



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

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



1-0051450

(51)^{2020.01} C07K 16/18; G01N 33/68; A61K 39/00; (13) B
A61P 25/28

(21) 1-2022-00273

(22) 13/07/2020

(86) PCT/KR2020/009207 13/07/2020

(87) WO 2021/010712 21/01/2021

(30) 10-2019- 0085233 15/07/2019 KR

(45) 25/09/2025 450

(43) 26/09/2022 414A

(73) ADEL, INC. (KR)

Department of Brain Science, Asan Medical Center College of Medicine, University
of Ulsan, 88, Olympic-ro 43-gil Songpa-gu, Seoul 05505, Republic of Korea

(72) YOON, Seung-Yong (KR).

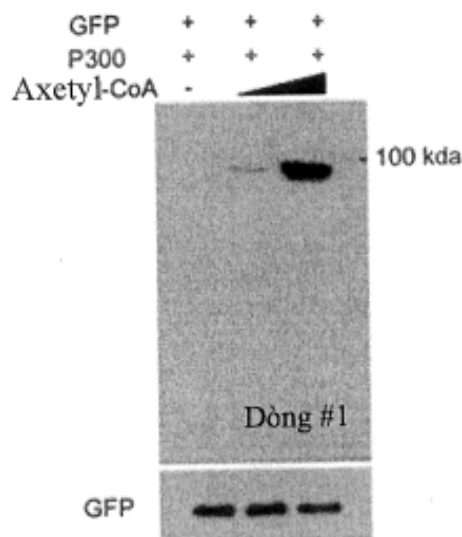
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG TAU, POLYNUCLEOTIT MÃ HÓA KHÁNG THỂ NÀY,
VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2022-00273

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng tau liên kết đặc hiệu với protein tau. Kháng thể kháng tau theo sáng chế có thể liên kết đặc hiệu với protein tau, trong đó lysin thứ 280 được axetyl hóa, và nó có thể ức chế sự kết tụ của các protein tau bất thường. Ngoài ra, trong trường hợp kháng thể kháng tau theo sáng chế được sử dụng cho mô hình động vật được gây sa sút trí tuệ, kháng thể kháng tau có thể cải thiện chức năng vận động và chức năng nhận thức của mô hình động vật này. Do đó, kháng thể kháng tau theo sáng chế có thể được sử dụng hiệu quả để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thoái hóa thần kinh.

FIG. 3



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng tau liên kết đặc hiệu với protein tau và mô tả cách sử dụng kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh Alzheimer, chiếm khoảng 50% các dạng sa sút trí tuệ khởi phát, là một bệnh thoái hóa dây thần kinh sọ với tỷ lệ khởi phát gia tăng kể từ tuổi 65 và nó đang gia tăng nhanh chóng trên toàn thế giới khi dân số già đi.

Người ta tin rằng nguyên nhân khởi phát bệnh Alzheimer chủ yếu là do tích tụ dạng tinh bột β , tăng phosphoryl hóa protein tau, hoặc tăng sản xuất dạng tinh bột β do presenilin 1. Trong số này, độc tính tế bào thần kinh gây ra do tích tụ dạng tinh bột β được cho là nguyên nhân chính gây ra bệnh sa sút trí tuệ Alzheimer (Hardy AJ *et al.*, *Science*, 256, 184-185, 1992). Tuy nhiên, khi thử nghiệm giai đoạn III đối với solanezumab, một ứng cử viên thuốc mới của Eli Lilly and Company cho bệnh Alzheimer đã thất bại, người ta nhận thấy rằng độc tính tế bào thần kinh do tích tụ dạng tinh bột β là không đáng kể. Do đó, sự tập trung được đặt vào ý tưởng rằng sự tăng phosphoryl hóa bất thường của protein tau đóng vai trò là nguyên nhân chính gây ra bệnh Alzheimer.

Protein tau là protein làm ổn định vi ống mà là protein vận chuyển vật chất tế bào. Protein tau tồn tại với sáu đồng dạng trong cơ thể con người và có nhiều trong các tế bào thần kinh của hệ thần kinh trung ương. Ngoài ra, trong trường hợp đột biến xảy ra trong protein tau, được biết là protein tau bị phosphoryl hóa quá mức, cho phép các đám rối sợi thần kinh (NFT) bị tích tụ bất thường trong các tế bào thần kinh, do đó gây ra bệnh thoái hóa thần kinh như sa sút trí tuệ và bệnh Parkinson (Dong Hee Choi *et al.*, *Brain & NeuroRehabilitation*, 4, 21-29, 2011).

Tuy nhiên, protein tau của người gồm 441 axit amin có rất nhiều vị trí ở đó có thể xảy ra biến đổi sau dịch mã, điều này gây khó khăn cho việc tìm thấy, trong protein tau, phần đích có tác dụng ngăn ngừa hoặc điều trị chứng sa sút trí tuệ. Do những thay đổi khác nhau như vậy, cũng có những khó khăn trong việc phát triển chất trị liệu.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Theo đó, các tác giả sáng chế đã nghiên cứu để phát triển chất trị liệu hiệu quả cho bệnh thoái hóa thần kinh. Kết quả là, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng kháng thể mà liên kết đặc hiệu với mảnh của protein tau, trong đó lysin thứ 280 bị axetyl hóa, làm giảm sự kết tụ của protein tau. Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng trong các thử nghiệm sử dụng mô hình động vật được gây ra chứng sa sút trí tuệ, mô hình động vật mà kháng thể được sử dụng thể hiện chức năng vận động và chức năng nhận thức được cải thiện.

Giải pháp cho vấn đề

Để giải quyết các vấn đề trên, theo một khía cạnh của sáng chế, được đề xuất là kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm (i) vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1, CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2 và CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 3 và (ii) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 4, CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 5 và CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 6.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, được đề xuất là polynucleotit mã hóa kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng tau.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, được đề xuất là vector biểu hiện chứa polynucleotit nêu trên.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, được đề xuất là tế bào chủ mà vector biểu hiện được đưa vào đó.

Vẫn theo một khía cạnh khác của sáng chế, được đề xuất là phương pháp sản xuất kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ nêu trên.

Vẫn theo một khía cạnh khác của sáng chế, được đề xuất là thể lai có số nộp lưu KCTC 14155BP.

Vẫn theo một khía cạnh khác của sáng chế, được phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thoái hóa thần kinh được đề xuất, được phẩm này chứa kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó làm thành phần hoạt tính.

Vẫn theo một khía cạnh khác của sáng chế, chế phẩm để chẩn đoán bệnh thoái hóa thần kinh được đề xuất, chế phẩm này chứa kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Vẫn theo một khía cạnh khác của sáng chế, kit để phòng ngừa, điều trị hoặc chẩn đoán bệnh thoái hóa thần kinh được đề xuất, kit này bao gồm kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, polynucleotit, vector biểu hiện, hoặc tế bào chủ nêu trên.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Kháng thể kháng tau theo sáng chế có thể liên kết đặc hiệu với protein tau, trong đó lysin thứ 280 được axetyl hóa, và ức chế sự kết tụ của protein tau bất thường. Ngoài ra, trong trường hợp kháng thể kháng tau theo sáng chế được sử dụng cho mô hình động vật mắc chứng sa sút trí tuệ, thì kháng thể kháng tau có thể cải thiện chức năng vận động và chức năng nhận thức của mô hình động vật. Do đó, kháng thể kháng tau theo sáng chế có thể được sử dụng một cách thuận lợi để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh thoái hóa thần kinh.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 minh họa bằng sơ đồ mảnh protein tau K280-ac được điều chế theo một phương án của sáng chế.

Fig. 2 là sơ đồ của vector biểu hiện pET-21b-Tau (K18) được sử dụng theo một phương án của sáng chế.

Fig. 3 minh họa kết quả của phân tích thẩm tách Western được thực hiện để xác định liên kết giữa kháng thể và mảnh protein K280-ac để chọn kháng thể đơn dòng liên kết đặc hiệu với mảnh protein K280-ac.

Fig. 4 minh họa kết quả của thử nghiệm ELISA được thực hiện để xác định liên kết giữa kháng thể và mảnh protein K280-ac để chọn kháng thể đơn dòng liên kết đặc hiệu với mảnh protein K280-ac.

Fig. 5 minh họa kết quả của thử nghiệm được thực hiện để xác định xem liệu kháng thể đã chọn ADEL-Y01 có liên kết với protein tau kiểu đại được axetyl hóa (Tau)

và protein tau (Tau K280A) có axit amin thứ 280 lysin được thay thế bằng alanin hay không.

Fig. 6 minh họa kết quả của thử nghiệm được thực hiện để xác định liệu protein kiểu dại được axetyl hóa và protein tau kiểu dại không được axetyl hóa có liên kết đặc hiệu với kháng thể ADEL-Y01h_v01 hay không.

Fig. 7 minh họa các giá trị hằng số phân ly (Kd) được đo bằng cách sử dụng hệ thống Octet® K2 để xác định ái lực giữa kháng thể ADEL-Y01m và mảnh protein K280-ac.

Fig. 8 minh họa kết quả của thử nghiệm ELISA được thực hiện để xác định liên kết giữa các kháng thể ADEL-Y01h (v01 đến v12) và mảnh protein K280-ac.

Fig. 9 minh họa các mức biểu hiện và các kiểu mẫu của protein tau (Tau5) và protein tau được axetyl hóa (Tau-acK208) trong các mô não của chuột bình thường (kiểu dại) và chuột sa sút trí tuệ (Tau P301L) 4 tháng tuổi hoặc 12 tháng tuổi.

Fig. 10 minh họa phác đồ thử nghiệm để xác định tác dụng cải thiện hành vi đạt được khi sử dụng kháng thể ADEL-Y01m trong não thất bằng cách sử dụng mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ.

Fig. 11 minh họa kết quả của thử nghiệm xây tổ (***) ($p < 0,001$), trong đó kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ qua đường trong não thất.

Fig. 12 minh họa kết quả của thử nghiệm mê cung chữ Y (* $p < 0,05$) trong đó kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ qua đường trong não thất.

Fig. 13 minh họa kết quả của thử nghiệm mê cung nước trong đó kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ qua đường trong não thất.

Fig. 14 minh họa thời gian tiêu tốn ở trong mỗi khu vực trong thử nghiệm mê cung nước (** $p < 0,01$), trong đó kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ qua đường trong não thất.

Fig. 15 minh họa kết quả của thử nghiệm độ bền kẹp (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), trong đó kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ qua đường trong não thất.

Fig. 16 minh họa phác đồ thử nghiệm để xác định tác dụng cải thiện hành vi đạt được khi sử dụng kháng thể ADEL-Y01m trong màng bụng bằng cách sử dụng mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ.

Fig. 17 minh họa kết quả của thử nghiệm xây tổ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), trong đó kháng thể ADEL-Y01m được sử dụng trong màng bụng vào mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ.

Fig. 18 minh họa kết quả của thử nghiệm mê cung chữ Y (* $p < 0,05$), trong đó kháng thể ADEL-Y01m được sử dụng trong màng bụng vào mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ.

Fig. 19 minh họa kết quả của thử nghiệm mê cung nước, trong đó kháng thể ADEL-Y01m được sử dụng trong màng bụng vào mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ.

Fig. 20 minh họa thời gian tiêu tốn ở trong mỗi khu vực trong thử nghiệm mê cung nước (* $p < 0,05$), trong đó kháng thể ADEL-Y01m được sử dụng trong màng bụng vào mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ trước khi thực hiện thử nghiệm mê cung nước.

Fig. 21 minh họa kết quả của các thử nghiệm kết tủa miễn dịch và thẩm tách Western được thực hiện để xác định liên kết giữa kháng thể ADEL-Y01m và protein tau được axetyl hóa (Tau-acK280) biểu hiện trong vỏ não và mô hồi hải mã của chuột bình thường (kiểu đại) hoặc mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ (Tau P301L).

Fig. 22 minh họa các hình ảnh được chụp sau khi mô não của người già bình thường và mô não của bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer được nhuộm hóa mô miễn dịch bằng cách sử dụng kháng thể ADEL-Y01m.

Fig. 23A minh họa kết quả của thử nghiệm được thực hiện để xác định mức biểu hiện của toàn bộ protein tau (Tau5), protein tau được axetyl hóa (Tau-acK280), và dạng tinh bột β trong mô não của người già bình thường hoặc mô não của bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer.

Fig. 23B minh họa kết quả của thử nghiệm được thực hiện để xác định liên kết giữa kháng thể ADEL-Y01m và protein tau được axetyl hóa biểu hiện trong mô não của người già bình thường hoặc mô não của bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer (* $p < 0,05$).

Fig. 24 minh họa kết quả của thử nghiệm được thực hiện để xác định mức biểu hiện của toàn bộ protein tau (Tau5), protein tau được axetyl hóa (Tau-acK280) và protein

tau được phosphoryl hóa (pSer396) trong các mô não của chuột bình thường, mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ gây ra và mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ mà kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào chuột qua đường trong não thất.

Fig. 25 minh họa các mức biểu hiện của toàn bộ protein tau (Tau5) trong mô não của chuột bình thường, mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ và mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ mà kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào chuột qua đường trong não thất (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

Fig. 26 minh họa các mức biểu hiện của protein tau được phosphoryl hóa (pSer396) trong các mô não của chuột bình thường, mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ và mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ mà kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào chuột qua đường trong não thất (** $p < 0,01$).

Fig. 27 minh họa các mức biểu hiện của protein tau được axetyl hóa (Tau-acK280) trong mô não của chuột bình thường, mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ và mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ mà kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào chuột qua đường trong não thất.

Fig. 28 minh họa các hình ảnh cho thấy các mô não được nhuộm miễn dịch với protein tau phosphoryl hóa (AT8, pT231), trong đó các mô não được lấy từ chuột bình thường, mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ và mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ (Tau-P301L-ADEL-Y01m) mà kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào chuột qua đường trong não thất.

Fig. 29 minh họa mức biểu hiện của AT8 và protein tau được phosphoryl hóa (pT231) trong các mô não của chuột bình thường, mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ và mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ (Tau-P301L-ADEL-Y01m) mà kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào chuột qua đường trong não thất (* $p < 0,05$).

Fig. 30 minh họa các mức biểu hiện của toàn bộ protein tau (Tau5), protein tau được axetyl hóa (Tau-acK280), và protein tau được phosphoryl hóa (pT231) trong các mô não của chuột bình thường, mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ và mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ (Tau-P301L-ADEL-Y01m) mà kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào chuột qua đường trong màng bụng.

Fig. 31 minh họa mức biểu hiện của toàn bộ protein tau (Tau5) trong các mô não

của chuột bình thường, mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ và mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ mà kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào chuột qua đường trong màng bụng (* $p < 0,05$).

Fig. 32 minh họa các mức biểu hiện của protein tau được axetyl hóa (Tau-acK280) trong các mô não của chuột bình thường, mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ và mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ mà kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào chuột qua đường trong màng bụng (* $p < 0,05$).

Fig. 33 minh họa các mức biểu hiện của protein tau được phosphoryl hóa (pT231) trong các mô não của chuột bình thường, mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ và mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ mà kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào chuột qua đường trong màng bụng (* $p < 0,05$).

Fig. 34 minh họa mức biểu hiện của các protein liên quan đến synap (PSD95 và synapsin-1) trong các mô não của chuột bình thường, mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ và mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ mà kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào chuột qua đường trong não thất.

Fig. 35 minh họa mức biểu hiện của PSD95 trong các mô não của chuột bình thường, mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ, mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ mà kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào chuột qua đường trong não thất (* $p < 0,05$).

Fig. 36 minh họa mức biểu hiện của synapsin-1 trong các mô não của chuột bình thường, mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ, mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ mà kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào chuột qua đường trong não thất (* $p < 0,05$).

Fig. 37 minh họa mức biểu hiện của các protein liên quan đến synap (PSD95 và synapsin-1) trong các mô não của chuột bình thường, mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ và mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ mà kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào chuột qua đường trong màng bụng.

Fig. 38 minh họa mức biểu hiện của PSD95 trong mô não của chuột bình thường, mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ và mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ mà kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào chuột qua đường trong màng bụng (* $p < 0,05$).

Fig. 39 minh họa mức biểu hiện của synapsin-1 trong các mô não của chuột bình thường, mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ và mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ mà

kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào chuột qua đường trong màng bụng (* $p < 0,05$).

Fig. 40 minh họa kết quả của thử nghiệm được thực hiện để xác định xem liệu kháng thể ADEL-Y01m có thâm nhập vào các mô não của chuột bình thường, mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ và mô hình chuột bị gây sa sút trí tuệ mà kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào chuột qua đường trong màng bụng hay không, và liệu kháng thể có liên kết với protein tau hay không.

Fig. 41 minh họa phác đồ thử nghiệm để xác định tác dụng cải thiện hành vi đạt được khi sử dụng kháng thể ADEL-Y01m trong màng bụng bằng cách sử dụng mô hình chuột bị gây ra chứng sa sút trí tuệ tuổi già.

Fig. 42 minh họa kết quả của thử nghiệm xây tổ (* $p < 0,05$), trong đó kháng thể ADEL-Y01m được sử dụng trong màng bụng cho mô hình chuột bị gây ra chứng sa sút trí tuệ tuổi già.

Fig. 43 minh họa kết quả của thử nghiệm mê cung chữ Y (* $p < 0,05$) trong đó kháng thể ADEL-Y01m được sử dụng trong màng bụng cho mô hình chuột bị gây ra chứng sa sút trí tuệ tuổi già.

Fig. 44 minh họa thời gian tiêu tốn ở trong mỗi khu vực trong thử nghiệm mê cung nước (* $p < 0,05$) trong đó kháng thể ADEL-Y01m được sử dụng trong màng bụng cho mô hình chuột bị gây ra chứng sa sút trí tuệ tuổi già.

Fig. 45 minh họa mức biểu hiện của toàn bộ protein tau (Tau5), protein tau được axetyl hóa (Tau-acK280), và protein tau được phosphoryl hóa (pT231) trong các mô não của chuột bình thường, mô hình chuột bị gây ra chứng sa sút trí tuệ tuổi già và mô hình chuột bị gây ra chứng sa sút trí tuệ tuổi già trong đó kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào qua đường trong màng bụng.

Fig. 46 minh họa mức biểu hiện của toàn bộ protein tau (Tau5) trong các mô não của chuột bình thường, mô hình chuột bị gây ra chứng sa sút trí tuệ tuổi già và mô hình chuột bị gây ra chứng sa sút trí tuệ tuổi già trong đó kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào qua đường trong màng bụng (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Fig. 47 minh họa mức biểu hiện của protein tau được axetyl hóa (Tau-acK280) trong các mô não của chuột bình thường, mô hình chuột bị gây ra chứng sa sút trí tuệ tuổi già và mô hình chuột bị gây ra chứng sa sút trí tuệ tuổi già mà kháng thể ADEL-

Y01m được đưa vào qua đường trong màng bụng (** $p < 0,01$).

Fig. 48 minh họa mức biểu hiện của toàn bộ protein tau được phosphoryl hóa (pT231) trong các mô não của chuột bình thường, mô hình chuột bị gây ra chứng sa sút trí tuệ tuổi già và mô hình chuột bị gây ra chứng sa sút trí tuệ tuổi già trong đó kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào qua đường trong màng bụng (* $p < 0,05$).

Fig. 49 minh họa kết quả của thử nghiệm được thực hiện để xác định, đối với mỗi phần, các kết tụ tau không tan trong vỏ não của chuột bình thường, mô hình chuột bị gây ra chứng sa sút trí tuệ tuổi già và mô hình chuột bị gây ra chứng sa sút trí tuệ tuổi già trong đó kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào qua đường trong màng bụng.

Fig. 50 minh họa các mức biểu hiện của hemagglutinin (HA), toàn bộ protein tau (Tau5) và protein tau được axetyl hóa (Tau-acK280) mà được xác định bằng thử nghiệm thấm tách Western được thực hiện sau khi đưa các tế bào cho đã được xử lý bằng protein tau axetyl hóa qua bước phân giải.

Fig. 51 minh họa mức biểu hiện của hemagglutinin (HA), toàn bộ protein tau (Tau5) và protein tau được axetyl hóa (Tau-acK280) mà được xác định bằng thử nghiệm thấm tách Western được thực hiện sau khi thu được môi trường tế bào cho được xử lý bằng protein tau được axetyl hóa.

Fig. 52 minh họa các kết tụ protein tau nội bào được xác định bằng thử nghiệm thấm tách Western được thực hiện sau khi sử dụng giống cấy tế bào cho được xử lý bằng protein tau đã axetyl hóa cho các tế bào thần kinh và đưa các tế bào thần kinh này qua bước phân giải sau 1 giờ hoặc 20 giờ.

Fig. 53 minh họa các kết tụ protein tau nội bào được xác định bằng các thử nghiệm thấm tách Western và kết tủa miễn dịch sau khi sử dụng giống cấy tế bào cho được xử lý bằng protein tau đã được axetyl hóa cho các tế bào thần kinh và đưa các tế bào thần kinh này qua bước phân giải sau 1 giờ hoặc 20 giờ.

Fig. 54 minh họa tác dụng ức chế tạo hạt protein tau (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) được xác định bởi FRET thực hiện sau khi đưa các tế bào cảm biến sinh học Tau-RD-P301S FRET qua bước xử lý bằng mảnh protein K280-ac hoặc kết tụ của nó và kháng thể ADEL-Y01h01_v01.

Fig. 55 minh họa tác dụng ức chế tạo hạt protein tau (** $p < 0,01$) được xác định

bằng sự truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang (FRET) được thực hiện sau khi đưa các tế bào cảm biến sinh học Tau-RD-P301S FRET qua bước xử lý bằng phân không tan Sarkosyl từ bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer và bằng kháng thể ADEL-Y01h01_v01.

Fig. 56 minh họa các hình ảnh cho thấy các mô não được nhuộm miễn dịch bằng kháng thể kháng AT8, trong đó các mô não được tách chiết sau khi phân không tan Sarkosyl từ bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer được đưa vào lớp CA1 ở hồi hải mã bên trái của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L (Ipsi: một bên cơ thể, Contra: đối bên).

Fig. 57 minh họa các hình ảnh cho thấy các mô não được nhuộm miễn dịch bằng kháng thể kháng AT8, trong đó các mô não được tách chiết sau khi phân không tan Sarkosyl từ bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer được đưa vào lớp CA1 ở hồi hải mã bên trái của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L (DG: hồi răng, EC: vỏ não nội khứu).

Fig. 58 và 59 là biểu đồ cho thấy mức độ các mô não được nhuộm miễn dịch bằng kháng thể kháng AT8, trong đó các mô não được tách chiết sau khi phân không tan Sarkosyl từ bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer được đưa vào lớp CA1 ở vùng hải mã bên trái của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Fig. 60 minh họa kết quả của thử nghiệm Thioflavin-T được thực hiện để xác định các thay đổi về sự kết tụ của các protein tau được axetyl hóa sau khi xử lý protein tau được axetyl hóa với kháng thể IgG hoặc ADEL-Y01m.

Fig. 61 minh họa kết quả của thử nghiệm được thực hiện để xác định các thay đổi về lượng protein tau được axetyl hóa kết tụ (Tau-acK280) sau khi xử lý protein tau (K18), protein tau được axetyl hóa (K18 + P300), và protein tau được axetyl hóa kết tụ (K18 + P300 + heparin) với kháng thể ADEL-Y01m.

Fig. 62 là biểu đồ thể hiện hoạt động của lactat dehydrogenaza (LDH) có trong chất nổi bề mặt thu được sau khi các tế bào thần kinh có nguồn gốc từ chuột được xử lý với kháng thể IgG hoặc ADEL-Y01m được xử lý bằng các kết tụ protein tau được axetyl hóa (** $p < 0,001$).

Fig. 63 là biểu đồ thể hiện khả năng sống sót của các tế bào thần kinh thu được sau khi các tế bào thần kinh có nguồn gốc từ chuột được xử lý bằng kháng thể IgG hoặc ADEL-Y01m được xử lý bằng các kết tụ protein tau được axetyl hóa (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$).

Fig. 64 là biểu đồ thể hiện sự phát huỳnh quang của HiLyte™ Fluor 488 của tiểu thần kinh đệm thu được sau khi tiểu thần kinh đệm có nguồn gốc từ chuột được xử lý với kháng thể IgG hoặc ADEL-Y01m được xử lý bằng các kết tụ protein tau được axetyl hóa được đánh dấu HiLyte™ Fluor 488.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1, CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2 và CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 4, CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 5 và CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 6.

Thuật ngữ "kháng thể" như được sử dụng ở đây có nghĩa là protein miễn dịch có thể liên kết với kháng nguyên, do đó can thiệp vào hoạt động của kháng nguyên hoặc loại bỏ kháng nguyên. Có năm kiểu kháng thể: IgM, IgD, IgG, IgA và IgE, và các kháng thể này chứa các chuỗi nặng được tạo ra bởi các gen vùng không đổi chuỗi nặng, lần lượt là μ , δ , γ , α và ϵ . Trong các kỹ thuật sử dụng kháng thể, IgG được sử dụng chủ yếu. IgG có bốn isotyp: IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4, và các đặc điểm cấu trúc và chức năng của chúng có thể khác nhau.

IgG tạo thành cấu trúc ổn định hình chữ Y (trọng lượng phân tử: khoảng 150 kDa) được tạo thành từ hai protein chuỗi nặng (khoảng 50 kDa) và hai protein chuỗi nhẹ (khoảng 25 kDa). Trong kháng thể, chuỗi nhẹ và chuỗi nặng gồm vùng biến đổi mà trình tự axit amin của nó khác nhau giữa kháng thể này với kháng thể khác và vùng không đổi mà trình tự axit amin của nó giống nhau giữa các kháng thể. Có các miền CH1, H (bản lề), CH2, và CH3 trong vùng không đổi của chuỗi nặng. Mỗi trong số các miền này bao gồm hai tấm β và các miền được nối với nhau thông qua liên kết disulfua nội phân tử. Hai vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được kết hợp để tạo thành vị trí liên kết kháng nguyên. Vị trí liên kết kháng nguyên tồn tại trên mỗi nhánh trong số hai nhánh hình chữ Y. Phần có khả năng liên kết với kháng nguyên được gọi là Fab (mảnh liên kết

của kháng thể), và phần không liên kết với kháng nguyên được gọi là Fc (mảnh có thể kết tinh). Fab và Fc được nối với nhau thông qua vùng bản lề linh hoạt.

Thuật ngữ "CDR" như được sử dụng ở đây có nghĩa là vùng siêu biến đổi, là vị trí nằm trong vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể và có trình tự axit amin khác nhau giữa kháng thể này với kháng thể khác, trong đó vị trí này liên kết với kháng nguyên. Trong cấu trúc ba chiều của kháng thể, CDR được hình thành ở dạng vòng trên bề mặt của kháng thể và dưới vòng này, vùng khung (FR) tồn tại để hỗ trợ CDR về mặt cấu trúc. Có ba cấu trúc vòng trong chuỗi nặng, ba cấu trúc vòng trong chuỗi nhẹ, và sáu cấu trúc vòng của vùng này được kết hợp với nhau để tiếp xúc trực tiếp với kháng nguyên.

Vùng biến đổi chuỗi nặng có thể bao gồm một trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 7 đến 11 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có thể bao gồm một trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 12 đến 15.

Ngoài ra, kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể là bất kỳ loại nào được chọn từ nhóm sau:

kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 7 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 12;

kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 8 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 13;

kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 8 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 14;

kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 8 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 15;

kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 9 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 13;

kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 9 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 14;

kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 9 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 15;

kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 10 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 13;

kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 10 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 14;

kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 10 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 15;

kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 11 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 13;

kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 11 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 14; và

kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 11 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 15.

Trong trường hợp CDR1, CDR2, và CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng là giống nhau, có thể biến đổi phần khung của chúng. Cụ thể, trình tự axit amin của một phần của phần khung có thể được biến đổi để tạo ra kháng thể được làm tương thích với người.

Trình tự axit amin và các SEQ ID NO. của kháng thể kháng tau theo các ví dụ của sáng chế được tổng kết trong bảng 1 và 2 dưới đây.

Bảng 1

Tên ADEL	VH-CDR1	SEQ ID NO	VH-CDR2	SEQ ID NO	VH-CDR3	SEQ ID NO
Y01m01	GDSITSGY	1	IRYSGRT	2	ASVYFTY	3
Y01h01v01						
Y01h01v02						
Y01h01v03						
Y01h01v04						
Y01h01v05						
Y01h01v06						
Y01h01v07						
Y01h01v08						
Y01h01v09						
Y01h01v10						
Y01h01v11						
Y01h01v12						
Tên ADEL	VL-CDR1	SEQ ID NO	VL-CDR2	SEQ ID NO	VL-CDR3	SEQ ID NO
Y01m01	QSLDSDGKTY	4	LVS	5	WQGSHPYT	6
Y01h01v01						
Y01h01v02						
Y01h01v03						
Y01h01v04						
Y01h01v05						
Y01h01v06						
Y01h01v07						
Y01h01v08						
Y01h01v09						
Y01h01v10						
Y01h01v11						
Y01h01v12						

Bảng 2

Tên ADEL	Trình tự axit amin VH	SEQ ID NO	Trình tự axit amin VL	SEQ ID NO
Y01m01	EVQLEESGPSLVKPSQTLSTCSV TGDSITSGYWNWIRKFPNGKLEY MGYIRYSGRTYYNPSLKSRSITR DTSKNQFYLQLISVTTEDTATYY CASVYFTYWGQGTLLTVSS	7	DVLMTQTPLTSLVTIGQPASI SCKSSQSLLDSDGKTYLNW LLQRPQGSPKRLISLVSKLDS GVPDRFTGSGSGTDFTLKIS RVEAEDLGVIYCWQGSHP YTFGGGKLEIK	12
Y01h01v01	EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCT VSGDSITSGYWNWIRQPPGKGLE YIGYIRYSGRTYYNPSLKSRTIS RDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCASVYFTYWGQGTLLTVSS	8	DVVMQTQSPSLPVTLGQPAS ISCKSSQSLLDSDGKTYLNW FQRPQGSPKRLISLVSKLDS GVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYCWQGSHP YTFGQGTLEIK	13
Y01h01v02	EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCT VSGDSITSGYWNWIRQPPGKGLE	8	DVVMQTQSPDSLAVSLGERAT INCKSSQSLLDSDGKTYLNW	14

	YIGYIRYSGRTYYNPSLKSRTIS RDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCASVYFTYWGQGLTVTVSS		YQQKPGQSPKRLISLVSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCWQGSHP YTFGQGTKLEIK	
Y01h01v03	EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCT VSGDSITSGYWNWIRQPPGKGLE YIGYIRYSGRTYYNPSLKSRTIS RDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCASVYFTYWGQGLTVTVSS	8	EVVLTQSPGTLSPGERATL SCKSSQSLDSDGKTYLNW YQQKPGQSPKRLISLVSKLD SGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCWQGSHP YTFGQGTKLEIK	15
Y01h01v04	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCA VSGDSITSGYWNWIRQSPSRGLE WLGYIRYSGRTYYNPSLKSRTIN RDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVY YCASVYFTYWGQGLTVTVSS	9	DVVMTQSPSLPVTLGQPAS ISCKSSQSLDSDGKTYLNW FQQRPGQSPKRLISLVSKLDS GVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGYYCWQGSHP YTFGQGTKLEIK	13
Y01h01v05	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCA VSGDSITSGYWNWIRQSPSRGLE WLGYIRYSGRTYYNPSLKSRTIN RDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVY YCASVYFTYWGQGLTVTVSS	9	DVVMTQSPDSLAVSLGERAT INCKSSQSLDSDGKTYLNW YQQKPGQSPKRLISLVSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCWQGSHP YTFGQGTKLEIK	14
Y01h01v06	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCA VSGDSITSGYWNWIRQSPSRGLE WLGYIRYSGRTYYNPSLKSRTIN RDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVY YCASVYFTYWGQGLTVTVSS	9	EVVLTQSPGTLSPGERATL SCKSSQSLDSDGKTYLNW YQQKPGQSPKRLISLVSKLD SGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCWQGSHP YTFGQGTKLEIK	15
Y01h01v07	EVTLKESGPTLVKPTQTLTLTCTV SGDSITSGYWNWIRQPPGKALEY LAYIRYSGRTYYNPSLKSRLTITR DTSKNQVVLMTNMDPVDATY YCASVYFTYWGQGLTVTVSS	10	DVVMTQSPSLPVTLGQPAS ISCKSSQSLDSDGKTYLNW FQQRPGQSPKRLISLVSKLDS GVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGYYCWQGSHP YTFGQGTKLEIK	13
Y01h01v08	EVTLKESGPTLVKPTQTLTLTCTV SGDSITSGYWNWIRQPPGKALEY LAYIRYSGRTYYNPSLKSRLTITR DTSKNQVVLMTNMDPVDATY YCASVYFTYWGQGLTVTVSS	10	DVVMTQSPDSLAVSLGERAT INCKSSQSLDSDGKTYLNW YQQKPGQSPKRLISLVSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCWQGSHP YTFGQGTKLEIK	14
Y01h01v09	EVTLKESGPTLVKPTQTLTLTCTV SGDSITSGYWNWIRQPPGKALEY LAYIRYSGRTYYNPSLKSRLTITR DTSKNQVVLMTNMDPVDATY YCASVYFTYWGQGLTVTVSS	10	EVVLTQSPGTLSPGERATL SCKSSQSLDSDGKTYLNW YQQKPGQSPKRLISLVSKLD SGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCWQGSHP YTFGQGTKLEIK	15
Y01h01v10	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCT VSGDSITSGYWNWFRQAPGKGL EYVGYIRYSGRTYYNPSLKSRTI SRDTSKNIAYLQMNSLKTEDTAV	11	DVVMTQSPSLPVTLGQPAS ISCKSSQSLDSDGKTYLNW FQQRPGQSPKRLISLVSKLDS GVPDRFSGSGSGTDFTLKIS	13

	YYCASVYFTYWGQGTTLTVSS		RVEAEDVGYYCWQGSHP YTFGQGTKLEIK	
Y01h01v11	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCT VSGDSITSGYWNWFRQAPGKGL EYVGYIRYSGRTYYNPSLKSRTI SRDTSKNIAYLQMNSLKTEDTAV YYCASVYFTYWGQGTTLTVSS	11	DVVMQTQSPDSLAVSLGERAT INCKSSQSLLDSDGKTYLNV YQQKPGQSPKRLISLVSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCWQGSHP YTFGQGTKLEIK	14
Y01h01v12	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCT VSGDSITSGYWNWFRQAPGKGL EYVGYIRYSGRTYYNPSLKSRTI SRDTSKNIAYLQMNSLKTEDTAV YYCASVYFTYWGQGTTLTVSS	11	EVVLTQSPGTLSPGERATL SCKSSQSLLDSDGKTYLNV YQQKPGQSPKRLISLVSKLD SGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCWQGSHP YTFGQGTKLEIK	15

Các trình tự nucleotit của kháng thể kháng tau theo các ví dụ của sáng chế được tổng kết trong bảng 3 dưới đây.

Bảng 3

Tên ADEL	Trình tự nucleotit VH (SEQ ID NO)	Trình tự nucleotit VL (SEQ ID NO)
Y01m01	16	21
Y01h01v01	17	22
Y01h01v02	17	23
Y01h01v03	17	24
Y01h01v04	18	22
Y01h01v05	18	23
Y01h01v06	18	24
Y01h01v07	19	22
Y01h01v08	19	23
Y01h01v09	19	24
Y01h01v10	20	22
Y01h01v11	20	23
Y01h01v12	20	24

Thuật ngữ "ADEL-Y01m" được sử dụng trong tài liệu này đề cập đến kháng thể của chuột liên kết đặc hiệu với mảnh protein mà có, trong trình tự axit amin của protein tau được biểu thị bởi SEQ ID NO: 25, phần trình tự axit amin thứ 275 đến 286, với axit

amin thứ 280 được axetyl hóa. Ngoài ra, thuật ngữ "ADEL-Y01h" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ kháng thể thu được bằng cách làm cho kháng thể ADEL-Y01m tương thích với người.

Mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể là mảnh bất kỳ được chọn từ nhóm gồm Fab, scFv, F(ab')₂ và Fv. Mảnh đề cập đến miền liên kết kháng nguyên ngoại trừ vùng có thể kết tinh (vùng Fc) mà có chức năng (chức năng thực hiện) để truyền kích thích do liên kết với kháng nguyên gây ra đến tế bào, bỏ thể hoặc tương tự và mảnh này có thể bao gồm mảnh thể hệ thứ 3 chẳng hạn như kháng thể miền đơn và kháng thể nhỏ.

Mảnh này có ưu điểm là nó có khả năng thâm nhập tốt vào hàng rào máu não vì kích thước của mảnh nhỏ hơn kích thước của IgG của cấu trúc hoàn chỉnh và nó có chi phí sản xuất thấp vì nó có thể được tạo ra ở vi khuẩn. Ngoài ra, vì mảnh kháng thể thiếu Fc, nên mảnh kháng thể được sử dụng trong trường hợp không mong muốn chức năng truyền kích thích do liên kết với kháng nguyên đến tế bào, bỏ thể hoặc tương tự. Mảnh này thích hợp để chẩn đoán trong cơ thể sống do thời gian bán hủy trong cơ thể người ngắn. Tuy nhiên, trong trường hợp trong số các axit amin cấu thành kháng thể, một số axit amin bazơ, axit hoặc trung tính được thay thế cho nhau, thì điểm đẳng điện (pI) nội tại của chính kháng thể có thể thay đổi. Sự thay đổi điểm đẳng điện của kháng thể như vậy có thể dẫn đến những thay đổi như giảm tác dụng phụ độc hại *in vivo* của kháng thể hoặc tăng khả năng hòa tan trong nước. Do đó, trong trường hợp kháng thể điều trị, khi xem xét ái lực hoặc dạng cấu trúc của nó, có thể sử dụng IgG của cấu trúc hoàn chỉnh.

Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng có thể có trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các SEQ ID NO: 7 đến 11, hoặc nó có thể có độ tương đồng 95%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng.

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể có trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa một trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các SEQ ID NO: 12 đến 15, hoặc nó có thể có độ tương đồng ít nhất 95%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ.

Kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể có độ tương đồng ít nhất 95%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng chứa một trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các SEQ ID NO: 7 đến 11 và với trình tự vùng

biến đổi của chuỗi nhẹ chứa một trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các SEQ ID NO: 12 đến 15.

Có thể dễ dàng tạo ra kháng thể kháng tau bằng kỹ thuật điều chế kháng thể đơn dòng đã biết. Kháng thể đơn dòng có thể được tạo ra bằng cách thu thể lai sử dụng tế bào lympho B từ động vật đã được gây miễn dịch hoặc bằng cách sử dụng kỹ thuật biểu lộ thể thực khuẩn. Tuy nhiên, phương pháp tạo kháng thể đơn dòng không bị giới hạn ở đó.

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể đơn dòng của kháng thể kháng tau có thể dễ dàng được tạo ra bằng cách chuẩn bị, dưới dạng dòng tế bào lai, tế bào lympho B thu được bằng cách tiêm, vào chuột, mảnh protein (K280-ac) mà có phần trình tự axit amin thứ 275 đến 286 trong trình tự axit amin của protein tau kiểu đại có SEQ ID NO: 25, trong đó axit amin thứ 280 được axetyl hóa.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, được đề xuất là polynucleotit mã hóa kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Theo một khía cạnh khác của sáng chế, được đề xuất là polynucleotit mã hóa chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Cụ thể, polynucleotit có thể bao gồm một trình tự nucleotit bất kỳ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 16 đến 20 và/hoặc một trình tự nucleotit bất kỳ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 21 đến 24.

Polynucleotit có thể là loại bất kỳ được chọn từ nhóm sau:

polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 16 và/hoặc trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 21;

polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 17 và/hoặc trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 22;

polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 17 và/hoặc trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 23;

polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit được biểu thị bằng SEQ ID NO: 17 và/hoặc trình tự nucleotit được biểu thị bằng SEQ ID NO: 24;

polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 18 và/hoặc trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 22;

polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 18 và/hoặc trình tự nucleotit được biểu thị bằng SEQ ID NO: 23;

polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 18 và/hoặc trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 24;

polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 19 và/hoặc trình tự nucleotit được biểu thị bằng SEQ ID NO: 22;

polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 19 và/hoặc trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 23;

polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 19 và/hoặc trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 24;

polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 20 và/hoặc trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 22;

polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit được biểu thị bằng SEQ ID NO: 20 và/hoặc trình tự nucleotit được biểu thị bằng SEQ ID NO: 23; và

polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 20 và/hoặc trình tự nucleotit được biểu thị bởi SEQ ID NO: 24.

Polynucleotit có thể được biến đổi bằng cách thay thế, xóa hoặc chèn vào ít nhất một bazơ, hoặc kết hợp của chúng. Trong trường hợp trình tự nucleotit được điều chế bằng phương pháp tổng hợp hóa học, có thể sử dụng các phương pháp tổng hợp đã biết trong lĩnh vực này, chẳng hạn như các phương pháp được mô tả trong Engels and Uhlmann, *Angew Chem IntEd Engl.*, 37: 73-127, 1988. Các phương pháp như vậy có thể bao gồm các phương pháp trieste, phosphit, phosphoramidit và H-phosphat, PCR và các phương pháp môi tự động khác, tổng hợp oligonucleotit trên giá đỡ rắn, và các phương pháp tương tự.

Vẫn theo một khía cạnh khác của sáng chế, được đề xuất là vector biểu hiện bao gồm polynucleotit. Vector biểu hiện có thể là ADN plasmit, ADN thể thực khuẩn hoặc tương tự và nó cũng có thể bao gồm các plasmit được phát triển thương mại (pUC18, pBAD, pIDTSAMRT-AMP, và tương tự), plasmit có nguồn gốc từ *E. coli* (pYG601BR322, pBR325, pUC118, pUC119, và tương tự), plasmit có nguồn gốc từ *Bacillus subtilis* (pUB110, pTP5, và tương tự), plasmit có nguồn gốc từ nấm men

(YEp13, YEp24, YCp50, và tương tự), ADN của thể thực khuẩn (Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λ gt10, λ gt11, λ ZAP, và tương tự), vector virút động vật (retrovirut, adenovirut, virút vắc xin, và tương tự), vector virút côn trùng (baculovirut), và tương tự. Trong vector biểu hiện, mức biểu hiện, sự biến đổi, và tương tự của protein thay đổi tùy thuộc vào tế bào chủ, do đó, người ta ưu tiên chọn và sử dụng tế bào chủ phù hợp nhất cho mục đích.

Vẫn theo một khía cạnh khác của sáng chế, được đề xuất là tế bào chủ chứa vector biểu hiện. Tế bào chủ cho tế bào được biến nạp có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tế bào có nguồn gốc từ động vật có vú, thực vật, côn trùng, nấm hoặc vi khuẩn. Có thể sử dụng tế bào của động vật có vú, tế bào CHO, tế bào F2N, tế bào CSO, tế bào BHK, tế bào u melanin Bowes, tế bào HeLa, tế bào 911, tế bào AT1080, tế bào A549, tế bào HEK 293, tế bào HEK293T hoặc tương tự; tuy nhiên, các tế bào của động vật có vú không bị giới hạn ở đó. Bất kỳ tế bào nào mà những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết và có thể được sử dụng làm tế bào vật chủ của động vật có vú đều có thể được sử dụng.

Ngoài ra, trong trường hợp vector biểu hiện được đưa vào tế bào chủ, có thể sử dụng các phương pháp sau: kết tủa CaCl_2 , phương pháp Hanahan, trong đó chất khử gọi là dimetyl sulfoxit (DMSO) được sử dụng kết hợp với kết tủa CaCl_2 để tăng hiệu suất, xung điện, kết tủa canxi phosphat, dung hợp thể nguyên sinh, khuấy trộn bằng cách sử dụng sợi silic cacbua, biến nạp qua trung gian *Agrobacterium*, biến nạp qua trung gian PEG, dextran sulfat, lipofectamin, biến nạp qua trung gian hút ẩm/ức chế, và tương tự.

Vẫn theo một khía cạnh khác của sáng chế, được đề xuất là phương pháp tạo ra kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ. Cụ thể, phương pháp sản xuất có thể bao gồm các bước i) nuôi cấy tế bào chủ để thu được dịch nuôi cấy và ii) thu gom kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó từ môi trường nuôi cấy.

Bước nuôi cấy tế bào chủ có thể được thực hiện bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Cụ thể, việc nuôi cấy có thể được thực hiện trong quy trình theo mẻ hoặc được thực hiện liên tục trong quy trình mẻ cấp hoặc mẻ cấp lặp lại.

Bước thu gom kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó từ môi trường nuôi cấy có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh

vực này. Cụ thể, việc thu gom có thể được thực hiện với các phương pháp bao gồm ly tâm, lọc, chiết, phun, sấy khô, bay hơi, kết tủa, kết tinh, điện di, hòa tan phân đoạn (ví dụ, kết tủa amoni sulfat), sắc ký (ví dụ, trao đổi ion, ái lực, kỵ nước, hoặc sắc ký loại trừ kích thước), và các loại tương tự.

Vẫn theo một khía cạnh khác của sáng chế, được đề xuất là thể lai có số nộp lưu KCTC14155BP. Thể lai có số nộp lưu KCTC14155BP có thể tạo ra ADEL-Y01m. Đối với ADEL-Y01m, tham chiếu đến phần mô tả ở trên về kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Vẫn theo một khía cạnh khác của sáng chế, được phẩm được đề xuất để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thoái hóa thần kinh, được phẩm này chứa, làm thành phần hoạt tính, kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Bệnh thoái hóa thần kinh có thể là bệnh về thần kinh được điều tiết bởi protein tau. Cụ thể, bệnh về thần kinh được điều tiết bởi protein tau có thể là bệnh lý tau, bệnh lý tau nguyên phát do tuổi già, bệnh não do chấn thương mãn tính, bệnh liệt siêu nhân tiến triển, thoái hóa vỏ não hạch đáy, sa sút trí tuệ trán-thái dương, bệnh Lytico-Bodig, bệnh Parkinson, viêm màng não xơ cứng bán cấp, bệnh não do chì, bệnh xơ cứng củ, u hạch, u bạch cầu, u màng não, viêm não xơ cứng bán cấp, bệnh Hallervorden-Spatz, hoặc bệnh lý tích tụ lipofuscin.

Ngoài ra, bệnh lý tau có thể là bệnh Alzheimer (AD), bệnh bại liệt tiến triển (PSP), thoái hóa vỏ não hạch đáy (CBD), bệnh Pick (PiD), nhóm các rối loạn liên quan được gọi chung là sa sút trí tuệ trán-thái dương với bệnh Parkinson liên quan đến nhiễm sắc thể 17 (FTDP- 17), bệnh xơ cứng teo cơ một bên (ALS), bệnh Creutzfeld-Jakob (CJD), bệnh sa sút trí tuệ chấn thương não (DP), bệnh Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSSD), bệnh thể Lewy, bệnh não chấn thương mãn tính (CTE) hoặc bệnh Huntington.

Dược phẩm có thể còn chứa một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm chất mang, chất pha loãng và chất hỗ trợ dược dụng. Các chất mang thích hợp cho dược phẩm là đã biết với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, protein, đường, và các chất tương tự. Chất mang có thể là dung dịch nước hoặc không chứa nước, hỗn dịch và nhũ tương. Ví dụ về chất mang là dung dịch không chứa nước có thể bao gồm propylen glycol, polyetylen glycol, dầu ăn như dầu ô liu và este hữu cơ tiêm được như etyl oleat.

Ví dụ về chất mang là dung dịch nước có thể bao gồm nước, dung dịch cồn/nước, nhũ tương hoặc hỗn dịch bao gồm dung dịch nước muối và môi trường đệm. Ví dụ về chất mang để dùng ngoài đường tiêu hóa có thể bao gồm dung dịch natri clorua, dextroza Ringer, dextroza và natri clorua, Ringer lactat hóa hoặc dầu cố định. Ví dụ về chất mang để tiêm tĩnh mạch có thể bao gồm chất bổ sung điện giải như chất bổ sung dựa trên dextroza Ringer, chất lỏng và chất bổ sung dinh dưỡng. Ngoài ra, các chất bảo quản và các chất phụ gia khác như chất kháng khuẩn, chất chống oxy hóa, chất tạo chelat và khí trơ cũng có thể có mặt. Các chất bảo quản được ưu tiên có thể bao gồm formalin, thimerosal, neomycin, polymyxin B và amphotericin B.

Dược phẩm có thể còn chứa chất hỗ trợ (chất điều hòa miễn dịch hoặc chất định vị miễn dịch). Chất hỗ trợ dùng để chỉ hợp chất hoặc hỗn hợp giúp tăng cường đáp ứng miễn dịch và/hoặc tăng tốc độ hấp thụ sau khi tiêm, và nó có thể bao gồm chất tăng tốc hấp thụ bất kỳ. Các chất hỗ trợ được chấp nhận có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tá dược hoàn chỉnh của Freund, tá dược không hoàn chỉnh của Freund, saponin, gel khoáng như nhôm hydroxit, chất hoạt động bề mặt như lysoluxithin, polyol pluronic, polyanion, peptit, dầu hoặc nhũ tương hydrocacbon, hemocyanin của keyhole limpet (KLH), dinitrophenol, và tương tự.

Dược phẩm có thể được sử dụng thông qua đường dùng bất kỳ được lựa chọn từ nhóm bao gồm trong não, não thất, trong màng bụng, qua da, trong cơ, trong màng cứng, trong tĩnh mạch, dưới da và đường mũi, và tốt hơn là dùng qua đường trong não, trong não thất, trong màng cứng, hoặc trong màng bụng.

Cụ thể, việc dùng trong não, trong não thất, hoặc trong màng cứng có thể hữu ích vì không cần quan tâm đến vấn đề thâm nhập hàng rào máu não (BBB). Ngoài ra, việc dùng trong não có thể được sử dụng trong trường hợp muốn biết tác dụng của thuốc trên một vùng nhất định trong não bằng cách đưa trực tiếp một lượng nhỏ thuốc vào vùng đó. Dùng trong não thất là phương pháp đưa thuốc vào não thất, và nó có thể được sử dụng trong trường hợp muốn biết tác dụng của thuốc trên toàn bộ vùng não. Ngoài ra, dùng trong màng cứng là phương pháp tiêm thuốc vào ống tủy sống bằng cách đưa kim vào khoảng trống xung quanh tủy sống giữa hai đốt sống ở phần dưới của cột sống, và nó có thể được sử dụng trong trường hợp thuốc là cần thiết để cung cấp tác động

nhANH chóng hoặc cục bộ lên não, tủy sống hoặc các lớp mô (màng não) bao phủ não hoặc tủy sống.

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể theo sáng chế có chức năng nhận thức, chức năng vận động được cải thiện hiệu quả ở mô hình động vật bị sa sút trí tuệ thông qua sử dụng trong màng bụng cũng như sử dụng trong não thất.

Dược phẩm được sử dụng với lượng có được hiệu. Thuật ngữ "lượng có được hiệu" như được sử dụng ở đây có nghĩa là lượng đủ để dược phẩm thể hiện tác dụng điều trị mà không gây ra tác dụng phụ hoặc các đáp ứng miễn dịch nghiêm trọng hoặc quá mức. Mức độ của lượng hiệu quả có thể khác nhau tùy thuộc vào các yếu tố khác nhau bao gồm rối loạn cần được điều trị, mức độ nghiêm trọng của rối loạn, hoạt tính của hợp chất cụ thể, đường dùng, tốc độ loại bỏ protein, thời gian điều trị, thuốc được sử dụng kết hợp hoặc đồng thời với protein, độ tuổi, cân nặng, giới tính, thói quen ăn uống, tình trạng sức khỏe chung của cá thể và các yếu tố đã biết trong lĩnh vực y tế.

Liều của dược phẩm được xác định một cách mong muốn dựa trên độ tuổi, giới tính, tình trạng của bệnh nhân, mức độ hấp thụ thành phần hoạt tính trong cơ thể, tốc độ bất hoạt và các thuốc được sử dụng kết hợp. Dược phẩm có thể được sử dụng với lượng từ 0,0001 mg/kg (trọng lượng cơ thể) đến 300 mg/kg (trọng lượng cơ thể) dựa trên kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, còn được đề xuất là phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thoái hóa thần kinh, phương pháp này bao gồm bước sử dụng kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó cho cá thể dự kiến sẽ phát triển bệnh thoái hóa thần kinh hoặc đã phát triển bệnh thoái hóa thần kinh.

Kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là như được mô tả ở trên.

Liều của kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó thay đổi trong phạm vi tùy thuộc vào cân nặng, độ tuổi, giới tính, tình trạng sức khỏe của bệnh nhân, chế độ ăn uống, thời gian dùng thuốc, phương pháp dùng thuốc, tốc độ bài tiết và mức độ nghiêm trọng của bệnh. Có thể dùng một liều duy nhất với lượng khoảng từ 0,001 mg/kg đến 300 mg/kg hàng ngày hoặc hàng tuần. Lượng hiệu quả có thể được quyết định theo quyết định của bác sĩ điều trị cho bệnh nhân.

Lượng hiệu quả của kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể thay đổi tùy thuộc vào các yếu tố khác nhau như tuổi tác, cân nặng, đặc điểm và mức độ triệu chứng của bệnh nhân, các loại phương pháp điều trị hiện thời, số lượng điều trị, dạng liều và đường dùng, và có thể dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực liên quan.

Kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể được sử dụng cùng với hoặc tuân tự với thành phần được lý hoặc sinh lý được đề cập ở trên, và nó cũng có thể được sử dụng kết hợp với chất trị liệu thông thường bổ sung, trong đó kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể được sử dụng tuân tự hoặc đồng thời với chất trị liệu thông thường. Việc sử dụng như vậy có thể là sử dụng đơn lẻ hoặc sử dụng nhiều lần. Cần nhắc tất cả các yếu tố trên, điều quan trọng là sử dụng một lượng mà là lượng tối thiểu và cho phép đạt được hiệu quả tối đa mà không có tác dụng phụ, và lượng này có thể được xác định dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Vẫn theo một khía cạnh khác của sáng chế, chế phẩm được đề xuất để chẩn đoán bệnh thoái hóa thần kinh, chế phẩm này chứa kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Kháng thể kháng tau có thể là kháng thể liên kết với protein tau đã được biến đổi. Các kháng thể được mô tả ở trên.

Cụ thể, đã xác định được rằng việc axetyl hóa axit amin thứ 280 trong trình tự axit amin của protein tau gây ra sự kết tụ tau và bệnh về thần kinh được điều tiết bởi protein tau. Kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với epitop chứa axit amin thứ 278 đến 284, với axit amin thứ 280 được axetyl hóa, trong trình tự axit amin của protein tau được biểu thị bởi SEQ ID NO: 25, và do đó, kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên có thể được sử dụng để chẩn đoán bệnh thần kinh được điều tiết bởi protein tau hiệu quả hơn.

Trong trường hợp sử dụng kháng thể, các thử nghiệm để xác định lượng protein tau đã biến đổi liên kết với nó bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phương pháp thẩm tách Western, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA), thử nghiệm phóng xạ (RIA), khuếch tán phóng xạ, khuếch tán miễn dịch Ouchterlony, điện di miễn dịch nhanh, nhuộm mô miễn dịch, thử nghiệm kết tủa miễn dịch, thử nghiệm cố định bổ

thể, dụng cụ phân loại tế bào hoạt hóa huỳnh quang (FACS), phương pháp chip protein, và tương tự.

Vẫn theo một khía cạnh khác của sáng chế, được đề xuất là kit để ngăn ngừa, điều trị hoặc chẩn đoán bệnh thoái hóa thần kinh, kit này bao gồm kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, polynucleotit, vector biểu hiện, hoặc tế bào chủ.

Vẫn theo một khía cạnh khác của sáng chế, kit chẩn đoán cho bệnh thoái hóa thần kinh được đề xuất, kit này bao gồm kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Kit này có thể được sử dụng để đo mức biểu hiện của protein tau đã được biến đổi từ mẫu của một cá thể, để chẩn đoán bệnh thoái hóa thần kinh. Ngoài ra, kháng thể cũng như chế phẩm, dung dịch hoặc thiết bị bao gồm một hoặc nhiều thành phần khác và phù hợp với phương pháp thử nghiệm có thể được đưa vào đó để đo mức biểu hiện của protein tau đã biến đổi.

Mẫu có thể được phân lập từ một cá thể bằng cách sử dụng quy trình đã biết. Thuật ngữ "mẫu" như được sử dụng ở đây bao gồm, nhưng không giới hạn ở, mẫu chẳng hạn như mô, tế bào, máu và huyết tương, mỗi mẫu có một mức biểu hiện khác nhau của protein tau đã được biến đổi và tương tự.

Ngoài ra, bước đo protein có thể được thực hiện bằng phương pháp thẩm tách western, ELISA, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, khuếch tán miễn dịch phóng xạ, khuếch tán miễn dịch Ouchterlony, điện di miễn dịch nhanh, nhuộm mô miễn dịch, thử nghiệm kết tủa miễn dịch, thử nghiệm cố định bổ thể, FACS hoặc phương pháp chip protein. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Thông qua các phương pháp thử nghiệm trên, có thể so sánh lượng phức hợp kháng nguyên-kháng thể được hình thành trong đối chứng bình thường với lượng phức hợp kháng nguyên-kháng thể được hình thành trong cá thể và để xác định bệnh về thần kinh được điều tiết bởi protein tau.

Thuật ngữ "phức hợp kháng nguyên-kháng thể" như được sử dụng ở đây có nghĩa là sự kết hợp của protein tau được biến đổi với kháng thể đặc hiệu của nó và lượng phức hợp kháng nguyên-kháng thể được tạo thành có thể được đo định lượng thông qua kích

thước tín hiệu của nhãn phát hiện. Nhãn phát hiện như vậy có thể được chọn từ nhóm gồm các enzym, chất huỳnh quang, phối tử, chất phát quang, vi hạt, phân tử oxy hóa khử và đồng vị phóng xạ, nhưng không nhất thiết phải giới hạn ở đó. Trong trường hợp sử dụng enzym làm nhãn phát hiện, các enzym có sẵn bao gồm β -glucuronidaza, β -D-glucosidaza, β -D-galactosidaza, ureaza, peroxidaza, kiềm phosphatasa, và các loại tương tự. Các phối tử bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các dẫn xuất biotin, và các chất tương tự.

Vẫn theo một khía cạnh khác của sáng chế, được đề xuất là việc sử dụng kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thoái hóa thần kinh.

Vẫn theo một khía cạnh khác của sáng chế, được đề xuất là việc sử dụng kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó để điều chế thuốc phòng ngừa hoặc điều trị bệnh thoái hóa thần kinh.

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết bằng các ví dụ. Tuy nhiên, các ví dụ sau đây chỉ nhằm minh họa cho sáng chế và sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Ví dụ thực hiện sáng chế

I. Chuẩn bị các mảnh protein tau đã biến đổi và các kháng thể dựa vào đó

Ví dụ điều chế 1. Chuẩn bị các mảnh protein tau biến đổi

Để chuẩn bị các mảnh protein tau biến đổi, trong trình tự axit amin của protein tau (2N4R) gồm 441 axit amin, các mảnh protein tau, mà hoạt động trong cơ chế sinh bệnh của bệnh Alzheimer và cho thấy tác dụng cải thiện chức năng nhận thức khi gây miễn dịch chủ động cho mô hình chuột biến đổi gen tau, được chọn. Như được minh họa trên Fig. 1, trong trình tự axit amin của các mảnh protein tau nằm trong miền liên kết vi ống, một phần gồm 12 axit amin được chỉ định.

Cụ thể, mảnh protein mà có, trong trình tự axit amin protein tau kiểu dại của SEQ ID NO: 25, phần trình tự axit amin thứ 275 đến 286, với axit amin thứ 280 được axetyl hóa, được chỉ định là K280-ac. Mảnh protein K280-ac được tạo ra bằng cách yêu cầu Peptron Inc. tạo ra các mảnh protein này.

Ngoài ra, mảnh protein K280-ac với hemoxyanin của keyhole limpet (KLH) liên kết ở đầu cuối N được tạo ra bằng cách yêu cầu ANYGEN Inc. (Nam-myeon, Hàn Quốc)

tạo ra các mảnh protein này. Mảnh protein K280-ac có KLH liên kết ở đầu cuối N được tinh chế bằng cách sử dụng hệ thống Shimadzu HPLC 10AVP (độ tinh khiết 91,8%) trong điều kiện gradien nồng độ với 5% đến 65% axetonitril trong TFA 0,05%.

Ngoài ra, mảnh protein của các miền lặp (RD) 1, 2, 3 và 4, mà chứa, trong trình tự axit amin protein tau kiểu đại của SEQ ID NO: 25, axit amin thứ 244 đến 372 (SEQ ID NO: 26) được chỉ định là K18. Vector chứa gen mã hóa mảnh protein K18 đã được chuyển nạp vào tế bào *E. coli* để tạo ra mảnh protein K18.

Cụ thể, mảnh protein K18 được tạo ra như sau. Vector biểu hiện pET-21b-Tau (K18) (Fig. 2) trước tiên được chuyển nạp vào *E. coli* BL21 (DE3), và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong môi trường LB chứa ampicillin ở nồng độ 50 µg/ml cho đến khi mật độ quang (OD) ở bước sóng 600 nm đạt đến 0,6 đến 0,8. Sau đó, việc xử lý bằng IPTG ở nồng độ 0,5 mM được thực hiện và sản phẩm thu được được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 3 giờ và nuôi cấy ở nhiệt độ 18°C trong 18 giờ.

Sau 18 giờ, khuẩn lạc đơn đã hình thành được nuôi cấy với môi trường nuôi cấy khởi động trong 5 ml môi trường LB chứa ampicillin ở nồng độ 50 µg/ml trong điều kiện ở nhiệt độ 37°C và 220 vòng/phút trong khoảng 16 giờ. Môi trường nuôi cấy khởi động được cấy, theo tỷ lệ 1:500, vào bình Erlenmeyer, trong đó 5 L môi trường LB chứa ampicillin ở nồng độ 50 µg/ml được đặt vào và sau đó được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 4 giờ. Sau đó, dịch cấy được ly tâm ở tốc độ 3500 vòng/phút trong 30 phút. Sau đó, phần nổi bề mặt được loại bỏ, và viên còn lại được cấp đông ở nhiệt độ -20°C.

Viên đông lạnh được tạo huyền phù lại trong dung dịch đệm phân giải (20 mM Tris-HCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl florua, pH=8,0) với tỷ lệ 25 ml/g. Tế bào được phân giải trong 30 phút ở điều kiện 1500 W bằng cách sử dụng thiết bị đồng nhất siêu âm JY99-IIDN. Sau đó, sản phẩm thu được được ly tâm trong điều kiện ở nhiệt độ 4°C và 15.000 vòng/phút trong 20 phút, và phần nổi bề mặt được lọc bằng bộ lọc 0,45 µm.

Dịch lọc được lọc qua cột His-Trap SP 5 mL được cân bằng với đệm A (20 mM Tris-HCl, pH=8,0). Để loại bỏ liên kết không đặc hiệu, thực hiện rửa với 5 thể tích cột (CV) của đệm A, và sau đó thực hiện rửa giải với gradien nồng độ từ 0 đến 1 M NaCl bằng cách sử dụng 10 CV đệm B (20 mM Tris-HCl, pH=8,0, 300 mM NaCl).

Các phần chứa mảnh protein K18 được thu thập, và sau đó các phần này được lọc qua cột Hi-Trap SP 5 mL được cân bằng với đệm C (20 mM Tris-HCl, pH=8,0, 300 mM NaCl, 50 mM imidazol). Để loại bỏ liên kết không đặc hiệu, thực hiện rửa với 10 CV đệm C. Sau đó, thực hiện rửa giải với 20 CV đệm D (20 mM Tris-HCl, pH=8,0, 300 mM NaCl, 100 mM imidazol). Dịch rửa giải chứa mảnh protein K18 tinh khiết được cô đặc bằng cách sử dụng bộ lọc ly tâm trọng lượng phân tử 10 kDa.

Mảnh protein K18 được axetyl hóa (acK18) được điều chế bằng cách cho dung dịch đệm axetyl hóa của axit (2-hydroxyetyl)-1-piperazin etan sulfonic (HEPES, 10 mM, pH=7,4), 50 mM NaCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM dithiothreitol (DTT), 2,5 mM EGTA, 0,1 mM EDTA, phản ứng với mảnh protein K18 ở nồng độ 8 μM , axetyl CoA ở nồng độ 125 μM và 0,5 μg enzym P300 mà là axetyltransferaza, ở nhiệt độ 30°C trong 3 giờ.

Kết tụ của các mảnh protein K18 được chuẩn bị bằng cách hòa tan các mảnh protein K18 ở nồng độ 25 μM trong dung dịch DTT 25 mM trong 1 giờ ở nhiệt độ 24°C và thực hiện khuấy trong dung dịch axit (2-hydroxyetyl)-1-piperazin etan sulfonic (HEPES, 10 mM, pH=7,4), NaCl (100 mM), heparin (25 mM) sử dụng bộ trộn nhiệt Eppendorf Thermomixer C trong điều kiện ở nhiệt độ 37°C và 700 vòng/phút.

Ví dụ điều chế 2. Chuẩn bị kháng thể liên kết với mảnh protein tau biến đổi

Kháng thể liên kết đặc hiệu với mảnh protein K280-ac được chuẩn bị trong Ví dụ điều chế 1 được tạo ra bằng cách yêu cầu AbFrontier, một công ty phát triển kháng thể đơn dòng chuột của Hàn Quốc, tạo ra kháng thể này. Tế bào lympho B thu được bằng cách tiêm mảnh protein K280-ac làm kháng nguyên vào chuột được tạo ra dưới dạng tế bào lai. Sau đó, dòng tế bào tạo ra kháng thể liên kết đặc hiệu với mảnh protein K280-ac được sàng lọc thông qua ELISA. Ngoài ra, việc sàng lọc thư viện biểu lộ thể thực khuẩn được thực hiện bởi các nhà nghiên cứu phát triển kháng thể tại các trường đại học ở Hàn Quốc, để phát triển các kháng thể liên kết đặc hiệu với mảnh protein K280-ac.

Kết quả là, một dòng tế bào lai của chuột (dòng tế bào lai của chuột) cuối cùng đã được chọn và các ứng viên được chọn thông qua sàng lọc thư viện biểu lộ thể thực khuẩn bị loại trừ vì chúng tạo ra kháng thể có ái lực thấp hơn so với dòng tế bào lai của

chuột. Kháng thể được tạo ra từ dòng tế bào lai của chuột được kiểm tra *in vitro*, thông qua phương pháp thẩm tách western và ELISA, để liên kết với mảnh protein K280-ac.

Kết quả là, xác định được rằng kháng thể được tạo ra từ dòng tế bào lai #15E5 (dòng #1) là kháng thể liên kết đặc hiệu với mảnh protein K280-ac (Fig. 3 và 4). Kháng thể được tạo ra từ dòng tế bào lai #15E5 cuối cùng được chọn lọc và chỉ định là ADEL-Y01m.

Bắt đầu từ kháng thể chuột này, các kháng thể được làm tương thích với người được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết thông thường bao gồm phân tích vùng biến đổi kháng thể, nghiên cứu CDR, lập mô hình phân tử, phân tích kháng thể dòng mầm của người, ghép CDR và giải trình tự gen, và các kháng thể được làm tương thích với người này được ký hiệu là ADEL-Y01h (v01 đến v10).

Mặt khác, dòng tế bào lai #15E5 đã được nộp lưu tại Korean Collection for Type Cultures (KCTC) của Hàn Quốc vào ngày 18/3/2020, và nó được gán số nộp lưu vi sinh vật là KCTC14155BP.

Ví dụ thử nghiệm 1. Xác định liên kết đặc hiệu kháng nguyên

Để xác định liên kết đặc hiệu của kháng thể ADEL-Y01m được điều chế trong Ví dụ điều chế 2 với protein tau được axetyl hóa, protein tau kiểu dại và protein tau (Tau K280A) trong đó axit amin thứ 280 lysin được thay thế bằng alanin được axetyl hóa *in vitro*. Tại đây, việc axetyl hóa protein Tau kiểu dại và protein Tau K280A được thực hiện theo cách tương tự như trong phương pháp chuẩn bị mảnh protein K18 được axetyl hóa trong Ví dụ điều chế 1. Sau đó, phản ứng liên kết đặc hiệu kháng nguyên-kháng thể của kháng thể ADEL-Y01m - được kiểm tra thông qua phương pháp thẩm tách Western.

Đầu tiên, nồng độ của protein Tau kiểu dại và protein Tau K280A được đo thông qua thử nghiệm Bradford. Mỗi trong số các protein được trộn với 4X đệm mẫu (60 mM Tris-HCl [pH=6,8], SDS 2% trọng lượng/thể tích, glyxerol 25% thể tích/thể tích, β -mercaptoethanol 14,4 mM thể tích/thể tích và xanh bromophenol). Sau đó, mỗi protein được điện di trên gel SDS-PAGE. Sau đó, gel điện di được tách ra và chuyển lên màng PVDF (BioRad, California, Hoa Kỳ). Việc xử lý bằng đệm chặn (Tween-20 0,1% thể tích/thể tích [PBST], BSA 3% trọng lượng/thể tích, hoặc sữa tách béo 5% thể tích/thể tích trong đệm PBS) được thực hiện và phản ứng được phép tiến hành trong 1 giờ. Sau đó, thực hiện xử lý với kháng thể kháng axetyl-lysin (kháng axetyl-lysin, Cell Signaling,

9441) hoặc kháng thể ADEL-Y01m làm kháng thể chính và phản ứng được phép tiến hành ở 4°C qua đêm. Ngày tiếp theo, màng PVDF được rửa ba lần bằng đệm rửa (Tween-20 0,1% thể tích/thể tích [PBST] trong đệm PBS), và sau đó được xử lý bằng kháng thể kháng IgG của chuột được đánh dấu HRP (Bioxcell, BE0083). Màng PVDF được xử lý bằng thuốc thử phát quang hóa học (Thermo Fisher Scientific). Sau đó, phép đo và phân tích được thực hiện bằng cách sử dụng phim x-quang và phần mềm ImageJ (NIH, Bethesda, MD).

Kết quả là, xác định được rằng kháng thể ADEL-Y01m không liên kết với protein Tau K280A và với protein Tau K280A được axetyl hóa (Fig. 5). Từ các kết quả này, đã xác định được rằng kháng thể ADEL-Y01m là kháng thể chỉ liên kết đặc hiệu với protein tau trong đó axit amin thứ 280 lysin được axetyl hóa.

Ngoài ra, để xác định liên kết đặc hiệu với kháng thể ADEL-Y01h01_v01 được chuẩn bị trong Ví dụ điều chế 2, phương pháp thẩm tách western được thực hiện theo cách tương tự như trên bằng cách sử dụng mảnh protein K280-ac và mảnh protein K18. Ở đây, kháng thể ADEL-Y01h01_v01 và kháng thể kháng IgG người được đánh dấu HRP (Bioxcell, BE0297) được sử dụng.

Kết quả là, xác định được rằng kháng thể ADEL-Y01h01_v01 thể hiện ái lực kháng thể cao với mảnh protein K280-ac (Fig. 6).

Ví dụ thử nghiệm 2. Xác định ái lực kháng nguyên-kháng thể

Ái lực giữa mảnh protein K280-ac được chuẩn bị trong Ví dụ điều chế 1 và kháng thể ADEL-Y01m được chuẩn bị trong Ví dụ điều chế 2 được đo thông qua Hệ thống Octet® K2 (ForteBio).

Kháng thể ADEL-Y01m được cố định trên cảm biến sinh học AR2G theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Bề mặt của cảm biến sinh học được hydrat hóa trong 10 phút, sau đó được kích hoạt bằng cách sử dụng hỗn hợp gồm 20 mM 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimite hydroclorua (EDC) và 10 mM N-hydroxysulfosuxinimit (s-NHS). Kháng thể ADEL-Y01m được cố định trên cảm biến sinh học đã hoạt hóa bằng cách sử dụng đệm natri axetat 10 mM (pH=5,0) và được dập tắt bằng 1M etanol amin (pH=8,0) trong 5 phút. Cảm biến sinh học mà trên đó kháng thể ADEL-Y01m được cố định được ngâm trong 1X đệm PBS (pH=7,4) trong 60 giây, để thiết lập đường cơ sở. Sau đó, bộ cảm biến sinh học được nhúng trong 60 giây trong

các giếng chứa các nồng độ khác nhau của mảnh protein K280-ac (kháng nguyên) hoặc peptit liên kết BSA. Sau đó, bộ cảm biến sinh học lại được nhúng vào 1X đệm PBS (pH=7,4) trong 10 phút để sự phân ly xảy ra. Dữ liệu thử nghiệm được đánh giá bằng phần mềm Phân tích dữ liệu Octet Data Analysis (bản SW: 9.0.0.10).

Kết quả là, đối với ái lực giữa kháng thể ADEL-Y01m và mảnh protein K280-ac, giá trị hằng số phân ly kháng nguyên (Kd) được đo là $2,57 \times 10^{-10}$ M (Fig. 7).

Ngoài ra, liên kết của mảnh protein K280-ac được chuẩn bị trong Ví dụ điều chế 1 với kháng thể ADEL-Y01h (v01 đến v12) được chuẩn bị trong Ví dụ điều chế 2 được đo bằng ELISA.

Đầu tiên, các đĩa được xử lý với mảnh protein K280-ac ở 250 ng/giếng và phản ứng được phép tiến hành ở 4°C qua đêm. Ngày tiếp theo, thực hiện rửa bằng đệm rửa ba lần, và sau đó thực hiện xử lý bằng kháng thể sơ cấp với 8 nồng độ (2 µg, 1 µg, 0,5 µg, 0,25 µg, 0,12 µg, 0,06 µg, 0,03 µg, 0,01 µg). Làm kháng thể thứ cấp, kháng thể kháng IgG người được đánh dấu HRP được sử dụng.

Kết quả là, xác định được rằng các kháng thể ADEL-Y01h (v01 đến v10) thể hiện ái lực kháng thể cao với mảnh protein K280-ac (Fig. 8).

II. Xác định tác dụng trị liệu do kháng thể ADEL-Y01m gây ra sử dụng mô hình động vật

Ví dụ điều chế 3. Chuẩn bị mô hình chuột mắc chứng sa sút trí tuệ

Chuột JNPL3 biểu hiện gen đột biến Tau-P301L được mua từ Taconic, và lai ngược với chuột C57BL/6 trong 5 thế hệ trong phòng động vật thí nghiệm của Viện Khoa học Đời sống Asan (Asan Institute for Life Sciences), Hàn Quốc. Sau đó, những con chuột được nuôi trong điều kiện không có mầm bệnh (SPE) cụ thể.

Ví dụ thử nghiệm 3. Xác định các đặc điểm của mô hình chuột mắc chứng sa sút trí tuệ

Mô hình chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L được sử dụng trong các thử nghiệm cho thấy sự khác biệt về sự tích tụ protein tau trong mô não theo sự già hóa, so với những con chuột bình thường. Thẩm tách miễn dịch sử dụng kháng thể ADEL-Y01m được chuẩn bị trong Ví dụ điều chế 2 được tiến hành.

Não được tách từ chuột bình thường và chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L, sau đó các protein hòa tan và không hòa tan được tách ra thông qua các phân đoạn Sarkosyl từ các mô não. Các mẫu não được đồng nhất với RABuffer B (100 mM MES, 0,75 M NaCl, 1 mM EGTA, 0,5 mM MgSO₄, 2 mM DTT, pH=6,8 + chất ức chế proteaza/phosphatase). Các mẫu được ủ trên đá trong 20 phút và ly tâm ở tốc độ 9000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C. Sau khi ly tâm, phần nổi bề mặt được thu gom (các protein hòa tan). Viên được đồng nhất với đệm chiết (1% Sarkosyl, 10 mM Tris, 10% sucroza, 0,85 M NaCl, 1 mM EGTA, pH=7,4). Các mẫu được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng và ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C. Sau khi ly tâm, phần nổi bề mặt được thu gom (kết tụ tau). Các protein sau khi tách ra được tiến hành thẩm tách western theo cách tương tự như trong Ví dụ thử nghiệm 1.

Kết quả là, mô hình chuột 12 tháng tuổi bị sa sút trí tuệ thể hiện sự tăng số lượng protein tau được axetyl hóa trong các mô não. Cụ thể, đã xác định được rằng mô hình chuột sa sút trí tuệ 4 tháng tuổi có mức biểu hiện protein tau tương tự như ở chuột bình thường, trong khi mô hình chuột sa sút trí tuệ 12 tháng tuổi thể hiện các triệu chứng sa sút trí tuệ nghiêm trọng có mức biểu hiện của protein tau gấp khoảng 2 lần so với chuột bình thường (Fig. 9).

Ví dụ thử nghiệm 4. Xác định tác dụng cải thiện hành vi do kháng thể ADEL-Y01m gây ra: Sử dụng trong não thất

Để xác định tác dụng điều trị do kháng thể ADEL-Y01m gây ra, kháng thể ADEL-Y01m được sử dụng cho não thất bên của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L được chuẩn bị trong Ví dụ điều chế 3 bằng cách sử dụng bơm thẩm thấu theo phác đồ thử nghiệm được minh họa trên Fig. 10.

Ví dụ thử nghiệm 4.1. Xác định tác dụng cải thiện hành vi thông qua thử nghiệm xây tổ

Thử nghiệm xây tổ mà có thể xác định chức năng não đa phương thức của chuột được thực hiện.

Cụ thể, 2/3 lứa đẻ trong lồng nơi chuột được nuôi được lấy ra và 4 lớp bông vô trùng (5 cm × 5 cm) được đặt vào lồng. Một con chuột được phép vào một lồng. Sáng hôm sau, mức độ hoàn thiện của tổ được phân tích.

Điểm số theo sự hoàn thiện của tổ được tính bằng cách chia nó thành 1 đến 5 điểm. Đối với trường hợp bông vô trùng đã cung cấp được duy trì ở mức 90% hoặc cao hơn hoặc hầu như không bị chạm vào, trường hợp đó được tính là 1 điểm; và đối với trường hợp bông vô trùng được duy trì ở mức khoảng 50% đến 90% và bị rách một phần, trường hợp đó được tính là 2 điểm. Đối với trường hợp bông vô trùng bị rách 50% hoặc cao hơn và rải rác xung quanh chuồng, trường hợp đó được tính là 3 điểm; và đối với trường hợp bông vô trùng bị rách 90% hoặc cao hơn và tập trung ở phía bên của lồng, trường hợp đó được tính là 4 điểm. Đối với trường hợp bông vô trùng bị rách hoàn toàn và hình dạng tổ hoàn chỉnh được hình thành ở phía bên của lồng, trường hợp đó được tính là 5 điểm.

Kết quả là, được xác định rằng chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L biểu hiện giảm điểm số xây tổ khoảng 60% so với chuột bình thường và chuột sa sút trí tuệ (Tau-P301L-ADEL-Y01m) được sử dụng kháng thể ADEL-Y01m cho thấy điểm số xây tổ tương tự như chuột bình thường (Fig. 11).

Ví dụ thử nghiệm 4.2. Xác định tác dụng cải thiện hành vi thông qua thử nghiệm mê cung chữ Y

Thử nghiệm mê cung chữ Y được thực hiện để xác định sự phục hồi của chức năng nhận thức. Thử nghiệm mê cung chữ Y là thử nghiệm để xác định khả năng ghi nhớ ngắn hạn. Cụ thể, các vùng A, B và C được đặt trong một hộp hình chữ Y, và các con chuột được phép tự do di chuyển trong 5 phút ở trạng thái vùng B bị chặn. Một giờ sau, trạng thái ở đó vùng B bị chặn được loại bỏ và sự di chuyển của các con chuột được quan sát trong 5 phút ở trạng thái trong đó tất cả các vùng đều mở.

Kết quả là, trong trường hợp của chuột Tau-P301L, thời gian ở lại trong vùng A hoặc C là 100 giây hoặc ngắn hơn, giảm khoảng 50% so với chuột bình thường. Mặt khác, trong trường hợp chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L-ADEL-Y01m được cho sử dụng kháng thể ADEL-Y01m, thời gian ở lại trong vùng A hoặc C là khoảng 150 giây, tương tự như bình thường chuột. Từ những kết quả này, xác định rằng khả năng ghi nhớ ngắn hạn của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L-ADEL-Y01m được phục hồi (Fig. 12).

Ví dụ thử nghiệm 4.3. Xác định tác dụng cải thiện hành vi thông qua thử nghiệm mê cung nước

Thử nghiệm mê cung dưới nước được thực hiện để đánh giá khả năng học và ghi nhớ của các con chuột. Đối với thiết bị và chương trình được sử dụng cho thử nghiệm mê cung dưới nước, thiết bị hành vi được sở hữu bởi phòng động vật thí nghiệm của Viện Khoa học Đời sống Asan đã được sử dụng. Cụ thể, thử nghiệm mê cung dưới nước mất tổng cộng 5 ngày. Các con chuột được đào tạo trong 4 ngày ở trạng thái trong đó bộ và tín hiệu trực quan cho vị trí của bộ được đặt.

Nghiên cứu được tiến hành bằng cách đổ nước ($29 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) vào một bể bơi (đường kính 1,4 m, sâu 45 cm) có bộ đến độ sâu khoảng 26,5 cm, sau đó thêm 1,5L sữa bột nguyên chất để làm vẩn đục nước để chuột có thể nhớ bộ chỉ bằng tín hiệu. Sau đó, các con chuột được thích nghi với việc bơi tự do trong 60 giây và được phép nghỉ ngơi trên bộ trong 1 phút. Thử nghiệm được thực hiện tổng cộng 12 lần với 4 lượt ở ba vị trí bắt đầu khác nhau. Vào cuối mỗi thử nghiệm, có 30 giây giải lao. Vào cuối một lượt, có 30 đến 45 phút giải lao.

Sau 4 ngày học, thử nghiệm được thực hiện vào ngày thứ 5. Trong thử nghiệm để đánh giá, bộ không được đặt và số lượng ở lại khu vực đặt bộ được đo để xác định xem liệu các con chuột có ghé đúng vị trí bộ chỉ bằng cách sử dụng tín hiệu hay không. Ngoài ra, các con chuột được phép đến vị trí đã đặt bộ trong vòng một phút. Nếu các con chuột không đến được vị trí bộ trong vòng một phút, các con chuột này sẽ được đưa ra khỏi bể bơi.

Đầu tiên, thời gian để các con chuột tìm thấy bộ trong 4 ngày học được đo. Kết quả là, trong trường hợp chuột Tau-P301L, thời gian cần thiết để tìm thấy bộ là 20 giây hoặc lâu hơn trong 4 ngày. Mặt khác, trong trường hợp chuột bình thường và chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L-ADEL-Y01m được sử dụng kháng thể ADEL-Y01m, thời gian cần thiết để tìm ra bộ đã giảm xuống còn 20 giây hoặc ngắn hơn bắt đầu từ ngày thứ 2 (Fig. 13).

Ngoài ra, vào ngày thứ 5, đánh giá được thực hiện về thời gian ở lại vùng NW nơi bộ đã được đặt. Kết quả là, xác định được rằng chuột Tau-P301L ở lại trong vùng NW trong 10 giây hoặc ngắn hơn, trong khi chuột bình thường và chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L-ADEL-Y01m được sử dụng kháng thể ADEL-Y01m ở lại trong vùng NW trong 20 giây hoặc ngắn hơn (Fig. 14).

Ví dụ thử nghiệm 4.4. Xác định tác dụng cải thiện hành vi thông qua thử nghiệm độ bền bám

Thử nghiệm độ bền bám đã được thực hiện để xác định sức mạnh cơ bắp của các con chuột. Đối với một bó sắt được sử dụng trong các thử nghiệm, thiết bị hành vi của Viện Khoa học Đời sống Asan được sử dụng. Ở đây, bó sắt nặng 40 g được sử dụng. Các con chuột được chuẩn bị trong Ví dụ điều chế 3 được giữ bằng đuôi, và chân trước của chuột được đặt trên bó sắt 40 g để chuột có thể nắm lấy bó sắt. Sau đó, các con chuột được nâng lên độ cao khoảng 30 cm trong tình trạng đuôi của chúng được giữ chặt. Thời gian cho đến khi các con chuột tuột khỏi bó sắt được đo và so sánh với các con chuột tương ứng.

Kết quả là, các con chuột bình thường cho thấy thời gian đo được đối với độ bền bám là 20 giây hoặc ngắn hơn, và chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L cho thấy thời gian đo được cho độ bền bám là 5 giây hoặc ngắn hơn. Ngược lại, trong trường hợp chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L-ADEL-Y01m được sử dụng kháng thể ADEL-Y01m, thời gian đo được cho độ bền bám là 20 giây hoặc lâu hơn mà là lâu hơn so với thời gian ở chuột bình thường (Fig. 15). Từ những kết quả này, đã xác định được rằng khả năng vận động của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L-ADEL-Y01m mà được sử dụng kháng thể ADEL-Y01m được phục hồi.

Ví dụ thử nghiệm 5. Xác định tác dụng cải thiện hành vi của kháng thể ADEL-Y01m: Dùng trong màng bụng

Để xác định hiệu quả điều trị của kháng thể ADEL-Y01m, kháng thể ADEL-Y01m được sử dụng trong màng bụng cho chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L được chuẩn bị trong Ví dụ điều chế 3 trong 3 tháng theo phác đồ thử nghiệm được minh họa trên Fig. 16.

Ví dụ thử nghiệm 5.1. Xác định tác dụng cải thiện hành vi thông qua thử nghiệm xây tổ

Thử nghiệm xây tổ có thể xác định chức năng não đa phương thức của chuột được thực hiện theo cách tương tự như Ví dụ thử nghiệm 4.1.

Kết quả là, đã xác định được rằng chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L thể hiện sự giảm khoảng 60% điểm số xây tổ so với chuột bình thường, và chuột sa sút trí tuệ Tau-

P301L-ADEL-Y01m được sử dụng kháng thể ADEL-Y01m thể hiện điểm số xây tổ tương tự như các con chuột bình thường (Fig. 17).

Ví dụ thử nghiệm 5.2. Xác định tác dụng cải thiện hành vi thông qua thử nghiệm mê cung chữ Y

Thử nghiệm mê cung chữ Y được thực hiện theo cách tương tự như trong Ví dụ Thử nghiệm 4.2 để xác định sự phục hồi chức năng nhận thức. Kết quả là, trong trường hợp chuột Tau-P301L, thời gian ở lại trong vùng A hoặc C là khoảng 80 giây, giảm khoảng 50% so với chuột bình thường. Mặt khác, trong trường hợp chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L-ADEL-Y01m được sử dụng kháng thể ADEL-Y01m, thời gian ở lại trong vùng A hoặc C là khoảng 110 giây, tương tự như bình thường chuột. Từ các kết quả này, xác định được rằng khả năng ghi nhớ ngắn hạn của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L-ADEL-Y01m được phục hồi (Fig. 18).

Ví dụ thử nghiệm 5.3. Xác định tác dụng cải thiện hành vi thông qua thử nghiệm mê cung nước

Thử nghiệm mê cung dưới nước được thực hiện theo cách tương tự như trong Thử nghiệm 4.3. Thời gian để các con chuột tìm thấy bệ trong 4 ngày học được đo. Kết quả là, trong trường hợp chuột Tau-P301L, thời gian cần thiết để tìm thấy bệ là 20 giây hoặc ngắn hơn trong 4 ngày. Mặt khác, trong trường hợp chuột bình thường và chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L-ADEL-Y01m được sử dụng kháng thể ADEL-Y01m, thời gian cần thiết để tìm bệ giảm xuống còn 15 giây hoặc ngắn hơn bắt đầu từ ngày thứ 3 (Fig. 19).

Ngoài ra, vào ngày thứ 5, đánh giá được thực hiện về thời gian ở lại vùng NW nơi bệ đã được đặt. Kết quả là, xác định được rằng chuột Tau-P301L ở lại trong vùng NW trong 20 giây hoặc ngắn hơn, trong khi chuột bình thường và chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L-ADEL-Y01m được sử dụng kháng thể ADEL-Y01m ở lại trong vùng NW trong khoảng 25 giây (Fig. 20).

Ví dụ thử nghiệm 6. Xác định I về liên kết đặc hiệu giữa kháng thể ADEL-Y01m và protein tau biến đổi được biểu hiện ở mô chuột

Vỏ não và mô hồi hải mã của chuột bình thường và chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L được chuẩn bị trong Ví dụ điều chế 3 được đưa qua bước kết tủa miễn dịch (IP) và thẩm tách western bằng cách sử dụng IgG và kháng thể ADEL-Y01m.

Đầu tiên, đệm mẫu được chuẩn bị bằng cách thêm 1% Tx-100, 100 mM NaCl và 50 mM HEPES vào nước cất, và điều chỉnh pH đến pH=7,4. Sau đó, đệm mẫu được sử dụng để tái tạo huyền phù cho vỏ não và mô hồi hải mã của chuột bình thường và chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L, để thu được các mẫu được tạo huyền phù lại. Mỗi mẫu thu được được xử lý bằng kháng thể IgG hoặc ADEL-Y01m, và phản ứng được phép tiến hành trong 24 giờ. Sau đó, mẫu được xử lý với 100 μ l hạt protein G-agarosa (GE Healthcare Life Sciences), và phản ứng được phép tiến hành ở 4°C qua đêm. Ngày hôm sau, thực hiện ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút trong 1 phút ở 4°C, để thu thập mẫu, và thực hiện rửa ba lần với PBS chứa 0,1% Triton X-100. Mẫu được xử lý bằng 1X đệm mẫu, và được thẩm tách western. Ở đây, thẩm tách western được thực hiện theo cách tương tự như trong Ví dụ thử nghiệm 1 và IgG, kháng thể ADEL-Y01m và kháng thể kháng IgG chuột được đánh dấu HRP được sử dụng.

Kết quả là, xác định được rằng có phản ứng liên kết đặc hiệu giữa kháng thể ADEL-Y01m và protein tau (Tau-acK280), trong đó axit amin thứ 280 lysin được axetyl hóa, trong vỏ não và mô hồi hải mã của chuột sa sút trí tuệ Tau -P301L. Ngoài ra, từ các kết quả này, đã xác định được rằng kháng thể ADEL-Y01m liên kết tốt với protein tau được biến đổi được biểu hiện trong mô não *in vivo* (Fig. 21).

Ví dụ thử nghiệm 7. Xác định II về liên kết giữa kháng thể ADEL-Y01m và protein tau biến đổi được biểu hiện trong mô người

Để xác định liên kết đặc hiệu giữa kháng thể ADEL-Y01m và protein tau biến đổi được biểu hiện trong mô não người, vỏ não thái dương trong mô não của người già bình thường và bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer được nhuộm hóa mô miễn dịch bằng cách sử dụng kháng thể ADEL-Y01m.

Đầu tiên, mỗi vỏ não thái dương trong mô não của người già bình thường và bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer được cắt ra và gắn vào phiến kính. Các mô não được cung cấp bởi Ngân hàng Não Hà Lan (Netherlands Brain Bank). Phần này được rửa bằng 1X PBS, và quá trình thấu qua được thực hiện với 1X PBS chứa 0,1% Triton X-100 ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Sau đó, phần này được rửa và chặn bằng PBS chứa

3% BSA ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Phần này được rửa bằng 1X PBS và cho phản ứng với kháng thể ADEL-Y01m ở 4°C qua đêm.

Ngày hôm sau, đối với phương pháp nhuộm diaminobenzidin (DAB), phần thu được bằng cách cho phản ứng với kháng thể sơ cấp qua đêm được rửa bằng 1X PBS. Phần này được cho phản ứng với kháng thể kháng IgG chuột được biotin hóa (Vector Laboratories, California, Hoa Kỳ) làm kháng thể thứ cấp ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Phần này được rửa bằng 1X PBS, được xử lý bằng phức hợp avidin-biotin-peroxidaza (Vector Laboratories, California, Hoa Kỳ), và cho phản ứng. Phần mô não được để phản ứng trong 10 phút trong dung dịch DAB, và sau đó được rửa bằng 1X PBS. Phần này được gắn lên banzan Canada (Sigma-Aldrich). Phần này được chụp bằng kính hiển vi Zeiss (Carl Zeiss, Oberkochen, Đức) và hình ảnh được xử lý bằng Hệ thống chụp ảnh AxioVision.

Kết quả là, mẫu nhuộm với kháng thể ADEL-Y01m không được quan sát thấy trên vỏ não thái dương của người già bình thường, trong khi mẫu nhuộm với kháng thể ADEL-Y01m được quan sát thấy trên vỏ não thái dương của bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer. Ngoài ra, từ các kết quả này, đã xác định được rằng kháng thể ADEL-Y01m liên kết tốt với protein tau được biến đổi biểu hiện trong mô não *in vivo* (Fig. 22).

Ngoài ra, các mô não của người già bình thường và bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer đã được phân tích thông qua phương pháp thẩm tách western. Ở đây, thẩm tách western được thực hiện theo cách tương tự như trong Ví dụ thử nghiệm 1, và kháng thể kháng Tau5 (Invitrogen, AHB0042), kháng thể kháng axetyl-K280 (Anaspec, AS-56077), kháng thể kháng dạng tinh bột β (Covance, SIG-39300), kháng thể kháng GAPDH (Millipore, MAB374) và kháng thể kháng IgG người được đánh dấu HRP được sử dụng.

Kết quả là, mức biểu hiện tăng của toàn bộ protein tau, protein tau được axetyl hóa, và dạng tinh bột β được quan sát thấy trong mô não của bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer so với mô não của người già bình thường (Fig. 23A). Cụ thể, protein tau được axetyl hóa (Tau-acK280) đã được quan sát thấy nhiều hơn khoảng 3 lần trong các mô não của bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer (Fig. 23B).

Ví dụ thử nghiệm 8. Xác định tác dụng làm nhẹ bệnh lý tau sau khi sử dụng kháng thể ADEL-Y01m trong não thất

Để xác định tác dụng làm nhẹ bệnh lý tau sau khi sử dụng kháng thể ADEL-Y01m, các mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L mà IgG hoặc kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào qua đường trong não thất và chuột bình thường được tách, và mức biểu hiện của toàn bộ protein tau (Tau5), protein tau được axetyl hóa (Tau-acK280) và tau (Ser396) thu được bằng cách phosphoryl hóa serin, axit amin thứ 396, trong trình tự axit amin của protein tau đã được kiểm tra thông qua phương pháp thẩm tách western. Ở đây, thẩm tách western được thực hiện theo cách tương tự như trong Ví dụ thử nghiệm 1 và kháng thể kháng Tau5 (Invitrogen, AHB0042), kháng thể kháng pSer396 (Thermo, 44-752G), kháng thể kháng axetyl-K280 (Anaspec, AS-56077), và kháng thể kháng IgG chuột được đánh dấu HRP (Bioxcell, BE0083) được sử dụng.

Kết quả là, đã xác định được rằng toàn bộ protein tau, protein tau được axetyl hóa và protein tau được phosphoryl hóa có mặt với số lượng cao hơn trong các mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L, trong đó IgG đã được đưa vào qua đường trong não thất, so với trong mô não của chuột bình thường. Mặt khác, toàn bộ protein tau, protein tau được axetyl hóa và protein tau được phosphoryl hóa có mặt với số lượng thấp hơn trong các mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L, trong đó kháng thể ADEL-Y01m đã được đưa vào qua đường trong não thất, so với trong các mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L, trong đó IgG đã được đưa vào qua đường trong não thất (Fig. 24 đến 27).

Ngoài ra, việc nhuộm hóa mô miễn dịch được thực hiện để xác định mức biểu hiện của protein tau (pSer202/pThr205), thu được bằng cách phosphoryl hóa axit amin thứ 202 serin và axit amin thứ 205 threonin trong trình tự axit amin của protein tau, và tau được phosphoryl hóa (pT231) trong mô não của chuột. Ở đây, phương pháp nhuộm hóa mô miễn dịch được thực hiện theo cách tương tự như trong Ví dụ thử nghiệm 7 và kháng thể kháng AT8 (Thermo, MN1020) và kháng thể kháng pT231 (Thermo, MN1040) được sử dụng làm kháng thể sơ cấp.

Kết quả là, mức biểu hiện tăng của protein tau được phosphoryl hóa được quan sát thấy trong các mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L, trong đó IgG đã được đưa vào qua đường trong não thất, so với các mô não của chuột bình thường. Mặt khác, mức biểu hiện giảm của protein tau được phosphoryl hóa đã được quan sát thấy trong các mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L, trong đó kháng thể ADEL-Y01m đã được đưa

vào qua đường trong não thất, so với các mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L. chuột, trong đó IgG đã được đưa vào qua đường trong não thất (Fig. 28 và 29).

Ví dụ thử nghiệm 9. Xác định tác dụng làm nhẹ bệnh lý tau sau khi dùng kháng thể ADEL-Y01m qua đường trong màng bụng

Để xác định tác dụng làm nhẹ bệnh lý tau sau khi sử dụng kháng thể ADEL-Y01m, các mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L-ADEL-Y01m, trong đó IgG hoặc kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào trong màng bụng với lượng 50 mg/kg, và chuột bình thường được tách ra, và mức biểu hiện của toàn bộ protein tau (Tau5), tau được axetyl hóa và tau được phosphoryl hóa (pT231) được kiểm tra thông qua phương pháp thẩm tách western bán biến tính. Ở đây, thẩm tách western bán biến tính được thực hiện theo cách tương tự như thẩm tách western trong Ví dụ thử nghiệm 1, ngoại trừ mô não chuột được trộn với 2X đệm mẫu laemmli không có β -mercaptoethanol. Ngoài ra, kháng thể kháng Tau5 (Invitrogen, AHB0042), kháng thể kháng pT231 (Thermo, MN1040), kháng thể kháng axetyl-K280 (Anaspec, AS-56077) và kháng thể kháng IgG chuột được đánh dấu HRP (Bioxcell, BE0083) được sử dụng.

Kết quả là, đã xác định được rằng dạng oligome của toàn bộ protein tau, protein tau được phosphoryl hóa và protein tau được axetyl hóa có mặt với lượng cao hơn trong các mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L, trong đó IgG đã được đưa vào trong màng bụng, so với trong các mô não của chuột bình thường. Mặt khác, toàn bộ protein tau, protein tau được phosphoryl hóa và protein tau được axetyl hóa có mặt với lượng thấp hơn đáng kể trong các mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L-ADEL-Y01m trong đó kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào trong màng bụng, so với trong các mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L được sử dụng IgG trong màng bụng (Fig. 30 đến 33).

Ví dụ thử nghiệm 10. Xác định tác dụng cải thiện synap do kháng thể ADEL-Y01m gây ra: Sử dụng trong não thất

Để xác định tác dụng cải thiện synap sau khi sử dụng kháng thể ADEL-Y01m, các mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L, trong đó IgG hoặc kháng thể ADEL-Y01m được đưa vào trong não thất với lượng 50 mg/kg, và chuột bình thường được tách ra, và thực hiện thẩm tách western trên các protein liên quan đến synap. Ở đây, thẩm tách western được thực hiện theo cách tương tự như trong Ví dụ thử nghiệm 1 và

kháng thể kháng PSD95 (Abcam, ab2723), kháng thể kháng synapsin-1 (Chemicon, MAB355), kháng thể kháng β -actin (Sigma, A5441), và kháng thể kháng IgG chuột được đánh dấu HRP (Bioxcell, BE0083) được sử dụng.

Kết quả là, mức biểu hiện tăng của PSD59 và synapsin-1 được quan sát thấy trong các mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L được sử dụng IgG trong não thất, so với các mô não của chuột bình thường. Mặt khác, mức biểu hiện giảm của PSD59 và synapsin-1 được quan sát thấy trong các mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L được sử dụng kháng thể ADEL-Y01m trong não thất, so với các mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L được sử dụng IgG trong mạch não (Fig. 34 đến 36).

Ví dụ thử nghiệm 11. Xác định tác dụng cải thiện synap do kháng thể ADEL-Y01m gây ra: Dùng trong màng bụng

Để xác định tác dụng cải thiện synap sau khi sử dụng kháng thể ADEL-Y01m, các mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L được sử dụng IgG hoặc kháng thể ADEL-Y01m trong màng bụng với lượng 50 mg/kg, và chuột bình thường được tách ra, và thẩm tách western được thực hiện trên các protein liên quan đến synap. Ở đây, thẩm tách western được thực hiện theo cách tương tự như trong Ví dụ thử nghiệm 10.

Kết quả là, mức biểu hiện tăng của PSD59 và synapsin-1 được quan sát thấy trong mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L được sử dụng IgG trong màng bụng, so với mô não của chuột bình thường. Mặt khác, mức biểu hiện giảm của PSD59 và synapsin-1 được quan sát thấy trong các mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L được sử dụng kháng thể ADEL-Y01m trong màng bụng, so với các mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L được sử dụng IgG trong màng bụng (Fig. 37 đến 39).

Ví dụ thử nghiệm 12. Xác định sự xâm nhập của kháng thể ADEL-Y01m vào mô não và liên kết của nó với kháng nguyên sau khi sử dụng kháng thể ADEL-Y01m trong màng bụng

Để xác định sự phân bố kháng thể trong mô não sau khi sử dụng kháng thể ADEL-Y01m trong màng bụng, chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L được sử dụng kháng thể ADEL-Y01m trong màng bụng với lượng 50 mg/kg, và chuột bình thường được truyền dịch tim bằng nước muối sinh lý. Sau đó, các mô não được tách ra từ đó và đưa qua bước kết tủa miễn dịch với protein-G sepharosa (PGS). Sau đó, thực hiện thẩm tách western bằng cách sử dụng kháng thể kháng IgG chuột. Ở đây, thẩm tách western được

thực hiện theo cách tương tự như trong Ví dụ thử nghiệm 1 và kháng thể kháng Tau5 (Invitrogen, AHB0042), kháng thể kháng axetyl-K280 (Anaspec, AS-56077) và kháng thể kháng IgG chuột được đánh dấu HRP (Bioxcell, BE0083) được sử dụng.

Kết quả là, không có kháng thể nào được phát hiện trong mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L sử dụng IgG trong màng bụng. Mặt khác, xác định được rằng kháng thể có trong các mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L được sử dụng kháng thể ADEL-Y01m trong màng bụng (Fig. 40).

Ví dụ thử nghiệm 13. Xác định tác dụng cải thiện hành vi do kháng thể ADEL-Y01m gây ra ở mô hình chuột sa sút trí tuệ tuổi già: Dừng trong màng bụng

Để xác định hiệu quả điều trị của kháng thể ADEL-Y01m, mô hình chuột sa sút trí tuệ tuổi già đã được tạo ra bằng cách sử dụng chuột 14 tháng tuổi theo cách tương tự như trong Ví dụ điều chế 3. Sử dụng mô hình chuột sa sút trí tuệ tuổi già, kháng thể ADEL-Y01m được chuẩn bị trong Ví dụ điều chế 2 được thực hiện theo phác đồ thử nghiệm được minh họa trên Fig. 41.

Ví dụ thử nghiệm 13.1. Xác định tác dụng cải thiện hành vi thông qua thử nghiệm xây tổ

Thử nghiệm xây tổ mà có thể xác định chức năng não đa phương thức của chuột được thực hiện theo cách tương tự như Ví dụ thử nghiệm 4.1.

Kết quả là, xác định được rằng chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L có điểm xây tổ giảm khoảng 60% so với chuột bình thường, và chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L-ADEL-Y01m được sử dụng kháng thể ADEL-Y01m thể hiện điểm xây tổ tương tự như chuột bình thường (Fig. 42).

Ví dụ thử nghiệm 13.2. Xác định tác dụng cải thiện hành vi thông qua thử nghiệm mê cung chữ Y

Thử nghiệm mê cung chữ Y được thực hiện, theo cách tương tự như trong Ví dụ Thử nghiệm 4.2, để xác định sự phục hồi chức năng nhận thức.

Kết quả là, trong trường hợp của chuột Tau-P301L, thời gian ở trong vùng A hoặc C là khoảng 80 giây, giảm khoảng 25% so với chuột bình thường. Mặt khác, trong trường hợp chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L-ADEL-Y01m được sử dụng kháng thể ADEL-Y01m, thời gian ở trong vùng A hoặc C là khoảng 120 giây, tương tự như chuột

bình thường. Từ các kết quả này, xác định được rằng khả năng ghi nhớ ngắn hạn của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L-ADEL-Y01m được phục hồi (Fig. 43).

Ví dụ thử nghiệm 13.3. Xác định tác dụng cải thiện hành vi thông qua thử nghiệm mê cung nước

Thử nghiệm mê cung dưới nước được thực hiện theo cách tương tự như trong Thử nghiệm 4.3.

Kết quả là, vào ngày thứ 5, đánh giá được thực hiện về thời gian ở lại vùng NW nơi bệ được đặt. Kết quả là, xác định được rằng chuột Tau-P301L ở lại trong vùng NW trong 10 giây hoặc ngắn hơn, trong khi chuột bình thường và chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L-ADEL-Y01m được sử dụng kháng thể ADEL-Y01m ở lại trong vùng NW trong 25 giây hoặc lâu hơn (Fig. 44).

Ví dụ thử nghiệm 14. Xác định tác dụng làm nhẹ bệnh lý tau do kháng thể ADEL-Y01m gây ra trên mô hình chuột sa sút trí tuệ tuổi già: Dùng trong màng bụng

Để xác định tác dụng làm nhẹ bệnh lý tau sau khi sử dụng kháng thể ADEL-Y01m, các mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L tuổi già được sử dụng IgG hoặc kháng thể ADEL-Y01m trong màng bụng với lượng 50 mg/kg, và chuột bình thường được tách ra, và mức biểu hiện của toàn bộ protein tau (Tau5), protein tau được axetyl hóa (Tau-acK280) và tau được phosphoryl hóa (pT231) được kiểm tra thông qua phương pháp thẩm tách western. Ở đây, thẩm tách western được thực hiện theo cách tương tự như trong Ví dụ thử nghiệm 1 và kháng thể kháng Tau5 (Invitrogen, AHB0042), kháng thể kháng pT231 (Thermo, MN1040), kháng thể kháng axetyl-K280 (Anaspec, AS-56077), và kháng thể kháng IgG chuột được đánh dấu HRP (Bioxcell, BE0083) được sử dụng.

Kết quả là, mức biểu hiện tăng của dạng oligome của toàn bộ protein tau, protein tau được phosphoryl hóa và protein tau được axetyl hóa đã được quan sát thấy trong các mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L được sử dụng IgG trong màng bụng. Mặt khác, mức biểu hiện giảm đáng kể của toàn bộ protein tau, protein tau được phosphoryl hóa và protein tau được axetyl hóa được quan sát thấy trong các mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L được sử dụng kháng thể ADEL-Y01m trong màng bụng, so với các mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L được sử dụng IgG trong màng bụng (Fig. 45 đến 48).

Ngoài ra, mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L tuổi già được sử dụng IgG hoặc kháng thể ADEL-Y01m trong não thất với lượng 50 mg/kg, và chuột bình thường được tách ra, và các mô vỏ não được phân lập một phần từ đó sử dụng axit fomic. Trong các mô vỏ não, các kết tụ tau không hòa tan được kiểm tra thông qua phương pháp thẩm tách western nửa biến tính. Ở đây, thẩm tách western bán biến tính được thực hiện theo cách tương tự như trong Ví dụ thử nghiệm 9.

Kết quả là, sự gia tăng các kết tụ tau không hòa tan được quan sát thấy trong các mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L được sử dụng IgG trong màng bụng. Mặt khác, sự giảm đáng kể các kết tụ tau không hòa tan được quan sát thấy trong các mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L được sử dụng kháng thể ADEL-Y01m trong màng bụng, so với các mô não của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L được sử dụng IgG trong màng bụng (Fig. 49).

III. Xác định tác dụng ức chế tạo hạt Tau của kháng thể kháng tau

Ví dụ thử nghiệm 15. Xác định sự kết tụ tau và tạo hạt của protein tau được axetyl hóa

Đầu tiên, protein tau kiểu kiểu dại (Tau) được cho phản ứng *in vitro* với enzym P300, một axetyltransferaza. Các tế bào thần kinh nuôi cấy được xử lý bằng protein tau được axetyl hóa (Tau-K280-ac), mà đã được cho phản ứng với P300. Để xác định liệu protein tau được axetyl hóa có gây ra sự kết tụ nội bào hay không, thực hiện xử lý với protein tau được axetyl hóa hoặc protein tau kiểu dại và thẩm tách western được thực hiện trên dịch phân giải của tế bào cho bằng cách sử dụng kháng thể kháng HA (Sigma-Aldrich, #11867423001) khi đã trôi qua 1 giờ hoặc 20 giờ.

Ở đây, thẩm tách western được thực hiện theo cách tương tự như trong Ví dụ thử nghiệm 1 và kháng thể kháng Tau5 (Invitrogen, AHB0042), kháng thể kháng axetyl-K280 (Anaspec, AS-56077), kháng thể kháng β -actin (Sigma, A5441), kháng thể kháng HA (Sigma, # 11867423001) và kháng thể kháng IgG chuột đánh dấu HRP (Bioxcell, BE0083) được sử dụng. Kết quả là, sự kết tụ tăng của toàn bộ protein tau (Tau5) và protein tau được axetyl hóa (Tau-acK280) được quan sát thấy trong dịch phân giải của các tế bào cho được xử lý bằng protein tau được axetyl hóa (Fig. 50).

Ngoài ra, để xác định liệu lượng protein tau tiết ra khỏi tế bào có thay đổi hay không, môi trường tế bào cho được tiến hành kết tủa miễn dịch bằng cách sử dụng kháng thể kháng HA (Sigma-Aldrich, #11867423001), và sau đó thực hiện thẩm tách western.

Cụ thể, môi trường tế bào cho được ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 1 phút, để loại bỏ cặn tế bào. Sau đó, môi trường tế bào của người cho được xử lý bằng các hạt protein G-agarosa (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA) và để phản ứng ở 4°C trong 1 giờ. Sau đó, bước xử lý với 1 μ l kháng thể kháng HA được thực hiện và phản ứng được phép tiến hành ở 4°C qua đêm. Ngày hôm sau, các hạt Protein G sepharosa được thêm vào đó và phản ứng được phép tiến hành ở 4°C trong 1 giờ. Sau đó, thực hiện ly tâm ở 6000 vòng/phút trong 1 phút ở 4°C để thu gom mẫu. Mỗi mẫu được rửa hai lần bằng PBS chứa 0,1% Triton X-100. Mẫu được xử lý với đệm mẫu, và sau đó thực hiện thẩm tách western. Ở đây, thẩm tách western được thực hiện giống như cách thực hiện đối với dịch phân giải của tế bào cho.

Kết quả là, sự tăng lượng của toàn bộ protein tau (Tau5) và protein tau được axetyl hóa (Tau-acK280) được quan sát thấy trong môi trường của các tế bào cho được xử lý bằng protein tau được axetyl hóa (Fig. 51).

Ngoài ra, các tế bào thần kinh khác (tế bào nhận) được xử lý bằng môi trường tế bào cho và sản phẩm phân giải của tế bào nhận được thu gom sau 1 giờ hoặc 20 giờ. Thẩm tách Western được thực hiện trên mỗi mẫu bằng cách sử dụng kháng thể tau. Ở đây, thẩm tách western được thực hiện theo cách tương tự như trong Ví dụ thử nghiệm 1 và kháng thể kháng Tau5 (Invitrogen, AHB0042), kháng thể kháng axetyl-K280 (Anaspec, AS-56077), kháng thể kháng β -actin (Sigma, A5441), kháng thể kháng HA (Sigma, #11867423001) và kháng thể kháng IgG chuột được đánh dấu HRP (Bioxcell, BE0083) được sử dụng.

Kết quả là, các kết tụ protein tau được quan sát thấy trong sản phẩm phân giải của tế bào nhận được xử lý với môi trường của tế bào cho (Tau-ac-HA) được xử lý với protein tau được axetyl hóa (Fig. 52 và 53).

Ví dụ thử nghiệm 16. Xác định tác dụng ức chế sự tạo hạt của tau do kháng thể ADEL-Y01h gây ra: *In vitro*

Để xác định tác dụng ức chế sự tạo hạt tau *in vitro* gây ra bởi kháng thể ADEL-Y01h01_v01, mảnh protein K280-ac (mAC), kết tụ của chúng (aAC) hoặc phần không hòa tan Sarkosyl trong mô não của bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer đã được sử dụng vào hệ thống tế bào ổn định tau-FRET và mức độ tạo hạt tau được đo. Đối với các tế bào tạo

hạt tau, lần lượt kháng thể IgG và ADEL-Y01h01_v01 được sử dụng. Phân tích so sánh đã được thực hiện.

Đầu tiên, kết tụ của các mảnh protein K280-ac được sử dụng để xử lý tế bào được chuẩn bị như sau. Các mảnh protein K280-ac có nồng độ 25 μ M được hòa tan trong dung dịch DTT 25 mM ở nhiệt độ 24°C trong 1 giờ, và sản phẩm thu được được hòa tan, cùng với khuấy, trong dung dịch của axit (2-hydroxyethyl)-1-piperazin etan sulfonic (HEPES, 10 mM, pH=7,4), NaCl (100 mM), và heparin (25 mM), sử dụng bộ trộn nhiệt Eppendorf Thermomixer C dưới điều kiện 700 vòng/phút ở nhiệt độ 37°C. Bằng cách làm như vậy, kết tụ của các mảnh protein K280-ac được tạo ra.

Sau đó, cảm biến sinh học HEK293 Tau RD P301S-FRET (ATCC CRL-3275) được phân phối trong đĩa 96 giếng ở $3,5 \times 10^4$ tế bào mỗi giếng. 18 giờ sau, được xác định hiệu suất khoảng 60% mỗi giếng có được phủ bằng cảm biến sinh học HEK 293 Tau RD P301S-FRET hay không. Sau đó, 8,75 μ l OPTI-MEM, 1,25 μ l Lipofectamine 2000 (Invitrogen), và mảnh protein K280-ac, kết tụ của chúng, hoặc phần không hòa tan Sarkosyl được trộn và hỗn hợp được để phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Sau đó, mỗi giếng được xử lý bằng hỗn hợp này, và sau đó thực hiện ủ ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Sau đó, thực hiện phân tích bước sóng huỳnh quang bằng thiết bị CLARIOstar® (BMG Labtech).

Kết quả là, trong trường hợp sử dụng kháng thể ADEL-Y01h01_v01, các tế bào được xử lý bằng mảnh protein K280-ac có cường độ FRET hợp nhất giảm; và trong trường hợp sử dụng kháng thể ADEL-Y01h01_v01, các tế bào được xử lý bằng kết tụ của các mảnh protein K280-ac cũng thể hiện cường độ FRET hợp nhất giảm (Fig. 54). Ngoài ra, trong trường hợp sử dụng kháng thể ADEL-Y01h, các tế bào được xử lý bằng phần không hòa tan Sarkosyl trong mô não của bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer có cường độ FRET hợp nhất giảm (Fig. 55). Từ các kết quả này, đã xác định được rằng trong trường hợp sử dụng kháng thể ADEL-Y01h01_v01, sự tạo hạt của tau bị ức chế. Ví dụ thử nghiệm 17. Xác định tác dụng ức chế sự tạo hạt của tau do kháng thể ADEL-Y01h gây ra: *In vivo*

Để xác định tác dụng ức chế sự tạo hạt tau *in vivo* do kháng thể ADEL-Y01h gây ra, IgG hoặc kháng thể ADEL-Y01h đã được tiêm vào tĩnh mạch bắt đầu từ 2 tuần trước khi phần không hòa tan Sarkosyl từ bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer được đưa vào

lớp CA1 trong hồi hải mã trái của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L được tạo ra trong Ví dụ điều chế 3. Phần không hòa tan Sarkosyl được đưa vào lớp CA1 trong hồi hải mã trái của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L. Sau đó, mô não được lấy ra từ từng con chuột, và sau đó được cấp đông từng phần. Các phần não được nhuộm mô miễn dịch với kháng thể kháng AT8, và mức độ tạo hạt của tau được kiểm tra.

Cụ thể, mảnh không hòa tan Sarkosyl (3 μ l, 3,3 μ g/ μ l) trong mô não của bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer ở giai đoạn IV Braak đã được đưa qua bước siêu âm và được tiêm vào lớp CA1 (trước - sau: -1,9 mm, bên trong-bên ngoài: 1,5 mm, trái: -1,8 mm) ở hồi hải mã trái của chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L 6 tháng tuổi. Chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L đã được tiêm vào tĩnh mạch IgG hoặc kháng thể ADEL-Y01h với lượng 20 mg/kg/tuần bắt đầu từ 2 tuần trước khi sử dụng mảnh không hòa tan Sarkosyl; và chuột được dùng IgG hoặc kháng thể ADEL-Y01h trong tĩnh mạch một lần mỗi tuần kể từ tuần sử dụng mảnh không hòa tan Sarkosyl đến tuần 12. Ở đây, mảnh không hòa tan Sarkosyl được tiêm với tốc độ 0,2 μ l/phút bằng cách sử dụng xylanh thủy tinh 10 μ l (Hamilton, 0,49 mm, Reno, NV), và kim được rút ra sau 5 phút chờ đợi trước khi lấy ra để tránh chảy ngược. Sau 12 tuần, mô não được tách riêng ở từng con chuột và cắt thành các phần đông lạnh dày 30 μ m bằng Leica CM1860.

Đối với phương pháp nhuộm mô miễn dịch, mỗi phần não được rửa bằng đệm A (1% NGS, 0,2% Triton X-100 và 30% H₂O₂, và PBS). Phần não này được xử lý bằng PBS chứa 1% NGS và 0,2% Triton X-100, và IgG hoặc kháng thể ADEL-Y01m, và được để phản ứng ở 4°C qua đêm. Phần não được rửa nhiều lần bằng dung dịch PBS, sau đó cho phản ứng với kháng thể thứ cấp (Vector Laboratories) ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau đó, phần não được nhuộm miễn dịch bằng cách sử dụng kit Vectastain ABC (Vector Laboratories), và nhuộm miễn dịch được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các phần não bị nhuộm màu được phân tích bằng phần mềm ImageJ (NIH, Bethesda, MD), và ba phần não chứa hồi hải mã được định lượng. Đối với các tế bào thần kinh được nhuộm bằng kháng thể kháng AT8, phép đo được thực hiện bởi ba dụng cụ thử nghiệm mù với các phần não được sử dụng trong thử nghiệm, và phân tích định lượng được thực hiện ở các mức ngưỡng cụ thể. Ba phần não giữa Bregma -1,75 và Bregma -2,25 ở 7 con chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L sử dụng IgG và 8 con chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L sử dụng kháng thể ADEL-Y01h được sử dụng để phân tích. Kiểm định t được sử dụng để phân tích thống kê.

Kết quả là, đối với chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L được sử dụng IgG, mẫu nhuộm của các tế bào thần kinh được quan sát thấy rõ ràng ở các vùng não (vỏ não, hồi hải mã) đối diện với phía mà mảnh không hòa tan của bệnh nhân được sử dụng. Mặt khác, đối với chuột sa sút trí tuệ Tau-P301L được sử dụng kháng thể ADEL-Y01h, sự nhuộm màu giảm được quan sát thấy ở hồi hải mã và vỏ não (Fig. 56 đến 59).

Ví dụ thử nghiệm 18. Xác định kết tụ tau và các tác dụng ức chế sự tạo hạt do kháng thể ADEL-Y01m gây ra

Để xác định tác dụng ức chế sự kết tụ tau do kháng thể ADEL-Y01m gây ra, thử nghiệm kết tụ tau *in vitro* đã được thực hiện. Mảnh protein K18 được tạo ra *in vitro* được axetyl hóa bằng cách cho phản ứng với 1,5 μ g P300 và 1 mM Axetyl-CoA ở nhiệt độ 30°C trong 3 giờ. Sau đó, mảnh protein K18 monome được phản ứng với mảnh protein K18 được axetyl hóa 25 μ M (K18-P301L) ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau đó, sản phẩm thu được được xử lý với 25 mM heparin 57, HEPES (10 mM, pH=7,4) và NaCl (100 mM), và được khuấy ở điều kiện 700 vòng/phút để tạo ra kết tụ của các protein tau. Sau đó, sự kết tụ tau và tác dụng ức chế tạo hạt của chúng được phân tích, sử dụng kháng thể ADEL-Y01m, thông qua phương pháp thẩm tách western và thử nghiệm thioflavin-T. Đã xác định được bằng xét nghiệm thioflavin-T rằng kết tụ của các protein tau được axetyl hóa bị ức chế trong trường hợp xử lý bằng kháng thể ADEL-Y01h được thực hiện, so với trường hợp các protein tau được axetyl hóa được kết tụ.

Đầu tiên, đối với phản ứng kết sợi, 10 M đến 20 M protein tau được axetyl hóa (2N4R) được ủ ở 37°C trong dung dịch thu được bằng cách thêm heparin (Sigma-Aldrich) và DTT ở nồng độ 2 mM trong đệm natri axetat 100 mM (pH=7,0). Protein và dung dịch ThT (với tỷ lệ 1:1) được thêm vào mỗi giếng. Phân tích huỳnh quang ThT tại các thời điểm khác nhau được đo bằng cách sử dụng CLARIOstar® (BMG Labtech, Ortenberg, Đức) ở bước sóng 450 nm (kích thích) và 510 nm (phát xạ).

Các tế bào thần kinh của chuột nuôi cấy được xử lý với kết tụ của các protein được axetyl hóa, và thực hiện thẩm tách western để xác định kết quả.

Đối với thử nghiệm này, các tế bào thần kinh vỏ não sơ cấp (DIV10) được xử lý với K18-P301L monome, K18-P301L kết tụ, hoặc K18-P301L được axetyl hóa ở nồng độ 3 μ g/ml trong 24 giờ. Các tế bào thần kinh được xử lý trước bằng kháng thể ADEL-Y01m ở 3 μ g/ml trong 30 phút trước khi xử lý protein K18.

Kết quả là, được thấy rằng nhiều kết tụ tau xâm nhập vào tế bào thần kinh và tạo ra sự kết tụ của các protein tau nội tại; tuy nhiên, được xác định rằng trong trường hợp được xử lý đồng thời với kháng thể ADEL-Y01m, hiện tượng như vậy được giảm (Fig. 60 và 61).

Ví dụ thử nghiệm 19. Xác định tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh do kháng thể ADEL-Y01h gây ra

Để xác định tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh do kháng thể kháng ADEL-Y01h gây ra, tế bào thần kinh vỏ não trước tiên được phân lập từ não chuột trong những ngày phôi thai. Cụ thể, mô não được lấy ra từ chuột 16 ngày tuổi, và vỏ não được tách ra từ đó. Sau đó, mô vỏ não được phân tách trong dung dịch muối cân bằng Hank (HBSS) không chứa canxi và magiê và ủ trong dung dịch trypsin 0,125% ở 37°C trong 15 phút. Trypsin bị bất hoạt bằng cách xử lý với môi trường Eagle cải biến (DMEM) của Dulbecco có chứa 20% huyết thanh bào thai bò, và mô vỏ não được nghiền thành bột sử dụng pipet. Huyền phù tế bào thu được được pha loãng trong môi trường NB (môi trường nghiên cứu trên động vật, neurobasal medium) được bổ sung với chất bổ sung B27 (GibcoBRL), và phân phối lên đĩa phủ poly-D-lysine (Sigma) ở 50 µg/ml và laminin (GibcoBRL) ở 1 µg/ml. Các tế bào thần kinh được nuôi cấy ở điều kiện 37°C và 5% CO₂ trong 10 ngày. Sau đó, các tế bào thần kinh được nuôi cấy được xử lý bằng kết tụ của mảnh protein K18 được axetyl hóa ở 3 µg/ml và IgG hoặc kháng thể ADEL-Y01h, và để phản ứng trong 24 giờ.

Sau 24 giờ, phần nổi bề mặt được thu gom và phân tích bằng kit phát hiện độc tính tế bào (LDH, Roche Applied Sciences). Làm thử nghiệm so màu để định lượng sự chết của tế bào, phương pháp đo hoạt tính của lactat dehydrogenaza (LDH), được giải phóng vào phần nổi bề mặt từ dịch bào của tế bào thần kinh bị tổn thương, đã được sử dụng. Độ hấp thụ ở bước sóng 490 nm được đo sử dụng thiết bị Tecan Infinite® 200. Kết quả được biểu thị theo phần trăm khả năng sống sót của tế bào so với đối chứng âm (Mẫu trống).

Ngoài ra, khả năng sống của tế bào được đo sử dụng thử nghiệm khử MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Độ hấp thụ ở bước sóng 540 nm được đo sử dụng thiết bị Tecan Infinite® 200 và kết quả được biểu thị theo phần trăm so với đối chứng âm (Mẫu trống).

Ngoài ra, các kết quả thu được trong điều kiện của hai mẫu cấy độc lập và 6 giếng, và tất cả các giá trị được biểu thị bằng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (s.e.) của giá trị trung bình. ANOVA một thông số với kiểm định so sánh nhiều lần của Tukey được sử dụng để phân tích thống kê.

Kết quả là, như được minh họa trên Fig. 62, hoạt tính LDH cao đã được quan sát thấy trong các tế bào thần kinh được xử lý bằng IgG. Mặt khác, hoạt tính LDH giảm được quan sát thấy trong các tế bào thần kinh được xử lý bằng kháng thể ADEL-Y01h so với các tế bào thần kinh được xử lý bằng IgG. Ngoài ra, như được minh họa trên Fig. 63, khả năng sống sót giảm đáng kể được quan sát thấy trong các tế bào thần kinh được xử lý bằng IgG. Mặt khác, khả năng sống sót tăng lên đáng kể được quan sát thấy ở các tế bào thần kinh được xử lý bằng kháng thể ADEL-Y01h so với các tế bào thần kinh được xử lý bằng IgG. Từ các kết quả này, đã xác định được rằng kháng thể ADEL-Y01h có tác dụng bảo vệ chống lại các tổn thương trong tế bào thần kinh do sự kết tụ của các protein tau được axetyl hóa.

Ví dụ thử nghiệm 20. Xác định tác dụng thúc đẩy thực bào tiểu thần kinh đệm do kháng thể ADEL-Y01h gây ra

Để xác định tác dụng thúc đẩy quá trình thực bào tiểu thần kinh đệm do kháng thể ADEL-Y01h gây ra, tiểu thần kinh đệm nguyên phát đầu tiên được phân lập từ vỏ não của chuột từ 2 đến 3 ngày tuổi và được nuôi cấy theo phương pháp được mô tả trong McDonald DR *et al.*, *J Neurosci.* 1997; 17: 2284-94.

Sau đó, để phân tích khả năng thực bào của tiểu thần kinh đệm, mảnh protein K18 được axetyl hóa được đánh dấu HiLyte™ Fluor 488 theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Đối với sự kết tụ của các protein K18 được axetyl hóa được đánh dấu HiLyte™ Fluor 488, các protein này được ủ tương ứng ở 37°C trong đệm natri axetat 100 mM (pH=7,0) chứa heparin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Hoa Kỳ) và 2 mM DTT để tạo ra kết tụ của chúng.

Các tiểu thần kinh đệm được phân phối trong đĩa 12 giếng ở 5×10^4 tế bào/giếng, và sau đó kết tụ của các mảnh protein K18 được axetyl hóa (3 μ g/ml) được cho phản ứng ở 37°C trong 2 giờ. Tiền xử lý bằng IgG hoặc kháng thể ADEL-Y01h ở nồng độ 4,5 μ g/ml được thực hiện 30 phút trước khi xử lý với kết tụ của các mảnh protein K18 được axetyl hóa. Để phân tích khả năng thực bào, các tế bào được tách ra bằng cách xử

lý với trypsin, và sau đó được cố định bằng 1% paraformaldehyt (PFA). Đối với phương pháp đo tế bào dòng chảy, thực hiện xử lý bằng dung dịch HBSS chứa 200 μ l huyết thanh bào thai bò 2% và thực hiện phân tích bằng thiết bị FACSCanto™ II (BD Biosciences) và bộ lọc huỳnh quang 488.

Kết quả là, quá trình thực bào được thúc đẩy đã được quan sát thấy ở tiểu thần kinh đệm được xử lý bằng kháng thể ADEL-Y01h so với tiểu thần kinh đệm được xử lý bằng IgG (Fig. 64).

Phân tích thống kê

Phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm GraphPad (GraphPad Prism v7.0 và GraphPad Prism v8.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Dữ liệu được phân tích bằng ANOVA một thông số (kiểm định post hoc Tukey) và kiểm định t Student. Giá trị P nhỏ hơn 0,05 được coi là có ý nghĩa.

Số nộp lưu

Tên của tổ chức lưu giữ: Korean Collection for Type Cultures (KCTC)

Số nộp lưu: KCTC14155BP

Ngày nộp lưu: 18/3/2020

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, chứa:

vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm:

CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1;

CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 2;

và

CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 3,

và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) bao gồm:

CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 4;

CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 5;

và

CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 6.

2. Kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là kháng thể bất kỳ được chọn từ nhóm gồm:

kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 7 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 12;

kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 8 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 13;

kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 8 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 14;

kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 8 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 15;

kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 9 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 13;

kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 9 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 14;

kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 9 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 15;

kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 10 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 13;

kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 10 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 15;

kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 11 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 13; và

kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 11 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được biểu thị bởi SEQ ID NO: 15.

3. Kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó mảnh là mảnh bất kỳ được chọn từ nhóm gồm Fab, scFv, F(ab')₂, và Fv.
4. Polynucleotit mã hóa kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1.
5. Vector biểu hiện chứa polynucleotit theo điểm 4.
6. Tế bào chủ chứa vector biểu hiện theo điểm 5.
7. Phương pháp tạo ra kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 6.

8. Polynucleotit mã hóa chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được nêu trong điểm 2.
9. Tế bào lai có số nộp lưu KCTC 14155BP.
10. Dược phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thoái hóa thần kinh, dược phẩm này chứa kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 làm thành phần hoạt tính.
11. Chế phẩm để chẩn đoán bệnh thoái hóa thần kinh, chế phẩm này chứa kháng thể kháng tau hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1.
12. Kit để ngăn ngừa, điều trị, hoặc chẩn đoán bệnh thoái hóa thần kinh, kit này chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, polynucleotit theo điểm 4, vector biểu hiện theo điểm 5, hoặc tế bào chủ theo điểm 6.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> ADEL, INC.
 <120> Kháng thể kháng tau, polynucleotit mã hóa kháng thể này và dược phẩm chứa kháng thể này
 <130> PCC005026ADL
 <150> KR 10-2019-0085233
 <151> 2019-07-15
 <160> 26
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> trình tự axit amin cho kháng thể kháng tau của CDR1 (VH)

 <400> 1
 Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly Tyr
 1 5

 <210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> trình tự axit amin cho kháng thể kháng tau của CDR2 (VH)

 <400> 2
 Ile Arg Tyr Ser Gly Arg Thr
 1 5

 <210> 3
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> trình tự axit amin cho kháng thể kháng tau của CDR3 (VH)

 <400> 3
 Ala Ser Val Tyr Phe Thr Tyr
 1 5

 <210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>

<223> trình tự axit amin cho kháng thể kháng tau của CDR1 (VL)

<400> 4
Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr
1 5 10

<210> 5
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự axit amin cho kháng thể kháng tau của CDR2 (VL)

<400> 5
Leu Val Ser
1

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự axit amin cho kháng thể kháng tau của CDR3 (VL)

<400> 6
Trp Gln Gly Ser His Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 7
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự axit amin cho kháng thể kháng tau của vùng biến đổi (VH)

<400> 7
Glu Val Gln Leu Glu Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
35 40 45

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

Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Ile Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Val Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 8
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự axit amin cho kháng thể kháng tau của vùng biến đổi (VH)

<400> 8
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

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

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Val Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 9
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự axit amin cho kháng thể kháng tau của vùng biến đổi (VH)

<400> 9
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

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

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

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Ser Val Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

<210> 10
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự axit amin cho kháng thể kháng tau của vùng biến đổi (VH)

<400> 10
 Glu Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Leu
 35 40 45

Ala Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

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

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Ser Val Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

<210> 11
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự axit amin cho kháng thể kháng tau của vùng biến đổi (VH)

<400> 11
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Ile Ala Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Ser Val Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser

<210> 12
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> trình tự axit amin cho kháng thể kháng tau của vùng biến đổi (VL)

<400> 12
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Thr 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 Trp Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 13
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự axit amin cho kháng thể kháng tau của vùng biến đổi (VL)

<400> 13
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 14
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự axit amin cho kháng thể kháng tau của vùng biến đổi (VL)

<400> 14
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85 90 95
 Ser His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 15
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự axit amin cho kháng thể kháng tau của vùng biến đổi (VL)

<400> 15
 Glu Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Ile Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 16
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự nucleotit của kháng thể kháng tau của vùng biến đổi (VH)

<400> 16
 gaggtgcagc tggaggagtc aggacctagc ctcgtgaaac cttctcagac tctgtccctc 60
 acctgttctg tcaactggcga ctccatcacc agtggttact ggaactggat ccggaaattc 120
 ccaggggaata aacttgagta catggggtagc ataaggtaca gtggtagaac ttactacaat 180
 ccatctctca aaagtcgaat ctccatcact cgagacacat caaagaacca gttctacctg 240
 cagttgattt ctgtgactac tgaggacaca gccacatatt actgtgcaag tgtttacttt 300

acttactggg gccaaaggac tctggtcact gtctctaca 339

<210> 17
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự nucleotit của kháng thể kháng tau của vùng biến đổi (VH)

<400> 17
 gaggtgcagc tgcaagaaag cggacccggt ttagtgaagc ccagccagac ttatcttta 60
 acttgtaccg tgagcggcga ctccatcacc agcggctact ggaactggat cagacagcct 120
 cccggcaagg gtttagagta catcggctac attcggtaca gcggtcgtac ctactacaac 180
 cccctcttaa agtctcgtgt gaccatctct cgtgacacca gcaagaacca gttctcttta 240
 aagctgagca gcgtgacagc cgccgacaca gccgtgtact actgcgccag cgtgtacttc 300
 acctactggg gccaaaggac ttagtgacc gtctcgagc 339

<210> 18
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự nucleotit của kháng thể kháng tau của vùng biến đổi (VH)

<400> 18
 gaggtgcagc tgcagcagag cggacccgga ctggtgaagc ccagccagac actgtcttta 60
 acttgtgccg tgagcggcga tagcatcacc agcggctact ggaactggat tcgtcagagc 120
 cctagcagag gtttagagtg gctgggctac atcagatata gcggtcgtac ctactacaac 180
 cccctcttaa agtctcgtat caccatcaat cgtgacacca gcaagaacca gttctcttta 240
 cagctgaaca gcgtgacccc agaagacacc gccgtgtact actgcgccag cgtgtacttc 300
 acctactggg gccaaaggac ttagtgacc gtctcgagc 339

<210> 19
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự nucleotit của kháng thể kháng tau của vùng biến đổi (VH)

<400> 19
 gaggtgactt taaaggagag cggacccact ttagtgaagc ccacccagac ttaaacttta 60

acttgtagcg tgagcggcga cagcatcacc agcggctact ggaactggat cagacagccc 120
 cccggcaaag cttagagta ttagcctac attcggtaca gcggtcgtag atactacaac 180
 cccctcttaa agtctcgctt gaccatcact cgtgacacca gcaagaacca agttgtgctg 240
 accatgacca acatggaccc cgtggacacc gccacctact actgcgccag cgtgtatttc 300
 acctactggg gccaaaggtag ttagtgacc gtctcgagc 339

<210> 20
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự nucleotit của kháng thể kháng tau của vùng biến đổi (VH)

<400> 20
 gaggtgcagc tgggtggagag cggcggagga ctggtgcaac ccggtcggtc tttaaggctg 60
 agctgcaccg tgagcggcga cagcatcacc tccggctact ggaactgggt tcgtcaagct 120
 cccggtaaag gtttagagta cgtgggttag attcggtaca gcggtcgtag ctactacaat 180
 cccctcttaa agtctcggtt caccatctct cgtgacacca gcaagaacat cgcctattta 240
 cagatgaact cttaaagac cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag cgtgtacttc 300
 acctactggg gccaaaggtag ttagtgacc gtctcgagc 339

<210> 21
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự nucleotit của kháng thể kháng tau của vùng biến đổi (VL)

<400> 21
 gatgtttga tgacccaaac tccactcaat ttgtcggta ccattggaca accagcctcc 60
 atctcttgca agtcaagtca gagcctotta gatagtgatg gaaagacata ttgaattgg 120
 ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaattc ctctgggtgc taagctggac 180
 tctggagtcc ctgacagggt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agccgagtgg aggctgagga ttgggaggt tattattgct ggcaagggtc acattttccg 300
 tacacgttcg gagggggggac caagctggaa ataaga 336

<210> 22
 <211> 336
 <212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự nucleotit của kháng thể kháng tau của vùng biến đổi (VL)

<400> 22

```

gacgtggtga tgacccagag ccctttatct ttaccggtta cactgggcca gcccgcctct      60
atcagctgca agagcagcca gtctttactg gatagcgacg gcaagaccta tttaaactgg      120
ttccagcaga gacccggcca gagccccaag aggctgatct ctttagtgag caagctggac      180
agcggcggtgc ccgatcggtt cagcgggaagc ggcagcggca cagacttcac tttaaagatc      240
tctcgtgtgg aggccgagga cgtgggctgt tactactgct ggcaaggtag ccacttcccc      300
tacaccttcg gccaaggtac caagctcgag atcaag                                336

```

<210> 23

<211> 336

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự nucleotit của kháng thể kháng tau của vùng biến đổi (VL)

<400> 23

```

gacgtggtga tgacacagag ccccgattct ttagctgtgt ctttaggcga gagagccacc      60
atcaactgca agtccagcca gtctttactg gacagcgacg gcaagaccta tttaaactgg      120
taccagcaga agcccgcca gagccccaag aggctcatct ctttagtgag caagctggac      180
agcggcggtgc ccgatagggt cagcgggaagc ggcagcggca ccgacttcac tttaaccatc      240
agctctttac aagctgagga tgtggccgtg tactactgct ggcaaggtag ccacttcccc      300
tacaccttcg gccaaggtac caagctcgag atcaag                                336

```

<210> 24

<211> 336

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự nucleotit của kháng thể kháng tau của vùng biến đổi (VL)

<400> 24

```

gaggtggtgc tgacccagag ccccggtact ttatctttaa gcccgggtga gagagccact      60
ttaagctgca agagcagcca gtctttactg gacagcgacg gcaagaccta tttaaactgg      120
taccagcaga agcccgcca gagccccaag aggctgatct ctttagtgag caagctggac      180
agcggcatcc ccgacagatt cagcgggaagc ggcagcggca ccgacttcac tttaaccatc      240

```

tctcgtctgg agccagaaga cttcgccgtg tactactgct ggcaaggtag ccacttcccc 300
 tacaccttcg gccaaaggtag caagctcgag atcaag 336

<210> 25
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 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> 26
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự axit amin cho K18

<400> 26
 Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys
 1 5 10 15
 Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val
 20 25 30
 Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys
 35 40 45
 Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln
 50 55 60
 Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly
 65 70 75 80
 Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val

85 90 95
Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly
100 105 110
Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile
115 120 125
Glu

FIG. 1

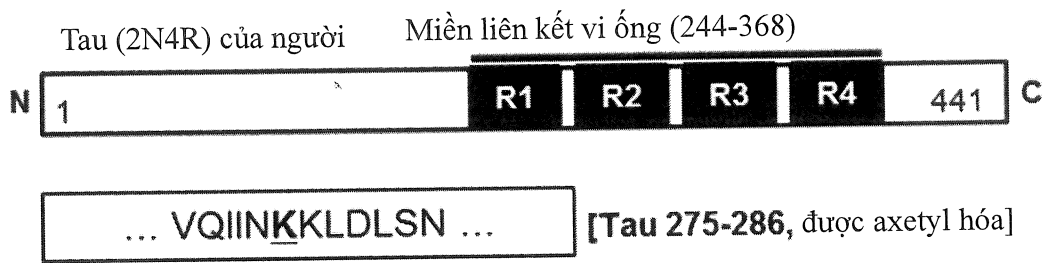


FIG. 2

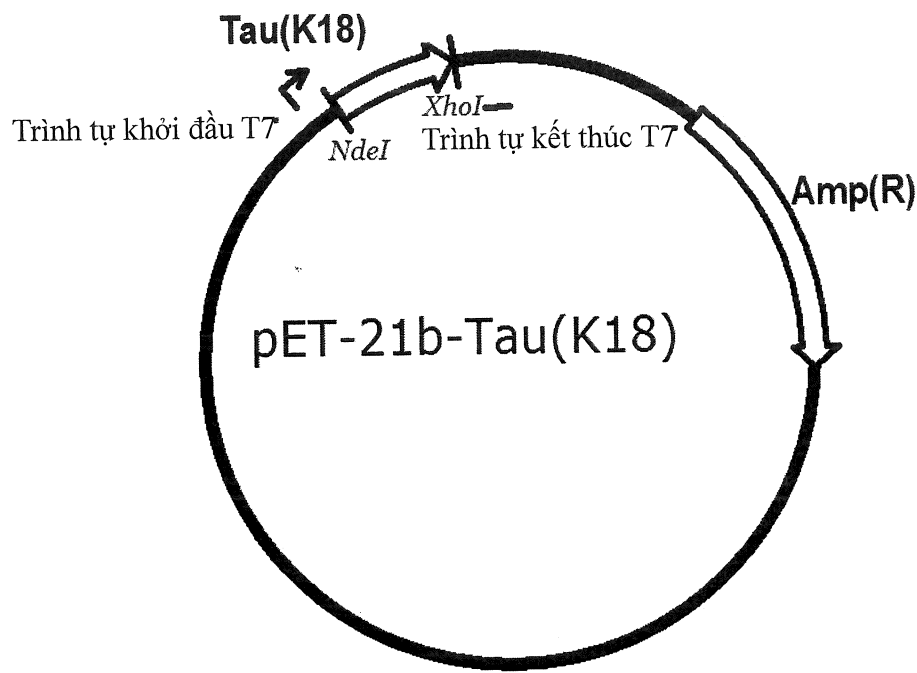


FIG. 3

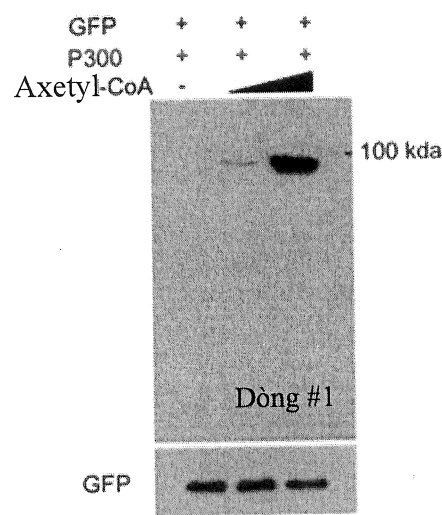


FIG. 4

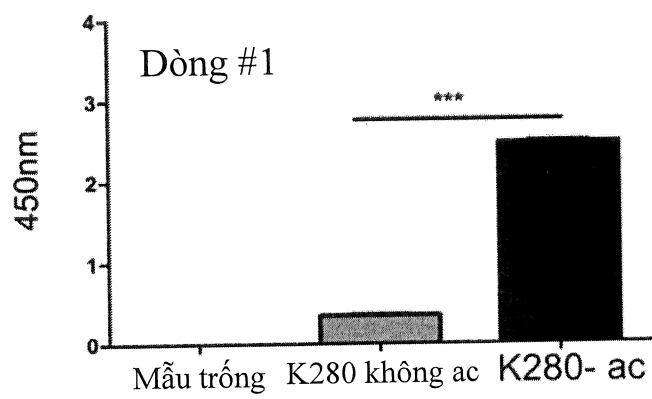
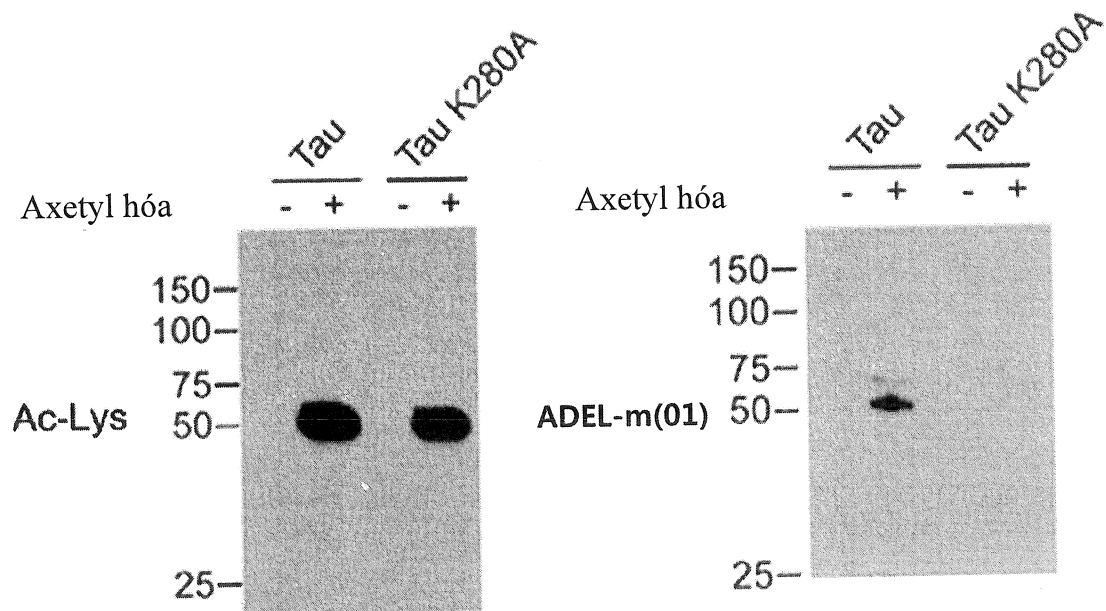
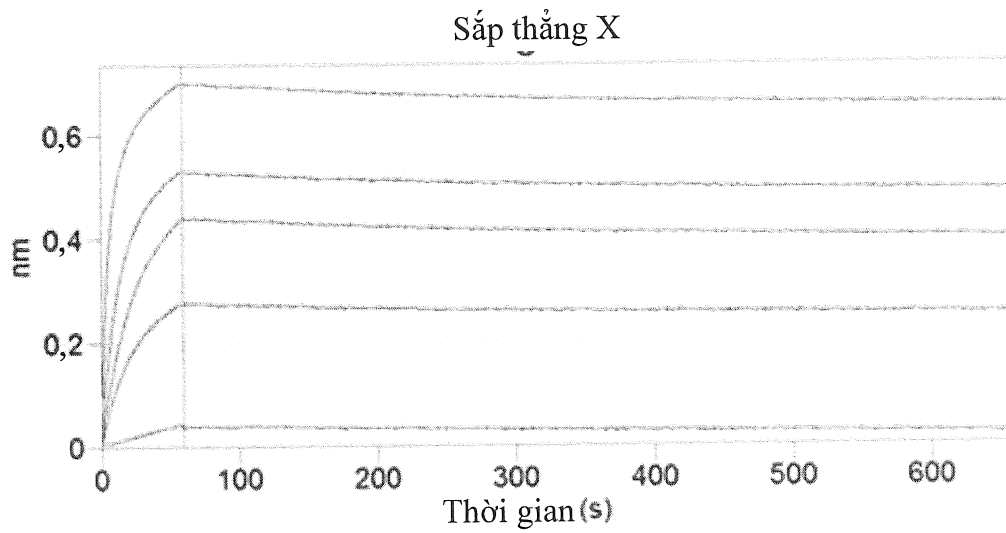


FIG. 5**FIG. 6**

Trung bình		▼ Ab bắt giữ: 1ug/giếng
▼ Kháng nguyên		ADEL_Y01h01_v01
Protein Ac-tau	100,00	1,4343
	50,00	1,0622
	25,00	0,5843
	12,50	0,3196
	6,25	0,2274
	0,00	0,1342
Protein tau không ac	100,00	0,2040
	25,00	0,1537
	6,25	0,1559

FIG. 7

- ✓ $K_D(M): 2,57 \times 10^{-10}$
- ✓ $K_a(1/Ms): 4,47 \times 10^5$
- ✓ $K_d(1/s): 1,57 \times 10^{-4}$

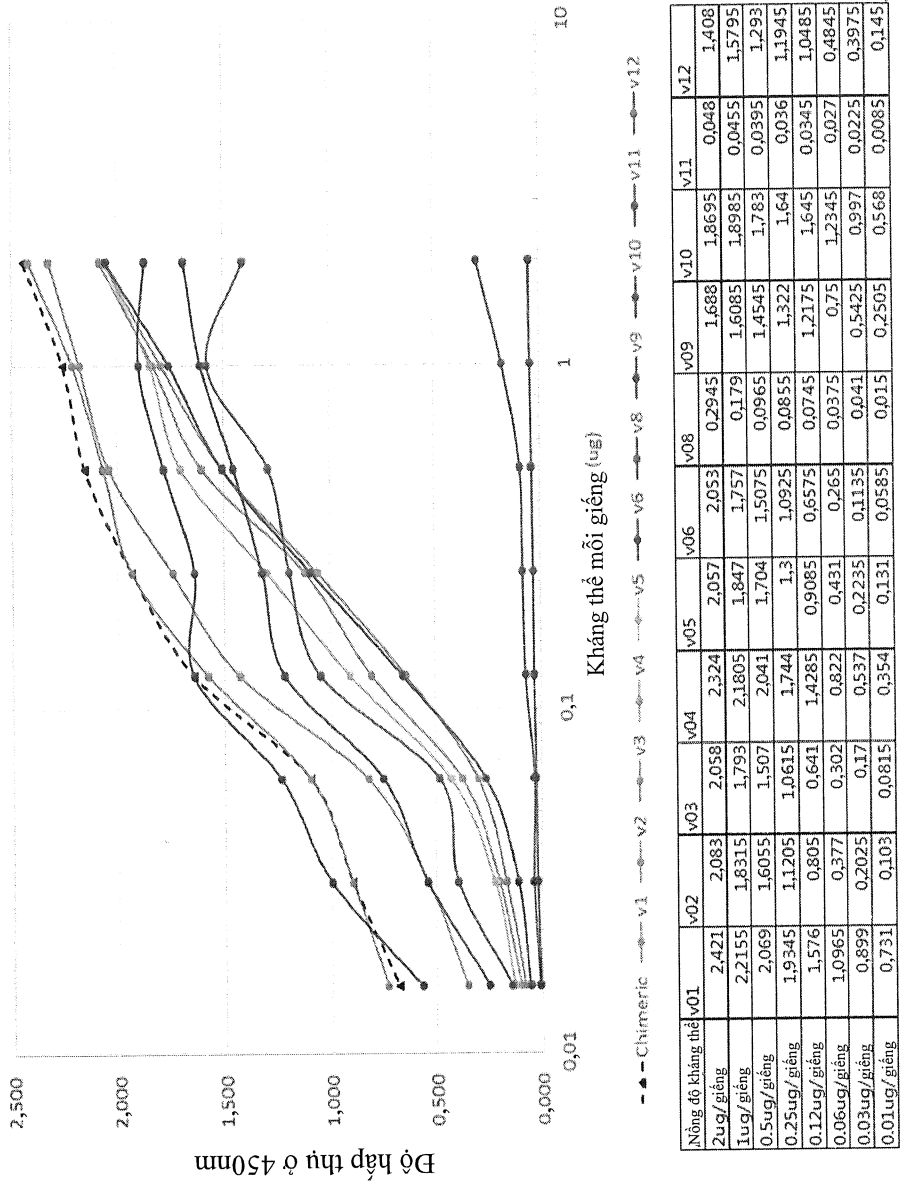


FIG. 9

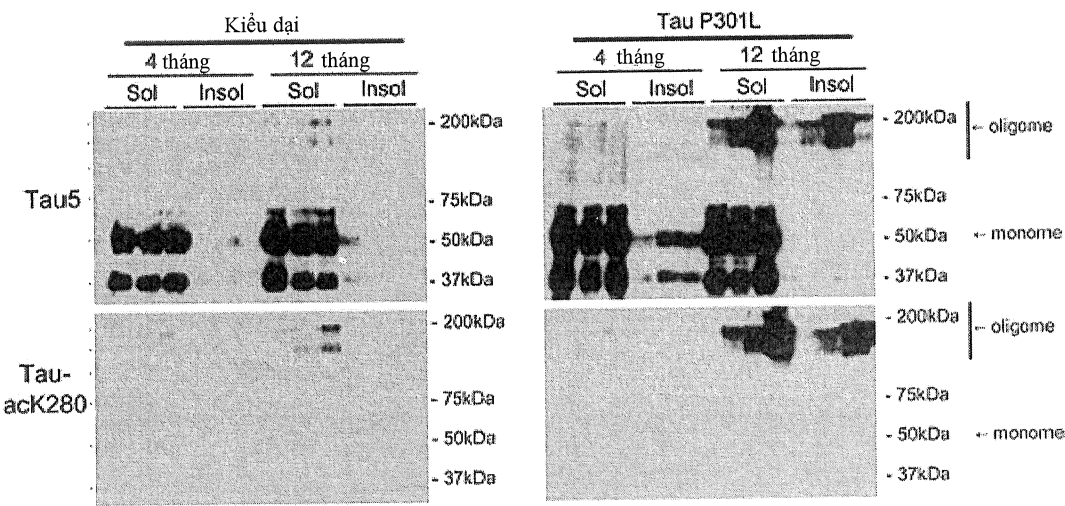
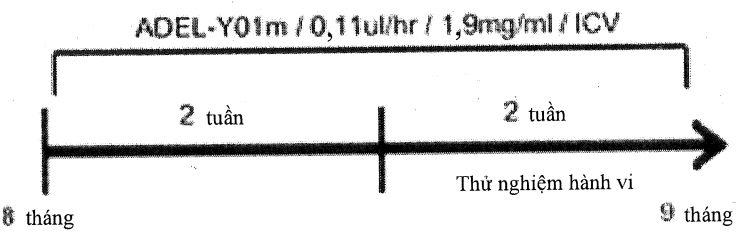
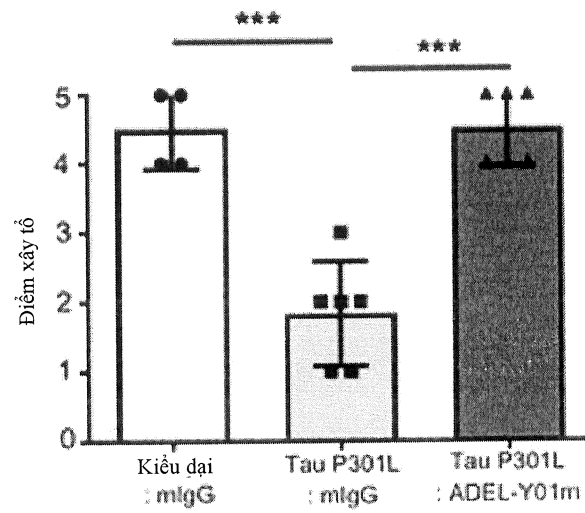


FIG. 10



7/35

FIG. 11**FIG. 12**

Mê cung chữ Y

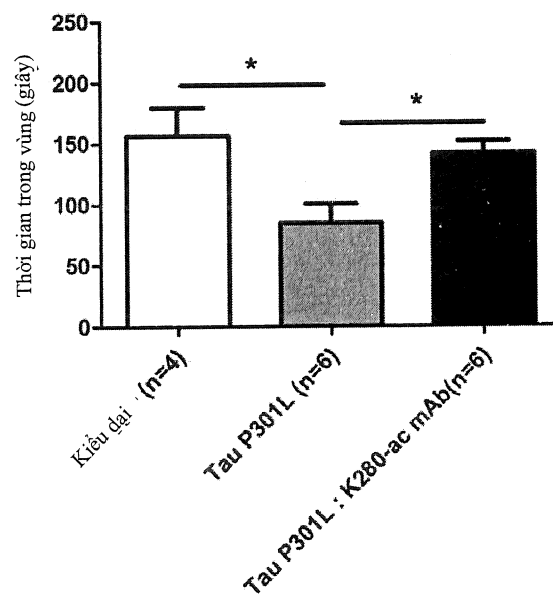
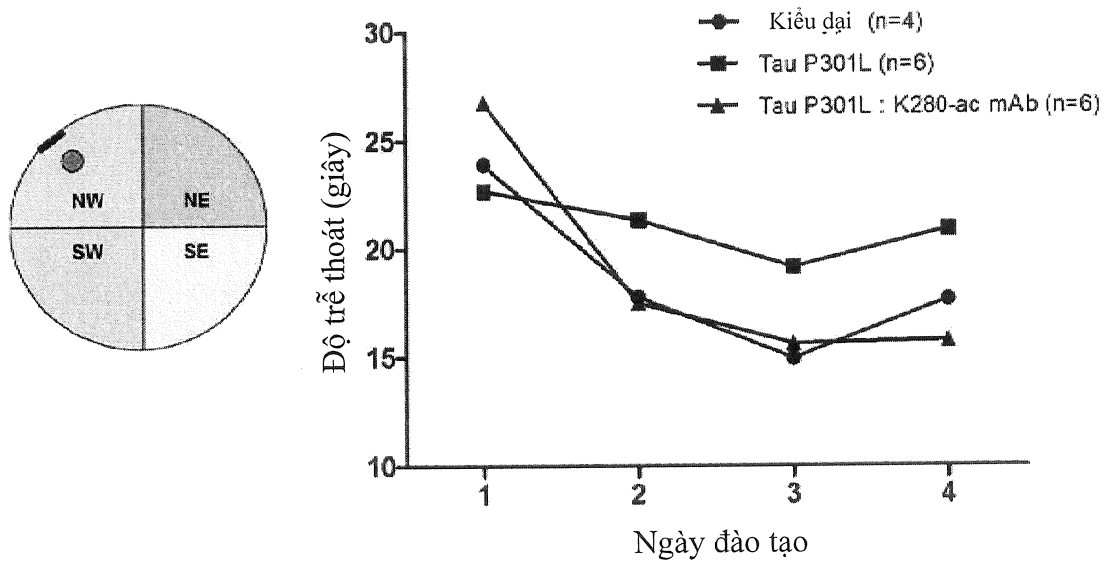
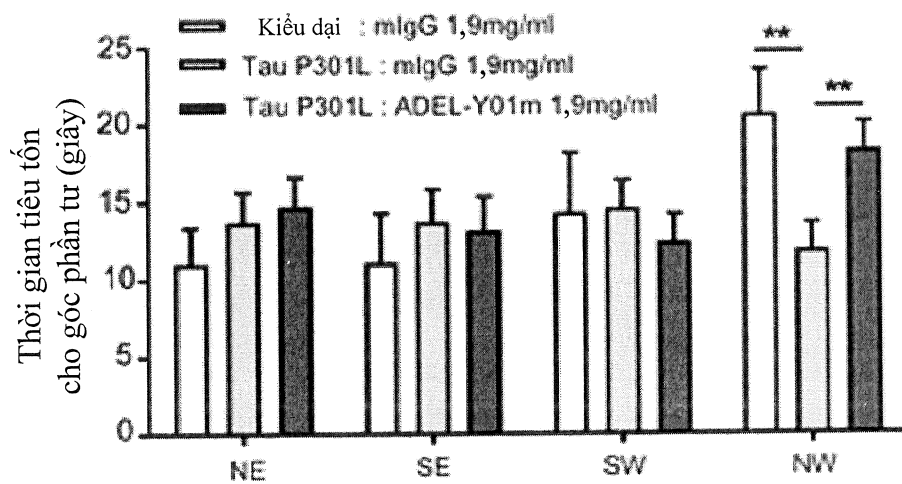
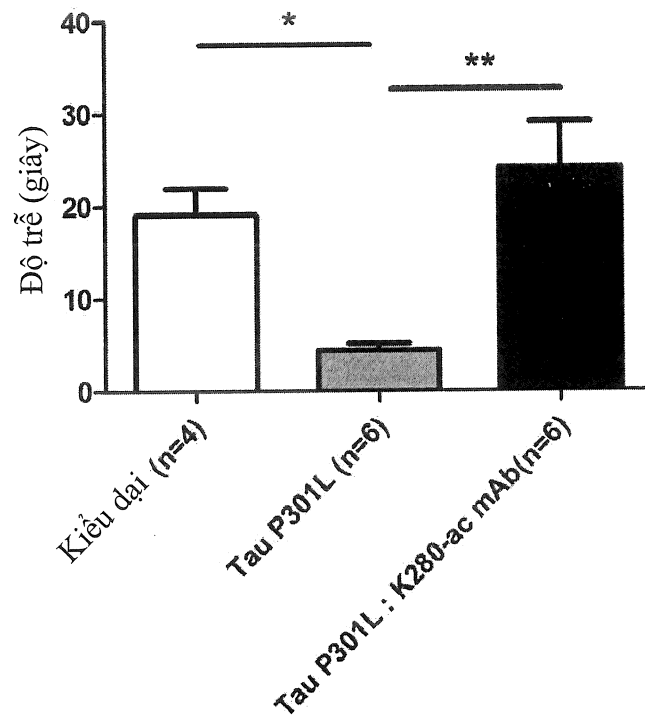
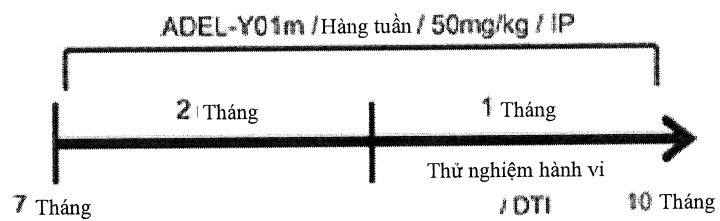
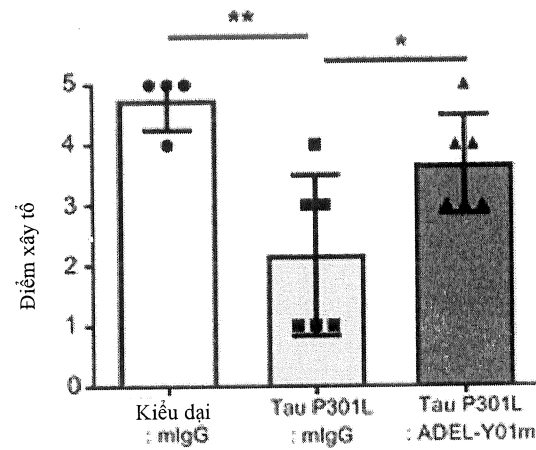
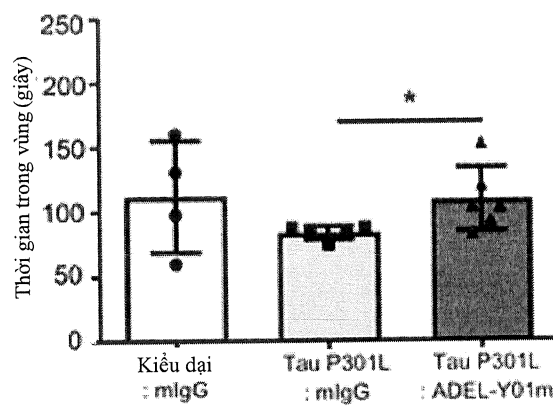


FIG. 13**FIG. 14**

9/35

FIG. 15**FIG. 16**

10/35

FIG. 17**FIG. 18**

11/35

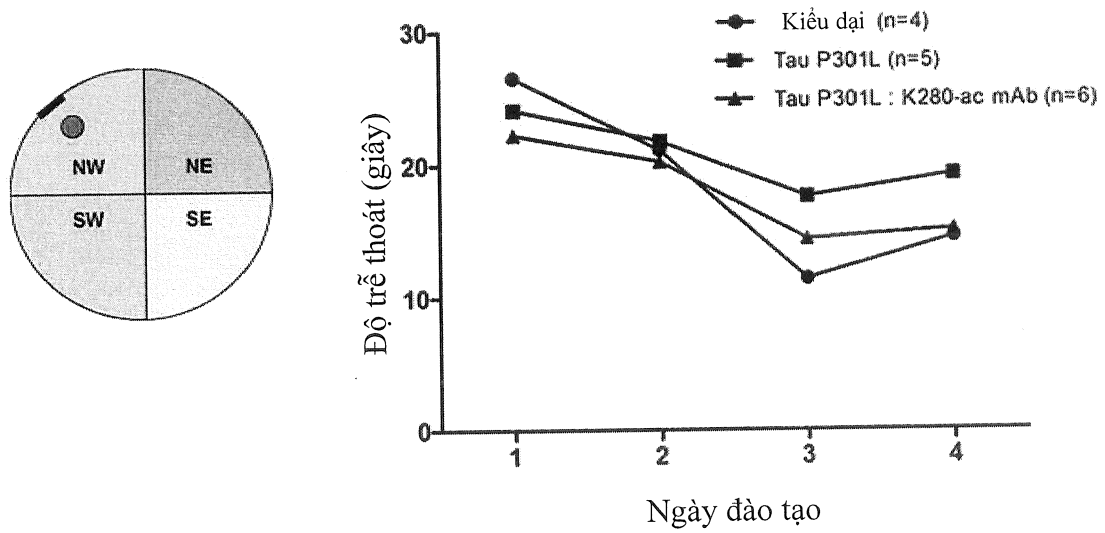
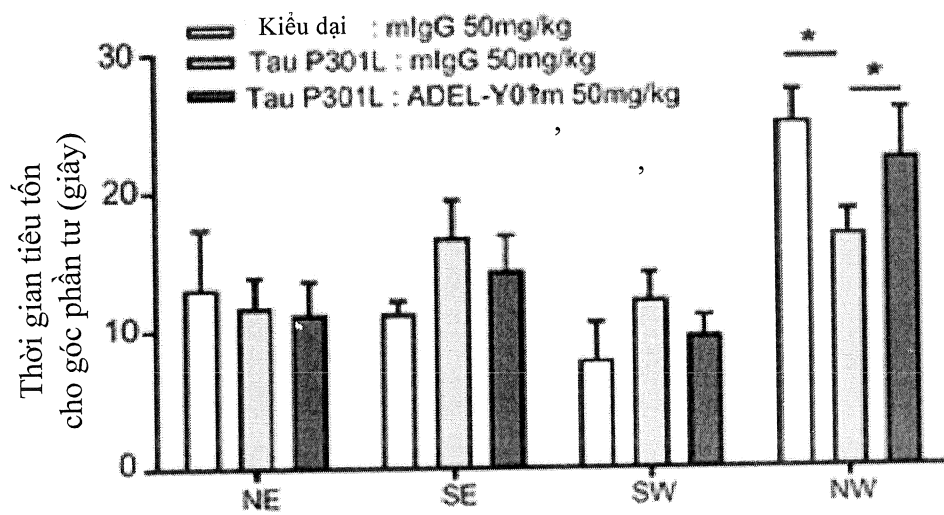
FIG. 19**FIG. 20**

FIG. 21

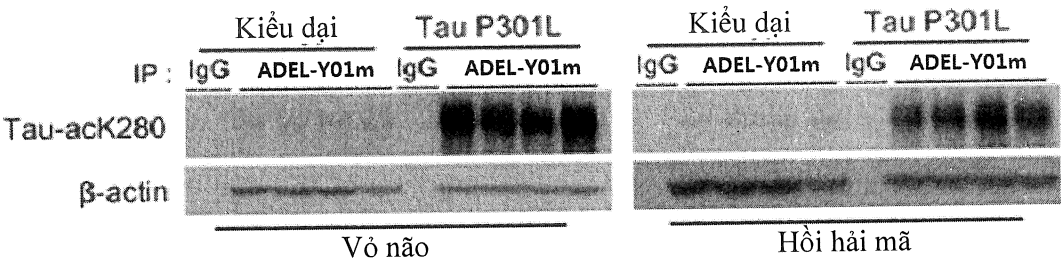
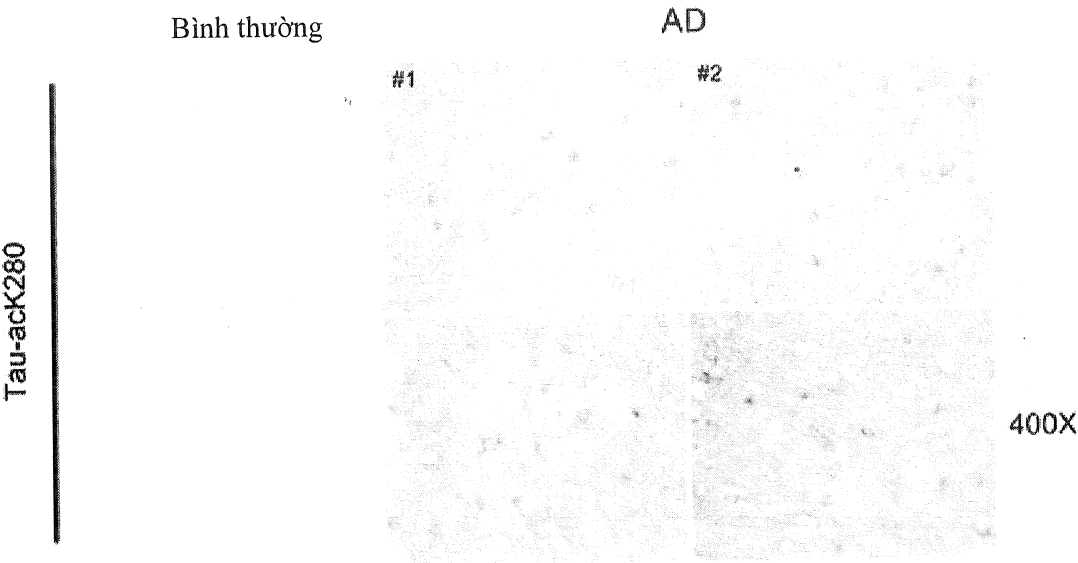
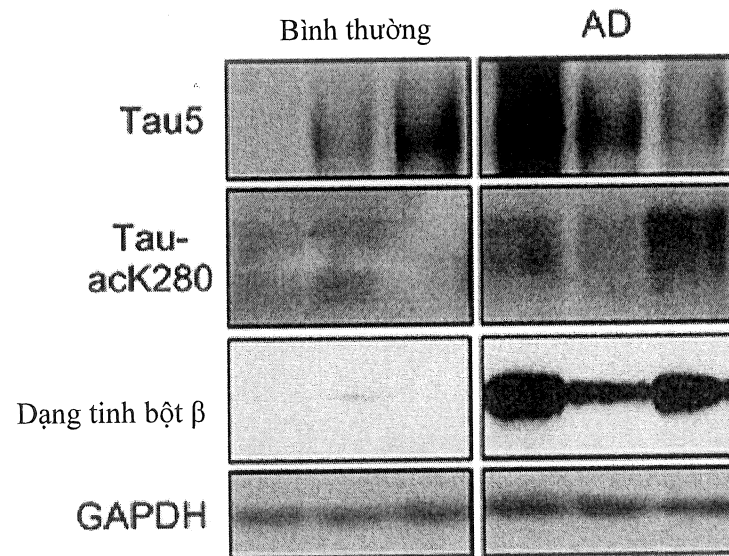
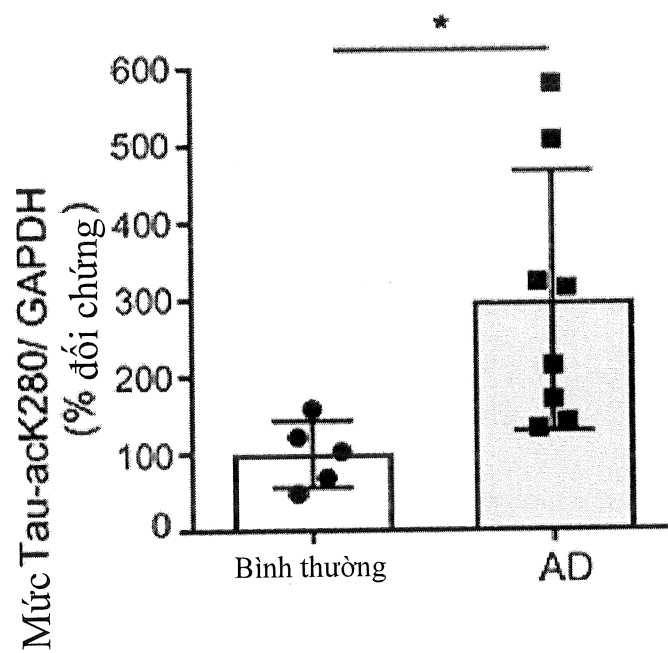


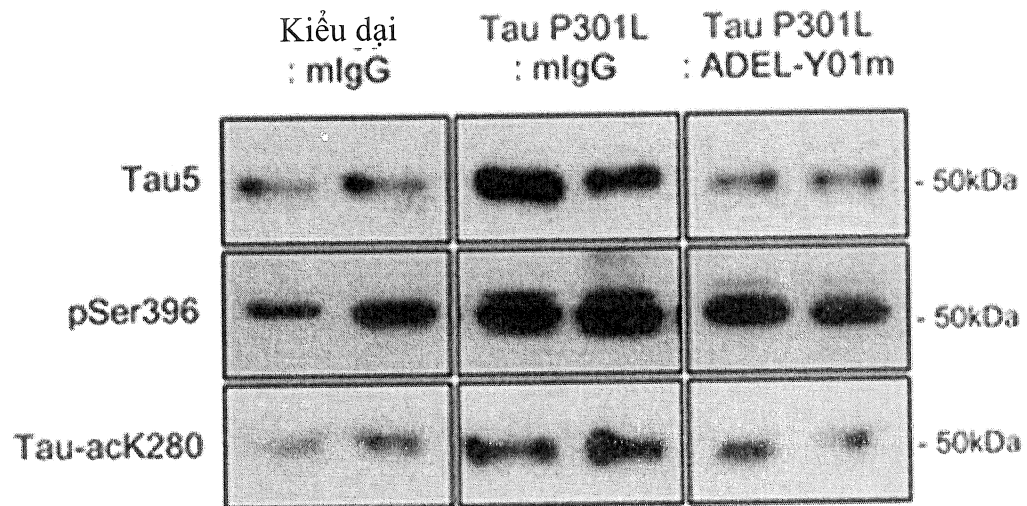
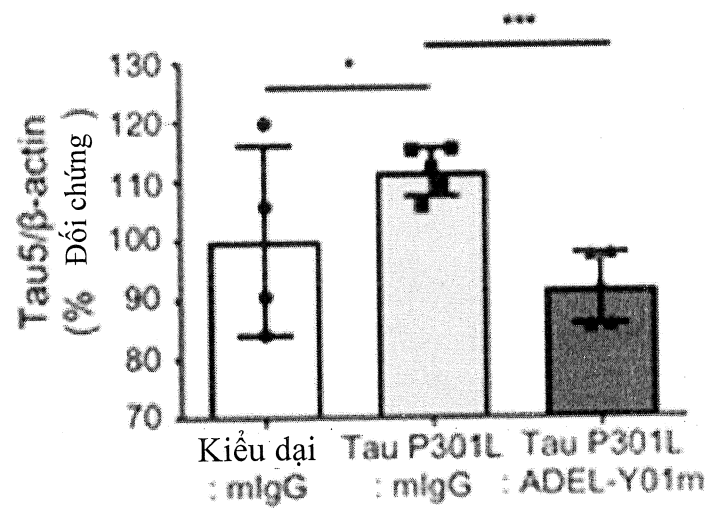
FIG. 22



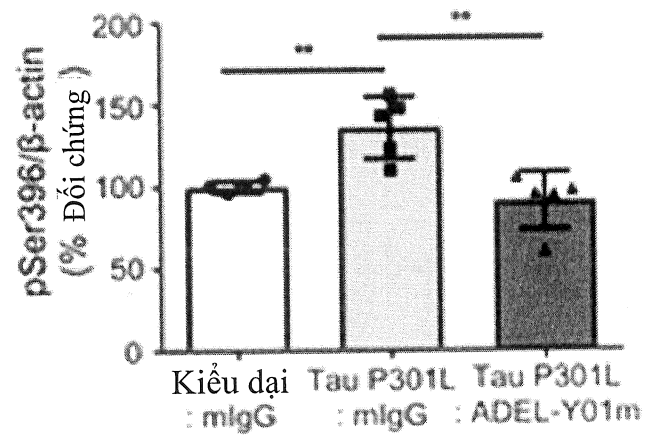
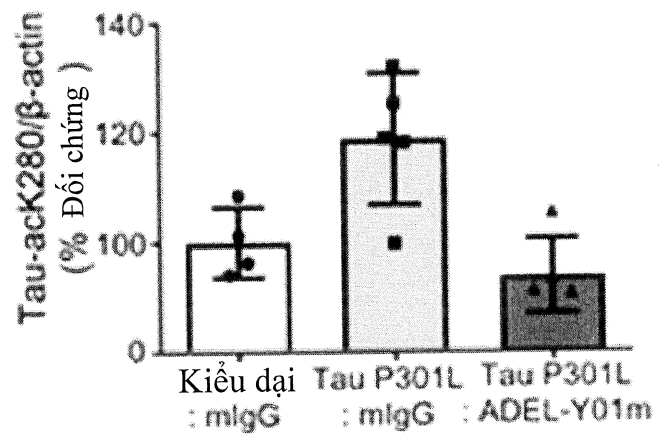
13/35

FIG. 23A**FIG. 23B**

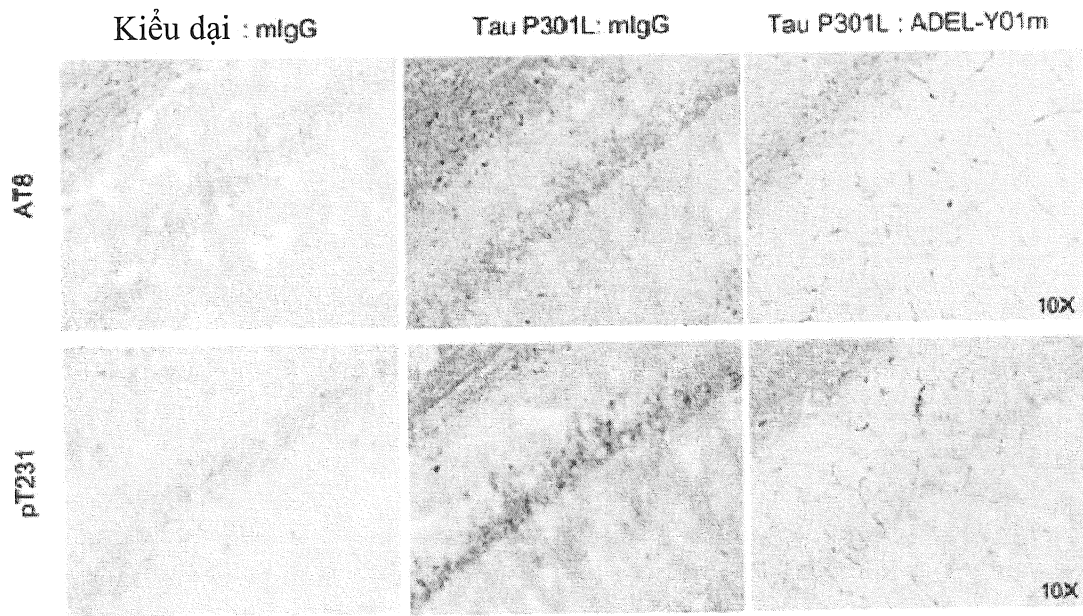
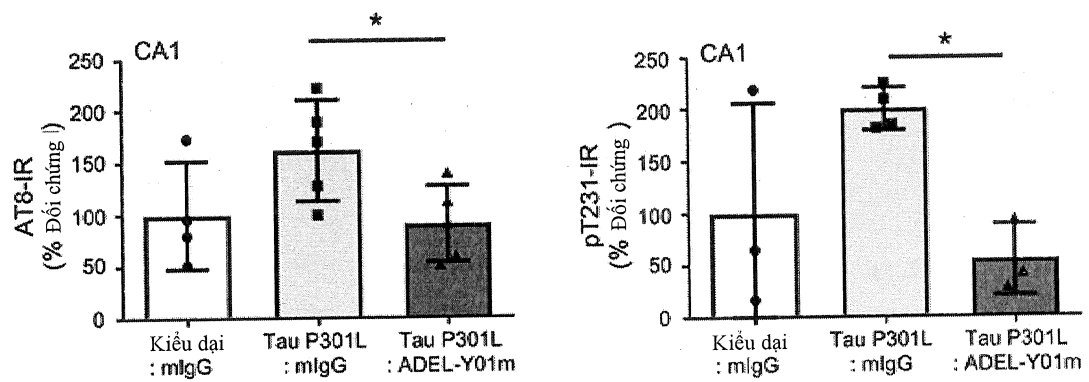
14/35

FIG. 24**FIG. 25**

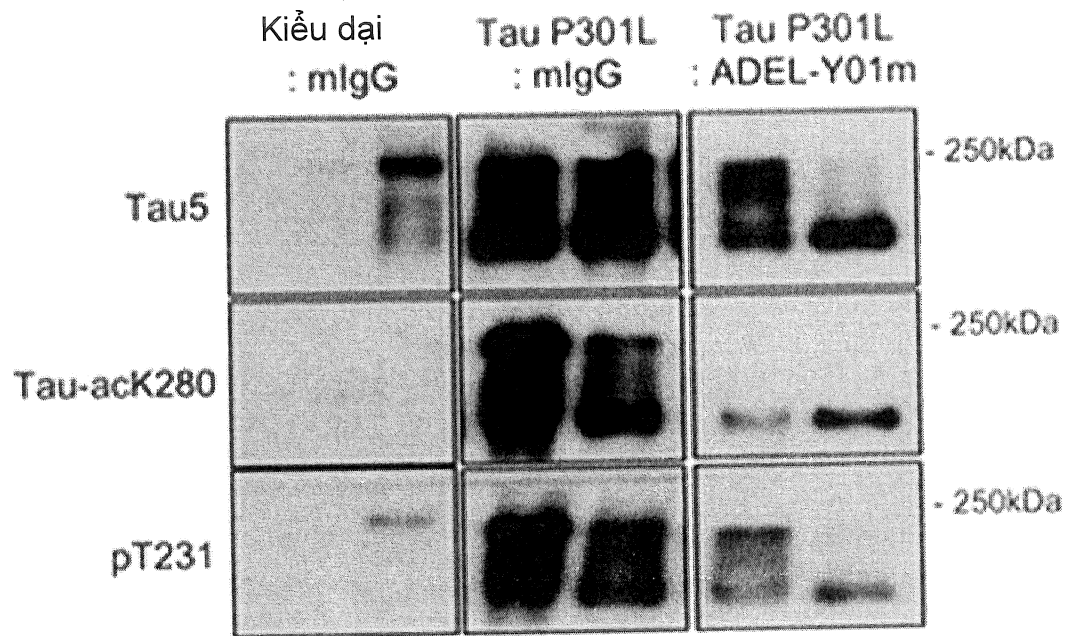
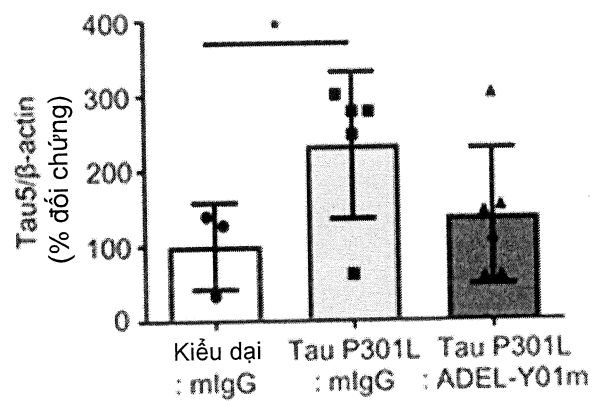
15/35

FIG. 26**FIG. 27**

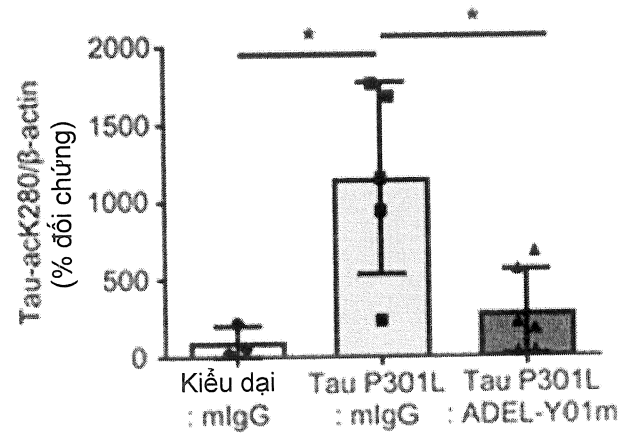
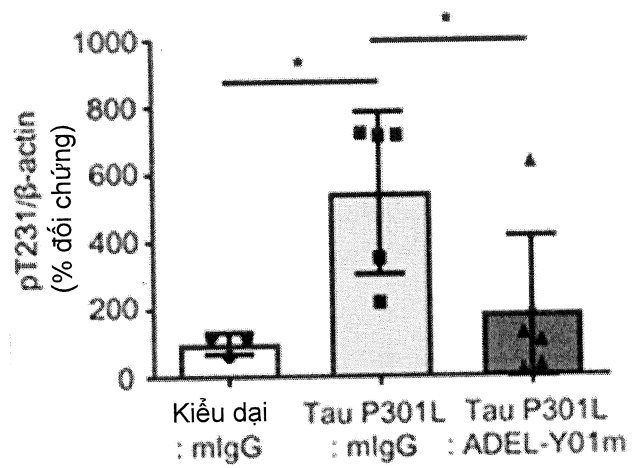
16/35

FIG. 28**FIG. 29**

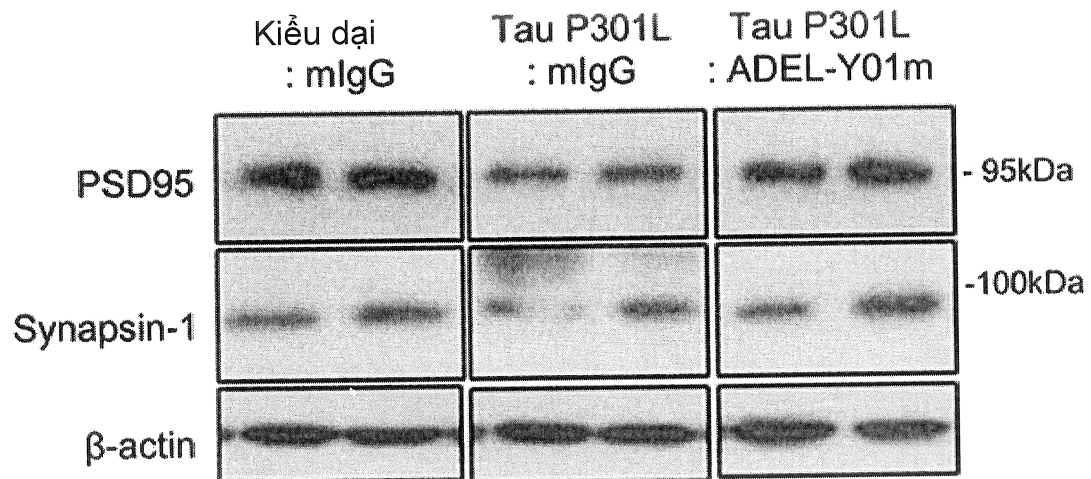
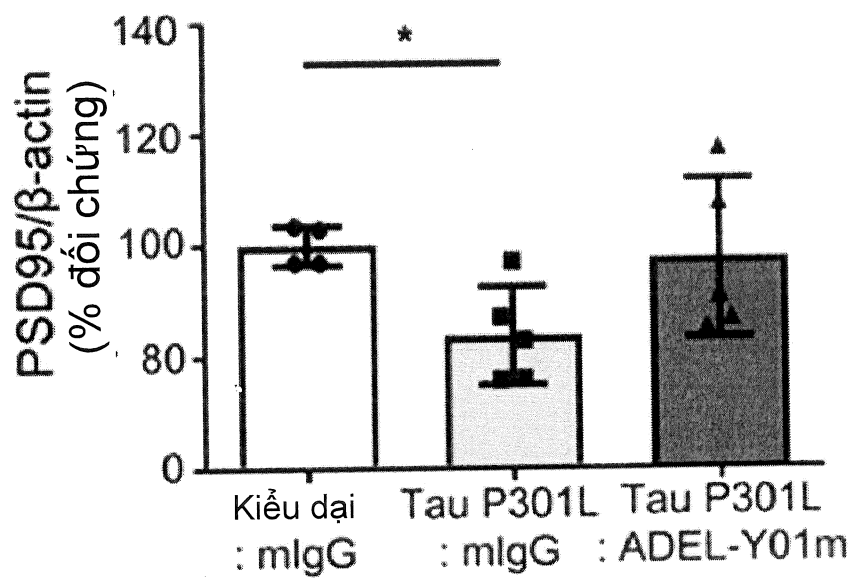
17/35

FIG. 30**FIG. 31**

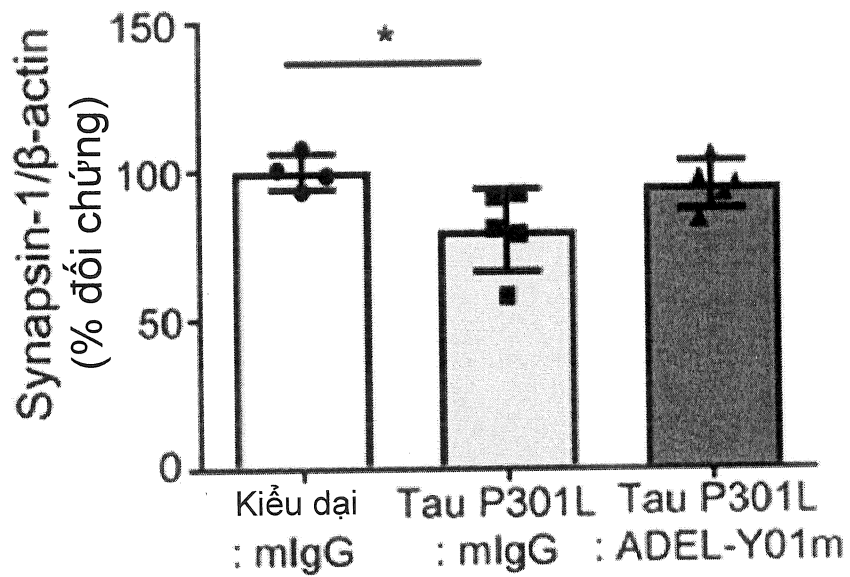
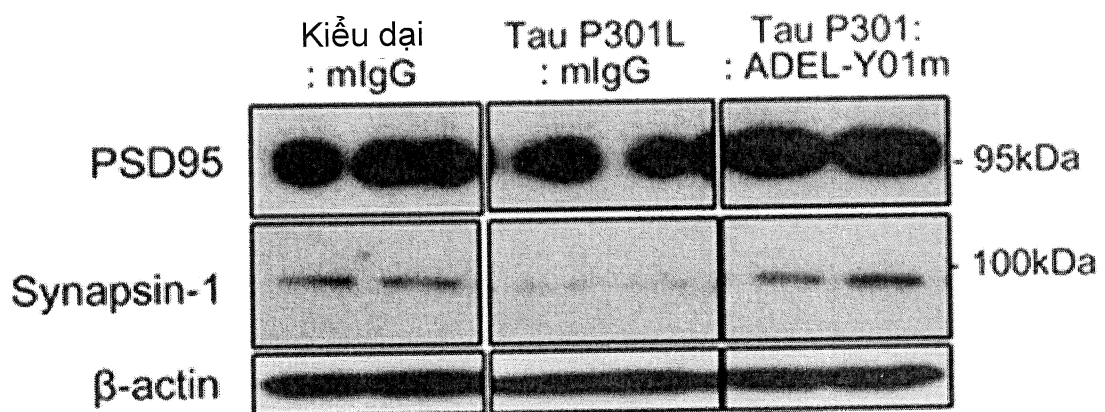
18/35

FIG. 32**FIG. 33**

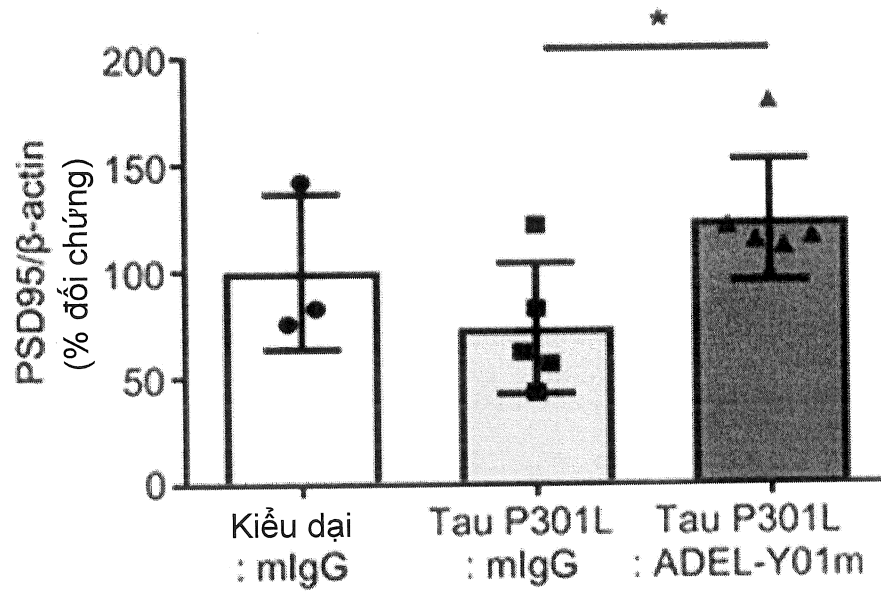
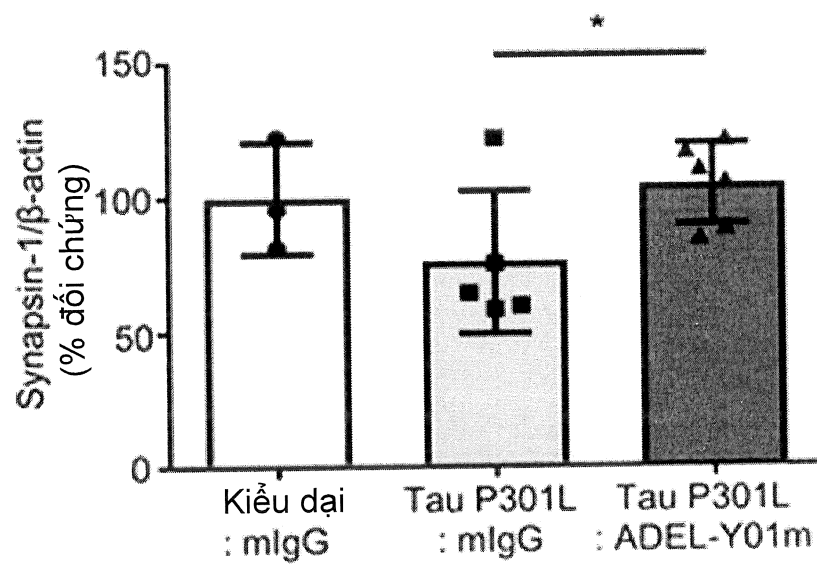
19/35

FIG. 34**FIG. 35**

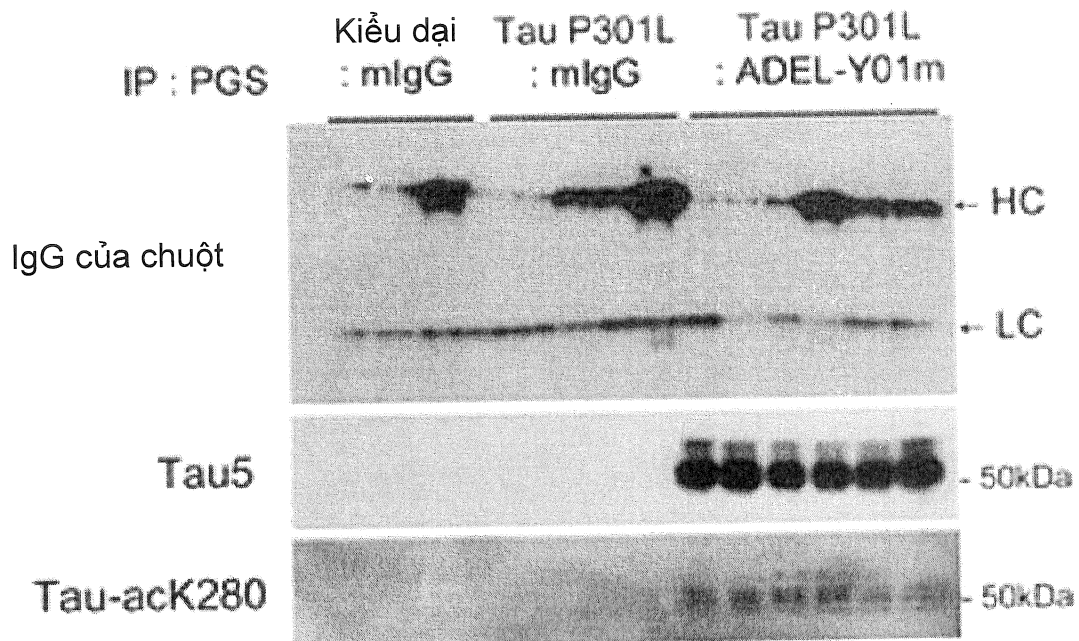
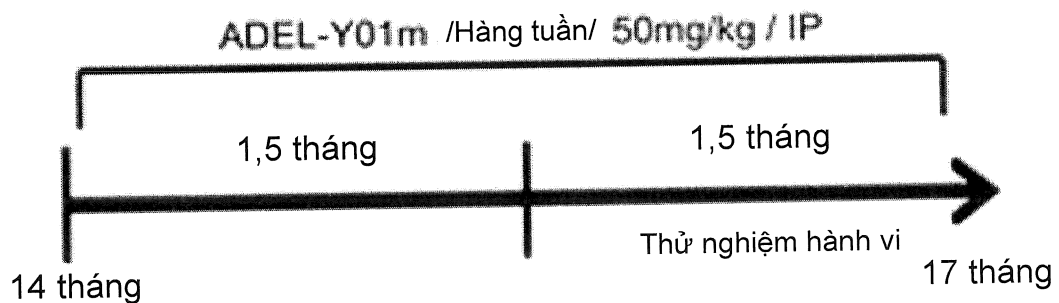
20/35

FIG. 36**FIG. 37**

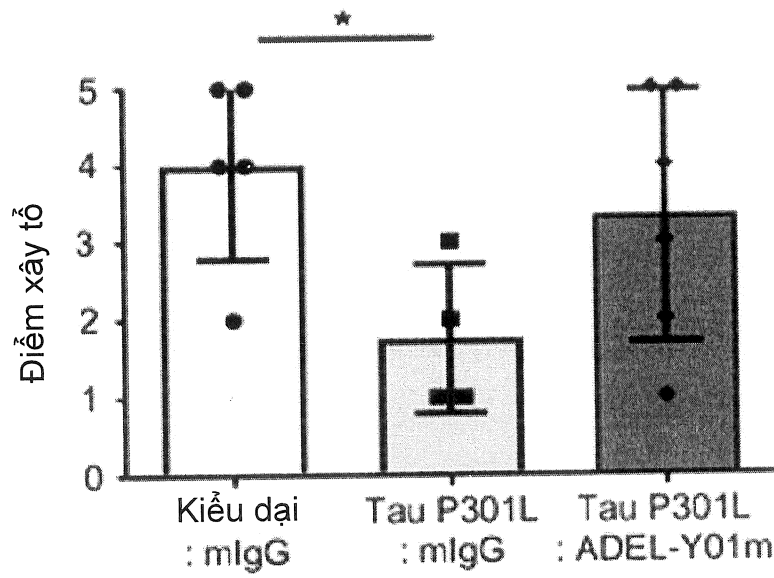
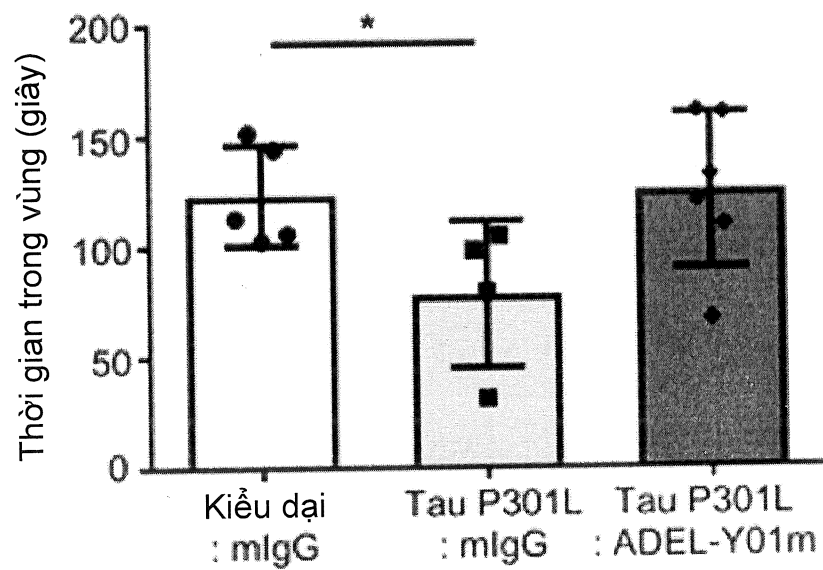
21/35

FIG. 38**FIG. 39**

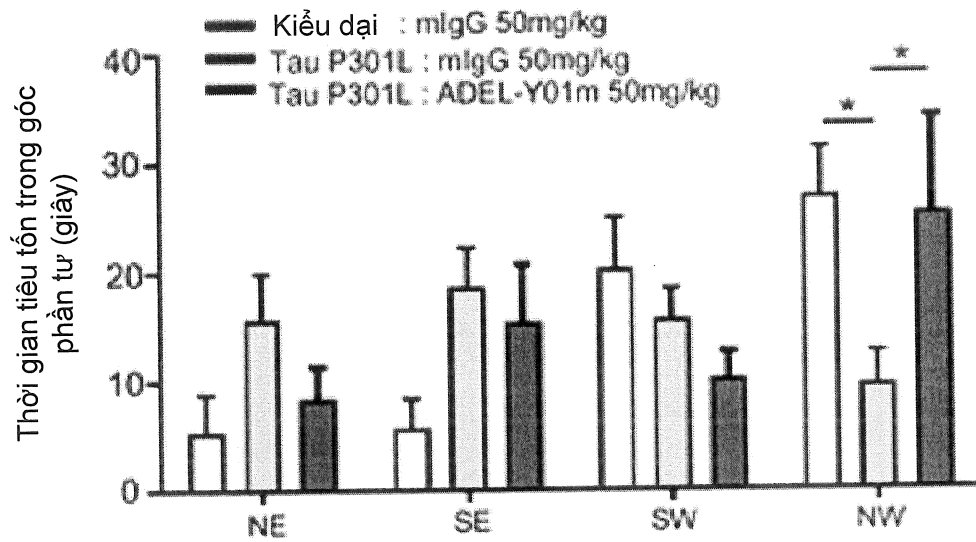
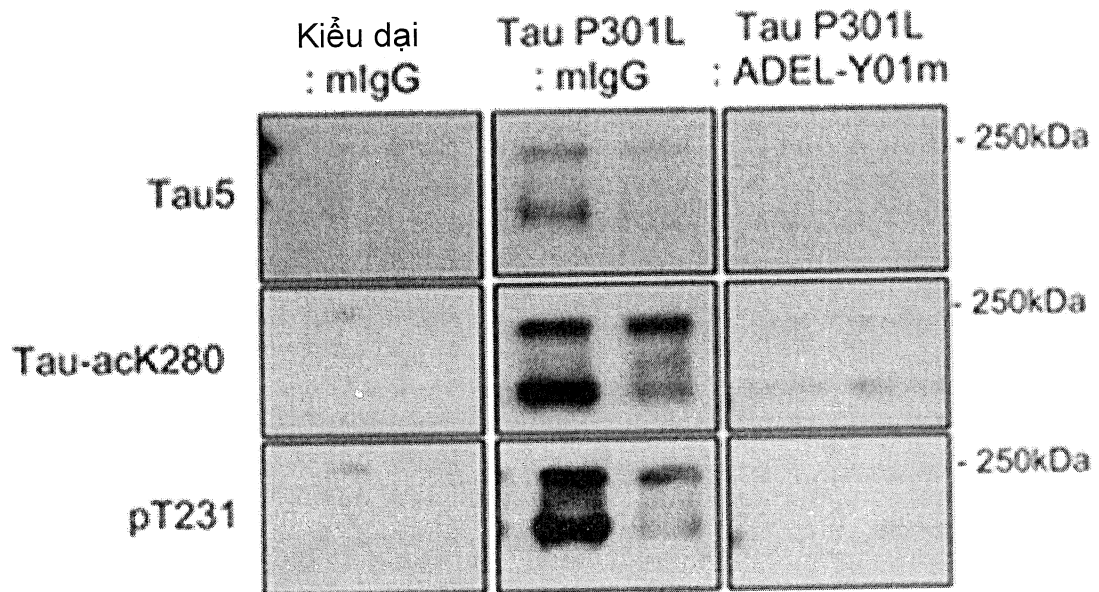
22/35

FIG. 40**FIG. 41**

23/35

FIG. 42**FIG. 43**

24/35

FIG. 44**FIG. 45**

25/35

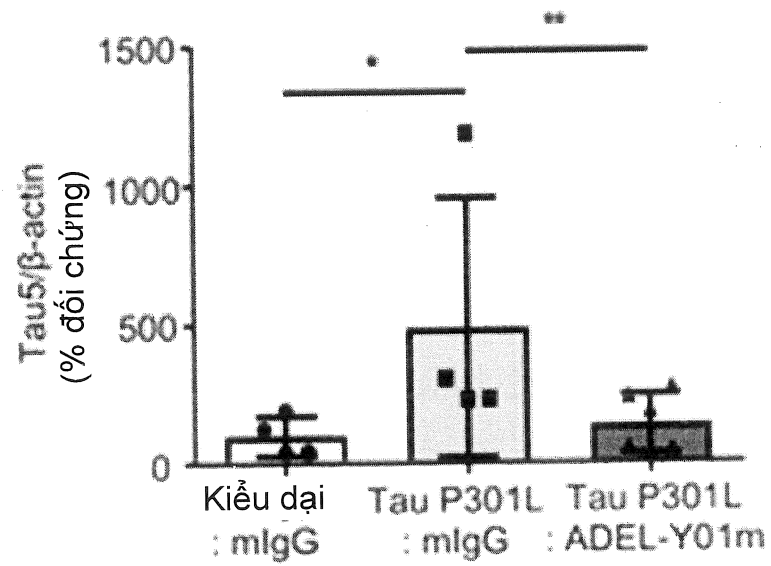
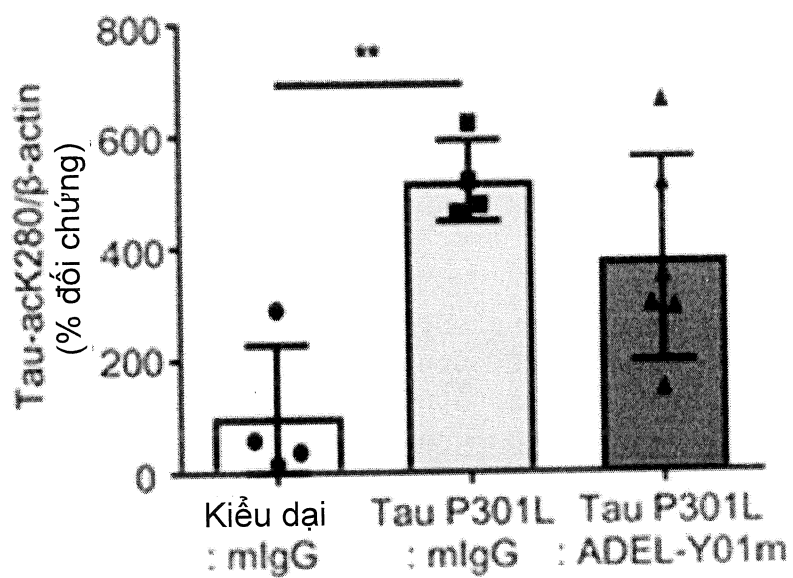
FIG. 46**FIG. 47**

FIG. 48

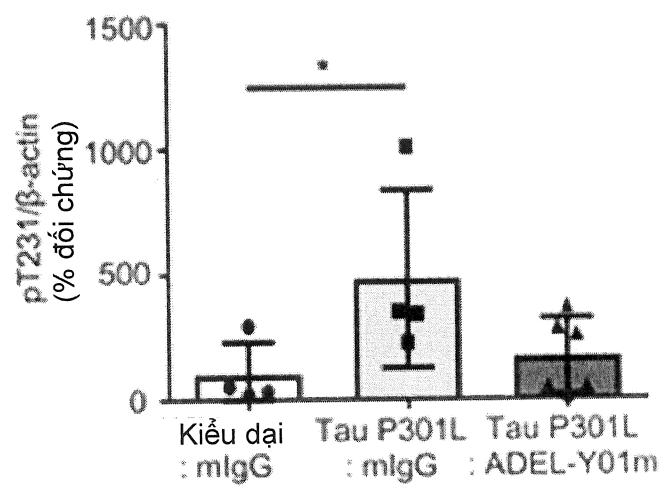


FIG. 49

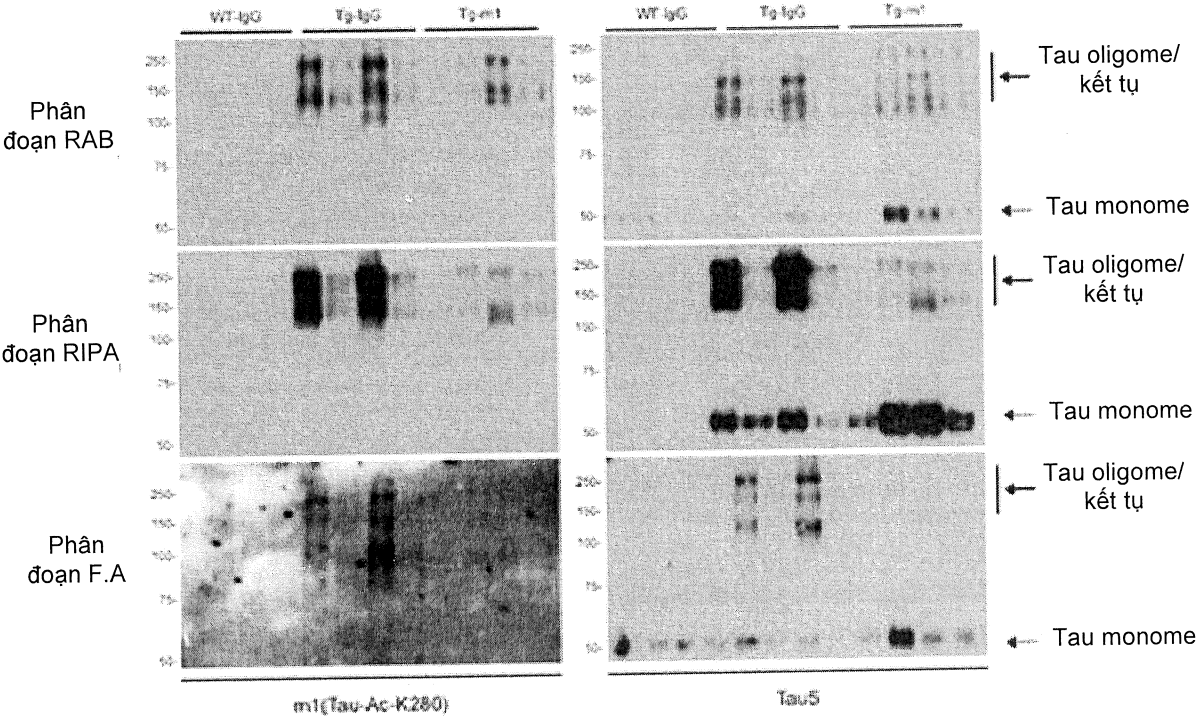


FIG. 50

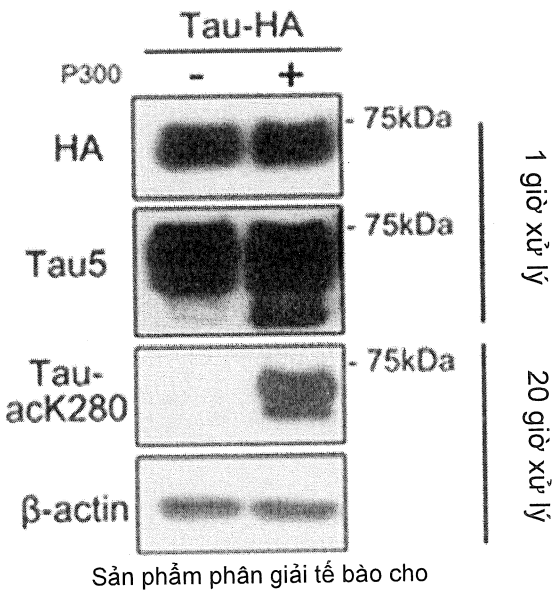


FIG. 51

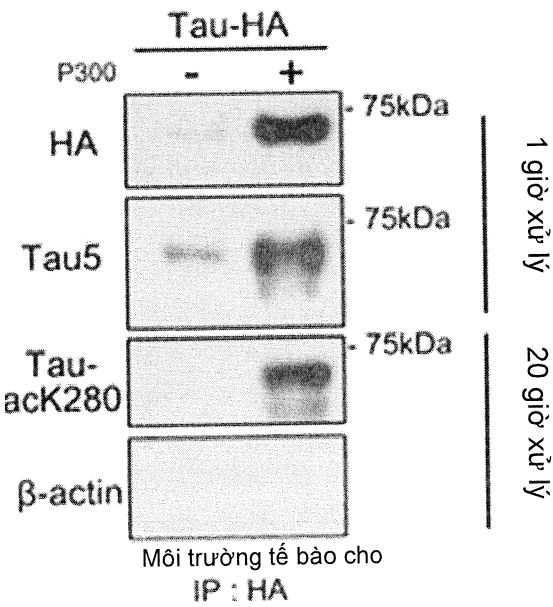


FIG. 52

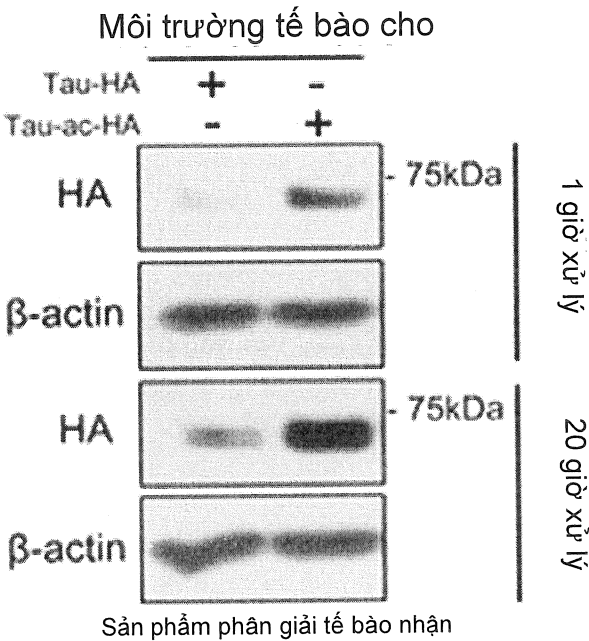
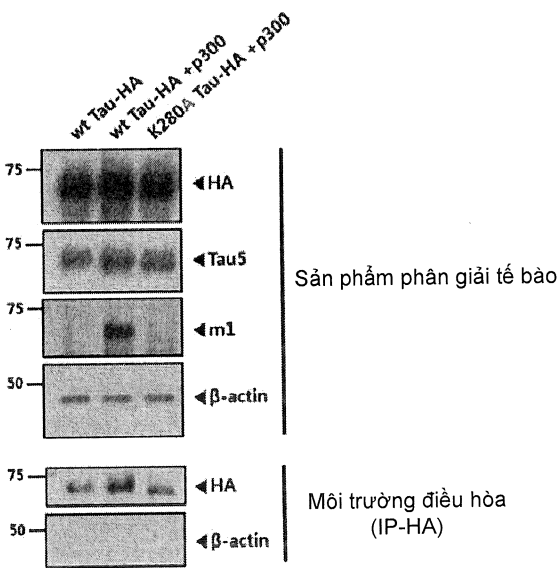
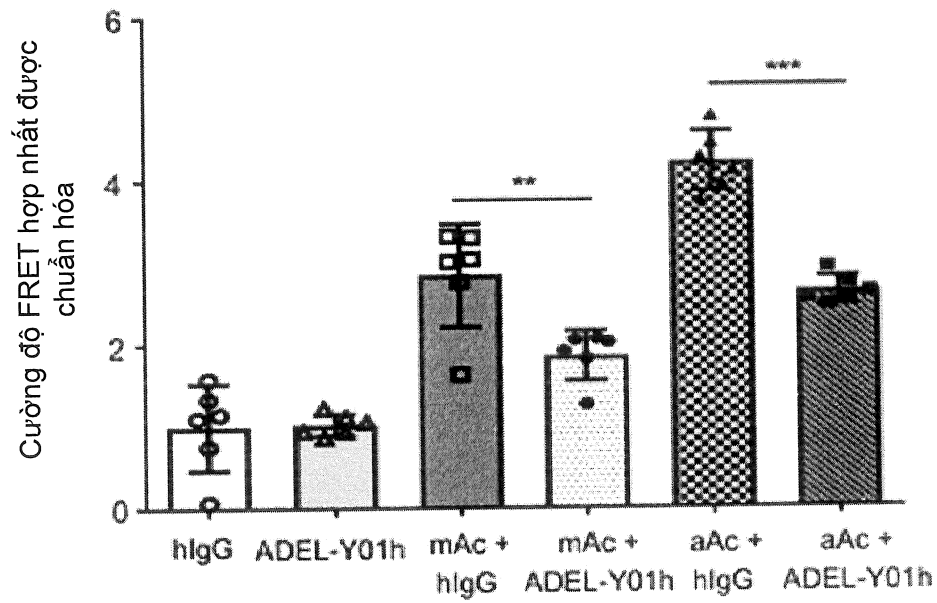
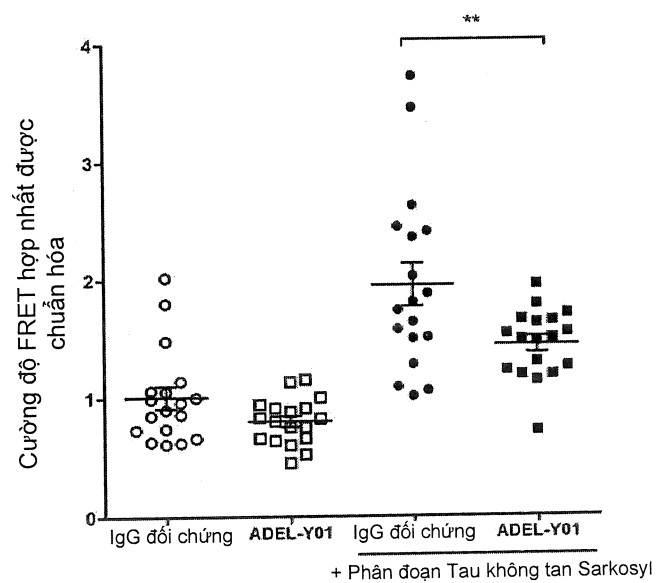


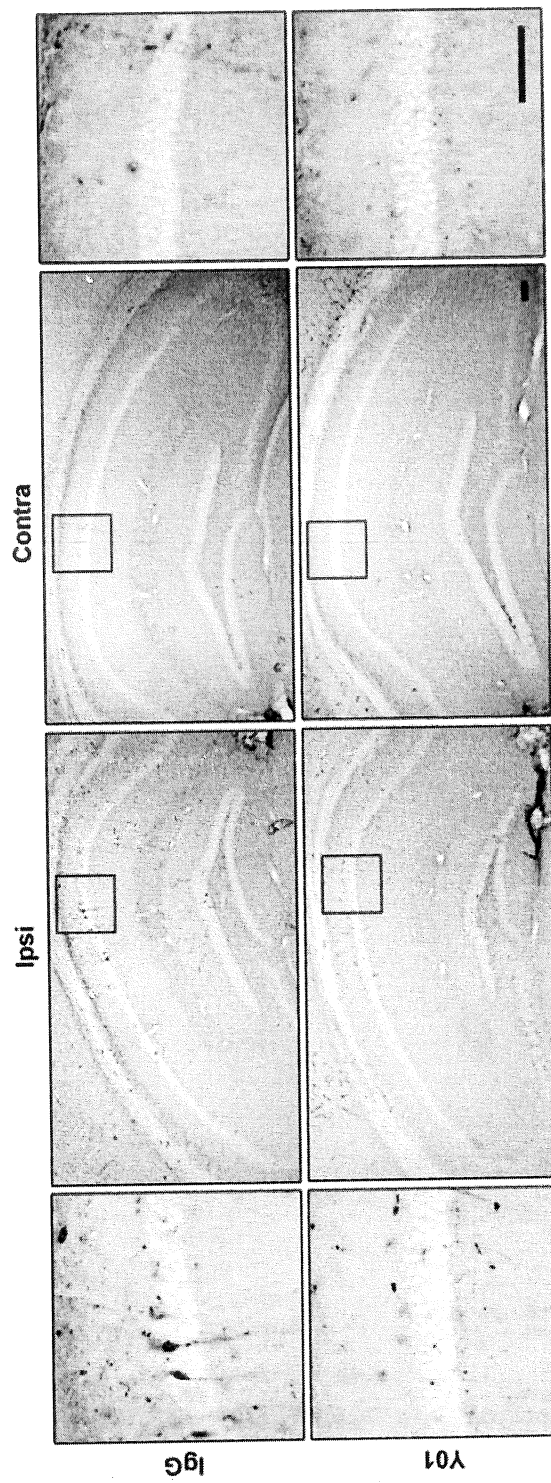
FIG. 53



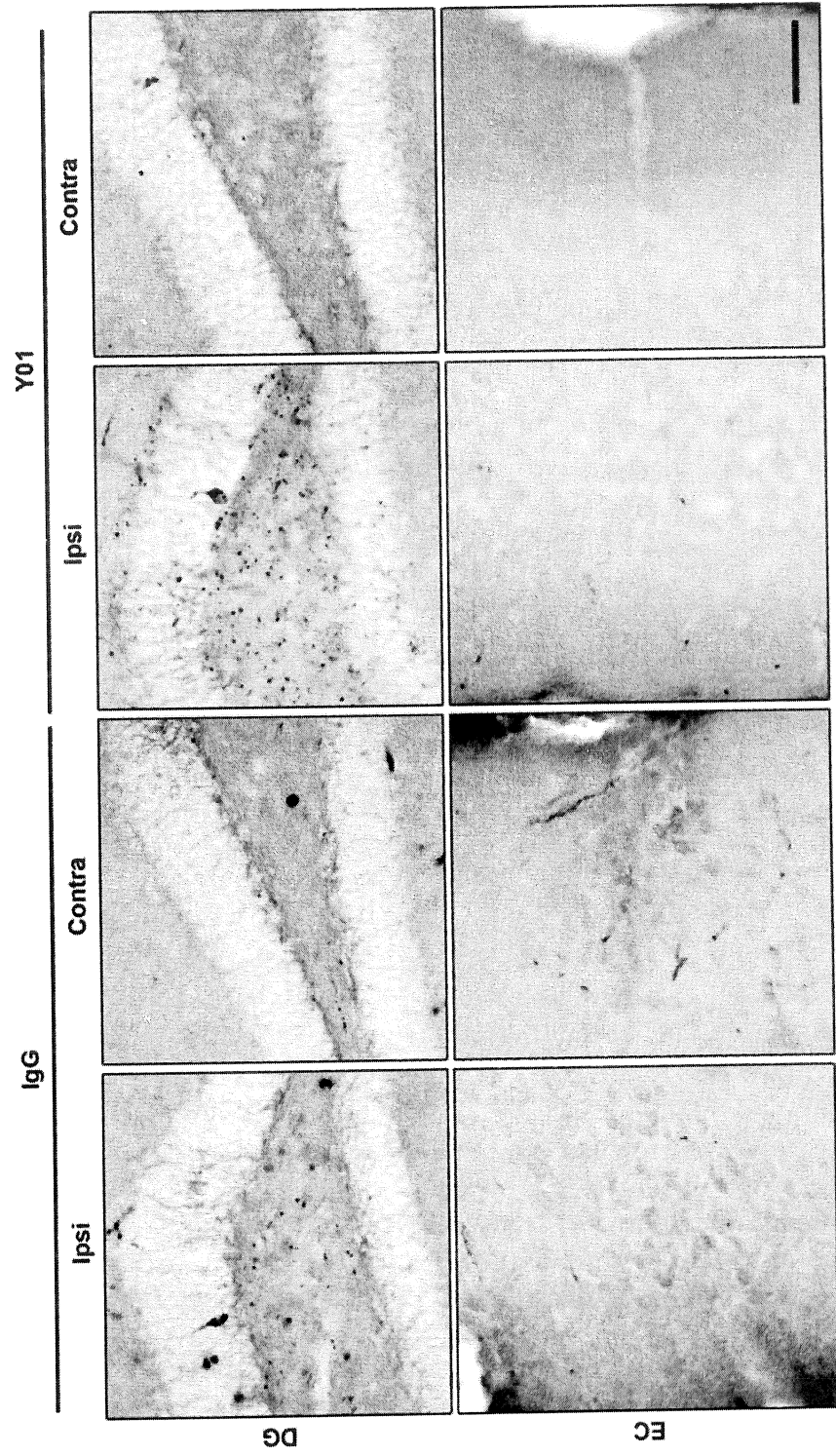
29/35

FIG. 54**FIG. 55**

30/35



31/35



32/35

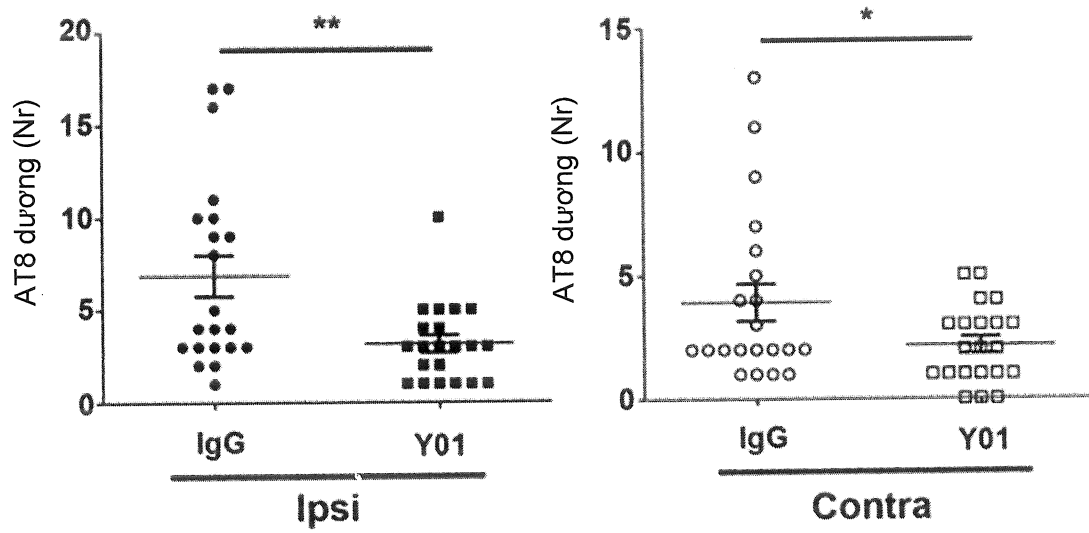
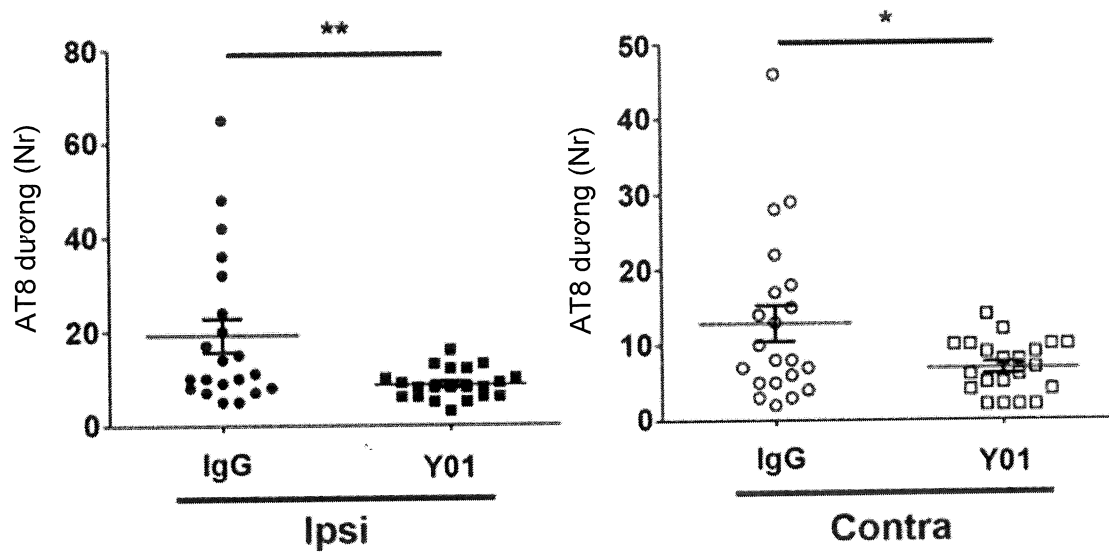
FIG. 58**FIG. 59**

FIG. 60

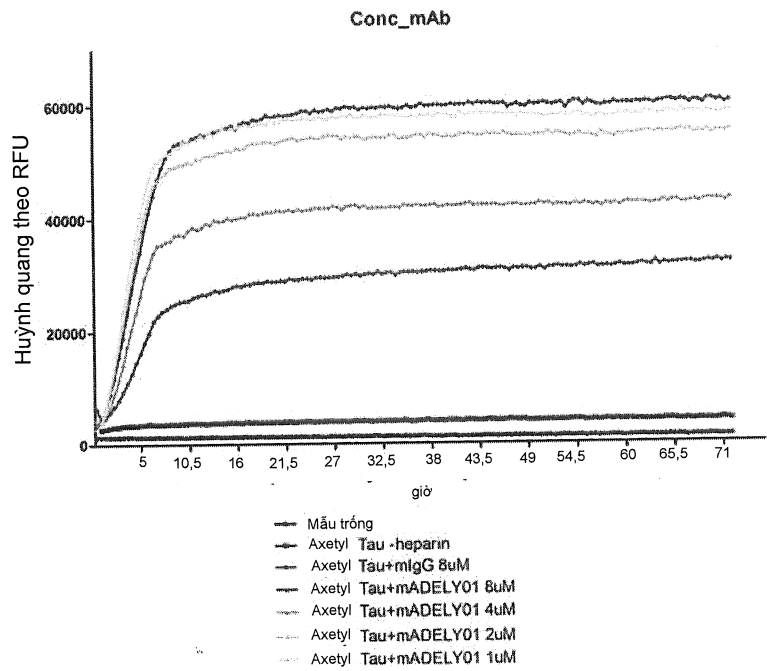
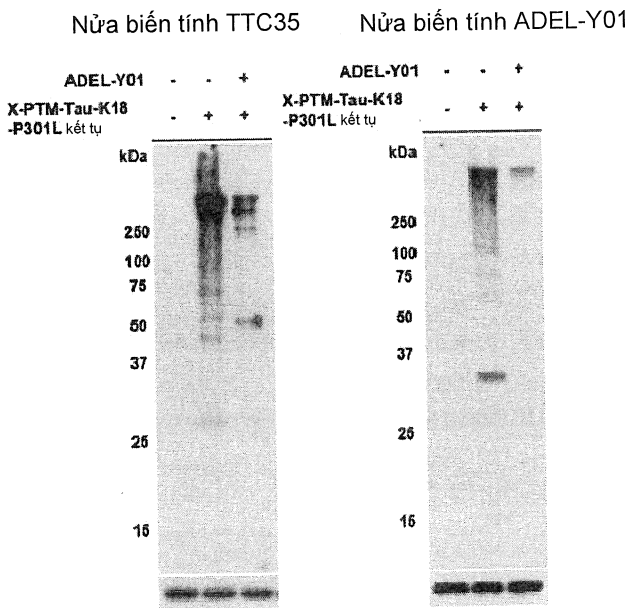
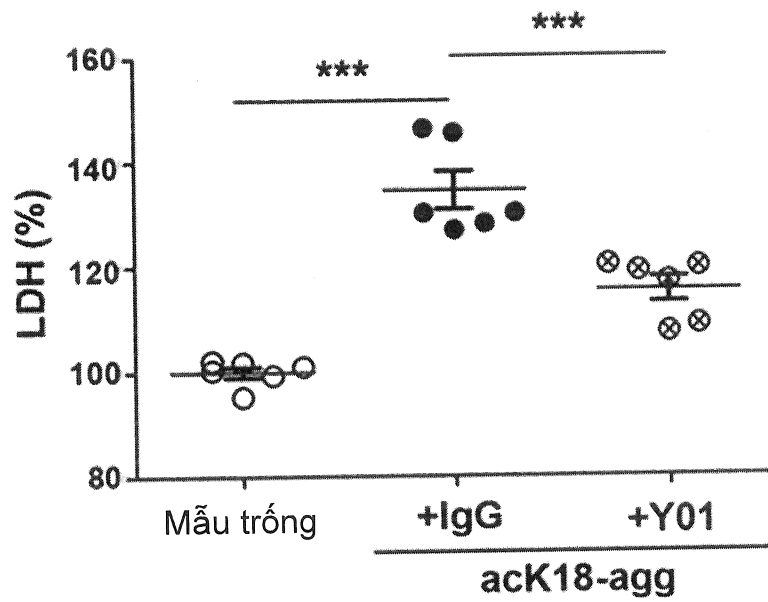
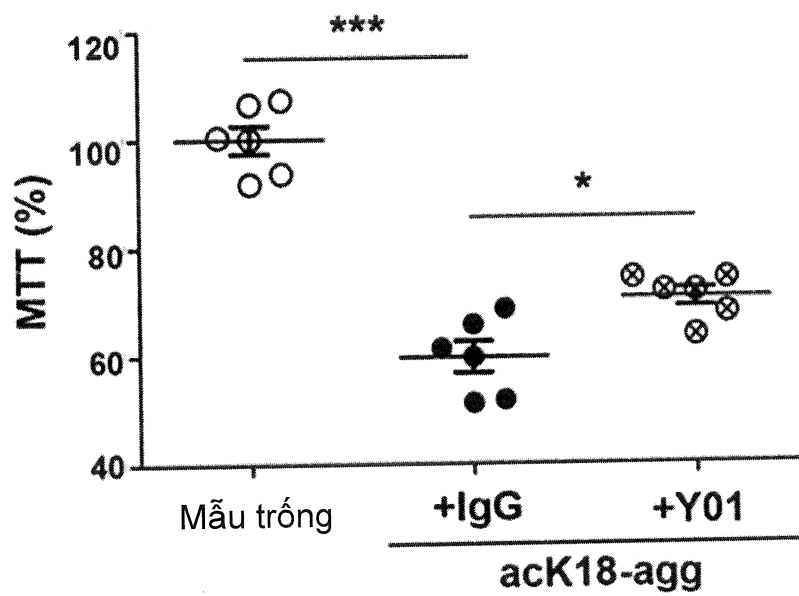


FIG. 61



34/35

FIG. 62**FIG. 63**

35/35

FIG. 64