt có các nút cao su. Các tế bào lách bị nghiền bị treo trong xấp xỉ 10 mL môi trường RPMI 1640 lạnh và bị treo tương tự trong môi trường RPMI 1640 lạnh được lọc và các dịch lọc được thu thập. Môi trường RPMI 1640 lạnh (hoặc PBS lạnh) được thêm vào với thể tích 40 mL cho việc treo tế bào lách. Nồng độ tế bào lympho trong thể huyền phù được đo bằng thiết bị đếm hồng cầu và các tế bào lympho ở lượng cuối cùng tương ứng với 2×10^7 tế bào được chuyển cho ống 50 mL. Bổ sung vào đó lượng tương đương 4×10^7 tế bào của dòng tế bào u tủy của chuột P3X63Ag8·U1 (P3·U1) trong giai đoạn tăng trưởng mà đã được nuôi cấy trong dung dịch nuôi cấy B (RPMI 1640 + 10% huyết thanh bào thai bò + 2 mM glutamin + 100 μ g/ml streptomycin + penixilin 100 đơn vị/mL), và sau khi ly tâm ở 1500 rpm trong 5 phút, chất nổi trên mặt được loại bỏ. Các viên tế bào được phân tán hoàn toàn bằng việc gõ và lắc ống. Các ống được thêm 0,5 ml dung dịch polyetylen glycol (gồm RPMI 1640 (2,3 mL) + polyetylen glycol 2000 (1,4 mL) + dimetyl sulfoxit (0,3 mL), sau đây gọi tắt là “giải pháp PEG”), và các tế bào được treo nhẹ nhàng. Sau 1 phút, 0,5 mL dung dịch PEG được thêm nhỏ giọt từ từ trong hơn 1 phút, 1,0 mL RPMI 1640 được thêm nhỏ giọt từ từ trong hơn 1 phút và sau đó 2 mL RPMI 1640 được thêm nhỏ

giọt từ từ trong hơn 2 phút. Tiếp đó 4 mL dung dịch nuôi cấy HAT/GIT (môi trường GIT [Nihon Pharmaceutical Co., Ltd.] + 5% huyết thanh thai bò + 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin + penixilin 100 đơn vị/mL + 95 μM hypoxanthin + 0,4 μM aminopterin + 16 μM thymidin) được thêm nhỏ giọt trong hơn 2 phút và sau đó 4 mL dung dịch nuôi cấy HAT/GIT được thêm nhỏ giọt trong hơn 2 phút. Cuối cùng dung dịch nuôi cấy HAT/GIT được thêm vào để thu được 40 đến 50 mL huyền phù tế bào. Sau khi ủ trong bồn tĩnh nhiệt ở 37°C trong 30 phút, huyền phù được cho vào 7 đĩa nuôi cấy (96 giếng). Các đĩa nuôi cấy được sử dụng là đĩa có 96 giếng (đĩa nuôi cấy) trên đó đại thực bào khoang bụng của chuột (ICR) (tế bào nuôi cấy) được nuôi cấy trong nhiều ngày ($> 1 \times 10^5/\text{giếng}$). Các đĩa sau đó được nuôi cấy trong 7 đến 10 ngày ở 37°C , 5% CO_2 .

Một nửa dung dịch nuôi cấy bị thay thế bằng dung dịch nuôi cấy HT mới (dung dịch nuôi cấy HAT/GIT không có aminopterin) mỗi lần một tuần và các tế bào lai được thu lại.

Sàng lọc kháng thể được tiến hành bởi phương pháp sau đây. Peptit pSer413(L) được pha loãng đến mức 1 $\mu\text{g/mL}$ với PBS, và sau đó được phân phối vào đĩa có 96 giếng với lượng 50 $\mu\text{L}/\text{giếng}$ và được cho phép đứng yên qua đêm ở nhiệt độ 4°C . Sau khi loại bỏ dung dịch, dịch đệm kết khối (3% BSA-PBS) được phân phối với lượng 250 $\mu\text{L}/\text{giếng}$ và phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ 25°C trong 60 phút. Sau khi rửa với dung dịch muối đệm phosphat chứa 0,05% Tween20 (PBS-Tween) kháng thể thứ hai (dung dịch chứa kháng thể IgG-Fc của dê kháng chuột đã đánh dấu photphataza kiềm [SouthernBiotech] được pha loãng 2000 lần với dịch đệm kết khối) được thêm vào với lượng 100 $\mu\text{L}/\text{giếng}$ và phản ứng được tiến hành ở 25°C trong 60 phút. Sau khi rửa, dung dịch chất nền (0,1 M chất đệm diethanolamin chứa 2,5 mM MgCl_2 với 0,7 đến 1,2 mg/mL PNPP [para-

nitrophenyl phosphat] được thêm vào với độ pH 9,8) được thêm vào với lượng 100 μ L/giếng để tạo màu ở 25°C trong 60 phút, sau khi khả năng hút được đo ở độ dài bước sóng đo là 405 nm.

Trong việc sàng lọc các tế bào được thu hồi từ các giếng dương tính và được đếm bằng thiết bị đếm hồng cầu và sau đó được cấy vào đĩa 96 giếng (đĩa nuôi cấy trước đó) với lượng 1-3 tế bào/giếng cho việc nhân bản bằng phương pháp hạn chế làm loãng (Ta1501, Ta1502, Ta1505-1509). Đối với phân tích tiếp theo, dòng vô tính được nuôi cấy tập trung và kháng thể được tinh chế bằng cột protein G. Ta1505 giống với Ta1505-2. Các lớp kháng thể được xác định bằng việc dùng bộ dụng cụ của AbD Serotec.

Kháng thể được tinh chế được phản ứng với đĩa ELISA được phủ một phần peptit tương ứng với các vị trí phosphoryl hóa khác nhau của tau để xác định tính đặc hiệu của nhóm photphat. Phương pháp này như sau.

Dung dịch 10% MDSO của từng peptit tau (pS46 [SEQ ID NO: 36], pS199 [SEQ ID NO: 37], pS202 [SEQ ID NO: 38], pT212 [SEQ ID NO: 39], pS214 [SEQ ID NO: 40], pT212/pS214 [SEQ ID NO: 41], pT217 [SEQ ID NO: 42], pS413 [SEQ ID NO: 33], non pS413 [SEQ ID NO: 34]), hoặc dung dịch PBS của peptit liên hợp BSA (pS400 [SEQ ID NO: 43]-BSA, pS412 [SEQ ID NO: 44]-BSA) được pha loãng đến mức 1 μ g/mL với PBS (pH 7) và được thêm vào đĩa 96 giếng (MaxiSorp: Nunc) với lượng 50 μ L/giếng và sau đó được ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C để cố định. Sau đó, dung dịch peptit được loại bỏ và được rửa 3 lần với TBS chứa 0,05% Tween20 sau khi BSA/PBS 3% được thêm vào với lượng 280 μ L/giếng và việc tạo khối được thực hiện ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Dung dịch tạo khối được hút ra, việc rửa được thực hiện 3 lần với TBS chứa 0,05% Tween20 và sau đó 1 $\mu\text{g/mL}$ của từng dung dịch kháng thể đơn dòng các dãy Ta15 trong BSA-PBS 3% được thêm vào với lượng 50 μL /giếng và phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau khi rửa 3 lần với TBS chứa 0,05% Tween20, 50 μL kháng thể IgG của dê kháng chuột được đánh dấu photphataza kiềm (ThermoScience) được pha loãng 2000 lần với PBS chứa 3% BSA được thêm vào và phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau khi rửa 3 lần với TBS chứa 0,05% Tween20, 100 μL dung dịch PNPP (para-nitrophenyl photphat) 1 mg/mL được hòa tan trong diethanolamin 0,1 M (pH 10) được thêm vào, phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ và khả năng hút ở mức 405 nm được đo. Các kết quả đánh giá khả năng phản ứng của từng kháng thể đối với từng peptit được thể hiện trong Bảng 2. Khả năng phản ứng được đánh giá dựa trên thang đánh giá 3 mức.

+: Có khả năng phản ứng, -: Không có khả năng phản ứng, $\pm$: Có phản ứng nhẹ nhưng rất yếu

Bảng 2

Đặc tính phản ứng của các nhóm photphat tương ứng của tau để thu được kháng thể

MAb \ pTau	1501	1502	1505	1506	1507	1508	1509
pS46	—	—	—	—	—	—	—
pS199	—	—	—	—	—	—	—
pS202	—	—	—	—	—	—	—
pT212	—	—	—	—	—	—	—
pS214	—	—	—	—	—	—	—
pT212/pS214	—	—	—	—	—	—	—
pT217	—	—	—	—	—	—	—
pS400 – BSA	—	—	—	—	—	—	—
pS412 – BSA	—	—	—	—	—	—	—
pS413	+	+	+	+	+	+	+
Non pS413	—	±	±	—	±	±	—

Các kháng thể này (sau đây gọi là “dãy Ta15”) chỉ được phản ứng với pSer413 trong số các peptit được xem xét và đặc tính của nhóm photphat là cực kỳ cao.

[Ví dụ 3] Việc đo ái lực liên kết kháng thể dãy Ta15

Để đánh giá ái lực liên kết giữa các kháng thể dãy Ta15 và peptit kháng nguyên (peptit pSer413 (Im): xem Ví dụ 2), hệ thống cộng hưởng Plasmon bề mặt Biacore (SPR) (BIACORE3000, mã # BR-1100-45, của GE Healthcare, Nhật Bản) và mỗi sản phẩm Biacore được sử dụng để đo lường theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Một phương pháp đo lường được sử dụng là phương pháp cố định (mã# BR-1006-33) kháng thể kháng chuột (mã # BR-1008-38) trên chip CM5 (chip được tạo thành từ lớp cacboxymetyldextran, mã # BR-1100-14) bằng liên kết cộng hóa trị thông qua phản ứng nối amin, liên kết kháng thể dãy Ta15 với kháng thể

kháng chuột được cố định và việc đo trạng thái liên kết của peptit kháng nguyên với kháng thể dây Ta15 được liên kết.

Hỗn hợp phản ứng liên kết đặc biệt được sử dụng với chất đệm HBS-EP (mã # BR-T-1001-88) và chip CM5 được kích hoạt bằng dung dịch trộn lẫn của N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydroclorua (EDC) và N-hydroxysuccinimide (NHS). Dung dịch của kháng thể kháng chuột được pha loãng đến mức 0,001 mg/mL với 10 nM chất đệm natri axetat ở pH 5,0 được phản ứng với 4 tế bào đo dòng trên chip và sau khi liên kết đồng hóa trị kháng thể kháng chuột với chip CM5, được tạo khối với ethanolamin. Trong số 4 tế bào đo dòng cố định kháng thể kháng chuột một kháng thể âm tính bị lấy (tiêu chuẩn so sánh đồng dạng IgG2a của chuột, mã # MAB003 của R&D Systems) trong khi các tế bào đo dòng khác lấy kháng thể dây Ta15 ở mật độ khoảng 1000 RU mỗi tế bào. Chất đệm HBS-EP (0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% v/v chất hoạt tính bề mặt P20) với 1 M NaCl được thêm vào được phản ứng trong 3 phút và kháng thể được hấp thụ không rõ ràng được loại bỏ, và sau đó chất đệm HBS-EP được phản ứng trong 10 phút ở tốc độ dòng chảy 50 μ L/phút để làm ổn định vạch ranh giới. Peptit được pha loãng lần lượt với chất đệm HBS-EP từ nồng độ 100 pM đến 5 mM (gần hằng số phân ly liên kết được đánh giá [KD]), các dung dịch peptit thu được (5 nồng độ) được phản ứng từ khoảng giữa 4 đến 6 phút (đồng dạng) trong các khoảng 6 phút một liên tiếp từ điểm cuối nồng độ thấp và tình trạng liên kết được đo.

Đối với dữ liệu tình trạng liên kết cụ thể cho peptit kháng nguyên, dữ liệu tình trạng liên kết được thu lại cho peptit không bị phosphoryl hóa (peptit non pSer413) là peptit âm tính, và nó được trừ khỏi dữ liệu tình trạng liên kết đối với peptit kháng nguyên để loại trừ các tác dụng sự nhiễu tạp tạo ra trong quá trình.

Không có sự liên kết giữa peptit không bị photphoryl hóa với kháng thể được quan sát ở các nồng độ đo. Dữ liệu tình trạng liên kết cụ thể được làm phù hợp với động lực vòng đơn 1:1, liên kết với vật mẫu lệch hướng bằng việc dùng phần mềm phân tích Biacore (ước lượng BIA: phân tích động lực vòng đơn, mã # AP-4000-01) và tỷ lệ liên kết động lực (K_a) và tỷ lệ phân giải (K_d) được đồng thời thu lại (Karlsson, R., Katsamba, P. S., Nordin, H., Pol, E. và Myszka, D. G. (2006). “Phân tích dây chuẩn độ động học sử dụng cảm biến sinh học ái lực” Anal.Biochem. 349(1): 136-47). Các giá trị hằng số phân ly của trạng thái cân bằng (KD) giống như việc đo lường ái lực đối với kháng thể dây Ta15 được tính là K_d/K_a .

<Kết quả>

[Bảng 3]

	K_a ($M s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	KD (M)
1501	$5,64 \times 10^4$	$1,05 \times 10^{-3}$	$1,86 \times 10^{-8}$
1502	$1,12 \times 10^5$	$4,70 \times 10^{-4}$	$4,20 \times 10^{-9}$
1505	$1,29 \times 10^5$	$4,99 \times 10^{-4}$	$3,87 \times 10^{-9}$
1506	$1,99 \times 10^5$	$1,94 \times 10^{-3}$	$9,75 \times 10^{-9}$
1507	$1,27 \times 10^5$	$5,33 \times 10^{-4}$	$4,20 \times 10^{-9}$
1508	$1,45 \times 10^5$	$9,80 \times 10^{-4}$	$6,76 \times 10^{-9}$
1509	$8,71 \times 10^4$	$1,25 \times 10^{-3}$	$1,44 \times 10^{-8}$

Đối với các kháng thể dây Ta15, kháng thể Ta1505 với ái lực mạnh nhất đối với peptit kháng nguyên được sử dụng trong thử nghiệm về hành vi sử dụng chuột bị suy giảm trí nhớ.

[Ví dụ 4] Điều chế kháng thể đơn dòng nhận diện peptit pSer396 và/hoặc pSer404

Đối với kháng nguyên được sử dụng peptit tổng hợp (SEQ ID NO: 47 được tổng hợp bởi Biosynthesis Co.) có GlyCys được gắn vào vị trí đầu cuối N của trình tự từ Arg thứ 379 đến Leu thứ 408 và bị photphoryl hóa tại gốc axit amin

tương ứng với Ser tại các vị trí 396 và 404 của trình tự axit amin của protein tau người được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1 (từ đây về sau, peptit này được gọi là “peptit pSer396/pSer404”).

Peptit pSer396/pSer404: N-GlyCys-

ArgGluAsnAlaLysAlaLysThrAspHisGlyAlaGluIleValTyrLys(pSer)ProValValSerGlyAspThr(pSer)ProArgHisLeu-C (SEQ ID NO: 47)

Sau khi tổng hợp peptit pSer396/pSer404, nó được tinh chế bằng HPLC và được liên kết đồng hóa trị với maleimit hoạt tính KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) (Thermo Scientific). Liên hợp thu được được sử dụng để chủng ngừa chuột Balb/c với lượng gần 0,04 mg trên một liều trên một con chuột. Sự chủng ngừa được thực hiện bằng việc tiêm vào màng bụng vào 4 con chuột với lượng 100 μ L mỗi con hỗn hợp của 0,3 ml dung dịch liên hợp (0,77 mg/ml peptit) và 0,3 mL tá được Freund hoàn chỉnh. Hai con chuột được chủng ngừa bằng việc chủng ngừa qua màng bụng (với cùng lượng kháng nguyên, sử dụng tá được Freund hoàn chỉnh) và chủng ngừa qua lòng bàn chân (kháng thể + tá được Titer Max) còn hai con khác chỉ được chủng ngừa bằng việc chủng ngừa qua màng bụng và việc chủng ngừa này được nhắc lại 2 lần trong khoảng thời gian 2 tuần. Chuột được chủng ngừa bằng việc chủng ngừa qua màng bụng và lòng bàn chân mà đã được tăng hàm lượng kháng thể huyết thanh được tiêm dung dịch kháng nguyên (hòa tan trong dung dịch muối) thông qua tĩnh mạch đuôi 15 ngày sau lần chủng ngừa cuối cùng và sau 3 ngày con vật bị giết và lá lách được tách ra. Hai kim tiêm 18G được sử dụng để phá vỡ lá lách và sau đó lá lách bị phá vỡ được cán nhẹ bằng bề mặt có các nướm cao su. Các tế bào lá lách bị nghiền được treo trong khoảng 10 mL môi trường RPMI 1640 lạnh, chất nổi trên bề mặt được lọc với dụng cụ lọc tế bào 40 μ m và sản phẩm lọc được thu thập lại trong ống 50 mL.

Mảnh vỡ của tế bào lá lách bị nghiền tiếp với bề mặt có các nôm cao su và tương tự được treo trong môi trường RPMI 1640 lạnh, được lọc và sản phẩm lọc được thu thập. Môi trường RPMI 1640 lạnh (hoặc PBS lạnh) được thêm vào thể tích cuối cùng là 40 mL để treo tế bào lá lách. Nồng độ tế bào lympho trong quá trình treo được đo với thiết bị đếm hồng cầu và các tế bào lympho ở lượng cuối cùng tương ứng với 2×10^7 tế bào được chuyển sang ống 50 mL. Thêm vào đó lượng tương đương 4×10^7 tế bào của dòng tế bào tủy chuột P3.U1 ở giai đoạn phát triển và được nuôi cấy trong dung dịch nuôi cấy B (RPMI 1640 + 10% huyết thanh thai bò + 2 mM glutamin + streptomycin 100 μ g/mL + penicillin 100 đơn vị/mL) và sau khi ly tâm ở 1500 rpm trong 5 phút, chất nổi trên bề mặt được loại bỏ. Viên tế bào được phân tán bằng cách gõ nhẹ ống nghiệm. 0,5 mL dung dịch được thêm từ từ vào ống nghiệm đó trong khoảng thời gian hơn 1 phút, 1,0 mL RPMI 1640 được thêm từ từ trong khoảng 1 phút và sau đó 2 mL RPMI 1640 được thêm từ từ trong khoảng 2 phút. Sau đó 4 mL dung dịch nuôi cấy HAT/GIT (môi trường GIT [Nihon Pharmaceutical Co., Ltd.] + 5% huyết thanh thai bò + 100 μ g/mL streptomycin + penicillin 100 đơn vị/mL + 95 μ M hypoxanthin + 0,4 μ M aminopterin + 16 μ M thymidin) được thêm vào trong khoảng 2 phút và sau đó 4 mL dung dịch nuôi cấy HAT/GIT được thêm vào trong khoảng 2 phút. Cuối cùng, dung dịch nuôi cấy HAT/GIT được thêm vào để thu được 40 đến 50 mL huyền phù tế bào. Sau khi ấp trong bồn tĩnh nhiệt ở nhiệt độ 37°C trong 30 phút, huyền phù được nuôi cấy vào trong 7 đĩa nuôi cấy (loại 96 giếng). Đĩa nuôi cấy được sử dụng là đĩa nuôi cấy 96 giếng (đĩa trung chuyển) mà trên đó đại thực bào khoang bụng của chuột (ICR) (tế bào trung chuyển) được nuôi cấy trong nhiều ngày ($> 1 \times 10^5$ /giếng). Các đĩa sau đó được nuôi cấy trong 7 đến 10 ngày ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂.

Một nửa dung dịch nuôi cấy được thay thế bằng dung dịch nuôi cấy HT mới (dung dịch nuôi cấy HAT/GIT không có aminopterin) một lần một tuần và các tế bào lai được thu lại.

Việc sàng lọc kháng thể đơn dòng được thực hiện theo cách dưới đây. Kháng nguyên sàng lọc được sử dụng là peptit pSer396/pSer404-BSA, có BSA được liên hợp với đầu cuối N Cys của peptit pSer396/pSer404 (N-GlyCys-ArgGluAsnAlaLysAlaLysThrAspHisGlyAlaGluIleValTyrLys(pSer)ProValValSerGlyAspThr(pSer)ProArgHisLeu-C) (SEQ ID NO: 47) và peptit BSA không bị phosphoryl hóa có BSA được liên hợp với đầu cuối N Cys của peptit không bị phosphoryl hóa (N-GlyCys-ArgGluAsnAlaLysAlaLysThrAspHisGlyAlaGluIleValTyrLysSerProValValSerGlyAspThrSerProArgHisLeu-C) (SEQ ID NO: 48). Peptit BSA không bị phosphoryl hóa hoặc peptit pSer396/pSer404 BSA được pha loãng đến 1 µg/mL với PBS và sau đó được phân phối vào đĩa 96 giếng với lượng 50 µL/giếng và được cho phép để yên qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Sau khi loại bỏ dung dịch, dịch đệm kết khối (3% BSA-PBS) được phân phối với lượng 250 µL/giếng và hỗn hợp được để đứng yên ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ hoặc lâu hơn. Dịch đệm kết khối (3% BSA-PBS) được hút ra, tế bào lai nổi lên trên được thêm với lượng 30-50 µL/giếng và phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ 25°C for 60 phút. Sau khi rửa với dung dịch muối được đệm phosphat chứa 0,05% Tween20 (PBS-Tween), thuốc thử phát hiện (dung dịch chứa Protein A được đánh dấu phosphat kiềm, được pha loãng 2000 lần với dịch đệm kết khối) được thêm vào với lượng 100 µL/giếng, và phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ 25°C trong 60 phút. Sau khi rửa, dung dịch nền (0,1 M chất đệm diethanolamin chứa 2,5 mM MgCl₂ với 0,7 đến 1,2 mg/mL PNPP [para-nitrophenyl phosphat] được thêm vào đến độ pH 9,8)

được bổ sung với lượng 100 μL /giếng để tạo màu ở nhiệt độ 25°C trong 60 phút, sau khi khả năng hút được đo với độ dài bước sóng đo là 405 nm.

Các tế bào được thu lại từ các giếng có khả năng phản ứng thấp với peptit không bị phosphoryl hóa BSA và khả năng phản ứng cao với peptit pSer396/pSer404 BSA và được nuôi cấy trong đĩa 96 giếng (đĩa chuyển giao trước) ở mức 1-3 tế bào/giếng để nhân bản bằng phương pháp pha loãng hạn chế. Việc nhân bản tạo kháng thể Ta9 (IgG3/ κ) được chọn trong số đó. Đối với phân tích tiếp theo, việc nhân bản được nuôi cấy tập trung và kháng thể được tinh chế bằng cột protein G.

Bằng việc đo lường giá trị KD của kháng thể Ta9 đối với peptit pSer396/pSer404 bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 3, giá trị đo được là $1,08 \times 10^{-10}$, với ái lực đối với peptit cao hơn so với các kháng thể dãy Ta15.

[Ví dụ 5] Thử nghiệm về hành vi: Tác dụng của các kháng thể thu được ở chuột bị suy giảm trí nhớ và nhận thức

Các tác dụng của việc cung ứng ba kháng thể sau đây cho chuột bị suy giảm trí nhớ và nhận thức (Tau-Tg) được kiểm chứng.

(1) Kháng thể đa dòng của tổ nhận diện pSer413: chuột Tau-Tg (dòng 609) hoặc chuột không Tg (vật so sánh chuẩn bình thường), 9-11 tháng tuổi, $n = 9-10$ /nhóm.

(2) Ta1505 (kháng thể đơn dòng nhận diện pSer413): chuột Tau-Tg (dòng 784) hoặc chuột không Tg, 14 tháng tuổi, $n = 9-10$ /nhóm

(3) Ta9 (kháng thể đơn dòng nhận diện pSer396): chuột Tau-Tg (dòng 609) hoặc chuột không Tg, 14 tháng tuổi, $n = 9-10$ /nhóm

Đối với thử nghiệm có sử dụng chuột đực Tau-Tg đột biến (dòng 609 hoặc dòng 784) và chuột không cùng lứa không Tg, 9-14 tháng tuổi. Các nhóm được chia ra sao cho không có sự khác nhau về cân nặng trung bình giữa các nhóm. Chuột Tau-Tg đột biến được cho dùng kháng thể được pha loãng bằng PBS hoặc chất đệm xitrat (pH 5) một lần một tuần trong tổng cộng 5 tuần vào khoang bụng với lượng 1 mg trên 1 con chuột trên 1 lần cung ứng. Đối với nhóm tiêu chuẩn so sánh âm tính, chất đệm được sử dụng để điều chế kháng thể hoặc kháng thể đơn dòng IgG của chuột mà không có khả năng phản ứng đối với tau được cung ứng vào khoang bụng ở cùng liều lượng. Đối với nhóm dương tính, chuột không cùng lứa không Tg được cung ứng chất đệm được sử dụng để điều chế kháng thể vào vùng bụng ở cùng liều lượng.

Các cấu trúc cho nhóm (1) đến (3) được thể hiện dưới đây

(1) <Chuột được sử dụng>: Tau-Tg đột biến (dòng 609), 9 đến 11 tháng tuổi

<Cấu trúc nhóm>

Nhóm kháng thể đánh giá: 1,6 mg/mL của kháng thể đa dòng kháng tau pSer413 của thỏ trong PBS (n=10)

Nhóm kháng thể tiêu chuẩn so sánh: PBS (n=9)

Nhóm không Tg: PBS (n=9)

(2) <Chuột được sử dụng>: Tau-Tg đột biến (dòng 784), 14 tháng tuổi

<Cấu trúc nhóm>

Nhóm kháng thể đánh giá: 3,84 mg/mL kháng thể đơn dòng kháng tau pSer413 của chuột Ta1505 trong 0,1 M chất đệm xitrat (pH5) (n=10)

Nhóm kháng thể tiêu chuẩn so sánh: 4,28 mg/mL kháng thể đơn dòng kháng trục khuẩn mũ xanh của chuột 4C10F4 trong 0,1 M chất đệm xitrat (pH 5) (n=9)

Nhóm không Tg: 0,1 M chất đệm xitrat (pH 5) (n=9)

(3) <Chuột được sử dụng>: Tau-Tg đột biến (dòng 609), 14 tháng tuổi

<Cấu trúc nhóm>

Nhóm kháng thể đánh giá: 2,66 mg/mL kháng thể đơn dòng kháng tau pSer396 của chuột Ta9 trong 0,02 M chất đệm xitrat (pH6) (n=10)

Nhóm kháng thể tiêu chuẩn so sánh: 4,50 mg/mL kháng thể đơn dòng kháng trực khuẩn mủ xanh 6F11 trong 0,02 M chất đệm xitrat (pH 6) (n=9)

Nhóm không Tg: 0,02 M chất đệm xitrat (pH 6) (n=9)

Từ thứ 2 của tuần sau lần cung ứng cuối cùng, thử nghiệm trí nhớ quy chiếu không gian được tiến hành bằng việc dùng mê cung nước Morris (thử nghiệm mê cung nước). Vào ngày tiếp theo sau khi hoàn thành thử nghiệm mê cung nước, thiết bị môi trường mở được sử dụng để đo số lượng động tác chủ động của chuột (thử nghiệm môi trường mở).

<Thử nghiệm mê cung nước: giống nhau ở các nhóm (1) đến (3)>

Chuẩn bị: Bể đen có đường kính bên trong là 100 cm và chiều cao là 45 cm được đổ nước có độ sâu 16 cm. Nhiệt độ nước được điều chỉnh đến 21-23°C, duy trì sự trong suốt không màu không có chất tạo màu bằng oxit titan hoặc các chất tương tự. Không thêm clo, và sau một vài ngày thử nghiệm phân được loại bỏ và khoảng 10 L nước được thay thế.

Thử nghiệm sơ bộ (thu thập): Bệ trong suốt cao 15 cm được đặt chìm vào vị trí 20 cm từ tường (30 cm từ điểm trung tâm). Phân ngăn thành 4 góc bao gồm vị trí mà tại đó bệ bị nhúng chìm, chuột được đưa vào một cách ngẫu nhiên từ một trong 3 góc mà không có bệ. Giới hạn cho mỗi lần thử nghiệm là 60 giây với 5 thử nghiệm được tiến hành mỗi ngày. Khoảng thời gian giữa các lần thử nghiệm

là xấp xỉ 5 phút. “Thời gian thoát” để vượt lên bề được ghi lại thành dữ liệu. Chuột không thoát ra trong 60 giây được đặt lên bề và thời gian trốn thoát được coi là 60 giây. Chuột ở trên bề được chuyển khỏi bề sau 10 giây và được cho phép hoạt động tự do cho đến lần thử nghiệm tiếp theo, làm khô cơ thể. Các kết quả của từng con chuột trong mỗi ngày được ghi lại là giá trị trung bình của số giây đối với thời gian trốn thoát trong 5 thử nghiệm.

Thử nghiệm thu thập được hoàn chỉnh khi các kết quả của nhóm tiêu chuẩn so sánh (không Tg) được làm ổn định và thử nghiệm thăm dò được tiến hành vào ngày tiếp theo.

Thử nghiệm thăm dò: Vào ngày liền sau ngày cuối cùng, bề được bỏ ra từ bể và việc bơi tự do được chụp lại bằng camera quay phim trong 60 giây. Đoạn phim ghi được được quan sát, và thời gian trong suốt quá trình những con chuột tự do bơi lội ở góc có bề (góc mục tiêu) trong số 4 góc được đo lại và được biểu thị bằng tỷ lệ phần trăm trong 60 giây. Trong suốt thời gian này việc bơi lội đến 30 giây sau khi đưa vào bể cũng được phân tích.

Thử nghiệm quan trọng cho thử nghiệm sơ bộ (thu thập) được thực hiện bằng việc lặp lại phép đo và PLSD Fisher và cả thử nghiệm quan trọng cho thử nghiệm thăm dò được thực hiện bằng PLSD Fisher.

<Thử nghiệm môi trường mở: Giống nhau ở các nhóm (1) đến (3)>

Thiết bị: Bảng acrylic trong suốt dày 5 mm được sử dụng để tạo ra hộp vuông có kích thước $30 \times 30 \times 30$ cm được lưu trữ trong môi trường cách âm. Một bóng đèn sợi đốt 40W được để vào môi trường lưu trữ và bề mặt sàn được chiếu xạ với độ rọi 110 lux.

Số lượng hành vi: (i) Các chùm tia hồng ngoại được để bên ngoài mặt của hộp acrylic ở các vị trí cách 1,5 cm từ bề mặt sàn với khoảng cách 10 cm. Khi chuột liên tiếp chặn 2 chùm tia, sự vận động bị phát hiện và được đếm lại.

(ii) Các bề mặt tia hồng ngoại được cung cấp tại các vị trí của 2 mặt đối diện, cách 3,5 cm từ mặt sàn. Khi chuột chặn một phần bề mặt tia, việc ngẩng lên được nhận thấy và được đếm lại.

Thử nghiệm: mỗi con chuột chỉ phải chịu một phiên 20 phút. Chuột được đưa vào vị trí trung tâm của hộp acrylic bằng việc đóng cửa nhanh chóng để tạo ra môi trường cách âm, phiên thử nghiệm được tiến hành.

10 phút đầu tiên của phiên thử nghiệm là hoạt động tự do dưới điều kiện có ánh sáng, trong khi ở 10 phút cuối, ánh sáng bị tắt cho sự hoạt động tự do trong điều kiện không có ánh sáng.

Phân tích: Số lượng hành vi của mỗi con chuột trong từng phút được chỉ định trên biểu đồ đường đối với việc vận động và việc ngẩng lên.

Việc nhận thức thị giác bình thường được định nghĩa là phản ứng đối với sự thay đổi của môi trường sang điều kiện tối 10 phút sau khi bắt đầu phiên thử nghiệm, nhờ đó chuột biểu thị sự thay đổi về số lượng hành vi.

Số lượng hành vi trong từng điều kiện sáng và điều kiện tối và tổng số lượng hành vi trong suốt 20 phút được biểu thị bằng biểu đồ cột.

Thử nghiệm quan trọng được thực hiện giữa các nhóm, đối với tổng số lượng hành vi của sự vận động và việc ngẩng lên.

Vận động là số lượng hành vi chủ yếu do tự phát trong khi ngẩng lên là hành vi chủ yếu mang tính thăm dò, khám phá, nhưng thực tế cả hai chỉ số có ảnh hưởng

lẫn nhau (ví dụ: kể cả khi việc vận động xuất hiện bị giảm, nếu việc ngừng lên tăng trong suốt thời gian đó thì số lượng hành vi không thể bị coi là giảm).

<Thử nghiệm hóa mô miễn dịch: chỉ với nhóm (2)>

Sau khi hoàn thành thử nghiệm về hành vi, 5 con chuột được chọn từ mỗi nhóm và được truyền dịch được cố định bằng focmalin. Sau khi nhúng trong paraffin, một lát mỏng được lấy từ não bằng việc dùng thiết bị vi phẫu và điều trị 4 lần với xylên và etanol mỗi 10 phút một giống như việc xử lý giải phóng mô khỏi paraffin. Nó sau đó được đun nóng trong 30 phút trong chất đệm axit xitric (pH 6) (việc xử lý kích hoạt kháng nguyên) và được quay trở lại nhiệt độ phòng sau khi nó được rửa 2 lần với dung dịch muối sinh lý chất đệm Tris (TS) trong 10 phút. Sau khi tạo khối trong 60 phút ở nhiệt độ phòng với TS chứa 20% huyết thanh bò, kháng thể synaptophysin kháng người của chuột (SVP-38 được pha loãng 200 lần với TS chứa 10% huyết thanh bò bằng xích-ma) được ráp vào và việc xử lý được tiến hành qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Sau khi rửa 2 lần với TS trong 10 phút, kháng thể IgG kháng chuột được đánh dấu FITC (kháng thể được pha loãng 20 lần với TS chứa 10% huyết thanh bò bằng vec-tơ) được ráp vào và việc xử lý được tiến hành ở nhiệt độ phòng trong 60 phút. Sau khi rửa 2 lần với TS trong 10 phút, VECTASHIELD (vec-tơ) được ráp vào và việc quan sát được thực hiện bằng kính hiển vi. Cường độ huỳnh quang được định lượng và được số hóa bằng NIH-hình ảnh J và được biểu thị các đơn vị tùy ý.

<Kết quả>

1. Tác dụng của việc dùng từng kháng thể cho suy giảm trí nhớ

(1) Kháng thể đa dòng pSer413 của thỏ

Các kết quả từ (1-1) đến (1-3) được thể hiện trong Fig. 4 đến Fig. 7. Tóm lại, miễn dịch thụ động với kháng thể đa dòng kháng pSer413 đặc biệt đã cải thiện việc suy giảm trí nhớ ở các con chuột thí nghiệm (Tau-Tg) lên mức giống với nhóm không Tg. Trong (1-3) không có tín hiệu khác nhau trong hoạt động chuyển động và nhận thức thị giác được nhận thấy giữa các nhóm.

(2) Kháng thể đơn dòng pSer413 của chuột (kháng thể 1505)

Các kết quả của (2-1) đến (2-3) được thể hiện trong Fig. 8 đến Fig. 11. Tóm lại, miễn dịch thụ động với kháng thể đơn dòng kháng pSer413 đặc biệt đã cải thiện sự suy giảm trí nhớ ở các con chuột thí nghiệm đến mức giống với nhóm không Tg. Trong (2-3), không có tín hiệu khác nhau nào được nhận thấy trong hoạt động vận động và nhận thức thị giác giữa các nhóm.

Trên cơ sở các kết quả của (2-1) và (2-2), epitop pSer413 được kết luận là epitop thỏa mãn làm mục tiêu của liệu pháp miễn dịch thụ động đối với cả kháng thể đơn dòng và kháng thể đa dòng.

(3) Kháng thể đơn dòng pSer396 của chuột (kháng thể Ta9)

Các kết quả của (3-1) đến (3-3) được thể hiện trong Fig. 12 đến Fig. 15. Tóm lại, việc dùng Ta9 đã cải thiện đáng kể việc suy giảm nhận thức đến mức giống với nhóm không Tg. Trong (3-3), không có tín hiệu khác nhau nào trong hoạt động vận động và nhận thức thị giác được nhận thấy giữa các nhóm.

Tuy nhiên, khi Ta9 được so sánh với Ta1505, tác dụng thuốc của nó được phát hiện là thấp hơn. Mặc dù ái lực kháng nguyên của Ta9 là lớn hơn Ta1505 (xem Ví dụ 2 và 3), tác dụng thuốc của Ta9 yếu hơn Ta1505 (Ví dụ 5) cho thấy sự khác biệt trong tác dụng thuốc do sự khác nhau trong việc photphoryl hóa epitop.

[Ví dụ 6] Các tác dụng của việc dùng kháng thể Ta1505 lên chức năng thần kinh

Các tác dụng của việc dùng kháng thể Ta1505 đối với mức synaptophysin được biết đến là dấu hiệu phản ánh chức năng nhận thức được kiểm chứng bằng việc nhuộm mô miễn dịch kháng thể kháng synaptophysin trong vùng hồi hải mã CA3 là vùng trung tâm của trí nhớ. Cường độ huỳnh quang được định lượng bằng NIH-hình ảnh J.

Kết quả được thể hiện trong Fig. 16. Bằng việc cung ứng kháng thể Ta1505, đã quan sát được sự phục hồi mức synaptophysin trong hồi hải mã mặc dù tỷ lệ phần trăm phục hồi không lớn.

[Ví dụ 7] Trình tự nucleotit của kháng thể đơn dòng dây Ta15 cDNA

(1) Việc tinh chế tế bào lai tổng RNA

Các kháng thể đơn dòng khác nhau sản sinh các tế bào lai được nuôi cấy và 1 mL của ISOGEN được sử dụng cho từng giếng của đĩa 6 giếng để dung giải các tế bào. Sau khi thêm 0,2 mL cloroform vào hợp chất dung giải tế bào và trộn lẫn với vòng xoáy, nó được cho phép đứng yên ở nhiệt độ phòng trong 2 đến 3 phút. Sự quay ly tâm được thực hiện ở mức 12000 rpm, 4°C trong 10 phút và lớp ở trên được chuyển sang ống nghiệm mới. Sau khi thêm 0,5 mL rượu isopropyl và trộn lẫn, hỗn hợp được cho phép đứng yên ở nhiệt độ phòng trong vòng 10 phút. Sau khi hỗn hợp được quay ly tâm ở mức 15000 rpm, 4°C trong 15 phút để làm kết tủa tổng RNA. Sau khi thêm 1 mL etanol 7% vào hạt và trộn kỹ, nó được quay ly tâm ở mức 10000 rpm, 4°C trong 5 phút. Hạt được làm khô bằng không khí, được hòa tan trong nước không có DNase/RNase và được lưu trữ ở -80°C.

(2) Việc thu được chuỗi H và chuỗi L cDNA bằng 5'-RACE and 3'-RACE và trình tự nucleotit của những cDNA này.

Mỗi được tổng hợp cho 5'-RACE (Mở rộng nhanh chóng đầu cuối của cDNA) và 3'-RACE dựa trên trình tự cDNA đã biết của các vùng liên tục của các chuỗi H IgG2b và IgG2a của chuột. Mỗi được tổng hợp theo cách tương tự cho 5'-RACE (Mở rộng nhanh chóng đầu cuối của cDNA) và 3'-RACE, dựa trên trình tự cDNA của vùng liên tục của chuỗi L của chuột.

Theo cách riêng biệt, 1 μ g tổng RNA thu được từ các tế bào lai được sử dụng để tổng hợp cDNA cho 5'-RACE và 3'-RACE bằng việc dùng bộ kit SMART-RACE (sản phẩm của Clontech) và 5'-RACE and 3'-RACE được thực hiện. Phản ứng PCR được tiến hành bằng việc dùng hỗn hợp polymeraza ưu thế 2 (Clontech) theo định ước của nhà sản xuất. Sản phẩm PCR thu được bằng 5'-RACE và 3'-RACE bị điện di trên chất keo đường agarose và đoạn DNA bị khuếch đại toàn bộ được cắt ra khỏi chất keo đường agarose, được chèn vào vec-tơ nhân bản TA (Invitrogen) và được sử dụng để biến đổi E. coli, thu được các bản sao. Plasmid được điều chế từ việc biến đổi bằng phương pháp đã được tạo và trình tự nucleotit của đoạn DNA được chèn được xác định.

(3) Việc thu được cDNA có độ dài đầy đủ của chuỗi H và chuỗi L và trình tự nucleotit của những cDNA này

Việc mã hóa các trình tự cDNA cho đầu cuối N và đầu cuối C của chuỗi H và chuỗi L được xác định dựa trên thông tin trình tự nucleotit và chuyển tiếp và đảo ngược mỗi được dành để mở rộng trình tự có độ dài đầy đủ. Những mỗi này được sử dụng để mở rộng độ dài đầy đủ của chuỗi H và chuỗi L bằng việc dùng mỗi STAR MaxPCR (TaKaRa) và đoạn PCR được nhân bản trên vec-tơ pEF4. Nó được sử dụng cho lần xác định cuối cùng chiều dài đầy đủ của trình tự cDNA.

Sự dịch mã trình tự axit amin được thực hiện dựa trên thông tin trình tự nucleotit thu được và IgBLAST (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) được sử dụng để xác định các vùng CDR bằng phương pháp Kabat (Kabat, E.A. and Wu, T.T., J. Immunol., 147, 1709-1719, 1991).

Trình tự của vùng CDR thu được được liệt kê từ SEQ ID NO: 14 hướng về trước.

Thông tin liên quan đến trình tự CDR của các kháng thể mà nhận diện một cách rõ ràng pSer413 được thu lại từ đồng đẳng với những trình tự này (Bảng 4 và 6).

[Bảng 4]

Các trình tự axit amin kháng thể đơn dòng CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3

Kháng thể đơn dòng vô tính	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
Ta1501	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 13
Ta1502	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 13
Ta1505	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 13
Ta1506	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 13
Ta1507	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 13
Ta1508	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 13
Ta1509	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 13

[Bảng 5]

Các trình tự axit amin kháng thể đơn dòng CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3

Kháng thể đơn dòng vô tính	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3

Ta1501	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17
Ta1502	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17
Ta1505	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17
Ta1506	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17
Ta1507	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17
Ta1508	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17
Ta1509	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17

[Bảng 6]

Các trình tự axit amin kháng thể đơn dòng VH và VL

Kháng thể đơn dòng vô tính	VH	VL
Ta1501	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 25
Ta1502	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 26
Ta1505	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 26
Ta1506	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 27
Ta1507	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 28
Ta1508	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 29
Ta1509	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 30

[Ví dụ 8] Thử nghiệm hành vi: Hiệu quả của các kháng thể thu được ở chuột bị suy giảm trí nhớ và nhận thức

Hiệu quả của việc dùng hai loại kháng thể sau ở chuột bị suy giảm trí nhớ và nhận thức được kiểm nghiệm với liều lượng là 0,1 mg.

(4) Ta1505 (kháng thể đơn dòng nhận diện pSer413): chuột Tau-Tg (dòng 784) hoặc chuột không Tg, 10 tháng tuổi, n = 9-10/nhóm

(5) Ta9 (kháng thể đơn dòng nhận diện pSer396): chuột Tau-Tg (dòng 784) hoặc chuột không Tg 11 tháng tuổi, $n = 8-10/\text{nhóm}$

Đối với thử nghiệm sử dụng chuột đực đột biến Tau-Tg (dòng 784) và những con cùng một lứa không Tg, 10-11 tháng tuổi. Các nhóm được chia ra sao cho không có sự khác biệt về trọng lượng trung bình giữa các nhóm. Chuột đột biến Tau-Tg ở đây được cho dùng kháng thể được pha loãng với PBS 1 lần 1 tuần, tổng cộng 5 lần vào vùng khoang bụng với liều lượng 0,1 mg trên một con chuột trên một lần cung ứng. Đối với nhóm tiêu chuẩn so sánh âm tính, PBS được sử dụng để điều chế kháng thể hoặc kháng thể đơn dòng IgG của chuột không có khả năng phản ứng đối với tau được cung ứng vào qua vùng khoang bụng ở cùng liều lượng. Đối với nhóm tiêu chuẩn so sánh dương tính, những con chuột cùng một lứa không Tg được cung ứng PBS được sử dụng để điều chế kháng thể vào vùng khoang bụng ở cùng liều lượng.

Các cấu trúc của các nhóm (4) đến (5) được thể hiện dưới đây

(4) <Chuột được sử dụng>: đột biến Tau-Tg (dòng 784), 10 tháng tuổi

<Cấu trúc nhóm>

Nhóm kháng thể đánh giá: 0,25 mg/mL kháng thể đơn dòng Ta1505 kháng tau pSer413 của chuột trong PBS ($n = 10$)

Nhóm kháng thể tiêu chuẩn so sánh: 0,25 mg/mL kháng thể đơn dòng 4C10F4 kháng trực khuẩn mủ xanh của chuột trong PBS ($n = 10$)

Nhóm không Tg: PBS ($n = 9$)

(5) <Chuột được sử dụng>: Đột biến Tau-Tg (dòng 784), 11 tháng tuổi

<Cấu trúc nhóm>

Nhóm kháng thể đánh giá: 0,25 mg/mL kháng thể đơn dòng Ta9 kháng tau pSer396 của chuột trong PBS (n = 10)

Nhóm kháng thể tiêu chuẩn so sánh: 0,25 mg/mL kháng thể đơn dòng 6F11 kháng trực khuẩn mủ xanh trong PBS (n = 8)

Nhóm không Tg: PBS (n = 8)

Từ thứ 2 của tuần sau lần cung ứng cuối cùng, thử nghiệm trí nhớ tham chiếu không gian được thực hiện bằng việc dùng mê cung nước Morris (thử nghiệm mê cung nước). Thử nghiệm mê cung nước được tiến hành theo cách tương tự như ở Ví dụ 5.

<Kết quả>

1. Hiệu quả của việc dùng từng kháng thể đối với việc suy giảm trí nhớ

(4) Kháng thể đơn dòng pSer413 của chuột (kháng thể 1505)

Kết quả của thử nghiệm sơ bộ (4-1) và thử nghiệm thăm dò (4-2) được thể hiện trong Fig. 18 và Fig. 19. Tóm lại, miễn dịch thụ động bằng kháng thể đơn dòng kháng pSer413 đã cải thiện việc suy giảm trí nhớ ở những con chuột thí nghiệm lên mức 50% hoặc hơn so với chuột không Tg.

Kết quả của (4-1) và (4-2) xác nhận tác dụng thuốc đối với kháng thể đơn dòng epitop pSer413 ngay cả với liều lượng 0,1 mg.

(5) Kháng thể đơn dòng pSer396 của chuột (kháng thể Ta9)

Kết quả của thử nghiệm sơ bộ (5-1) và thử nghiệm thăm dò (5-2) được thể hiện trong Fig. 20 và Fig. 21. Tóm lại, việc suy giảm trí nhớ không được cải thiện bằng việc dùng Ta9 ở liều lượng 0,1 mg.

Những thử nghiệm này cho thấy rõ ràng hơn sự khác biệt trong tác dụng thuốc ở liều 0,1 mg do sự khác nhau ở việc photphoryl hóa epitop.

Việc dùng kháng thể ở liều lượng 0,1 mg trên một con chuột tương ứng với việc dùng ở liều lượng xấp xỉ 2,5 mg/kg.

[Ví dụ 9] Sự thay đổi mức Tau bị photphoryl hóa trong não bằng việc dùng kháng thể Ta1505

Tác dụng của việc dùng kháng thể Ta1505 đối với các mức Tau bị photphoryl hóa trong não của chuột Tau-Tg được kiểm định bằng việc nhuộm mô miễn dịch bằng kháng thể Ta1505 nhận diện pSer413 và kháng thể AT8 (epitop pSer202/pThr205 nhận diện PHF) trong vùng hải mã là vùng trung tâm của trí nhớ.

Dựa trên việc hoàn thành thử nghiệm hành vi, 5 con chuột được chọn từ mỗi nhóm và được truyền cố định với paraformaldehyde/PBS 4%. Các bộ não được lấy ra và được ngâm trong parafin và các lát mỏng 5 μ m được chuẩn bị bằng thiết bị vi phẫu. Sau 4 lần xử lý với xylen và etanol trong 10 phút mỗi lần, việc xử lý loại bỏ parafin được tiến hành và các lát được xử lý đun nóng (việc xử lý kích hoạt kháng nguyên) trong 10 phút ở pH 2, nhiệt độ phòng. Sau khi khôi phục về nhiệt độ phòng, các lát não được rửa 2 lần với dung dịch muối sinh lý Tris-HCl (TS) trong 10 phút. Việc tạo khối được thực hiện sau đó trong 60 phút ở nhiệt độ phòng bằng việc dùng huyết thanh bò 20% chứa TS.

Các kháng thể kháng tau (Ta1505, AT8) được pha loãng đến 1 μ g/mL với 10% huyết thanh bò chứa TS được ráp vào để xử lý qua đêm ở 4°C. Sau khi rửa 2 lần với TS trong 10 phút kháng thể kháng chuột được đánh dấu bioti (Vector Co.) được pha loãng 500 lần với TS chứa 10% huyết thanh bò được ráp vào để xử lý ở nhiệt độ phòng trong 60 phút.

Sau khi rửa 2 lần với TS trong 10 phút, dung dịch ABC được đánh dấu HRP (Vector Co.) được ráp vào để phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 30 phút và sau khi rửa thêm, việc tạo màu được tiến hành với diaminobenzidin (DAB). Nó đã được gói gọn bằng Entellan (Merck) và được quan sát và chụp ảnh.

Kết quả của nhuộm mô miễn dịch bằng Ta1505 được thể hiện trong Fig. 22 đến Fig. 24

Như được nhìn thấy trong Fig. 22, Tau dương tính Ta1505 được quan sát ở vùng hồi hải mã CA3 (cột đầu tiên từ trái sang) và vùng hồi hải mã CA23 (cột thứ hai từ trái sang) ở 5 cá thể của nhóm được cung ứng IgG tiêu chuẩn so sánh nhưng mức nhuộm màu trong vùng hồi hải mã CA3 (cột thứ ba từ trái sang) và vùng hồi hải mã CA23 (cột thứ tư từ trái sang) trong 5 cá thể của nhóm được cung ứng Ta1505 là rõ ràng thấp hơn nhóm được cung ứng IgG tiêu chuẩn so sánh. Điều này xác nhận rằng việc dùng Ta1505 đã giảm Tau Ta1505 dương tính hay chính là Tau Ser413 bị photphoryl hóa trong vùng hồi hải mã CA3 và vùng hồi hải mã CA23. Cụ thể hơn, nhóm IgG tiêu chuẩn so sánh cho thấy các điểm nâu nhỏ bị tích tụ, sự nhuộm màu ở một đường đậm từ trái sang phải trong CA3. Với CA23, một đường cong đậm bị nhuộm màu từ đỉnh bên phải sang bên trái. Nhóm được cung ứng Ta1505 có các điểm nâu cực nhỏ và mỏng với đường nhuộm màu đậm từ đỉnh bên trái xuống đáy phải trong CA3. Với CA23, đường cong đậm bị nhuộm màu từ đỉnh bên phải sang bên trái. Hầu như không có sự nhuộm màu được nhận thấy trong bốn vùng CA3 và 3 vùng CA23.

Trong Fig. 23 và Fig. 24, việc nhuộm màu Tau AT8 dương tính được nhận thấy trong vùng vỏ não (Vùng vỏ não quanh mũi (cột đầu tiên từ trái sang trong Fig. 23), vùng vỏ não khứu giác mặt bên (cột thứ 2 từ trái sang trong Fig. 23) và vùng vỏ não khứu giác trung tâm (cột thứ 3 từ trái sang trong Fig. 23)), đối với 5

cá thể trong nhóm được cho dùng IgG tiêu chuẩn so sánh. (Sự nhuộm màu thành các điểm nâu trong Fig. 23).

Mức độ nhuộm màu trong vùng vỏ não (Vùng vỏ não quanh mũi (cột đầu tiên từ trái sang trong Fig. 24), vùng vỏ não khứu giác mặt bên (cột thứ 2 từ trái sang trong Fig. 24) và vùng vỏ não khứu giác trung tâm (cột thứ 3 từ trái sang trong Fig. 24)) được giảm một cách rõ ràng xuống thấp hơn nhóm được cung ứng IgG tiêu chuẩn so sánh, đối với 5 cá thể trong nhóm được cung ứng Ta1505, đến mức mà không bộc lộ sự nhuộm màu.

Điều này xác nhận rằng việc cung ứng Ta1505 giảm Tau Ta1505 dương tính, mà chính là Tau Ser413 bị phosphoryl hóa trong vùng vỏ não (vùng vỏ não quanh mũi, vùng vỏ não khứu giác mặt bên và vùng vỏ não khứu giác trung tâm).

Việc nhuộm màu điểm nâu được thể hiện trong Fig. 23 nhưng hầu như không nhìn thấy sự nhuộm màu điểm nâu trong Fig. 24.

Việc cung ứng kháng thể Ta1505 được xác nhận làm giảm mức Tau Ser413 bị phosphoryl hóa trong não (vùng hồi hải mã CA3, vùng hồi hải mã CA23, PRh, Ent (vùng bên, vùng trung tâm)).

PRh = Vùng vỏ não quanh mũi

Ent = Vùng vỏ não khứu giác

Kết quả của việc nhuộm mô miễn dịch bằng AT8 được thể hiện trong Fig. 25 đến Fig. 27

Như được thấy trong Fig. 25, việc nhuộm màu Tau AT8 dương tính được quan sát ở vùng hồi hải mã CA3 (cột đầu tiên từ trái sang) và vùng hồi hải mã CA23 (cột thứ 2 từ trái sang) ở 5 cá thể của nhóm được cho dùng IgG tiêu chuẩn so sánh, nhưng mức độ nhuộm màu trong vùng hồi hải mã CA3 (cột thứ 3 từ trái

sang) và vùng hồi hải mã CA23 (cột thứ 4 từ trái sang) trong 5 cá thể của nhóm được cho dùng Ta1505 là thấp hơn rõ ràng so với nhóm được cho dùng IgG tiêu chuẩn so sánh. Điều này khẳng định rằng việc dùng Ta1505 làm giảm Tau AT8 dương tính mà chính là Tau Ser202/Thr205 bị phosphoryl hóa trong vùng hồi hải mã CA3 và vùng hồi hải mã CA23. Cụ thể hơn, trong Fig. 25, nhóm IgG tiêu chuẩn so sánh cho thấy các điểm nâu nhỏ được tích tụ, việc nhuộm màu đường đậm từ đỉnh trái xuống đáy phải trong vùng CA3. Với vùng CA23, đường cong đậm được nhuộm màu từ đỉnh bên phải sang bên trái. Nhóm được dùng Ta1505 có các điểm nâu rất mỏng và nhỏ cùng với đường nhuộm màu đậm từ đỉnh trái xuống đáy phải trong vùng CA3. Với vùng CA23, đường cong đậm bị nhuộm màu từ đỉnh bên phải sang bên trái.

Trong Fig. 26, việc nhuộm màu Tau AT8 dương tính trong vùng vỏ não (vùng vỏ não quanh mũi (cột thứ nhất từ trái sang trong Fig. 26), vùng vỏ não khứu giác mặt bên (cột thứ 2 từ trái sang trong Fig. 26) và vùng vỏ não khứu giác trung tâm (cột thứ 3 từ trái sang trong Fig. 26)) đối với 5 cá thể trong nhóm được cho dùng IgG tiêu chuẩn so sánh. (Việc nhuộm màu thành điểm nâu trong Fig. 26).

Trong Fig. 27, mức độ nhuộm màu trong vùng vỏ não (vùng vỏ não quanh mũi (cột thứ nhất từ trái sang trong Fig. 27), vùng vỏ não khứu giác mặt bên (cột thứ 2 từ trái sang trong Fig. 27) và vùng vỏ não khứu giác trung tâm (cột thứ 3 từ trái sang trong Fig. 27)) bị giảm một cách rõ rệt xuống dưới nhóm được cho dùng IgG tiêu chuẩn so sánh, đối với 5 cá thể trong nhóm được cho dùng Ta1505. (Việc nhuộm màu thành điểm nâu nhỏ trong Fig. 27).

Điều này khẳng định rằng việc dùng Ta1505 làm giảm Tau AT8 dương tính mà chính là Tau Ser202/Thr205 bị phosphoryl hóa trong vùng vỏ não (vùng vỏ

não quanh mũi, vùng vỏ não khứu giác mặt bên và vùng vỏ não khứu giác trung tâm).

Việc dùng kháng thể Ta1505 được khẳng định là có xu hướng làm giảm mức độ Tau Ser202/Thr205 bị phosphoryl hóa nhận diện AT8 trong não (= vùng hồi hải mã CA3, vùng hồi hải mã CA23, PRh, Ent (vùng bên, vùng trung tâm)).

Kết quả này càng khẳng định rằng việc dùng kháng thể cải thiện tình trạng bệnh lý trong não và có tác dụng cải thiện sự suy giảm trí nhớ. Các kết quả chỉ ra rằng việc dùng kháng thể qua màng bụng có ảnh hưởng lên não.

[Ví dụ 10] Tác dụng của việc dùng kháng thể Ta1505 đối với các mức độ Tau trong não

Dùng kháng thể AT8 mà được cho là để nhận diện sự hiện diện của Tau bị tăng phosphoryl hóa trong PHF (kháng thể đơn dòng của chuột nhận diện pSer202/pThr205, Innax Co.), G2 (kháng thể nhận diện vùng đầu cuối N đặc trưng kháng người: kháng thể đa dòng của thỏ), PHF1 (kháng thể đơn dòng của chuột nhận diện pSer396/pSer404, được cho là để nhận diện sự hiện diện của Tau bị tăng phosphoryl hóa trong PHF) và Ta1505, tác dụng của việc dùng kháng thể 1505 đối với Tau và mức độ Tau bị tăng phosphoryl hóa trong chất đồng chất não được kiểm định bằng phương pháp lai thấm protein sử dụng chất đồng chất não của chuột Tau-Tg được cung ứng kháng thể.

Việc nghiền bằng sóng âm được thực hiện đối với 100 đến 200 mg bán cầu đại não chuột ở lượng gấp 5 lần TBS (chứa dung dịch hỗn hợp thuốc của chất ức chế protiaza và dung dịch hỗn hợp thuốc của chất ức chế phosphataza). Hỗn hợp này được quay ly tâm ở 100.000 g trong 15 phút ở 4°C và chất nổi trên bề mặt được thu thập làm phần hòa tan TBS.

Kết tủa bị treo trong 1% sarkosyl/TBS (chứa dung dịch hỗn hợp thuốc của chất ức chế proteaza và dung dịch hỗn hợp thuốc của chất ức chế phosphataza) và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Chất này được quay ly tâm ở 100.000 g trong 15 phút ở nhiệt độ phòng và chất nổi trên bề mặt được sử dụng làm phần hòa tan sarkozyl.

Phần hòa tan TBS và phần hòa tan sarkozyl được điện di với 7% chất keo Tris-axetat và được chia ra, được chuyển sang màng PVDF và được đưa vào để tạo khối qua đêm ở nhiệt độ phòng với 1% BSA/3% sữa gầy/0,05% Tween20/TBS. Tiếp theo dung dịch kháng thể được phản ứng bằng việc dùng kháng thể liên hợp HRP làm kháng thể thứ hai, phản ứng được tiến hành bằng phương pháp ECL và việc phân tích được thực hiện với máy phân tích hình ảnh LAS3000 để xác định số lượng.

Kết quả được thể hiện trong Fig. 28 và Fig. 29

Đối với phần có thể hòa tan TBS, việc cung ứng kháng thể Ta1505 được khẳng định là làm giảm đáng kể Tau người (được nhận diện bằng kháng thể G2), Tau bị tăng photphoryl hóa (được nhận diện bằng AT8 (epitop pS202/pT205) và PHF1 (epitop pSer396/pS404)) và Tau pS413 (được nhận diện bằng Ta1505) trong não chuột Tau-Tg.

Đối với phần có thể hòa tan sarkosyl, việc cung ứng kháng thể Ta1505 được khẳng định là giảm đáng kể Tau bị tăng photphoryl hóa (được nhận diện bằng AT8) trong não chuột Tau-Tg.

Các kết quả này càng chứng minh rằng việc cung ứng kháng thể cải thiện tình trạng bệnh lý trong não và có tác dụng cải thiện việc suy giảm trí nhớ. Các kết quả cũng chỉ ra rằng kháng thể được cung ứng qua khoang bụng có tác động đến não.

[Ví dụ sản xuất 1] Chuột Tg bộc lộ tau người loại thường (chuột Tau-Tg) là vật thí nghiệm bị suy giảm chức năng nhận thức

Các tác dụng được lý của các kháng thể của sáng chế đối với việc cải thiện chức năng nhận thức được kiểm chứng bằng việc dùng chuột Tg có đặc tính biểu hiện tau người loại thường và đặc biệt các dạng biểu thị như sự phát triển cá thể ở người mà là sự biểu thị chỉ tau loại 3R trong suốt giai đoạn phôi thai và cả hai loại tau 3R và 4R cùng với việc tiếp tục tăng trưởng, và biểu hiện sự khởi đầu việc suy giảm chức năng nhận thức ở tháng thứ 6 sau khi sinh ra. Chuột Tg được chuẩn bị bằng phương pháp sau.

Cấu trúc gen được sử dụng để chuẩn bị chuột Tg là axit nucleic mang gen tau có cấu trúc được thể hiện trong Fig. 17 bao gồm virus Simian 40 (SV40) 5'-intron (0,3 kb), gen tau (Tau; 7,3 kb), SV40 3'-intron (0,8 kb) và SV40 tín hiệu polyA (0,3 kb) ở trình tự này, phần cuối dòng của vùng khởi động α -calmodulin kinaza II α (CaMKII) (8,5 kb). Gen tau được sử dụng được thu lại bằng phương pháp tương tự như được miêu tả bằng Yamashita T. và các tác giả khác (FEBS Letters, Tập 1.579, trang 241-244, 2005) là gen có độ dài 7,3 kb bao gồm trình tự nucleotit của đoạn tương ứng với các exon từ 1 đến 9 trong mã hóa cDNA cho tau người, trình tự nucleotit bao gồm đoạn gồm 18 nucleotit đầu tiên và 3kb cuối cùng của intron 9, trình tự nucleotit của exon 10, đoạn gồm 3 kb đầu tiên và 38 nucleotit cuối của intron 10 (với xytozin thay thế cho thimin ở chỉ số bazơ 16 từ đầu cuối 5' của intron 10) và trình tự nucleotit của cDNA tương ứng với các exon 11 đến 13. Gen tau được nhân bản tại vị trí enzym hạn chế EcoRV của pNN265, vec-tơ bao gồm SV40 5'-intron và 3'-intron và trình tự tín hiệu poly(A) (Choi T và các tác giả khác, Mol. Cell. Biol. tập 11, trang 3070-3074, 1991). Đoạn DNA chứa SV40 5'-intron, gen tau, SV40 3'-intron và trình tự tín hiệu poly(A) bị cắt ra khỏi

plasmid thu được bằng các enzym hạn chế XhoI và NotI, và đoạn DNA được nhân bản trong vec-tơ pMM403 bao gồm vùng khởi động CaMKII (Mayford M và các tác giả khác, Tế bào, tập 81 trang 891-904, 1995). Ngoài ra, đoạn gen có cấu trúc được thể hiện trong Fig. 17 chứa gen tau bị cắt ra khỏi plasmid thu được bằng enzym hạn chế SfiI (17,2 kb), được cô lập bằng điện di gel agarose và được tinh chế khỏi vùng gel tương ứng bằng việc dùng bộ kit chiết gel QIAquick QIAGEN (R) (Cat. No.28704). Đoạn gen (DNA) thu được được áp bằng phôi giai đoạn tiền nhân thu được bằng việc gây giống chuột C57BL/6 đực hoặc cái theo phương pháp đã được biết đến [Hogan, B và các tác giả khác, “Thao tác với phôi của chuột. Sổ tay phòng thí nghiệm”, Phòng thí nghiệm Cold Spring Harbor (1986)]. Chúng được cấy vào các ống tử cung của chuột cái C57BL được làm thụ thai giả bằng cách cấy vào. Phần đuôi của chuột con được cắt bỏ, PCR được tiến hành để xác nhận có hay không gen được tạo ra đã được chuyển đổi và chuột cái hoặc chuột đực có gen được chuyển đổi được gây giống với chuột cái hoặc chuột đực bình thường để tạo ra chuột Tg được đề cập ở dòng 609 và dòng 784 của các ví dụ là chuột được tạo ra bằng phương pháp tương tự và bộc lộ tính trạng tương tự (có thể bỏ việc tham khảo các dòng trong phần ví dụ).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa bệnh lý tau bao gồm kháng thể, trong đó kháng thể này chứa

vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) có ba CDR gồm trình tự CDR-H1 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 8, CDR-H2 chứa trình tự mà ít nhất 90% giống với trình tự được biểu thị bằng SEQ ID NO: 9, và trình tự CDR-H3 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 13, và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có ba CDR gồm trình tự CDR-L1 chứa trình tự mà ít nhất 90% giống với trình tự được biểu thị bằng SEQ ID NO: 14, trình tự CDR-L2 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 16, và trình tự CDR-L3 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 17, và

trong đó kháng thể này liên kết với protein tau mà đã bị phosphoryl hóa tại gốc axit amin ở vị trí 413 của protein tau mà được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1 với ái lực lớn hơn so với protein tau mà không bị phosphoryl hóa ở vị trí 413 của protein tau mà được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1.

2. Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa theo điểm 1, trong đó CDR-H1 chứa trình tự được biểu thị bằng SEQ ID NO: 8, CDR-H2 chứa trình tự được biểu thị bằng SEQ ID NO: 9, CDR-H3 chứa trình tự được biểu thị bằng SEQ ID NO: 13, CDR-L1 chứa trình tự được biểu thị bằng SEQ ID NO: 14, CDR-L2 chứa trình tự được biểu thị bằng SEQ ID NO: 16, và CDR-L3 chứa trình tự được biểu thị bằng SEQ ID NO: 17.

3. Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa VH mà có trình tự được biểu thị bằng SEQ ID NO: 20 và VL mà có trình tự được biểu thị bằng SEQ ID NO: 26.

4. Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa theo điểm 1, trong đó ái lực của kháng thể với protein tau mà bị phosphoryl hóa tại gốc axit amin ở vị trí 413 của protein tau được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1 ít nhất bằng 2 lần so với ái lực với protein tau mà không bị phosphoryl hóa ở vị trí 413 của protein tau được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1.

5. Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa theo điểm 1, trong đó ái lực của kháng thể với protein tau mà bị phosphoryl hóa tại gốc axit amin ở vị trí 413 của protein tau được biểu thị SEQ ID NO: 1 ít nhất bằng 10 lần so với ái lực với protein tau mà không bị phosphoryl hóa ở vị trí 413 của protein tau được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1.

6. Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa theo điểm 1, trong đó ái lực của kháng thể với protein tau mà bị phosphoryl hóa tại gốc axit amin ở vị trí 413 của protein tau được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1 ít nhất bằng 30 lần so với ái lực với protein tau mà không bị phosphoryl hóa ở vị trí 413 của protein tau được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1.

7. Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa theo điểm 1, trong đó ái lực của kháng thể với protein tau mà bị phosphoryl hóa tại gốc axit amin ở vị trí 413 của protein tau được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1 ít nhất bằng 100 lần so với ái lực với protein tau mà không bị phosphoryl hóa ở vị trí 413 của protein tau được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1.

8. Tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể nhân hóa người hoặc kháng thể lai.

9. Kháng thể đơn dòng bao gồm

vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) có ba CDR gồm trình tự CDR-H1 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 8, CDR-H2 chứa trình tự mà ít nhất 90% giống với trình tự được biểu thị bằng SEQ ID NO: 9, và trình tự CDR-H3 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 13, và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có ba CDR gồm trình tự CDR-L1 chứa trình tự mà ít nhất 90% giống với trình tự được biểu thị bằng SEQ ID NO: 14, trình tự CDR-L2 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 16, và trình tự CDR-L3 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 17; và

trong đó kháng thể đơn dòng này liên kết với protein tau mà bị phosphoryl hóa tại gốc axit amin ở vị trí 413 của protein tau được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1 với ái lực lớn hơn so với protein tau mà không bị phosphoryl hóa ở vị trí 413 của protein tau được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1.

10. Kháng thể đơn dòng theo điểm 9, trong đó kháng thể đơn dòng này bao gồm

VH có ba CDR gồm trình tự CDR-H1 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 8, trình tự CDR-H2 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 9, và trình tự CDR-H3 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 13, và

VL có ba CDR gồm trình tự CDR-L1 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 14, trình tự CDR-L2 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 16, và trình tự CDR-L3 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 17.

11. Kháng thể đơn dòng theo điểm 9, trong đó sự liên kết giữa kháng thể đơn dòng này và một kháng thể là liên kết cạnh tranh với liên kết giữa một kháng thể bao gồm VH có trình tự được biểu thị bằng SEQ ID NO: 20 và VL có trình tự được biểu thị bằng SEQ ID NO: 26 và kháng nguyên.

12. Kháng thể đơn dòng theo điểm 9, trong đó kháng thể đơn dòng này gồm VH có trình tự được biểu thị bằng SEQ ID NO: 20 và VL có trình tự được biểu thị bằng SEQ ID NO: 26.

13. Kháng thể đơn dòng theo điểm 9, trong đó ái lực của kháng thể đơn dòng này đối với protein tau mà bị phosphoryl hóa tại gốc axit amin ở vị trí 413 của protein tau được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1 ít nhất bằng 2 lần so với ái lực đối với protein tau mà không bị phosphoryl hóa ở vị trí 413 của protein tau được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1.

14. Kháng thể đơn dòng theo điểm 9, trong đó ái lực của kháng thể đơn dòng này đối với protein tau mà bị phosphoryl hóa tại gốc axit amin ở vị trí 413 của protein tau được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1 ít nhất bằng 10 lần so với ái lực đối với protein tau mà không bị phosphoryl hóa ở vị trí 413 của protein tau được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1.

15. Kháng thể đơn dòng theo điểm 9, trong đó ái lực của kháng thể đơn dòng này đối với protein tau mà bị phosphoryl hóa tại gốc axit amin ở vị trí 413 của protein tau được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1 ít nhất bằng 30 lần so với ái lực đối với protein tau mà không bị phosphoryl hóa ở vị trí 413 của protein tau được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1.

16. Kháng thể đơn dòng theo điểm 9, trong đó ái lực của kháng thể đơn dòng này đối với protein tau mà bị phosphoryl hóa tại gốc axit amin ở vị trí 413 của protein tau được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1 ít nhất bằng 100 lần so với ái lực đối với protein tau mà không bị phosphoryl hóa ở vị trí 413 của protein tau được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1.

17. Kháng thể đơn dòng theo điểm 9, trong đó kháng thể này là kháng thể nhân hóa hoặc kháng thể lai.

18. Peptit bao gồm trình tự axit amin chứa các gốc axit amin 410-421 của protein tau của SEQ ID NO: 1, trong đó gốc axit amin mà tương ứng với Ser413 của protein tau của SEQ ID NO: 1 trong peptit bị phosphoryl hóa.

2/29

FIG. 2

	250	260	270	280	290	300
3R0N (Seq. ID:6)	SRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGK-----					216
3R1N (Seq. ID:5)	SRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGK-----					245
3R2N (Seq. ID:4)	SRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGK-----					274
4R0N (Seq. ID:3)	SRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHV					242
4R1N (Seq. ID:2)	SRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHV					271
4R2N (Seq. ID:1)	SRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHV					300

Prim. cons.	SRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHV					
	310	320	330	340	350	360
3R0N (Seq. ID:6)	-----VQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNI					271
3R1N (Seq. ID:5)	-----VQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNI					300
3R2N (Seq. ID:4)	-----VQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNI					329
4R0N (Seq. ID:3)	PGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNI					302
4R1N (Seq. ID:2)	PGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNI					331
4R2N (Seq. ID:1)	PGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNI					360

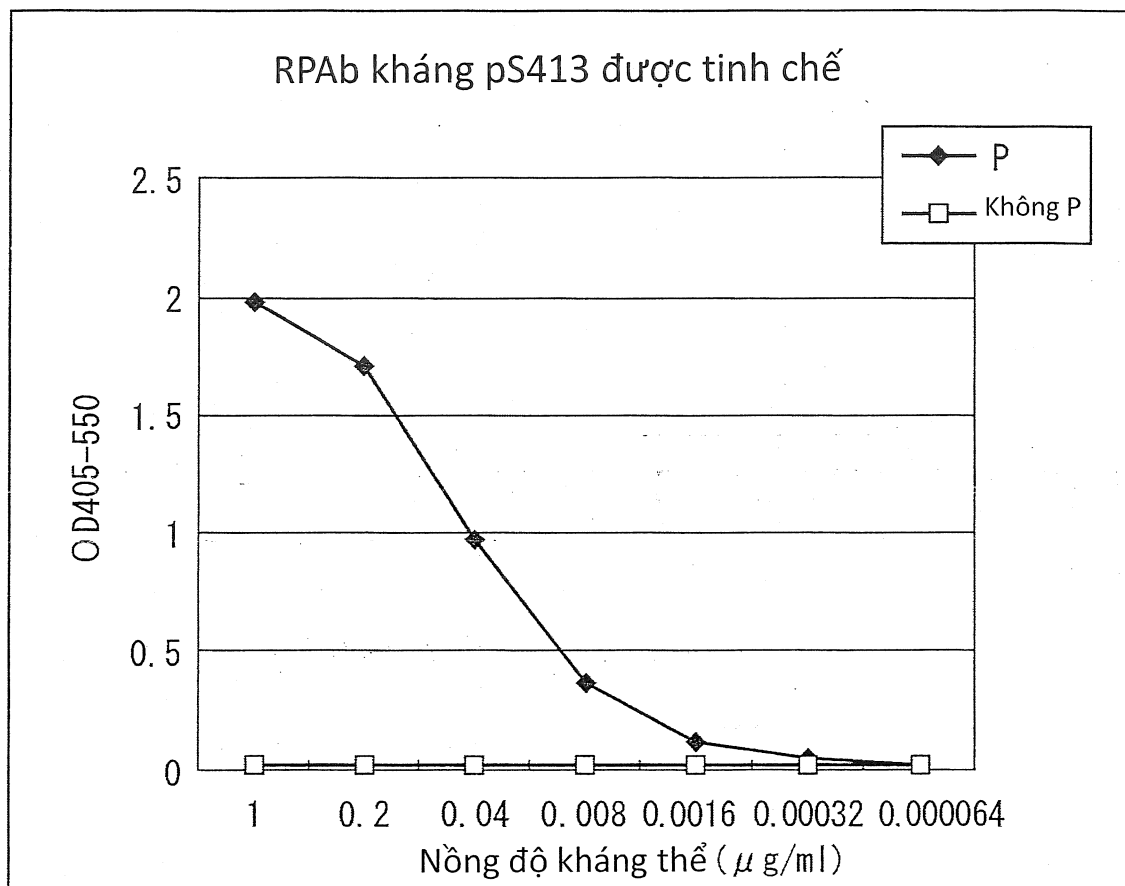
Prim. cons.	PGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNI					
	370	380	390	400	410	420
3R0N (Seq. ID:6)	THVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSS TGSIDMV					331
3R1N (Seq. ID:5)	THVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSS TGSIDMV					360
3R2N (Seq. ID:4)	THVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSS TGSIDMV					389
4R0N (Seq. ID:3)	THVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSS TGSIDMV					362
4R1N (Seq. ID:2)	THVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSS TGSIDMV					391
4R2N (Seq. ID:1)	THVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSS TGSIDMV					420

Prim. cons.	THVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSS TGSIDMV					
	430	440				
3R0N (Seq. ID:1)	DSPQLATLADEV SASLAKQGL					352
3R1N (Seq. ID:1)	DSPQLATLADEV SASLAKQGL					381
3R2N (Seq. ID:1)	DSPQLATLADEV SASLAKQGL					410
4R0N (Seq. ID:1)	DSPQLATLADEV SASLAKQGL					383
4R1N (Seq. ID:1)	DSPQLATLADEV SASLAKQGL					412
4R2N (Seq. ID:1)	DSPQLATLADEV SASLAKQGL					441

Prim. cons.	DSPQLATLADEV SASLAKQGL					

$\frac{3}{29}$

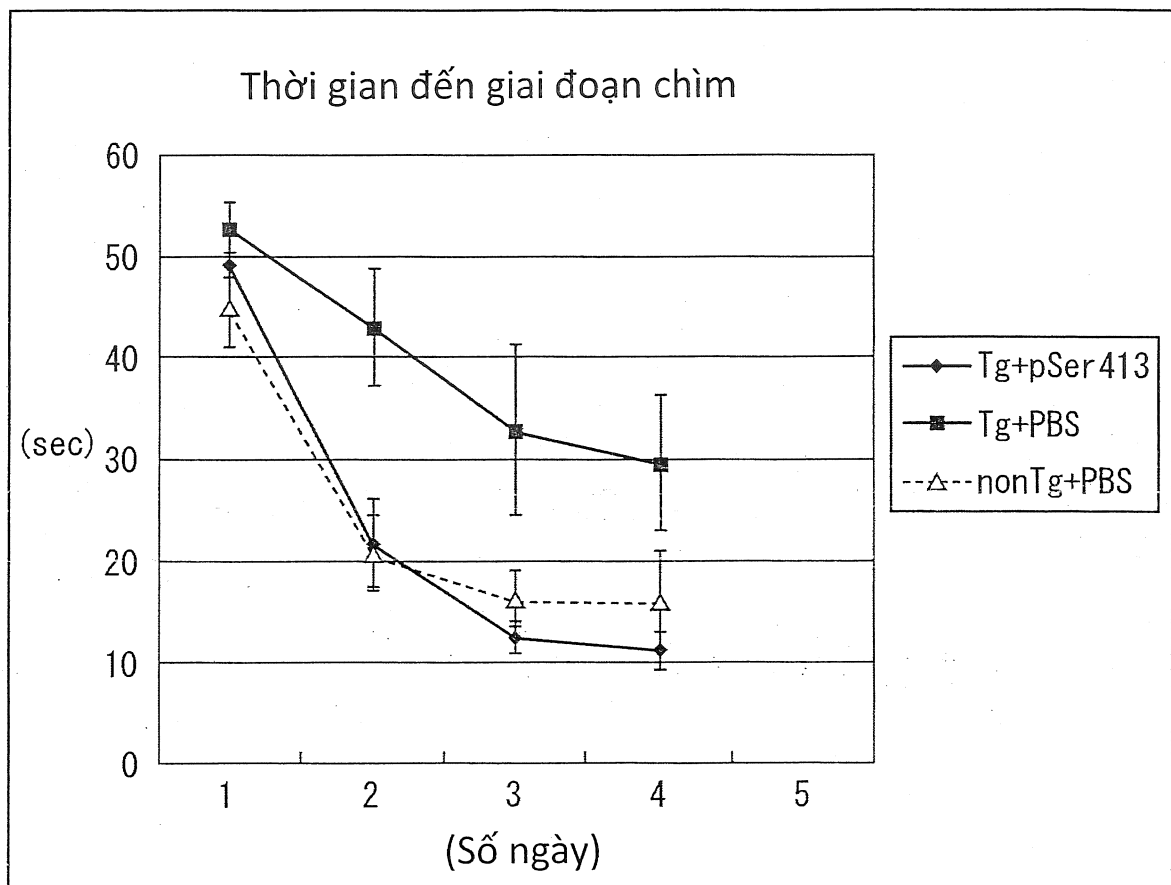
FIG. 3



4/29

FIG. 4

(1-1) Thử nghiệm so sánh



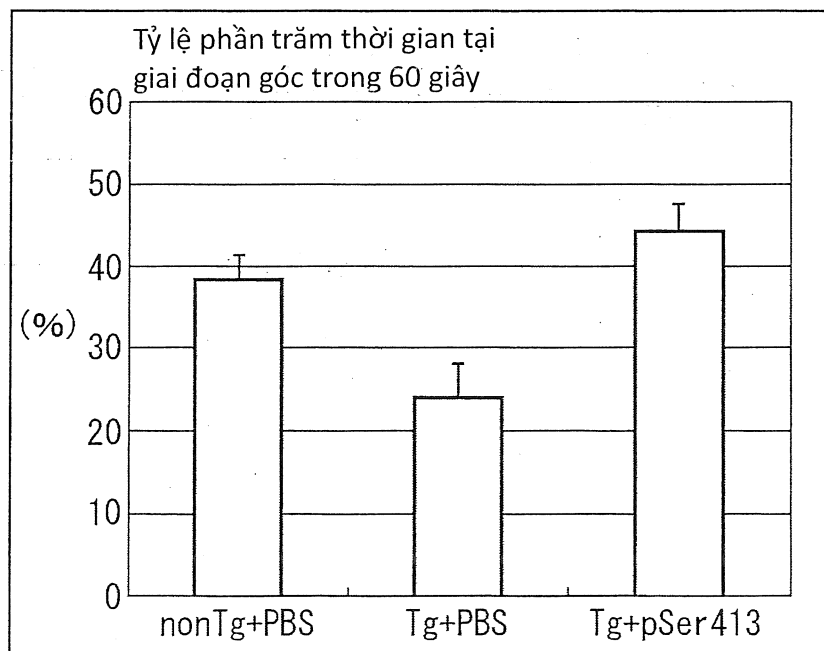
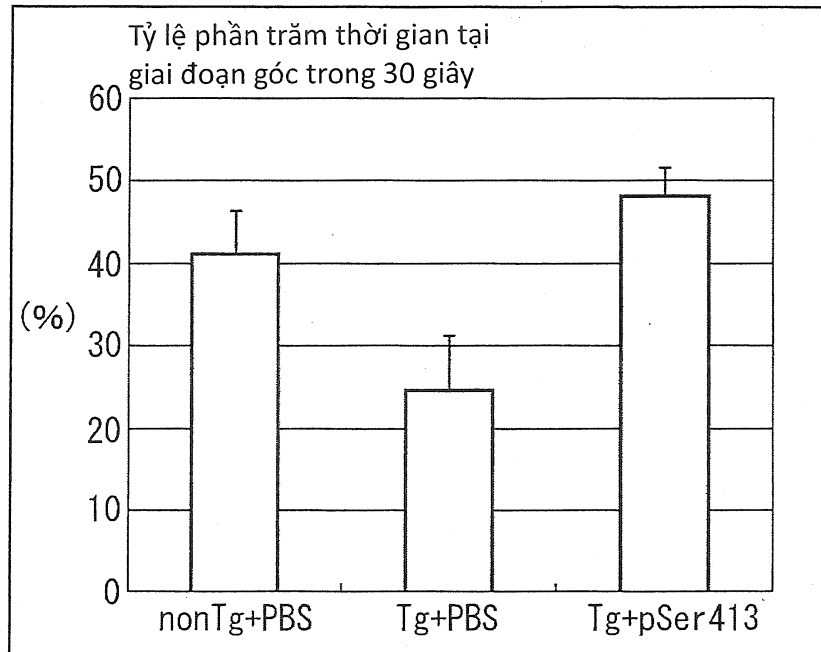
Sự khác biệt đáng kể

Không Tg với Tg: $p=0,0071$ Tg với Tg được chủng ngừa: $p=0,0029$

5/29

FIG. 5

(1-2) Thử nghiệm thăm dò



Khác biệt đáng kể

Phân tích thử nghiệm 30 giây:

Không Tg với Tg: $p=0,00321$

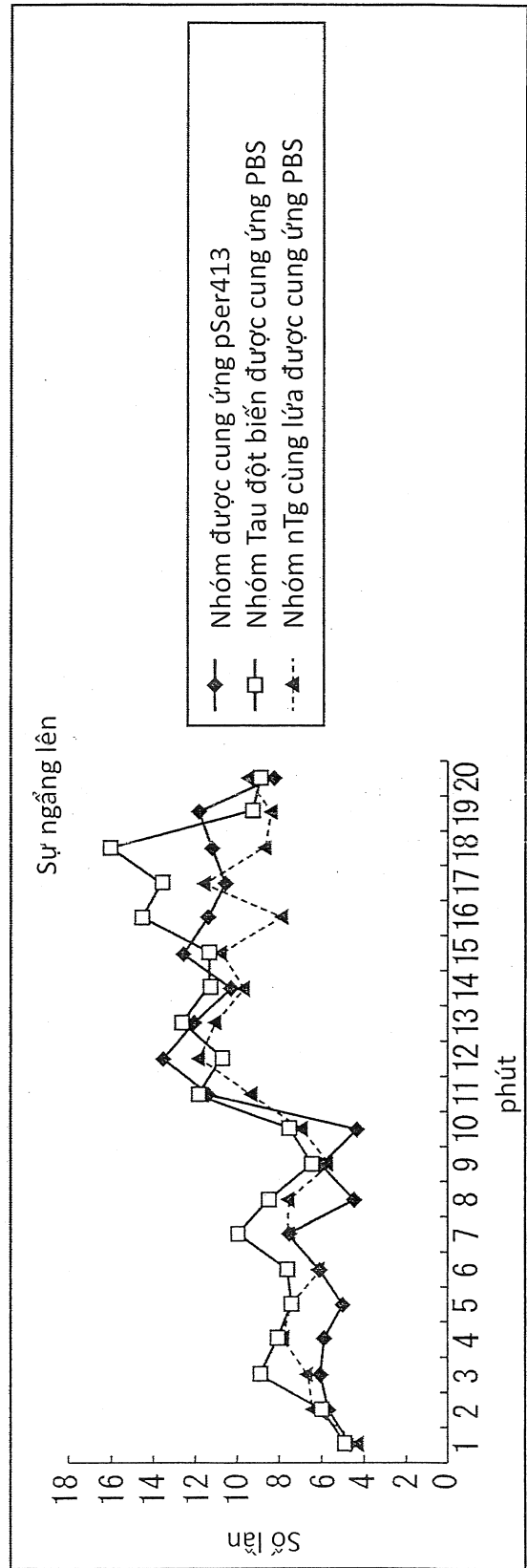
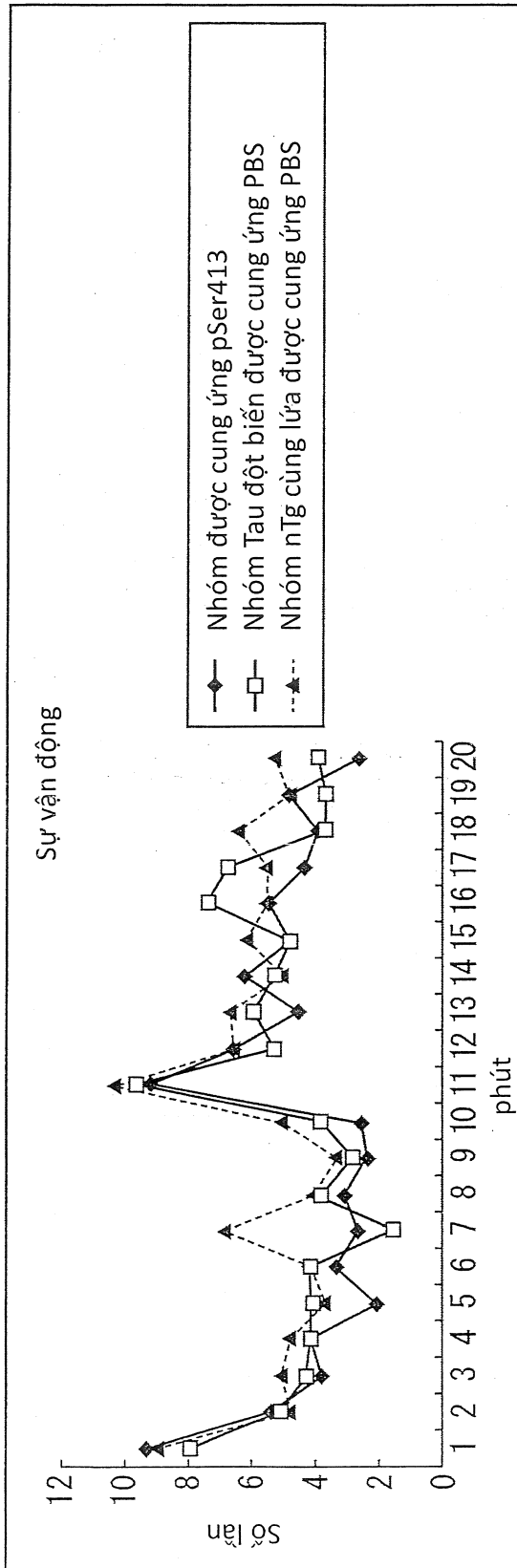
Phân tích thử nghiệm 60 giây:

Không Tg với Tg: $p=0,0085$ Tg với Tg được chủng ngừa: $p=0,0003$

6/29

FIG. 6

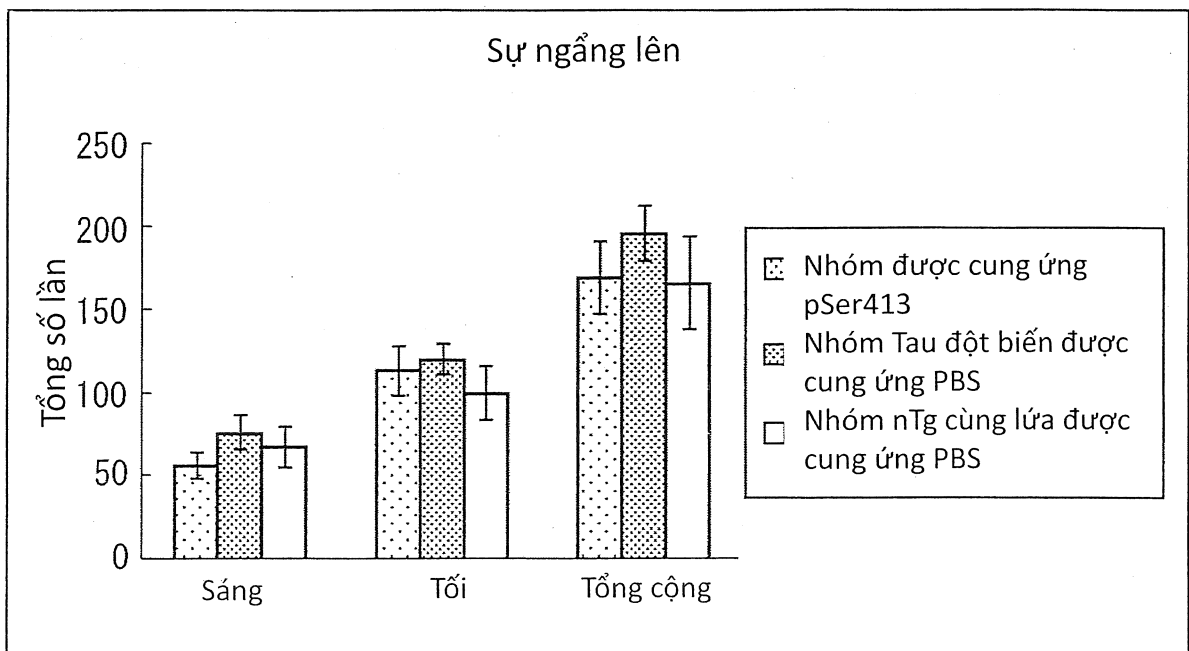
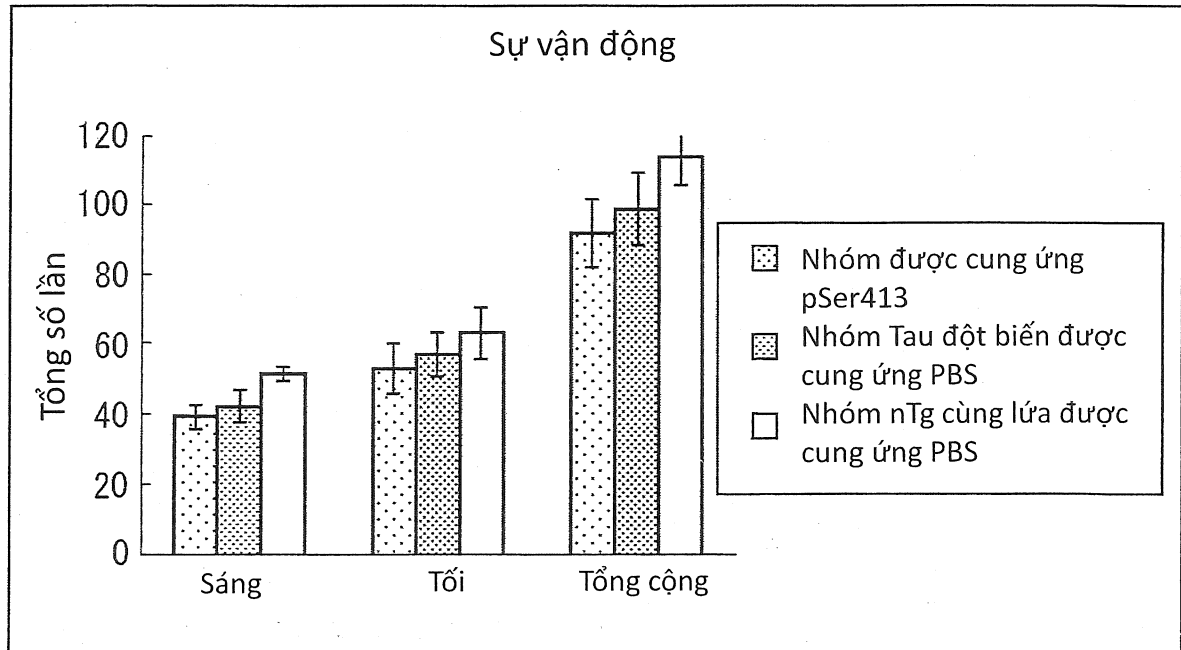
(1-3) Thử nghiệm môi trường mở



7/29

FIG. 7

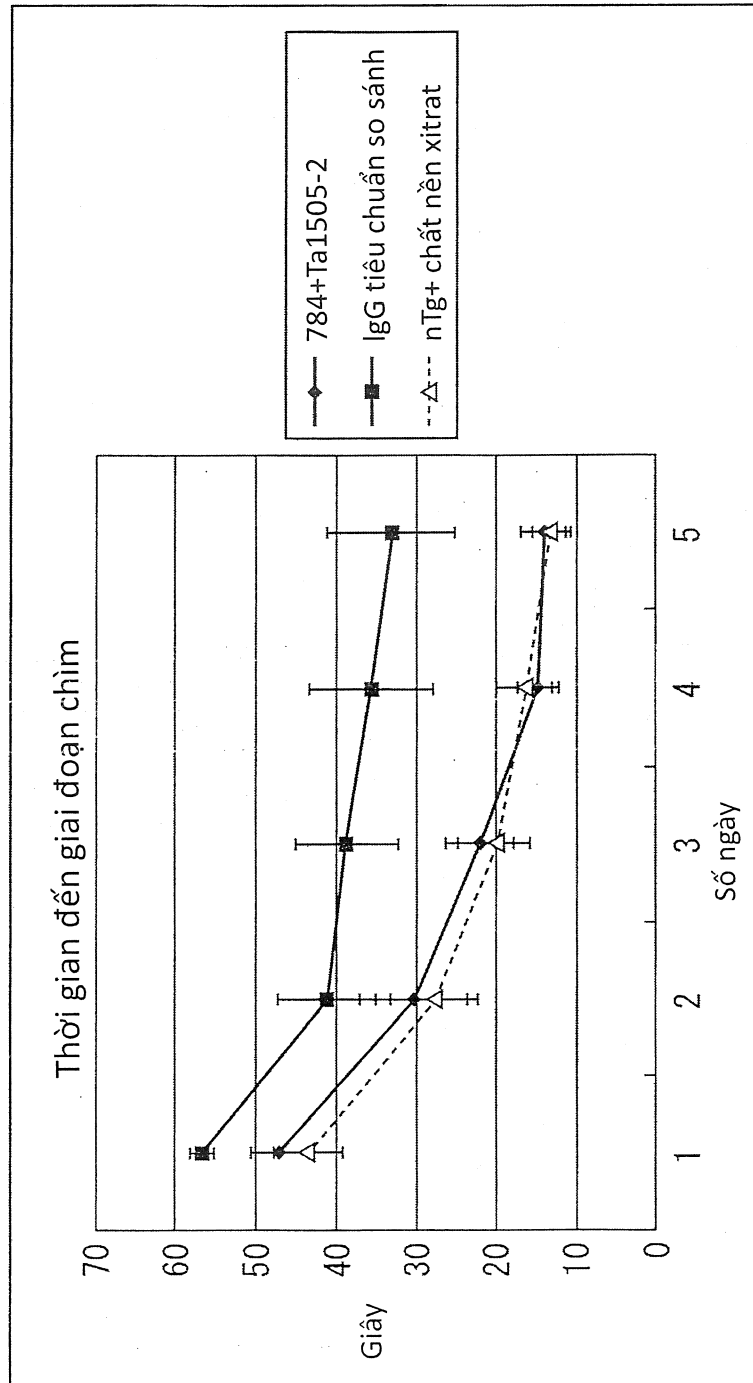
(1-3) Thử nghiệm môi trường mở



8/29

FIG. 8

(2-1) Thử nghiệm sơ bộ



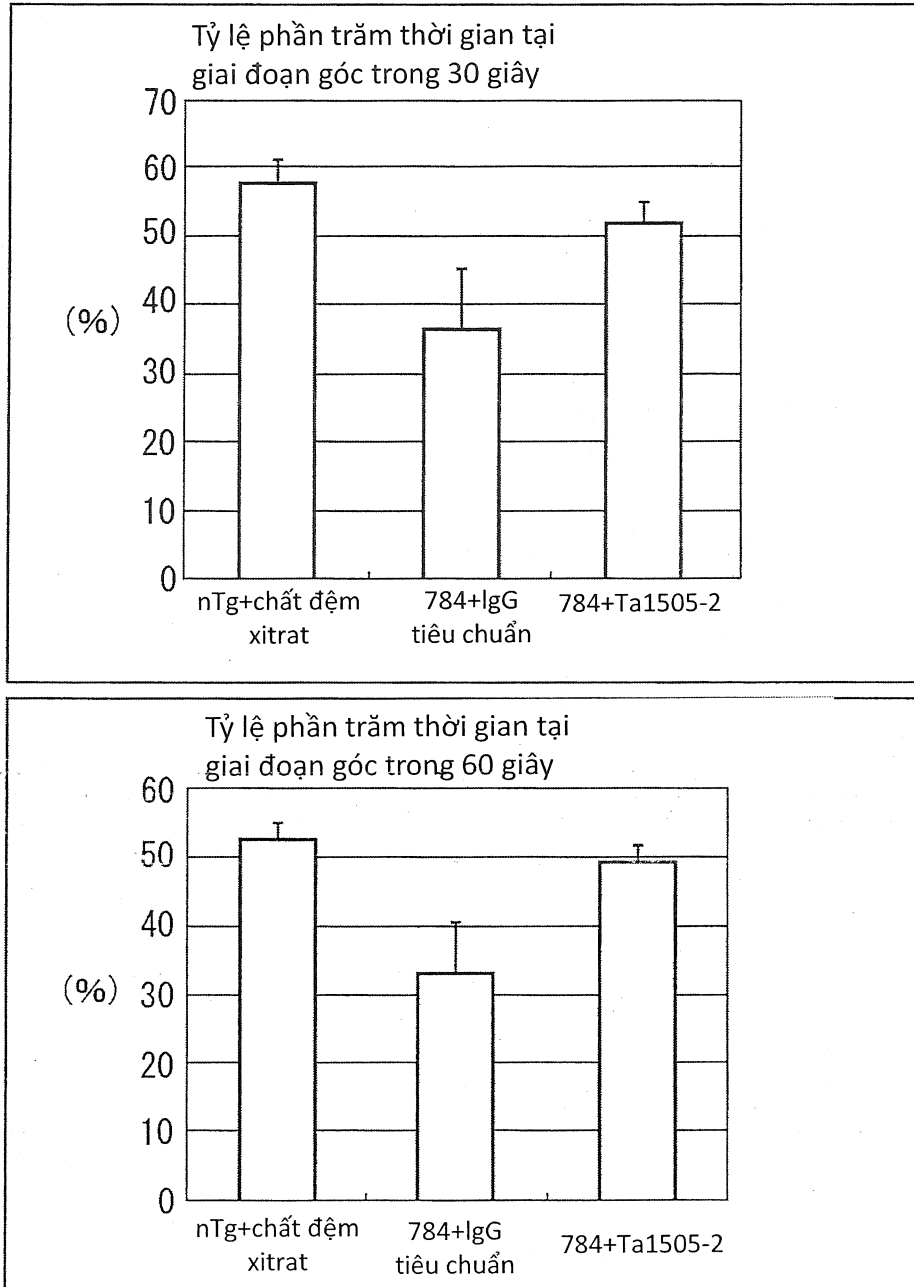
Khác biệt đáng kể

Không Tg với Tg (TgC tiêu chuẩn so sánh): $p=0,0110$ Không Tg với Tg (Ta1505-2): $p=0,8259$ (không có khác biệt đáng kể)Tg (Ta1505-2) với Tg(lgG tiêu chuẩn so sánh): $p=0,0152$

9/29

FIG. 9

(2-2) Thử nghiệm thăm dò



Khác biệt đáng kể

Phân tích thử nghiệm 30 giây:

Không Tg với Tg (IgG tiêu chuẩn): $p=0,0199$ Không Tg với Tg (Ta1505-2): $p=0,5106$ (không có khác biệt đáng kể)

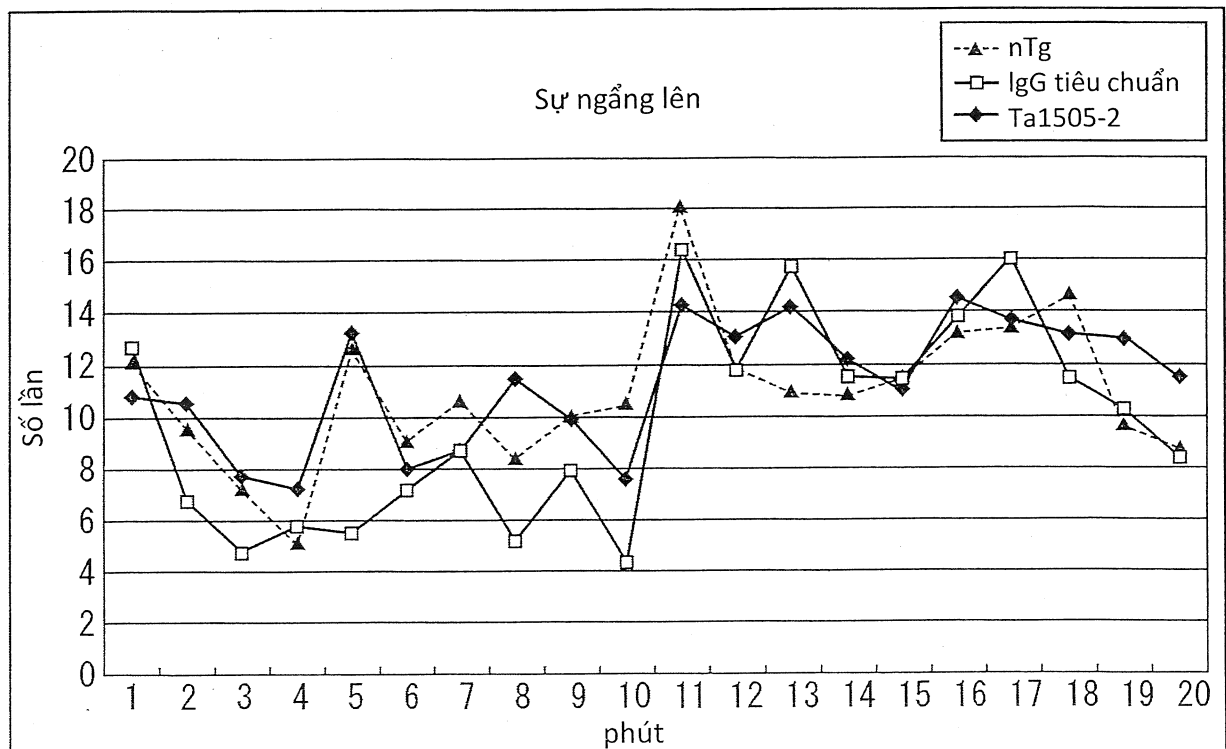
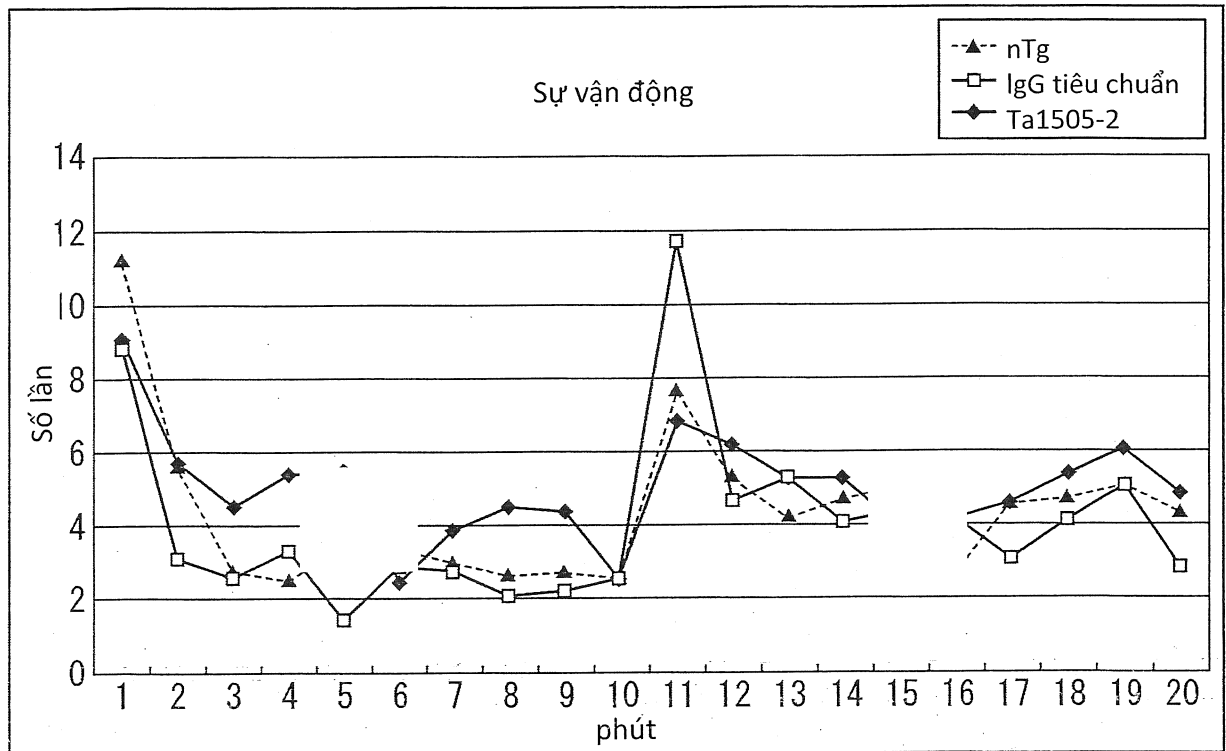
Phân tích thử nghiệm 60 giây:

Không Tg với Tg (IgG tiêu chuẩn): $p=0,0120$ Không Tg với Tg (Ta1505-2): $p=0,6639$ (không có khác biệt đáng kể)Tg (Ta1505-2) với Tg(IgG tiêu chuẩn): $p=0,273$

$$\frac{10}{29}$$

FIG. 10

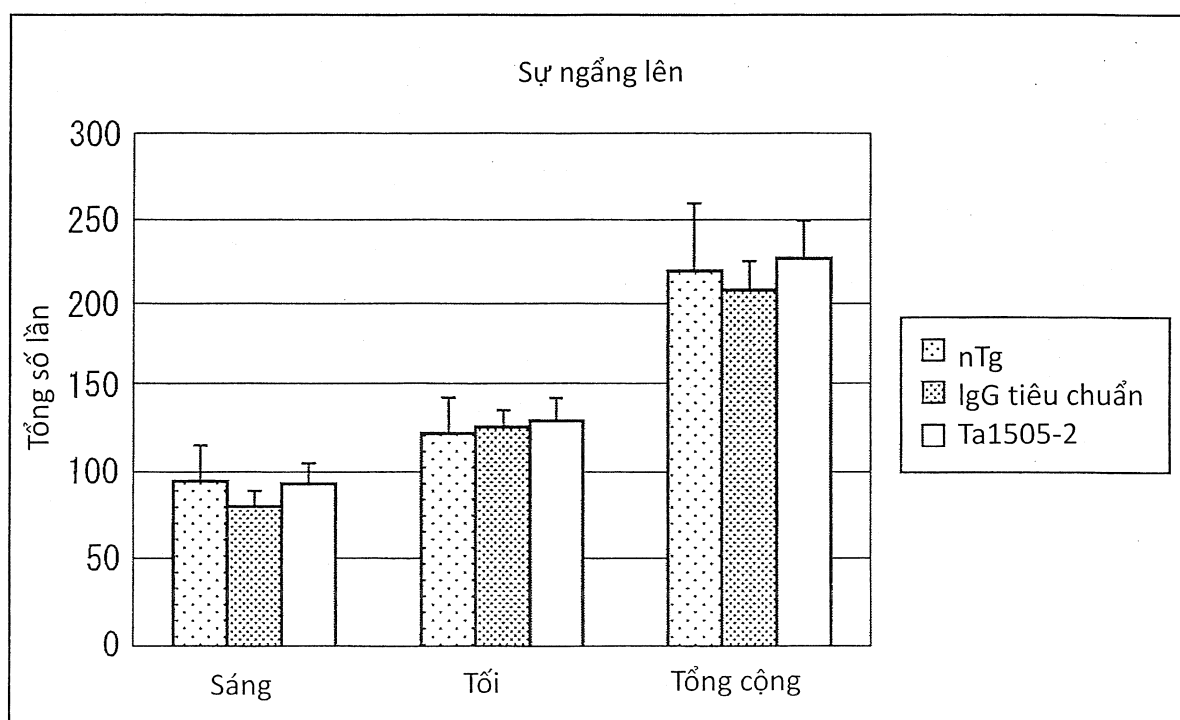
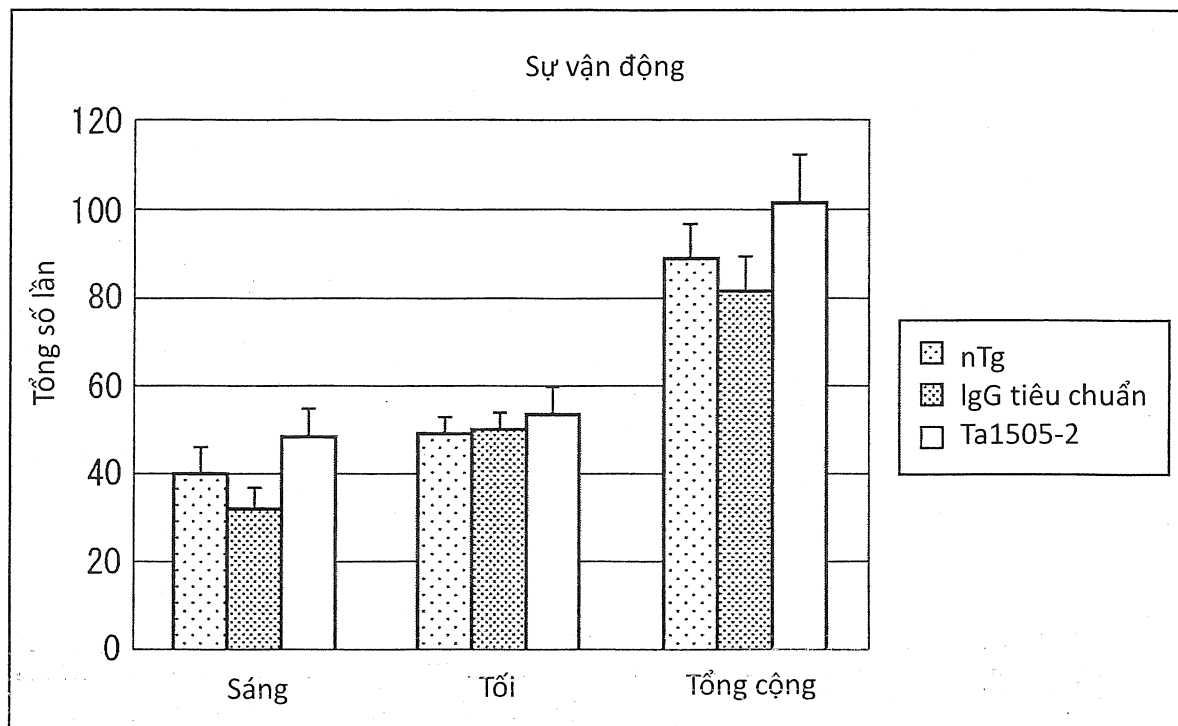
(2-3) Thử nghiệm môi trường mở



11/29

FIG. 11

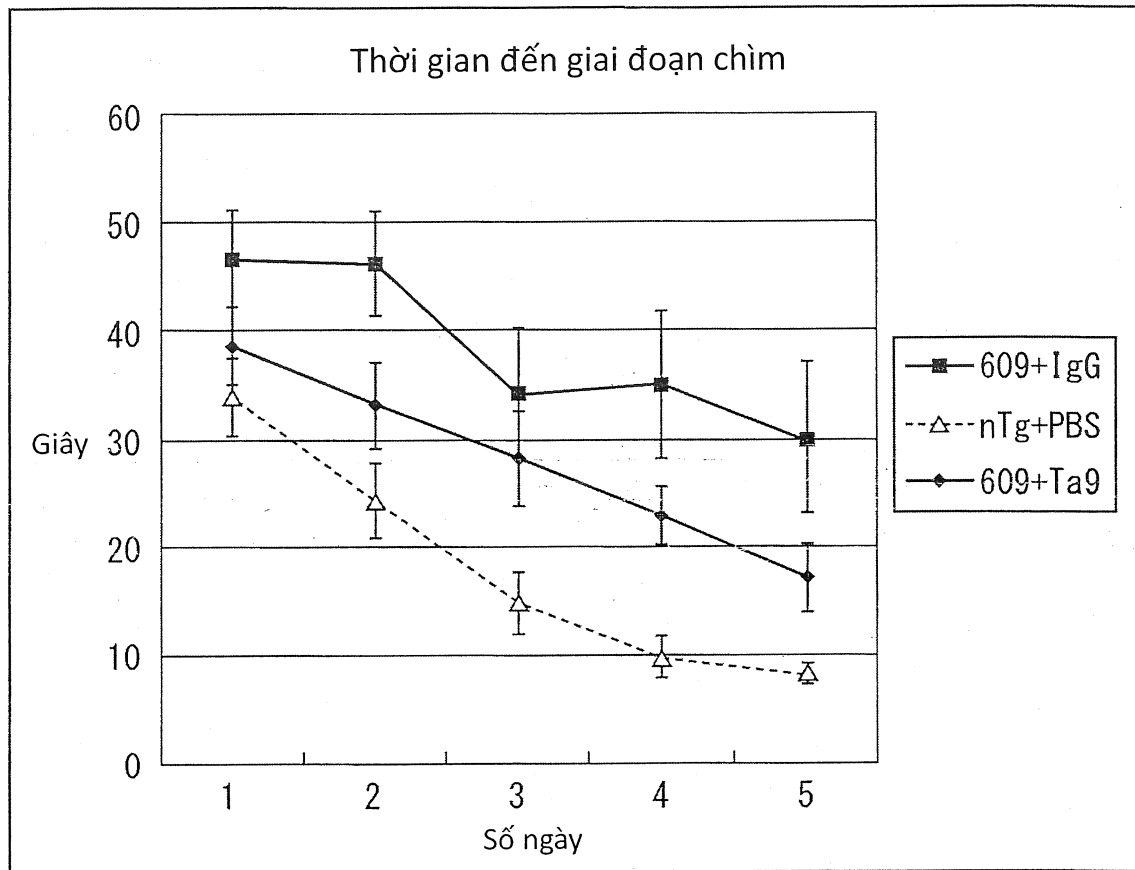
(2-3) Thử nghiệm môi trường mở



12/29

FIG. 12

(3-1) Thử nghiệm sơ bộ



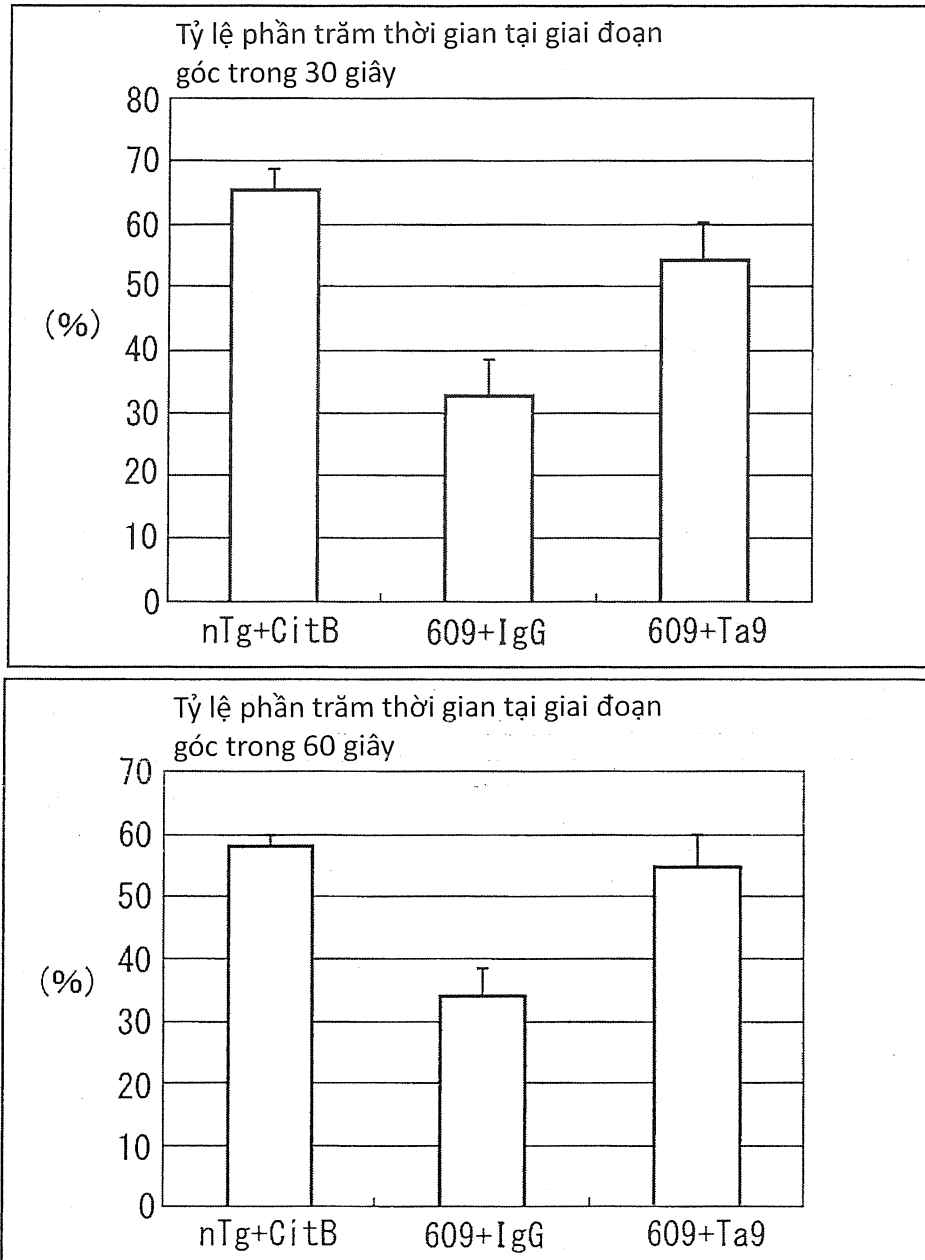
Khác biệt đáng kể

nTg với Tg+pSer396: $p=0,0460$ Tg+IgG tiêu chuẩn với Tg+pSer396: $p=0,0402$

13/29

FIG. 13

(3-2) Thử nghiệm thăm dò



Khác biệt đáng kể

Phân tích thử nghiệm 30 giây:

Ta9 với IgG, $p=0,0015$ Ta9 với không Tg, $p=0,8330$ (không có khác biệt đáng kể)IgG với không Tg, $p=0,0007$

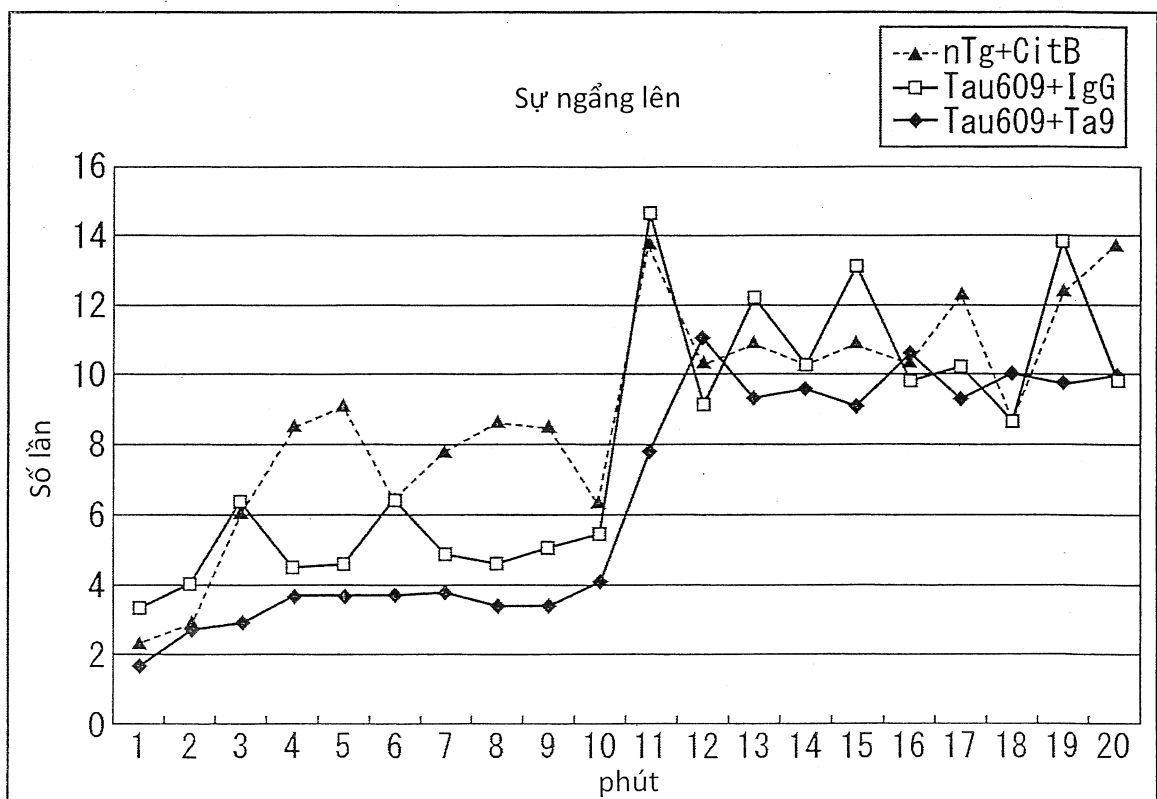
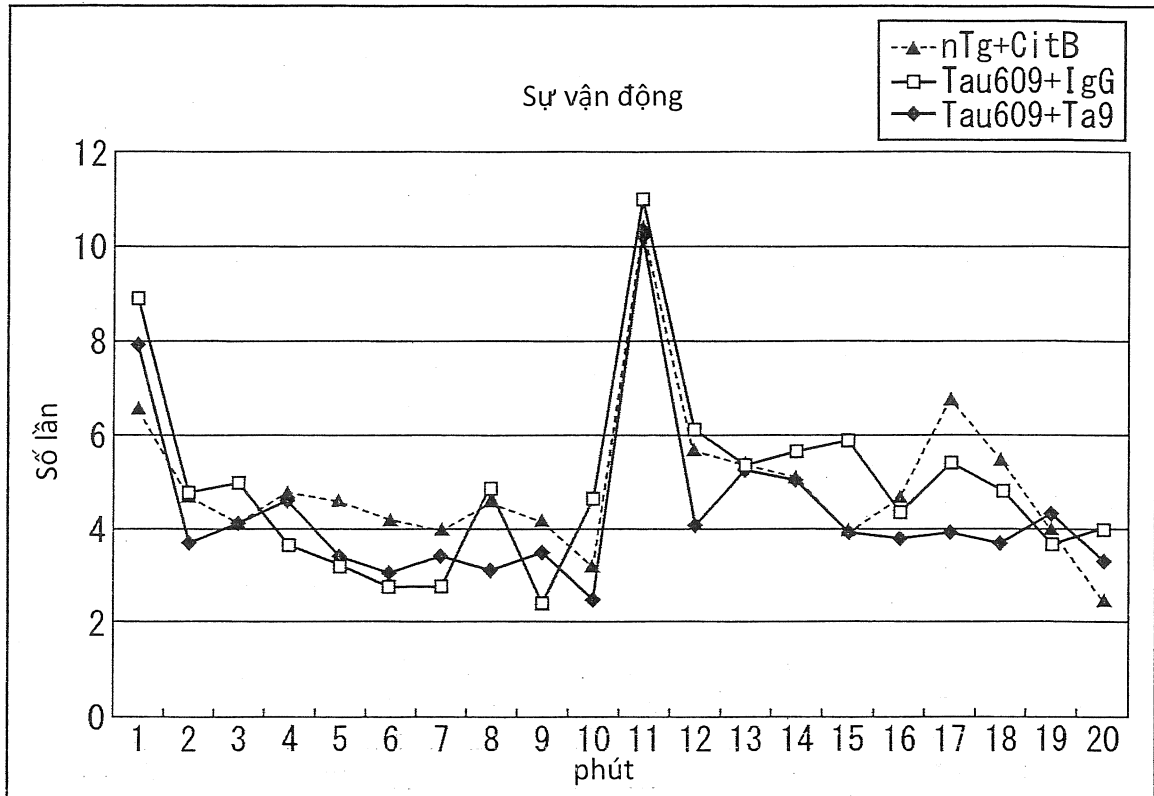
Phân tích thử nghiệm 60 giây:

Ta9 với IgG, $p=0,0061$ Ta9 với không Tg, $p=0,1637$ (không có khác biệt đáng kể)IgG với không Tg, $p=0,0001$

14/29

FIG. 14

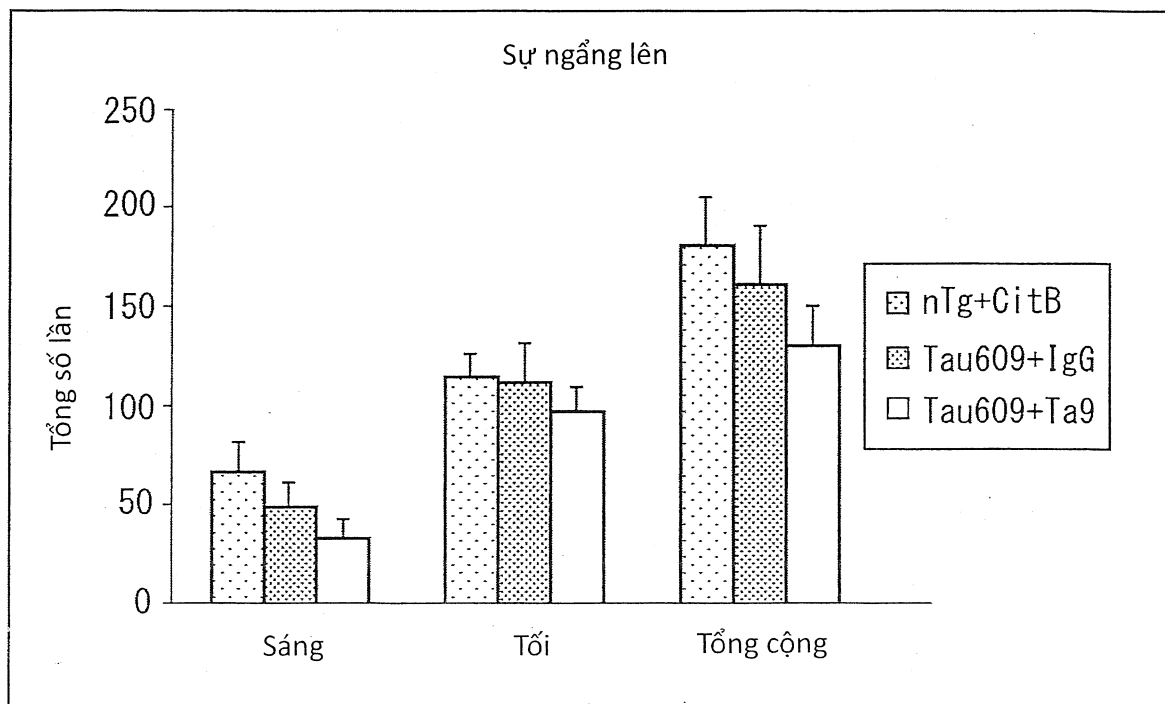
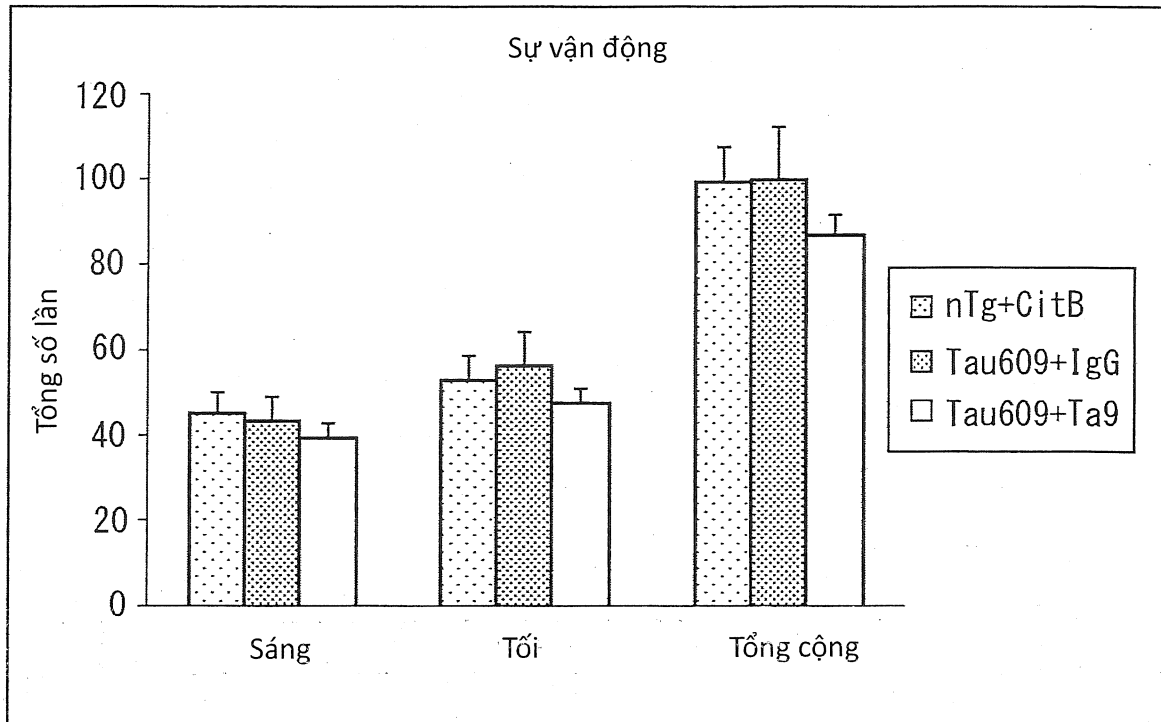
(3-3) Thử nghiệm môi trường mở



15/29

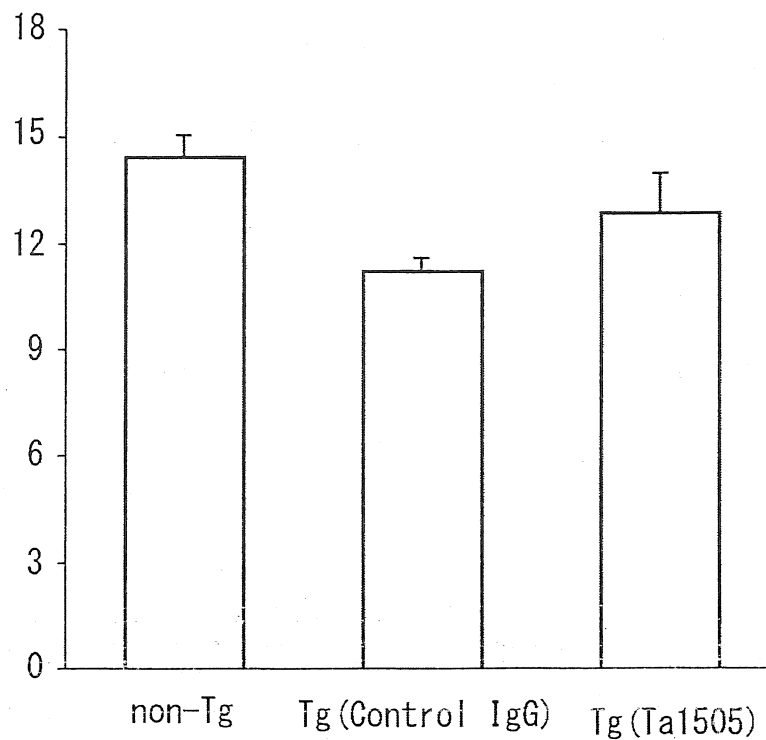
FIG. 15

(3-3) Thử nghiệm môi trường mở



16/29

FIG. 16



Trục dọc biểu thị thời kỳ nở rộ nhất của synaptophysin trong vùng hồi hải mã CA3 (đơn vị tùy ý)

Sự khác biệt đáng kể

không Tg với Tg (IgG tiêu chuẩn): $p=0,0138$

không Tg với Tg (Ta1505): $p=0,1806$ (không có khác biệt đáng kể)

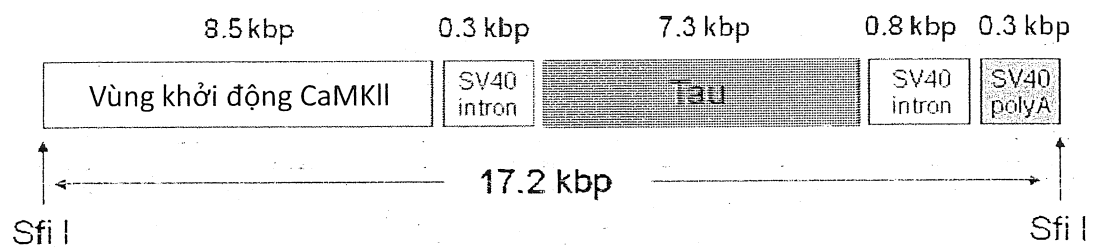
Tg (Ta1505) với Tg (IgG tiêu chuẩn): $p=0.1696$

(không có khác biệt đáng kể)

17/29

FIG. 17

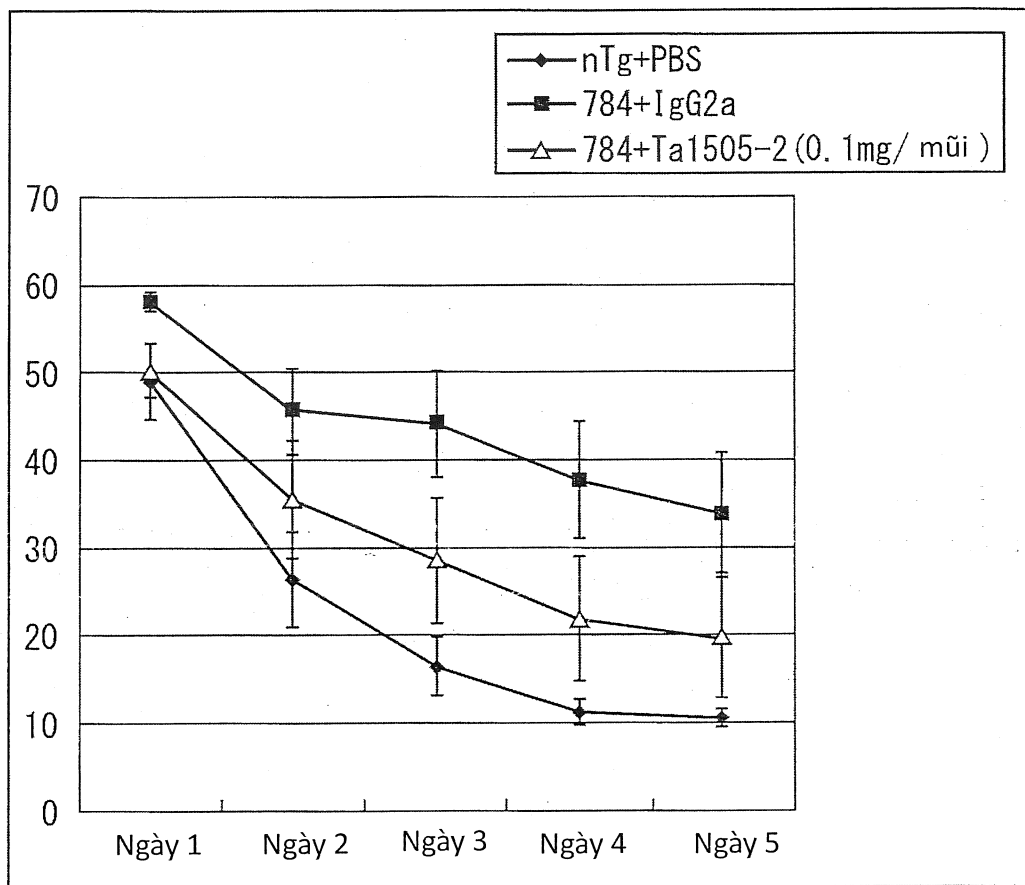
Cấu trúc nucleic mang Tau



18/29

FIG. 18

(4-1) Thử nghiệm sơ bộ



không Tg với Tg (IgG tiêu chuẩn)

p=0,0025

không Tg với Tg (Ta1505)

p=0,1926 (không
khác biệt đáng kể)

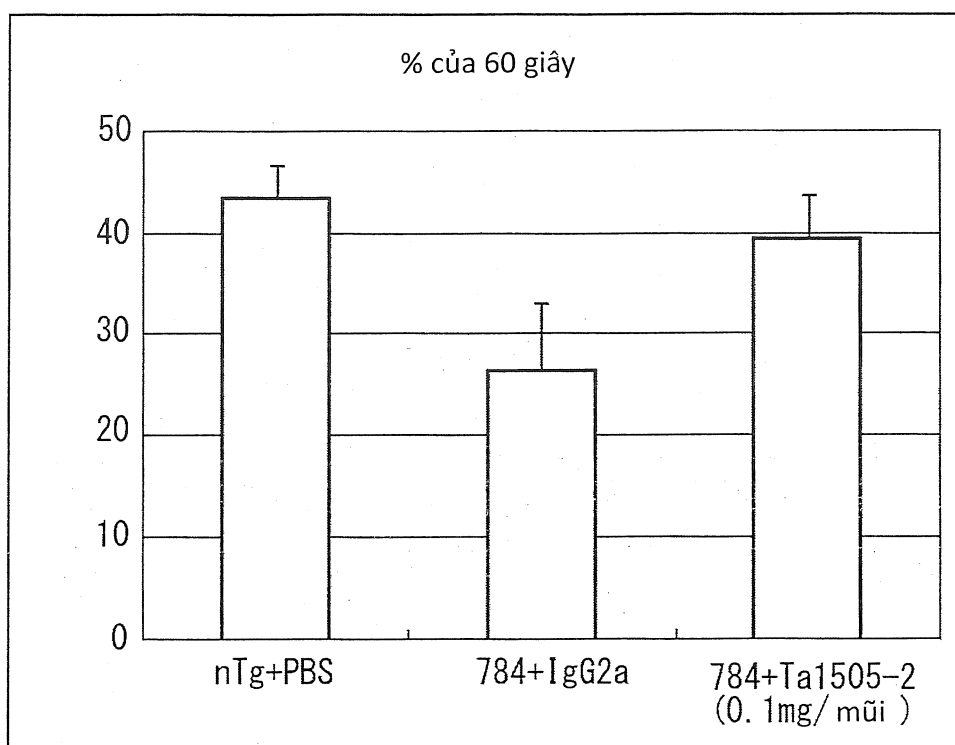
Tg (Ta1505) với Tg (IgG tiêu chuẩn)

p=0.0493

19/29

FIG. 19

(4-2) Thử nghiệm thăm dò



không Tg với Tg (IgG tiêu chuẩn)

p=0,0240

không Tg với Tg (Ta1505)

p=0,5783 (không có khác biệt đáng kể)

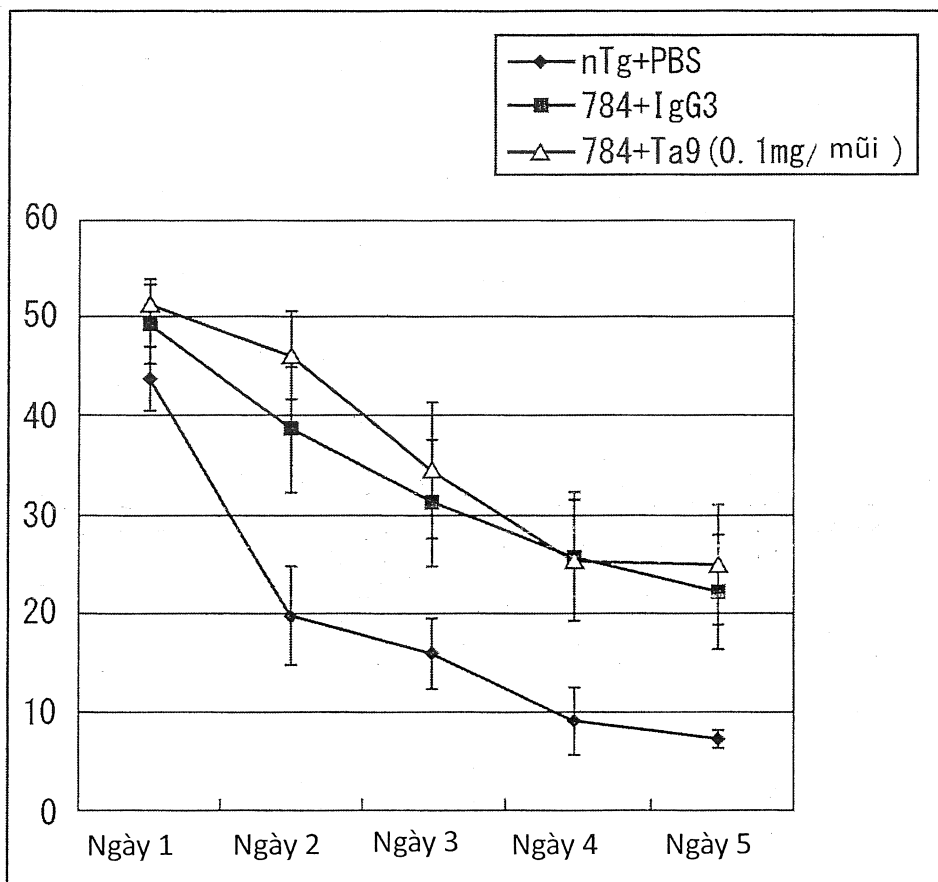
Tg (Ta1505) với Tg (IgG tiêu chuẩn)

p=0,0708 (không có khác biệt đáng kể)

20/29

FIG. 20

(5-1) Thử nghiệm sơ bộ



không Tg với Tg (IgG tiêu chuẩn)

p=0,0065

không Tg với Tg (Ta9)

p=0,0044

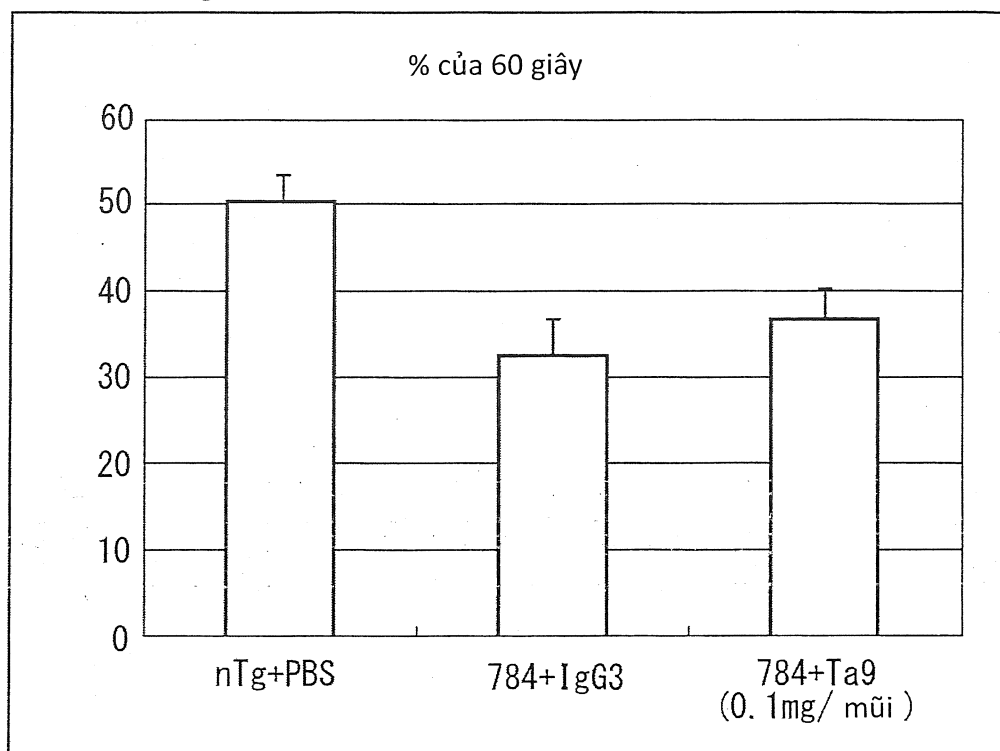
Tg (Ta9) với Tg (IgG tiêu chuẩn)

p=0.8635 (không khác biệt đáng kể)

21/29

FIG. 21

(5-2) Thử nghiệm thăm dò



không Tg với Tg (IgG tiêu chuẩn)

p=0,0033

không Tg với Tg (Ta9)

p=0,0100

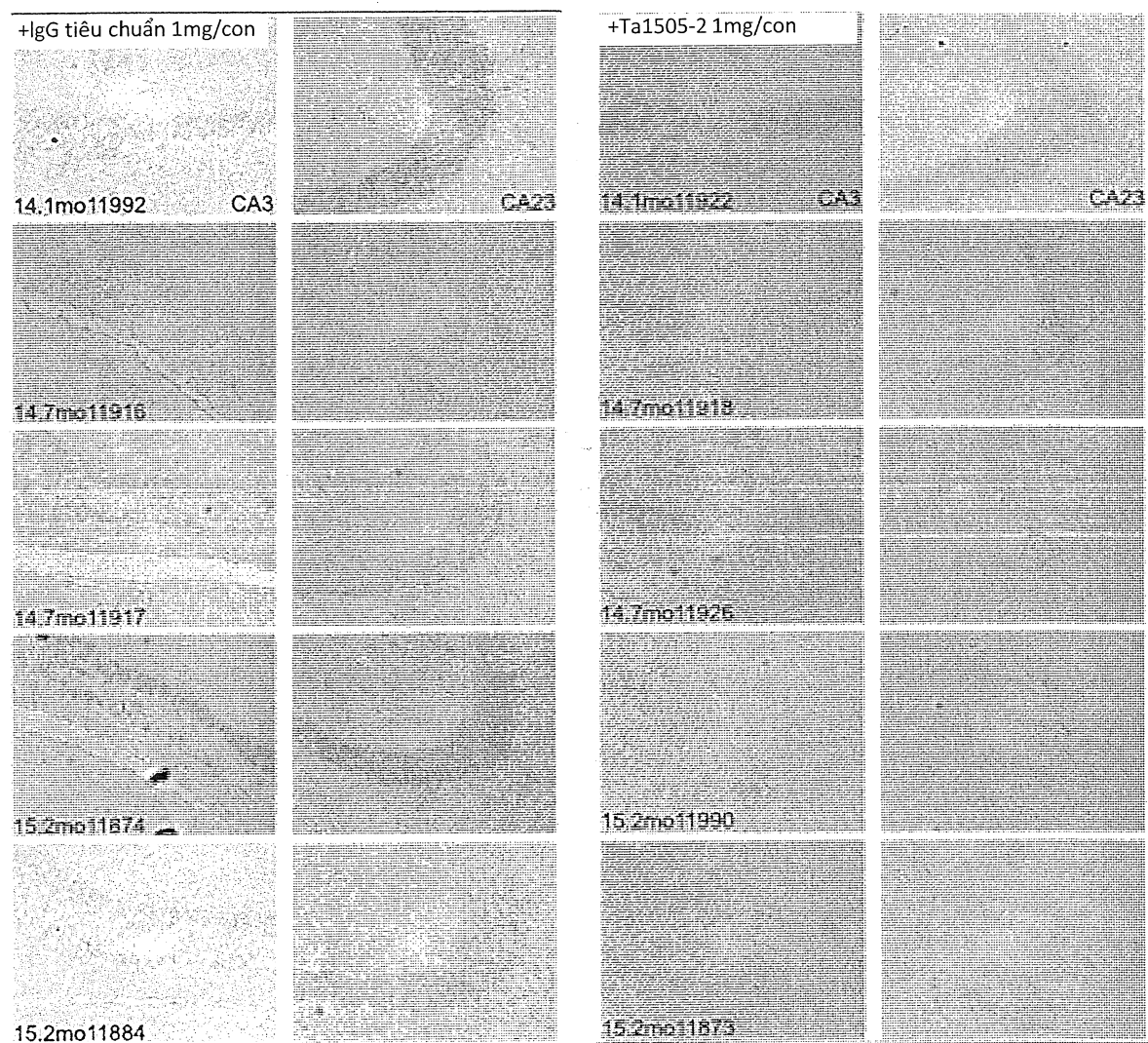
Tg (Ta9) với Tg (IgG tiêu chuẩn)

p=0,5226 (không có khác biệt đáng kể)

$\frac{22}{29}$

FIG. 22

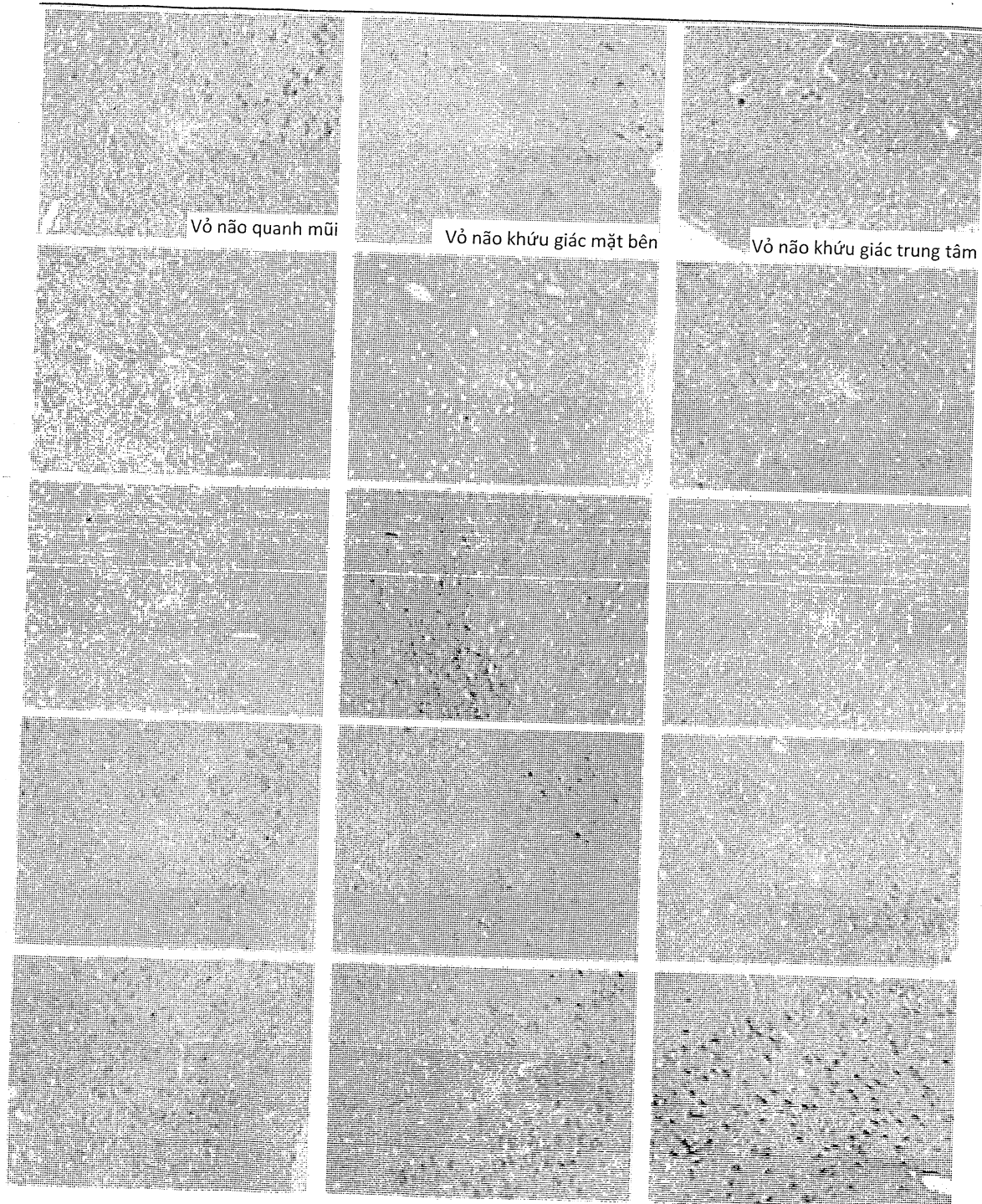
Sự nhuộm mô miễn dịch của vùng hồi hải mã (chất nhuộm màu Ta1505)



23/29

FIG. 23

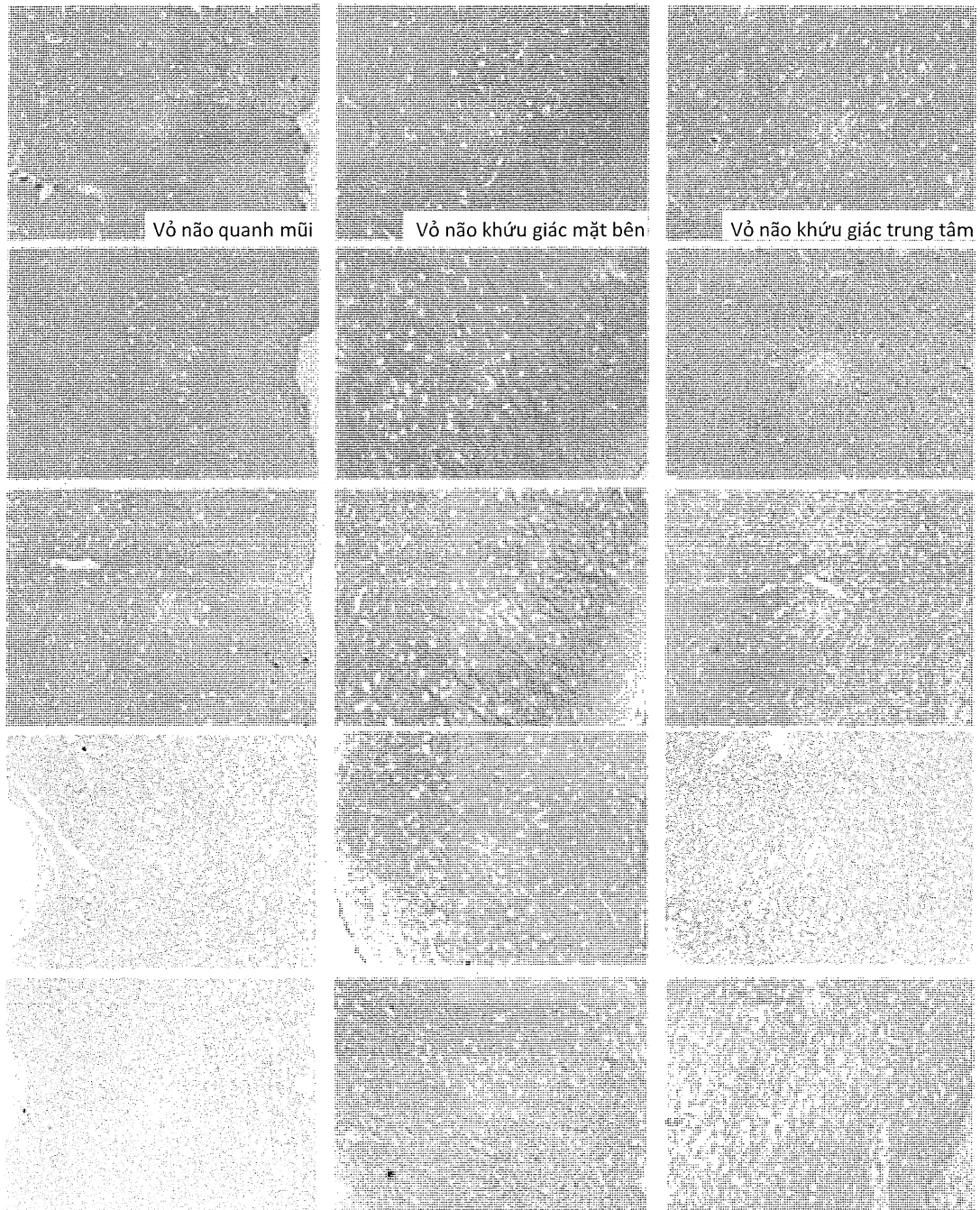
Sự nhuộm mô miễn dịch của vùng vỏ não (chất nhuộm Ta1505)
IgG tiêu chuẩn (1mg/con)



$\frac{24}{29}$

FIG. 24

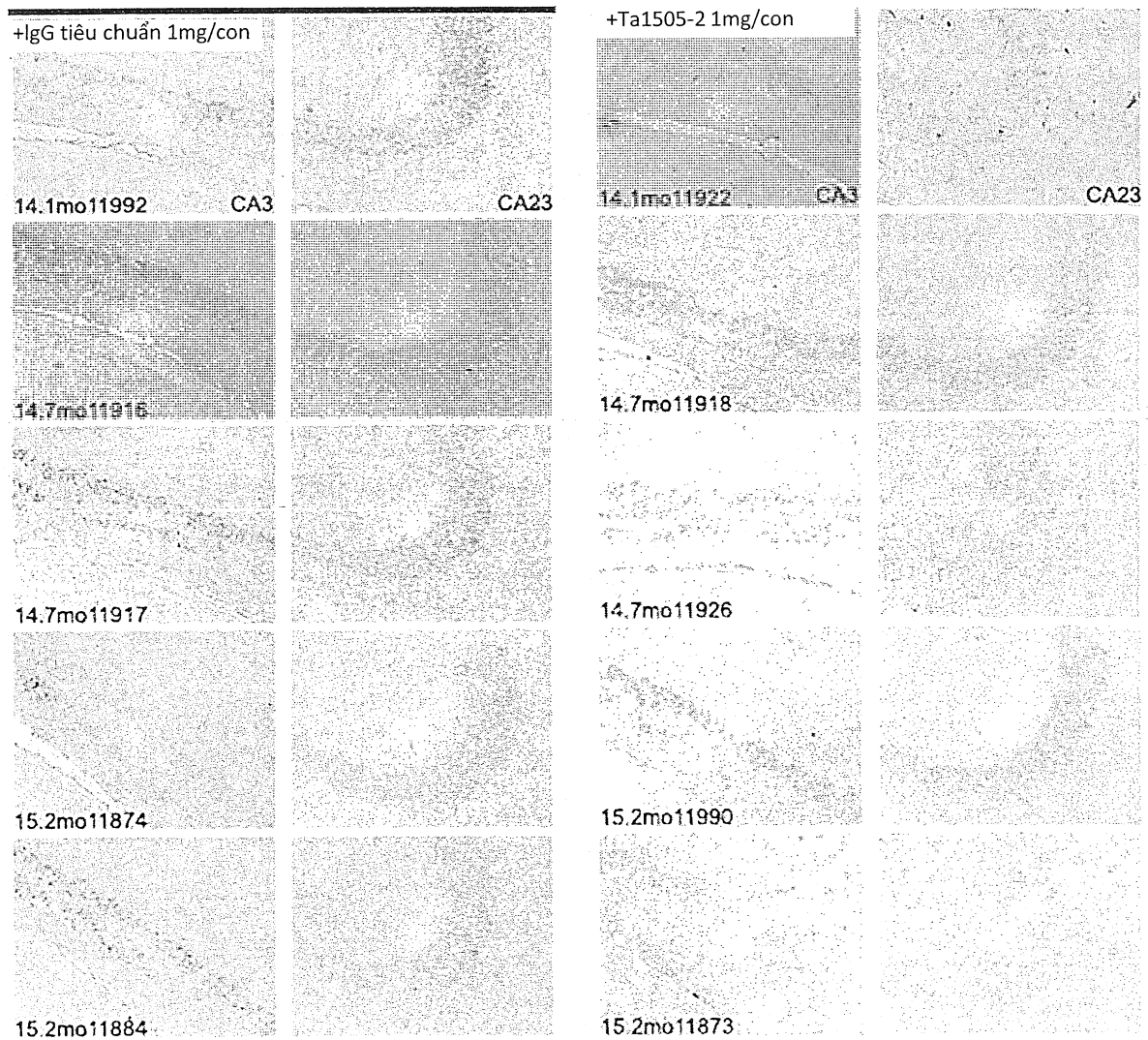
Việc cung ứng Ta1505 (1mg/con)



$\frac{25}{29}$

FIG. 25

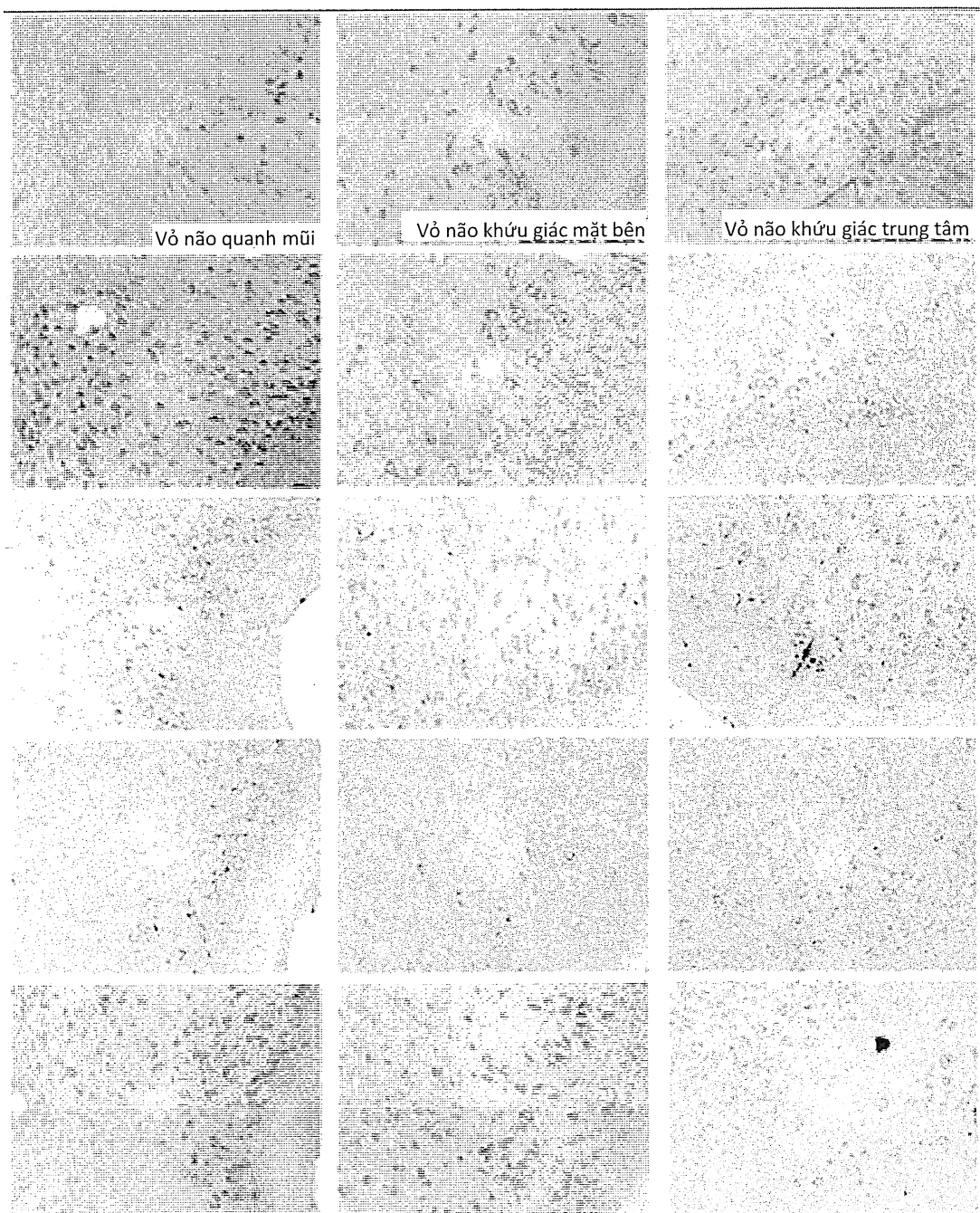
Sự nhuộm mô miễn dịch của vùng hồi hải mã (chất nhuộm AT8)



$\frac{26}{29}$

FIG. 26

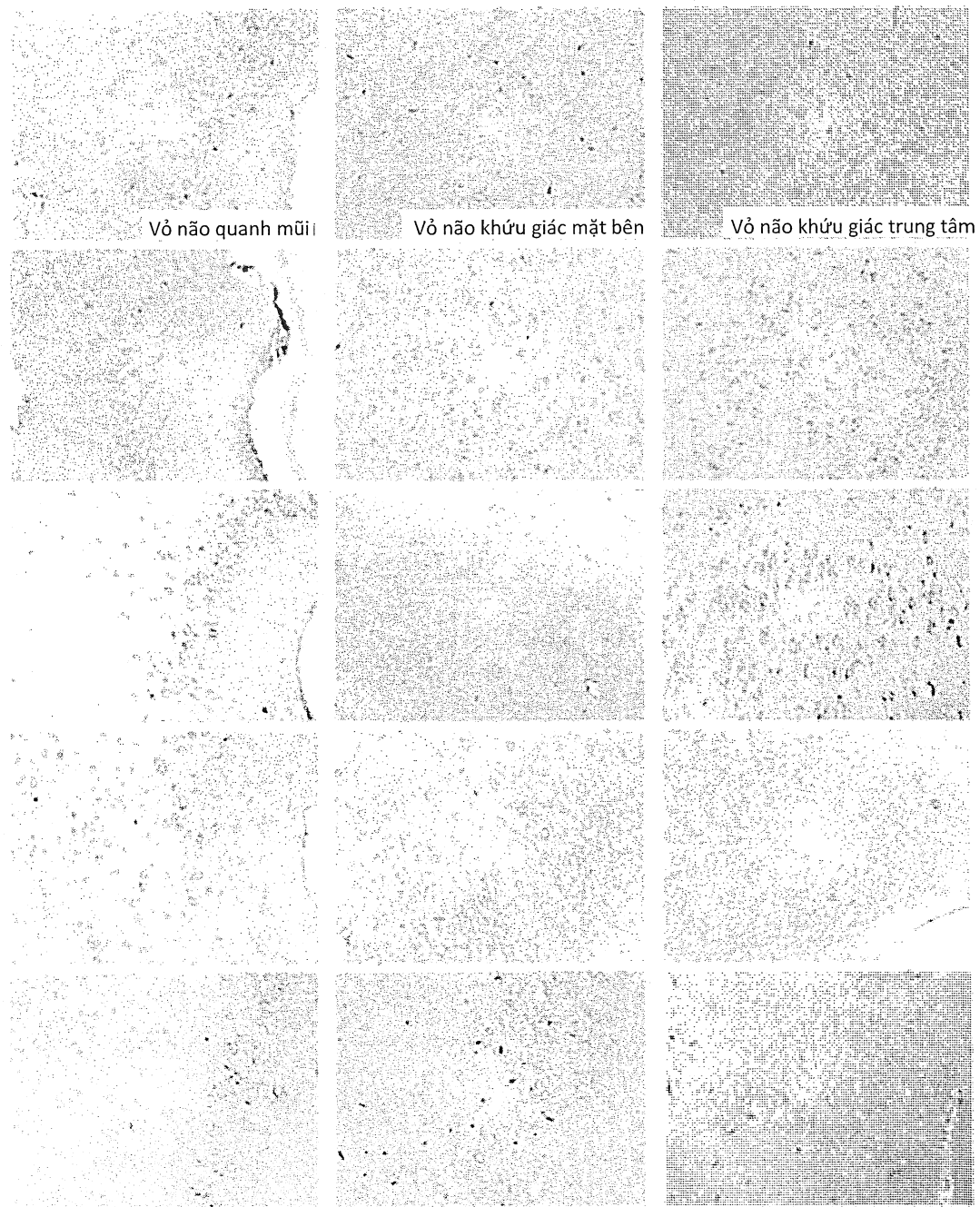
Sự nhuộm mô miễn dịch của vùng vỏ não (chất nhuộm AT8)
IgG tiêu chuẩn (1mg/con)



$\frac{27}{29}$

FIG. 27

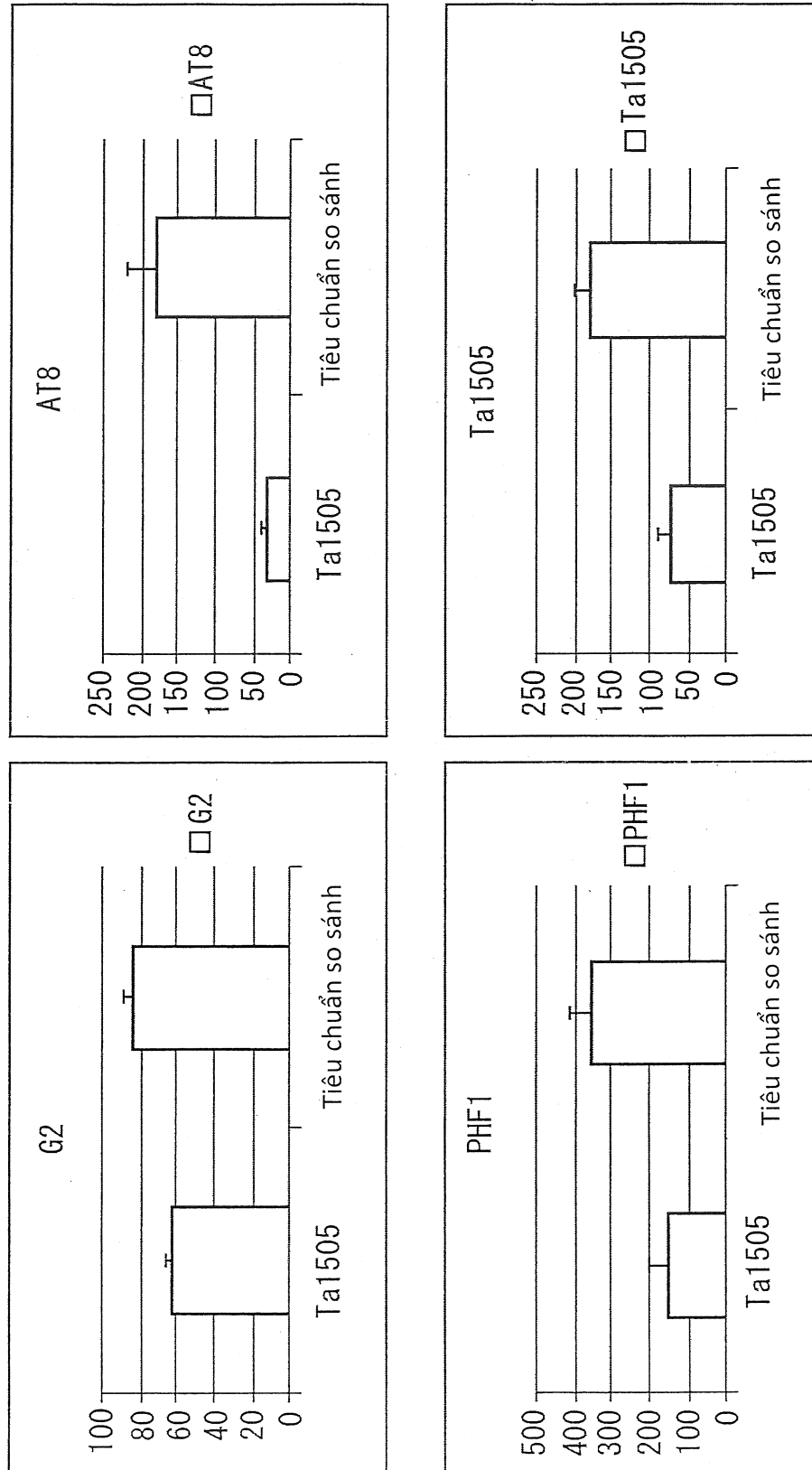
Việc cung ứng Ta1505 (1mg/con)



28/29

FIG. 28

Đoạn có thể hòa tan - TBS



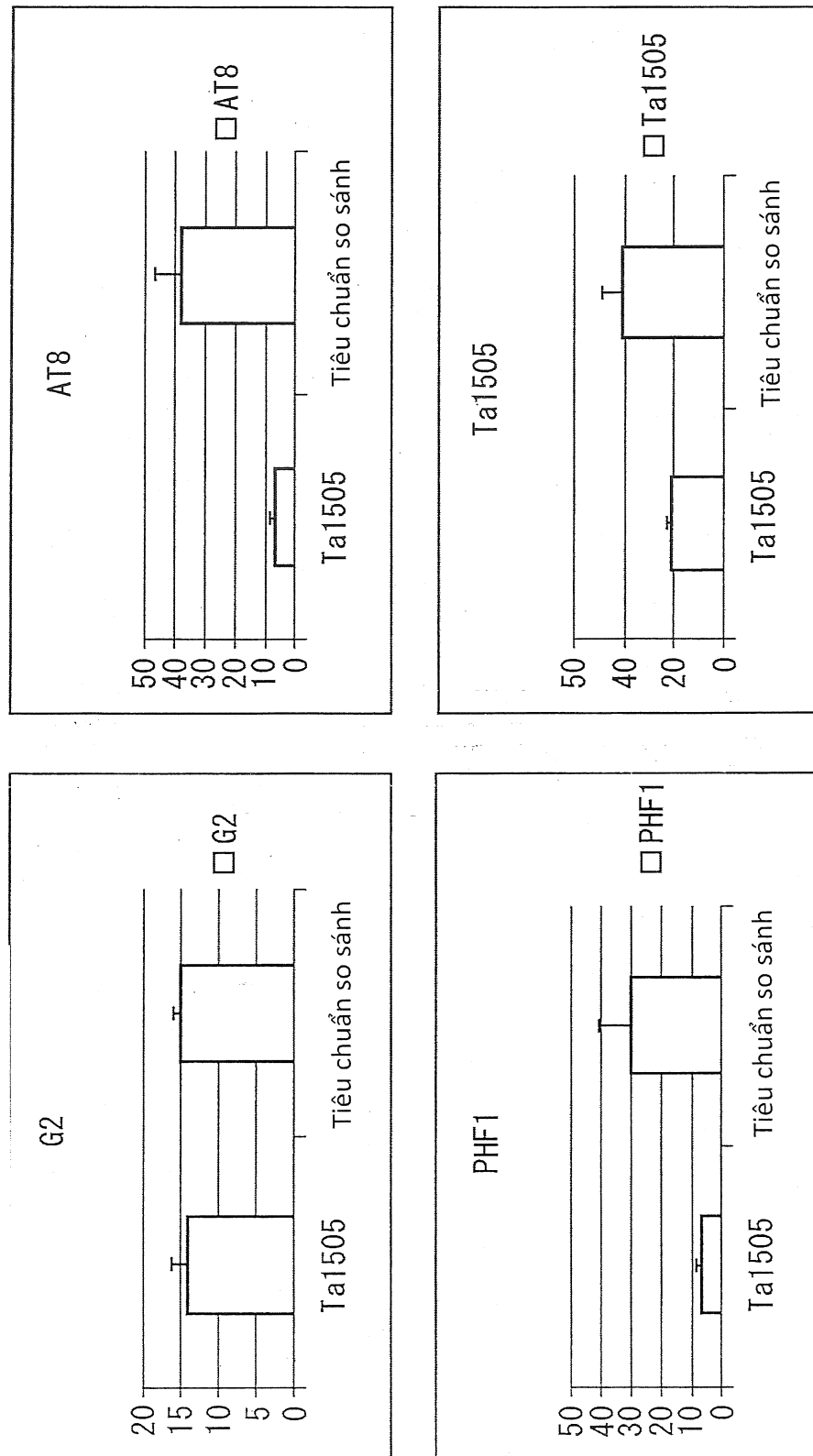
Thử nghiệm T

G2: Ta1505 với tiêu chuẩn so sánh $p=0,013276$ AT8: Ta1505 với tiêu chuẩn so sánh $p=0,016886$ PHF1: Ta1505 với tiêu chuẩn so sánh $p=0,021157$ Ta1505: Ta1505 với tiêu chuẩn so sánh $p=0,006104$

29/29

FIG. 29

Đoạn có thể hòa tan sarkosyl



Thử nghiệm T

G2: Ta1505 với tiêu chuẩn so sánh $p = 0,804878$ (không khác biệt đáng kể)AT8: Ta1505 với tiêu chuẩn so sánh $p = 0,012585$ PHF1: Ta1505 với tiêu chuẩn so sánh $p = 0,06155$ (giảm)Ta1505: Ta1505 với tiêu chuẩn so sánh $p = 0,063603$ (giảm)

Trình tự liệt kê

<110> Osaka City University và Teijin Pharma Limited

<120> Kháng thể, peptit và tác nhân ngăn ngừa hoặc điều trị rối loạn nhận thức chứa kháng thể hoặc peptit này

<130> AB606

<150> JP2012-124336

<151> 2012-05-31

<160> 48

<170> Sáng chế bản 3.1

<210> 1

<211> 441

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 1

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> 2
<211> 412
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 2

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 Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly
65 70 75 80

Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala
85 90 95

Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys
100 105 110

Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala
115 120 125

Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala
130 135 140

Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro
145 150 155 160

Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr
165 170 175

Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg
180 185 190

Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser
195 200 205

Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu
210 215 220

Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln
225 230 235 240

Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser
245 250 255

Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro
260 265 270

Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys
275 280 285

Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly
290 295 300

Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg
305 310 315 320

Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly
325 330 335

Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn
340 345 350

Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro
355 360 365

Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser
370 375 380

Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala
385 390 395 400

Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
405 410

<210> 3
<211> 383
<212> PRT
<213> Người hiện đại
<400> 3

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 Ala Glu Glu Ala
35 40 45

Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val
50 55 60

Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp
65 70 75 80

Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro
85 90 95

Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg
100 105 110

Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly
115 120 125

Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser
130 135 140

Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro
145 150 155 160

Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys
165 170 175

Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met
180 185 190

Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu
195 200 205

Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu
210 215 220

Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys
225 230 235 240

His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp
245 250 255

Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His
260 265 270

Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe
275 280 285

Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His
290 295 300

Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe
305 310 315 320

Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr
325 330 335

Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn
340 345 350

Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala
355 360 365

Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
370 375 380

<210> 4
 <211> 410
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 4

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 Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr
275 280 285

Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly
290 295 300

Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln
305 310 315 320

Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly
325 330 335

Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys
340 345 350

Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val
355 360 365

Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly
370 375 380

Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu
385 390 395 400

Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
405 410

<210> 5
<211> 381
<212> PRT

<213> Người hiện đại
<400> 5

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 Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly
65 70 75 80

Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala
85 90 95

Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys
100 105 110

Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala
115 120 125

Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala
130 135 140

Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro
145 150 155 160

Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr
165 170 175

Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg
180 185 190

Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser
195 200 205

Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu
210 215 220

Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln
225 230 235 240

Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser
245 250 255

Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro
260 265 270

Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp
275 280 285

Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro
290 295 300

Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu
305 310 315 320

Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser
325 330 335

Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser
340 345 350

Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu
355 360 365

Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
370 375 380

<210> 6
<211> 352
<212> PRT
<213> Người hiện đại
<400> 6

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 Ala Glu Glu Ala
35 40 45

Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val
50 55 60

Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp
65 70 75 80

Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro
85 90 95

Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg
100 105 110

Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly
115 120 125

Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser
130 135 140

Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro
145 150 155 160

Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys
165 170 175

Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met
180 185 190

Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu
195 200 205

Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val
210 215 220

Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His
225 230 235 240

His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp
245 250 255

Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr
260 265 270

His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr
 275 280 285

Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val
 290 295 300

Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser
 305 310 315 320

Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu
 325 330 335

Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 340 345 350

<210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Chuột nhà

<400> 7

Ser Phe Ala Met Asn
 1 5

<210> 8
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Chuột nhà

<400> 8

Ser Phe Ala Leu Asn
 1 5

<210> 9
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Chuột nhà

<400> 9

His Ile Arg Ser Lys Thr Asn Asn Tyr Ala Thr Phe Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Asp

<210> 10

<211> 19
 <212> PRT
 <213> Chuột nhà
 <400> 10

His Ile Arg Ser Lys Thr Asn Asn Tyr Val Thr Phe Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 11
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Chuột nhà

<400> 11

His Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Val Thr Phe Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Asp

<210> 12
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Chuột nhà

<400> 12

His Ile Arg Ser Lys Ala Asn His Tyr Val Thr Phe Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Asp

<210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Chuột nhà

<400> 13

Arg Gly Pro Arg Asp Ser Trp Phe Gly Tyr
 1 5 10

<210> 14
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Chuột nhà

<400> 14

Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> Chuột nhà

<400> 15

Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Thr Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Chuột nhà

<400> 16

Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Chuột nhà

<400> 17

Phe Gln Gly Ser His Leu Pro Leu Thr
 1 5

<210> 18

<211> 121

<212> PRT

<213> Chuột nhà

<400> 18

Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln Pro Lys Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Asn Ser Phe
 20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Asn Trp Val
 35 40 45

Ala His Ile Arg Ser Lys Thr Asn Asn Tyr Ala Thr Phe Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Asn Met
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg Arg Gly Pro Arg Asp Ser Trp Phe Gly Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 19

<211> 121

<212> PRT

<213> Chuột nhà

<400> 19

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Asn Ser Phe
20 25 30

Ala Leu Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ser Leu Glu Trp Val
35 40 45

Val His Ile Arg Ser Lys Thr Asn Asn Tyr Ala Thr Phe Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asp Ser Gln Asn Met
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg Arg Gly Pro Arg Asp Ser Trp Phe Gly Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 20

<211> 121
 <212> PRT
 <213> Chuột nhà

<400> 20

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Asn Ser Phe
 20 25 30

Ala Leu Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ser Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Val His Ile Arg Ser Lys Thr Asn Asn Tyr Ala Thr Phe Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met
 65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Val Arg Arg Gly Pro Arg Asp Ser Trp Phe Gly Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 21
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Chuột nhà

<400> 21

Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Asn Ser Phe
 20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

Ala His Ile Arg Ser Lys Thr Asn Asn Tyr Val Thr Phe Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Gln Thr Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg Arg Gly Pro Arg Asp Ser Trp Phe Gly Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 22
<211> 121
<212> PRT
<213> Chuột nhà

<400> 22

Glu Ile Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Ala Leu Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ser Leu Asp Trp Val
35 40 45

Ala His Ile Arg Ser Lys Ala Asn His Tyr Val Thr Phe Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg Arg Gly Pro Arg Asp Ser Trp Phe Gly Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 23
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Chuột nhà
 <400> 23

Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Asn Ser Phe
 20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

Ala His Ile Arg Ser Lys Thr Asn Asn Tyr Val Thr Phe Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met
 65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Gln Thr Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Val Arg Arg Gly Pro Arg Asp Ser Trp Phe Gly Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 24
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Chuột nhà
 <400> 24

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Asn Ser Phe
 20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

Ala His Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Val Thr Phe Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Ser Gly Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg Arg Gly Pro Arg Asp Ser Trp Phe Gly Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 25
<211> 109
<212> PRT
<213> Chuột nhà

<400> 25

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

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

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

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Thr 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 Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100 105

<210> 26
<211> 109
<212> PRT

<213> Chuột nhà

<400> 26

Asp Ile Leu 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 Asn Ile Val His Ser
 20 25 30

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

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Thr 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 Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100 105

<210> 27

<211> 109

<212> PRT

<213> Chuột nhà

<400> 27

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

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

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

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Thr 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 Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100 105

<210> 28
<211> 109
<212> PRT
<213> Chuột nhà

<400> 28

Asp Val Leu Leu 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 Asn Ile Val His Ser
20 25 30

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

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Thr 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 Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100 105

<210> 29
<211> 109
<212> PRT
<213> Chuột nhà
<400> 29

Val Val Leu 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 Asn Ile Val His Ser
20 25 30

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

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Thr 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 Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100 105

<210> 30
<211> 109
<212> PRT
<213> Chuột nhà
<400> 30

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

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

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

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Thr 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 Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100 105

<210> 31
<211> 8
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>

<223> Peptit tổng hợp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Sự photphoryl hóa

<400> 31

Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Cys

1

5

<210> 32

<211> 14

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Peptit tổng hợp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Sự photphoryl hóa

<400> 32

Gly Cys His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp

1

5

10

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Peptit tổng hợp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Sự photphoryl hóa

<400> 33

Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val

1

5

10

15

Asp

<210> 34
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Peptit tổng hợp

<400> 34

Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val
 1 5 10 15

Asp

<210> 35
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Peptit tổng hợp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (15)..(15)
 <223> Sự photphoryl hóa

<400> 35

Gly Cys Ser Gly Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr
 1 5 10 15

Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro
 20 25

<210> 36
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Peptit tổng hợp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Sự photphoryl hóa

<400> 36

Gly Leu Lys Glu Ser Pro
1 5

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Peptit tổng hợp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Sự photphoryl hóa

<400> 37

Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly
1 5 10

<210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Peptit tổng hợp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Sự photphoryl hóa

<400> 38

Ser Ser Pro Gly Ser Ser Pro Gly Thr Pro Cys
1 5 10

<210> 39
<211> 11
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Peptit tổng hợp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Sự photphoryl hóa

<400> 39

Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro
1 5 10

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Peptit tổng hợp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Sự photphoryl hóa

<400> 40

Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro
1 5 10

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Peptit tổng hợp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Sự photphoryl hóa

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Sự photphoryl hóa

<400> 41

Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro
1 5 10

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Peptit tổng hợp
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Sự photphoryl hóa

<400> 42

Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg
1 5

<210> 43
<211> 11
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Peptit tổng hợp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Sự photphoryl hóa

<400> 43

Gly Cys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser
1 5 10

<210> 44
<211> 8
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Peptit tổng hợp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Sự photphoryl hóa

<400> 44

Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Cys
1 5

<210> 45
<211> 19
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>

<223> Peptit tổng hợp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Sự photphoryl hóa

<400> 45

Pro	Arg	His	Leu	Ser	Asn	Val	Ser	Ser	Thr	Gly	Ser	Ile	Asp	Met	Val
1				5					10					15	

Asp Ser Pro

<210> 46

<211> 19

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Peptit tổng hợp

<400> 46

Pro	Arg	His	Leu	Ser	Asn	Val	Ser	Ser	Thr	Gly	Ser	Ile	Asp	Met	Val
1				5					10					15	

Asp Ser Pro

<210> 47

<211> 32

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Peptit tổng hợp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Sự photphoryl hóa

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28)..(28)

<223> Sự photphoryl hóa

<400> 47

Gly Cys Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile
1 5 10 15

Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu
20 25 30

<210> 48

<211> 32

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Peptit tổng hợp

<400> 48

Gly Cys Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile
1 5 10 15

Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu
20 25 30