



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

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

(11) 
1-0020141

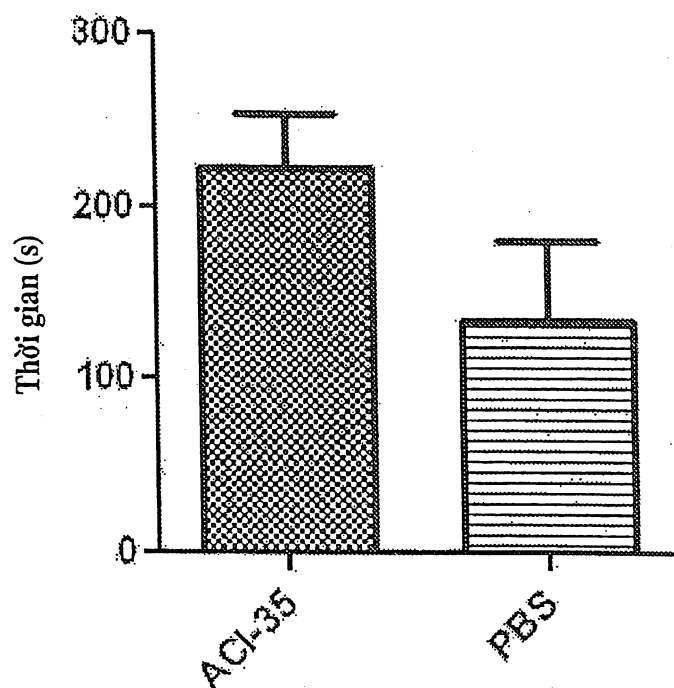
(51)⁷ **A61K 39/385, 38/10, 39/00, 9/127**

(13) **B**

(21)	1-2011-02985	(22)	01.04.2010		
(86)	PCT/EP2010/054418	01.04.2010	(87)	WO2010/115843	14.10.2010
(30)	09157303.0	03.04.2009	EP		
(45)	25.12.2018	369	(43)	25.09.2012	294
(73)	1. AC Immune S.A. (CH) EPFL-PSE Building B CH-1015 Lausanne Switzerland 2. KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN (BE) KU Leuven Reserch & Development Waaistraat 6 - box 5105, 3000 Leuven/Belgium				
(72)	PFEIFER, Andrea (DE), MUHS, Andreas (DE), VAN LEUVEN, Fred (BE), PIHLGREN, Maria (SE)				
(74)	Công ty Cổ phần Hỗ trợ phát triển công nghệ Detech (DETECH)				

(54) **PEPTIT KHÁNG NGUYÊN THU ĐƯỢC TỪ PROTEIN TAU VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PEPTIT NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến các phương pháp và dược phẩm để sử dụng chữa bệnh và chẩn đoán trong phương pháp điều trị các bệnh và các rối loạn gây ra bởi hoặc liên quan đến các mớ rối sợi thần kinh. Đặc biệt, sáng chế đề cập đến dược phẩm bao gồm peptit kháng nguyên, đặc biệt là các phospho-peptit kháng nguyên bắt chước các phospho-epitop bệnh lý chủ yếu của protein tau, để sử dụng chữa bệnh và chẩn đoán trong phương pháp điều trị các bệnh tau bao gồm bệnh Alzheimer.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các phương pháp và dược phẩm để sử dụng trong việc điều trị và chẩn đoán các bệnh và các rối loạn gây ra bởi hoặc liên quan đến các mớ rối sợi thần kinh. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến các phương pháp và dược phẩm để sử dụng trong việc điều trị và chẩn đoán các bệnh tau bao gồm bệnh Alzheimer (AD).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các mớ rối sợi thần kinh là dấu hiệu phân biệt bệnh lý thần kinh chủ yếu ở bệnh Alzheimer (AD). Chúng phát sinh bởi sự kết tụ của protein tau tăng phosphoryl hoá và các cấu hình riêng của nó. AD chia sẻ bệnh lý này với nhiều bệnh lý protein tau thoái hoá thần kinh, đặc biệt với các dạng sa sút trí tuệ trán - thái dương (frontotemporal dementia (FTD)).

Protein tau là protein “không gấp nếp tự nhiên”, tan tùy ý mà có thể gắn kết chặt chẽ với cấu trúc vi ống (microtubuli-MT) để thúc đẩy sự gắn kết và độ ổn định của chúng. Các MT có vai trò rất quan trọng đối với tính toàn vẹn bộ khung tế bào của các tế bào thần kinh – và do đó rất quan trọng đối với sự cấu tạo và hoạt động thích hợp của các dòng tế bào thần kinh, sau đây là sự học tập và trí nhớ. Gắn kết của tau với MT được kiểm soát bằng quá trình phosphoryl hoá động và loại phosphoryl, như được chứng tỏ chủ yếu *in vitro* và trong các tế bào không phải là tế bào thần kinh. Do số lượng các vị trí có thể phosphoryl hoá lớn (>80), nên sự đóng góp chính xác của từng vị trí và sự đồng nhất của các kinaza chịu trách nhiệm vẫn chưa được xác định được ở mức độ cao *in vivo*.

Ở não bị mắc AD, bệnh lý tau phát triển muộn hơn, và vì vậy có thể đáp ứng với bệnh lý amyloid, nó tạo nên giả thuyết xâu chuỗi về thác amyloid. Điều này dựa vào và được chứng tỏ bằng các nghiên cứu ở các bệnh nhân mắc hội chứng AD và Down, và được chứng thực bằng các nghiên cứu ở chuột chuyển gen có bệnh lý tau và amyloid kết hợp (Lewis et al., 2001; Oddo et al., 2004; Ribe et al., 2005; Muylleert et al, 2006; 2008; Terwel et al, 2008).

Thời điểm chính xác dẫn đến cả hai bệnh lý ở các bệnh nhân bị mắc AD cũng như các cơ chế mà gắn kết amyloid với bệnh lý tau vẫn chưa được biết đến rộng rãi, nhưng được đề xuất là có liên quan đến việc hoạt hóa con đường truyền tín hiệu thần kinh mà tác động lên hoặc bởi GSK3 và cdk5 làm “các tau-kinaza” chính (tổng quan bởi Muylleert et al, 2006, 2008).

Giả thuyết rằng bệnh tau không có tác dụng phụ lạnh tính mà việc thể hiện bệnh lý chủ yếu ở AD dựa vào các quan sát thử nghiệm và bệnh lý, di truyền hợp lý mà hoàn toàn củng cố lẫn nhau:

* đối với các trường hợp AD di truyền khởi phát sớm mà do các đột biến ở tiền chất protein amyloid (APR) hoặc presenilin, nguyên nhân gây bệnh bắt buộc là sự tích tụ amyloid, nhưng luôn là bệnh lý này bao gồm bệnh tau thứ phát, giống hệt với bệnh lý ở các trường hợp AD rời rạc khởi phát muộn.

* tính nghiêm trọng của sự rối loạn chức năng và sự sa sút trí tuệ liên quan đến bệnh tau, nhưng không liên quan đến bệnh lý amyloid, được minh họa mới đây nhất bằng một vài nghiên cứu lâm sàng các pha 1&2 mà bao gồm tạo ảnh PIB-PET cho amyloid và nhận dạng nhiều “đương tính giả”: các cá thể bình thường về mặt nhận thức với lớp bồi tích amyloid lớn trong não.

* ở FTD di truyền, bệnh tau bị kích thích bởi tau đột biến và gây trực tiếp đến sự thoái hoá thần kinh, mà không có biểu hiện bệnh lý amyloid.

* ở các mô hình chuột thử nghiệm, các thiếu hụt về nhận thức gây ra bởi bệnh lý amyloid được truyền giảm gần như hoàn toàn do không có protein tau (Roberson et al, 2007).

Các luận cứ kết hợp ủng hộ giả thuyết rằng protein tau là nhân tố chính gây chết nhận thức ở AD và các bệnh tau thoái hoá thần kinh liên quan.

Việc điều trị AD bắt đầu xuất hiện nổi bật nhất là bằng liệu pháp miễn dịch thụ động với mAbs đặc hiệu, để làm sạch các peptit amyloid và các khối kết tụ của chúng mà được cho là gây độc thần kinh hoặc gây độc khớp thần kinh.

Liệu pháp miễn dịch nhằm vào bệnh lý tau, như được đề xuất ở đây, được dự đoán là có thể làm trung hoà các cấu hình riêng protein tau bệnh lý đã biết hoặc được giả thiết là gây sự thoái hoá thần kinh. Bệnh lý amyloid ở AD gây ra và kết tụ các khối protein tau tăng phosphoryl hoá trong tế bào thần kinh được giả thiết là đóng vai trò hiệp đồng trong thác nhận thức và thoái hóa của các trường hợp bệnh lý dẫn đến từ suy giảm nhận thức nhẹ (MCI) thành sa sút trí tuệ trầm trọng của AD. Vì vậy việc kết hợp trị liệu nhằm vào tau với việc trị liệu nhằm vào amyloid (hoặc bất kỳ loại nào khác) sẽ tạo thành phương pháp điều trị AD được ưu tiên hơn, và về cơ bản là hiệu quả hơn.

Các phương pháp chữa bệnh khác nhằm vào protein tau là ít khi tìm thấy và chủ yếu bao gồm:

- Các chất ức chế kinaza mà được cho là làm tăng mức độ phosphoryl hoá tau thành các mức bệnh lý
- Các hợp chất phong bế sự tích tụ bào chất của quá trình tăng phosphoryl hoá protein tau.

Các phương pháp này cũng có những mặt hạn chế về tính đặc hiệu và tính hiệu quả, một vấn đề mà chúng cần nỗ lực xử lý để cải biến sự chuyển hoá của APP và amyloid, tất cả nhằm nhấn mạnh tầm quan trọng của việc nghiên cứu liên tục đối với các tùy chọn điều trị bổ sung, kể cả liệu pháp miễn dịch chống lại tau.

Trong thực tế, không có các nỗ lực nhằm xác định – chỉ đề đến đích - các cấu hình riêng tau bệnh lý *in vivo*. Trong thử nghiệm lâm sàng AJ342 pha II, bệnh lý mờ rối đường như không được xem xét và phân tích sâu đáng kể (Nicoll et al., 2003; Masliah et al., 2005). Nói cách khác, liệu pháp miễn dịch thử nghiệm nhằm vào amyloid trong kiểu chuột tiền lâm sàng có bệnh lý tương tự AD kết hợp cũng thể hiện hiệu quả đối với bệnh lý tau mặc dù các khối kết tụ tau vẫn tiếp tục tồn tại (Oddo et al., 2004).

Một số nghi ngờ đã được bị loại bỏ dựa vào tính khả thi của việc tiếp cận protein tau nội bào bằng liệu pháp miễn dịch. Chúng bị phản đối bởi nghiên cứu thử nghiệm mới đây nhất của Asuni và các cộng sự (Asuni et al., 2007) ở mô hình chuột mắc bệnh tau. Chúng thể hiện mức bệnh lý mờ rối giảm và các cải thiện chức năng nhờ tiêm chủng bằng phospho-peptit dẫn xuất từ protein tau. Các dữ liệu đó chứng thực các báo cáo trước đó về liệu pháp miễn dịch nhằm vào α -synuclein ở mô hình bệnh Parkinson (Parkinson's disease-PD) (Masliah et al., 2005) và vào peroxit dismutaza ở kiểu xơ cứng cột bên teo cơ (amyotrophic lateral sclerosis-ALS) (Urushitani et al., 2007). Hai loại bệnh này là các ví dụ về các protein nội bào tạo ra sự thoái hoá thần kinh mà gần như cho đến nay các cơ chế chưa được hiểu đầy đủ. Nói cách khác, protein tau tái tổ hợp có độ dài đầy đủ được tạo ra trong và phân lập từ vi khuẩn đường như không thích hợp làm vacxin, cho dù các chất phụ trợ đã sử dụng, tức là Freund hoàn chỉnh và độc tố ho gà, có thể góp phần tạo ra kết quả âm tính của thử nghiệm này (Rosenmann et al., 2006).

Vẫn có nhu cầu mà chưa được đáp ứng về các liệu pháp miễn dịch thụ động và/hoặc chủ động mà có tác dụng chống lại các cấu hình riêng protein bệnh lý đã biết – hoặc giả định – gây ra các rối loạn thoái hoá thần kinh, như bệnh lý amyloid ở AD bị gây ra bởi, ví dụ các khối kết tụ protein tau tăng phosphoryl hoá trong tế bào thần kinh mà thường là đặc trưng cho AD là amyloid.

Nhu cầu chưa được đáp ứng này có thể được thỏa mãn trong phạm vi của sáng chế nhờ đề xuất các phương pháp tạo miễn dịch chủ động và thụ động có sử dụng các vaccin trên cơ sở liposom (Nicolau et al., 2002; Muhs et al., 2007) và mAbs dựa vào các phospho-peptit bắt chước các phospho-epitop bệnh lý chủ yếu của protein tau. Các tác động kết hợp này tạo thành mAbs đặc hiệu mới chống lại các phospho-epitop đơn và phức hợp, tuyến tính và thích ứng dựa vào protein tau được cho là gây ra tính độc thần kinh và khớp thần kinh ở các bệnh lý tau, bao gồm AD.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các phương pháp mới và các peptit kháng nguyên theo sáng chế và như được mô tả ở đây và các mảnh có chức năng của chúng, kể cả các chế phẩm chứa các peptit kháng nguyên này hoặc các mảnh của chúng để tạo ra tính đặc hiệu cao, đặc biệt là đáp ứng miễn dịch, đặc hiệu thích hợp cho cơ thể sinh vật, mà cụ thể là ở động vật, cụ thể là động vật có vú hoặc người, mà có hiệu lực cao và có khả năng ngăn ngừa hoặc làm giảm các bệnh lý tau, hoặc các triệu chứng liên quan đến các bệnh lý tau, nhóm các bệnh và các rối loạn liên quan đến sự hình thành của các thương tổn sợi thần kinh, bệnh lý não nổi bật trong nhóm các rối loạn thoái hoá thần kinh này.

Sáng chế cũng đề cập đến các kháng thể, cụ thể là các kháng thể đơn dòng, kể cả các mảnh có chức năng của chúng, và các dược phẩm chứa các kháng thể này, chúng được tạo ra bởi tính đặc hiệu cao, đặc biệt là đáp ứng miễn

dịch, đặc hiệu thích hợp cho cơ thể sinh vật khi sử dụng peptit kháng nguyên theo sáng chế và như được mô tả ở đây hoặc mảnh có chức năng của chúng và chế phẩm chứa peptit kháng nguyên này hoặc mảnh của chúng để ngăn ngừa hoặc làm giảm các bệnh thoái hoá thần kinh, hoặc các triệu chứng liên quan đến các bệnh thoái hoá thần kinh, nhóm các bệnh và các rối loạn liên quan đến sự hình thành của các thương tổn sợi thần kinh, bệnh lý não nổi bật trong nhóm các rối loạn thoái hoá thần kinh này.

Nhóm các rối loạn thoái hoá thần kinh này có thể được chia nhỏ thành hai nhóm phụ, ở nhóm phụ thứ nhất, các bệnh hoặc các rối loạn trong đó có sự tồn tại đồng thời các bệnh lý tau và amyloid bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh Alzheimer, bệnh Creutzfeldt-Jacob, sa sút trí tuệ chấn thương não, hội chứng Down, bệnh Gerstmann-Straussier-Scheinker, viêm cơ thể vùi, bệnh mạch máu prion protein amyloid ở não và tổn thương chấn thương não.

Ở nhóm phụ thứ hai các bệnh hoặc các rối loạn trong đó không có bệnh lý amyloid khác biệt bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phức hợp xơ cứng cột bên teo cơ/parkinson-sa sút trí tuệ, sa sút trí tuệ nhuộm độc bạc màu nhuộm, thoái hoá dưới vỏ não, các mớ rối sợi thần kinh lan toả có sự vôi hoá, sa sút trí tuệ trán thái dương với bệnh Parkinson liên kết với nhiễm sắc thể 17, bệnh Hallevorden-Spatz, chứng teo đa hệ, bệnh Niemann-Pick, kiểu C, bệnh Pick, chứng tăng thần kinh đệm dưới vỏ tiền triền, viêm não trên nhân tiền triền.

Đặc biệt, sáng chế đề xuất các phương pháp mới và các dược phẩm bao gồm các peptit kháng nguyên theo sáng chế và như được mô tả ở đây hoặc các mảnh có chức năng của chúng và các kháng thể, đặc biệt là các kháng thể đơn dòng, bao gồm các phần có chức năng của chúng có thể thu được khi sử dụng các peptit kháng nguyên theo sáng chế và như được mô tả ở đây hoặc các mảnh có chức năng của chúng cho động vật chủ, để duy trì hoặc cải thiện, nhưng đặc biệt là để hồi phục, đặc biệt hơn là để hồi phục hoàn toàn khả năng nhớ liên

quan đến nhận thức ở động vật có vú, đặc biệt là người bị mắc bệnh hoặc rối loạn liên quan đến sự hình thành của các thương tổn sợi thần kinh.

Mục đích của sáng chế là đề xuất peptit kháng nguyên, đặc biệt là peptit kháng nguyên được cải biến hoặc mảnh có chức năng của chúng và các dược phẩm bao gồm peptit kháng nguyên này hoặc mảnh có chức năng của chúng, peptit này có thể thu được từ protein tau. Đặc biệt, sáng chế đề cập đến peptit kháng nguyên, đặc biệt là kháng nguyên phospho-peptit, hoặc mảnh có chức năng của chúng, bắt chước phospho-epitop bệnh lý chính của protein tau, peptit hoặc mảnh này được cải biến thêm nữa nhờ gắn kết với hoặc hoàn nguyên trong chất mang, dược phẩm bao gồm peptit kháng nguyên này hoặc mảnh có chức năng của chúng và phương pháp để tạo ra peptit hoặc mảnh có chức năng của chúng và dược phẩm tương ứng, để điều trị các bệnh và các rối loạn gây ra bởi hoặc liên quan đến sự hình thành của các thương tổn sợi thần kinh, bệnh lý não nổi bật ở bệnh tau bao gồm một nhóm pha tạp các bệnh hoặc các rối loạn thoái hoá thần kinh kể cả các bệnh hoặc các rối loạn có sự tồn tại đồng thời các bệnh lý tau và amyloid bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh Alzheimer, bệnh Creutzfeldt-Jacob, sa sút trí tuệ chấn thương não, hội chứng Down, bệnh Gerstmann-Straussier-Scheinker, viêm cơ thể vùi, bệnh mạch máu prion protein amyloid ở não và tổn thương chấn thương não và các bệnh hoặc các rối loạn khác không thể hiện bệnh lý amyloid khác biệt bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phức hợp xơ cứng cột bên teo cơ/parkinson-sa sút trí tuệ của Guam, bệnh tế bào thần kinh vận động không phải Guamanian có các mớ rối sợi thần kinh, sa sút trí tuệ nhuộm độc bạc màu nhuộm, thoái hoá dưới vỏ não, các mớ rối sợi thần kinh lan toả có sự vôi hoá, sa sút trí tuệ trán thái dương với bệnh Parkinson liên kết với nhiễm sắc thể 17, bệnh Hallevorden-Spatz, chứng teo đa hệ, bệnh Niemann-Pick, kiểu C, bệnh Pick, chứng tăng thần kinh đệm dưới vỏ tiền triền, chứng liệt trên nhân tiền triền, viêm não xơ cứng bán cấp, sự sa sút trí tuệ có duy nhất mớ rối, hội chứng Parkinson, chứng loạn dưỡng trương cơ lực.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến peptit kháng nguyên hoặc mảnh có chức năng của chúng và các dược phẩm bao gồm peptit kháng nguyên này hoặc mảnh có chức năng của chúng, peptit hoặc mảnh này bao gồm từ 5 gốc axit amin đến 30 gốc axit amin, cụ thể là từ 10 gốc axit amin đến 25 gốc axit amin, cụ thể là từ 12 gốc axit amin đến 22 gốc axit amin, cụ thể là từ 14 gốc axit amin đến 20 gốc axit amin, cụ thể là từ 16 gốc axit amin đến 18 gốc axit amin tương ứng, có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9 trong đó các trình tự này thể hiện kiểu phosphoryl hoá đặc trưng mà có liên quan đến tình trạng hoặc rối loạn bệnh lý, cụ thể là tình trạng hoặc rối loạn liên quan đến sự hình thành của các thương tổn sợi thần kinh.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic hoặc các mảnh của chúng mã hoá peptit kháng nguyên hoặc mảnh có chức năng của chúng được chọn từ nhóm gồm có các trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến peptit kháng nguyên, đặc biệt là peptit kháng nguyên được cải biến theo sáng chế, hoặc mảnh có chức năng của chúng và dược phẩm bao gồm peptit kháng nguyên này hoặc mảnh có chức năng của chúng, peptit hoặc mảnh này có trình tự axit amin thể hiện ít nhất 80%, đặc biệt là ít nhất 85%, đặc biệt là ít nhất 90%, đặc biệt là ít nhất 95%, đặc biệt là ít nhất 98%, đặc biệt là ít nhất 99%, độ đồng nhất về trình tự với trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 2 và về cơ bản có cùng hoạt tính sinh miễn dịch như peptit kháng nguyên này của SEQ ID NO: 2, trong đó gốc axit amin tương ứng với gốc axit amin 18 (P-Tyr₁₈) của SEQ ID NO: 2 được phosphoryl hoá (T1).

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến peptit kháng nguyên, đặc biệt là peptit kháng nguyên được cải biến theo sáng chế, hoặc mảnh có chức năng của chúng và được phẩm bao gồm peptit kháng nguyên này hoặc mảnh có chức năng của chúng, peptit hoặc mảnh này có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, trong đó gốc axit amin 18 (P-Tyr-is) được phosphoryl hoá (T1).

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến peptit kháng nguyên, đặc biệt là peptit kháng nguyên được cải biến theo sáng chế, hoặc mảnh có chức năng của chúng và được phẩm bao gồm peptit kháng nguyên này hoặc mảnh có chức năng của chúng, peptit hoặc mảnh này có trình tự axit amin thể hiện ít nhất 80%, đặc biệt là ít nhất 85%, đặc biệt là ít nhất 90%, đặc biệt là ít nhất 95%, đặc biệt là ít nhất 98%, đặc biệt là ít nhất 99%, tính đồng nhất về trình tự với trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 4 tương ứng, và về cơ bản có cùng hoạt tính sinh miễn dịch như peptit kháng nguyên này có SEQ ID NO: 3, trong đó ít nhất một, đặc biệt là ít nhất 2, đặc biệt là ít nhất 3, nhưng đặc biệt là toàn bộ các gốc axit amin tương ứng với gốc axit amin 202 (P-Ser₂₀₂), 205 (P-Thr₂₀₅), 212 (P-Thr₂₁₂), và 214 (P-Ser₂₁₄) của SEQ ID NO: 3 và 4 tương ứng, được phosphoryl hoá.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến peptit kháng nguyên, đặc biệt là peptit kháng nguyên được cải biến theo sáng chế, hoặc mảnh có chức năng của chúng và được phẩm bao gồm peptit kháng nguyên này hoặc mảnh có chức năng của chúng, peptit hoặc mảnh này có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 4, tương ứng, trong đó ít nhất một, đặc biệt là ít nhất 2, đặc biệt là ít nhất 3, nhưng đặc biệt là toàn bộ các gốc axit amin 202 (P-Ser₂₀₂), 205 (P-Thr₂₀₅), 212 (P-Thr₂₁₂), và 214 (P-Ser₂₁₄) được phosphoryl hoá.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến peptit kháng nguyên, đặc biệt là peptit kháng nguyên được cải biến theo sáng chế, hoặc mảnh có chức năng

của chúng và được phẩm bao gồm peptit kháng nguyên này hoặc mảnh có chức năng của chúng, peptit hoặc mảnh này có trình tự axit amin thể hiện ít nhất 80%, đặc biệt là ít nhất 85%, đặc biệt là ít nhất 90%, đặc biệt là ít nhất 95%, đặc biệt là ít nhất 98%, đặc biệt là ít nhất 99%, tính đồng nhất về trình tự với trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 4 và về cơ bản có cùng hoạt tính sinh miễn dịch như peptit kháng nguyên này của SEQ ID NO: 4, trong đó ít nhất một, đặc biệt là ít nhất 2 trong số các gốc axit amin tương ứng với gốc axit amin 202 (P-Ser₂₀₂) và 205 (P-Thr₂₀₅) của SEQ ID NO: 4 được phosphoryl hoá.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến peptit kháng nguyên, đặc biệt là peptit kháng nguyên được cải biến theo sáng chế, hoặc mảnh có chức năng của chúng và được phẩm bao gồm peptit kháng nguyên này hoặc mảnh có chức năng của chúng, peptit hoặc mảnh này có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO: 4, trong đó ít nhất một, đặc biệt là ít nhất 2 trong số các gốc axit amin 202 (P-Ser₂₀₂) và 205 (P-Thr₂₀₅) được phosphoryl hoá.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến peptit kháng nguyên, đặc biệt là peptit kháng nguyên được cải biến theo sáng chế, hoặc mảnh có chức năng của chúng và được phẩm bao gồm peptit kháng nguyên này hoặc mảnh có chức năng của chúng, peptit hoặc mảnh này có trình tự axit amin thể hiện ít nhất 8%, đặc biệt là ít nhất 85%, đặc biệt là ít nhất 90%, đặc biệt là ít nhất 95%, đặc biệt là ít nhất 98%, đặc biệt là ít nhất 99%, tính đồng nhất về trình tự với trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 3 và về cơ bản có cùng hoạt tính sinh miễn dịch như peptit kháng nguyên này có SEQ ID NO: 3, trong đó ít nhất một, đặc biệt là ít nhất 2 trong số các gốc axit amin tương ứng với gốc axit amin 212 (P-Thr₂₁₂) và 214 (P-Ser₂₁₄) của SEQ ID NO: 3 được phosphoryl hoá.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến peptit kháng nguyên, đặc biệt là peptit kháng nguyên được cải biến theo sáng chế, hoặc mảnh có chức năng của chúng và được phẩm bao gồm peptit kháng nguyên này hoặc mảnh có chức năng của chúng, peptit hoặc mảnh này có trình tự axit amin như được thể hiện

trong SEQ ID NO: 3, trong đó ít nhất một, đặc biệt là ít nhất 2 trong số các gốc axit amin 212 (P-Thr₂₁₂) và 214 (P-Ser₂₁₄) được phosphoryl hoá.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến peptit kháng nguyên, đặc biệt là peptit kháng nguyên được cải biến theo sáng chế, hoặc mảnh có chức năng của chúng và được phẩm bao gồm peptit kháng nguyên này hoặc mảnh có chức năng của chúng, peptit hoặc mảnh này có trình tự axit amin thể hiện ít nhất 80%, đặc biệt là ít nhất 85%, đặc biệt là ít nhất 90%, đặc biệt là ít nhất 95%, đặc biệt là ít nhất 98%, đặc biệt là ít nhất 99%, tính đồng nhất về trình tự với trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 5 và về cơ bản có cùng hoạt tính sinh miễn dịch như peptit kháng nguyên này có SEQ ID NO: 5, trong đó ít nhất một, nhưng đặc biệt là toàn bộ các gốc axit amin tương ứng với gốc axit amin 396 (P-Ser₃₉₆) và 404 (P-Ser₄₀₄) của SEQ ID NO: 5 được phosphoryl hoá.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến peptit kháng nguyên, đặc biệt là peptit kháng nguyên được cải biến theo sáng chế, hoặc mảnh có chức năng của chúng và được phẩm bao gồm peptit kháng nguyên này hoặc mảnh có chức năng của chúng, peptit hoặc mảnh này có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO: 5, trong đó ít nhất một, nhưng đặc biệt là toàn bộ các gốc axit amin 396 (P-Ser₃₉₆) và 404 (P-Ser₄₀₄) được phosphoryl hoá.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến peptit kháng nguyên, đặc biệt là peptit kháng nguyên được cải biến theo sáng chế, hoặc mảnh có chức năng của chúng và được phẩm bao gồm peptit kháng nguyên này hoặc mảnh có chức năng của chúng, peptit hoặc mảnh này có trình tự axit amin thể hiện ít nhất 80%, đặc biệt là ít nhất 85%, đặc biệt là ít nhất 90%, đặc biệt là ít nhất 95%, đặc biệt là ít nhất 98%, đặc biệt là ít nhất 99%, tính đồng nhất về trình tự với trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 6 và về cơ bản có cùng hoạt tính sinh miễn dịch như peptit kháng nguyên này có SEQ ID NO: 6, trong đó ít nhất một, nhưng đặc biệt là toàn bộ các gốc axit amin tương ứng với gốc axit amin 404 (P-Ser₄₀₄) và 409 (P-Ser₄₀₉) của SEQ ID NO: 6 được phosphoryl hoá.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến peptit kháng nguyên, đặc biệt là peptit kháng nguyên được cải biến theo sáng chế, hoặc mảnh có chức năng của chúng và được phẩm bao gồm peptit kháng nguyên này hoặc mảnh có chức năng của chúng, peptit hoặc mảnh này có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO: 6, trong đó ít nhất một, nhưng đặc biệt là toàn bộ các gốc axit amin 404 (P-Ser₄₀₄) và 409 (P-Ser₄₀₉) được phosphoryl hoá.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến peptit kháng nguyên, đặc biệt là peptit kháng nguyên được cải biến theo sáng chế, hoặc mảnh có chức năng của chúng và được phẩm bao gồm peptit kháng nguyên này hoặc mảnh có chức năng của chúng, peptit hoặc mảnh này có trình tự axit amin thể hiện ít nhất 80%, đặc biệt là ít nhất 85%, đặc biệt là ít nhất 90%, đặc biệt là ít nhất 95%, đặc biệt là ít nhất 98%, đặc biệt là ít nhất 99%, tính đồng nhất về trình tự với trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 7 và về cơ bản có cùng hoạt tính sinh miễn dịch như peptit kháng nguyên này có SEQ ID NO: 7, trong đó ít nhất một, đặc biệt là ít nhất 2, đặc biệt là ít nhất 3, nhưng đặc biệt là toàn bộ các gốc axit amin tương ứng với gốc axit amin 202 (P-Ser₂₀₂), 205 (P-Thr₂₀₅), 212 (P-Thr₂₁₂), và 214 (P-Ser₂₁₄) của SEQ ID NO: 7 được phosphoryl hoá.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến peptit kháng nguyên, đặc biệt là peptit kháng nguyên được cải biến theo sáng chế, hoặc mảnh có chức năng của chúng và được phẩm bao gồm peptit kháng nguyên này hoặc mảnh có chức năng của chúng, peptit hoặc mảnh này có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO: 7, trong đó ít nhất một, đặc biệt là ít nhất 2, đặc biệt là ít nhất 3, nhưng đặc biệt là toàn bộ các gốc axit amin 202 (P-Ser₂₀₂), 205 (P-Thr₂₀₅), 212 (P-Thr₂₁₂), và 214 (P-Ser₂₁₄) được phosphoryl hoá.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến peptit kháng nguyên, đặc biệt là peptit kháng nguyên được cải biến theo sáng chế, hoặc mảnh có chức năng của chúng và được phẩm bao gồm peptit kháng nguyên này hoặc mảnh có chức năng của chúng, peptit hoặc mảnh này có trình tự axit amin thể hiện ít nhất

80%, đặc biệt là ít nhất 85%, đặc biệt là ít nhất 90%, đặc biệt là ít nhất 95%, đặc biệt là ít nhất 98%, đặc biệt là ít nhất 99%, tính đồng nhất về trình tự với trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 và về cơ bản có cùng hoạt tính sinh miễn dịch như peptit kháng nguyên này có SEQ ID NO: 8, trong đó gốc axit amin tương ứng với gốc axit amin 409 (P-Ser₄₀₉) của SEQ ID NO: 8 được phosphoryl hoá.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến peptit kháng nguyên, đặc biệt là peptit kháng nguyên được cải biến theo sáng chế, hoặc mảnh có chức năng của chúng và được phẩm bao gồm peptit kháng nguyên này hoặc mảnh có chức năng của chúng, peptit hoặc mảnh này có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO: 8, trong đó gốc axit amin tương ứng với gốc axit amin 409 (P-Ser₄₀₉) của SEQ ID NO: 8 được phosphoryl hoá.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến peptit kháng nguyên, đặc biệt là peptit kháng nguyên được cải biến theo sáng chế, hoặc mảnh có chức năng của chúng và được phẩm bao gồm peptit kháng nguyên này hoặc mảnh có chức năng của chúng, peptit hoặc mảnh này có trình tự axit amin thể hiện ít nhất 80%, đặc biệt là ít nhất 85%, đặc biệt là ít nhất 90%, đặc biệt là ít nhất 95%, đặc biệt là ít nhất 98%, đặc biệt là ít nhất 99%, tính đồng nhất về trình tự với trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 9 và về cơ bản có cùng hoạt tính sinh miễn dịch như peptit kháng nguyên này có SEQ ID NO: 9, trong đó gốc axit amin tương ứng với gốc axit amin 404 (P-Ser₄₀₄) của SEQ ID NO: 9 được phosphoryl hoá.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến peptit kháng nguyên, đặc biệt là peptit kháng nguyên được cải biến theo sáng chế, hoặc mảnh có chức năng của chúng và được phẩm bao gồm peptit kháng nguyên này hoặc mảnh có chức năng của chúng, peptit hoặc mảnh này có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO: 9, trong đó gốc axit amin tương ứng với gốc axit amin 404 (P-Ser₄₀₄) của SEQ ID NO: 9 được phosphoryl hoá.

Cũng thuộc phạm vi của sáng chế là peptit kháng nguyên được cải biến theo sáng chế hoặc mảnh có chức năng của chúng và các được phẩm bao gồm peptit kháng nguyên được cải biến này hoặc mảnh có chức năng của chúng, peptit này về cơ bản đồng nhất với các peptit kháng nguyên đã nêu trên như được thể hiện trong các SEQ ID NO: 2 đến 9 và về cơ bản có cùng hoạt tính sinh miễn dịch như các peptit kháng nguyên này có các SEQ ID NO: 2 đến 9, nhưng đặc biệt là mảnh peptit biến dị là thể biến dị được cải biến bảo toàn của các mảnh đã nêu, trong đó các biến đổi tạo ra sự thay thế của một hoặc nhiều axit amin, đặc biệt là từ một đến 10 axit amin, đặc biệt hơn nữa là từ 1 đến 6 axit amin, thậm chí đặc biệt hơn nữa là từ 1 đến 4 axit amin, nhưng đặc biệt từ 1 đến 3 axit amin, với axit amin tương tự về phương diện hoá học. Các bảng thay thế bảo toàn đưa ra các axit amin tương tự theo chức năng là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật và được đề xuất dưới đây. Tốt hơn là thay thế bảo toàn được tạo ra sao cho tổng điện tích toàn phần của peptit và cả sự phân bố tải trọng trên phân tử peptit về cơ bản giữ nguyên như nhau.

Cũng thuộc phạm vi của sáng chế là mảnh peptit biến thể, đặc biệt là peptit kháng nguyên biến dị được cải biến theo sáng chế và được phẩm bao gồm mảnh peptit biến dị này, peptit này về cơ bản đồng nhất với các mảnh đã nhận biết ở trên của sáng chế và về cơ bản có hoạt tính sinh học tương tự của các phần này, trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin được làm khuyết đoạn.

Theo một phương án khác, peptit theo sáng chế hoặc mảnh có chức năng của chúng được tạo ra dưới dạng polyme được chọn từ nhóm gồm có 2-mer, 3-mer, 4-mer, 5-mer, 6-mer, 7-mer, 8-mer, 9-mer, 10-mer, 11-mer, 12-mer, 13-mer, 14-mer, 15-mer, 16-mer, 20-mer, 30-mer và 50-mer, trong đó các đơn vị monome cấu thành polyme này luôn là các đơn vị monome giống nhau hoặc khác nhau và được chọn từ nhóm gồm có peptit theo sáng chế và như được mô tả ở đây, đặc biệt là peptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:

3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, và SEQ ID NO: 9 hoặc mảnh có chức năng của chúng và các peptit biến dị.

Theo một phương án, peptit kháng nguyên theo sáng chế và như được mô tả ở đây hoặc mảnh có chức năng của chúng, được cải biến nhờ gắn kết với hoặc hoàn nguyên trong chất mang, đặc biệt là chất mang mà có chức năng như chất phụ trợ tạo ra cấu trúc siêu phân tử kháng nguyên. Theo một phương án cụ thể, peptit kháng nguyên theo sáng chế và như được mô tả ở đây hoặc mảnh có chức năng của chúng, được cải biến nhờ gắn kết với hoặc hoàn nguyên trong liposom để tạo ra "cấu trúc siêu phân tử kháng nguyên" như được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 2005/081872, được bao gồm bằng cách viện dẫn vào đây. Peptit kháng nguyên hoặc mảnh có chức năng của chúng được cải biến thêm nữa sao cho nó có biểu hiện duy nhất của peptit kháng nguyên trên bề mặt chất mang, mà tạo ra sự biểu hiện tăng cường của kháng nguyên và cuối cùng tạo ra các kháng thể có độ nhạy cấu hình cao. Đặc biệt, peptit kháng nguyên theo sáng chế và như được mô tả ở đây, được cải biến nhờ kết hợp với gốc ưa béo hoặc kỵ nước, nó tạo điều kiện thuận lợi cho việc xen đoạn vào lớp kép lipid của chất mang liposom/chất phụ trợ miễn dịch, đặc biệt là bằng gốc ưa béo hoặc kỵ nước hoạt động như neo đối với peptit trong lớp kép liposom và có kích thước khiến cho peptit được đặt ở vị trí và làm ổn định gần như với bề mặt liposom.

Theo một phương án khác của sáng chế, gốc ưa béo hoặc kỵ nước là axit béo, triglyxerit hoặc phospholipit, đặc biệt là axit béo, triglyxerit hoặc phospholipit chứa chuỗi cacbon từ C12 đến C24, nhưng đặc biệt là axit palmitic.

Theo một phương án đặc biệt của sáng chế, peptit kháng nguyên theo sáng chế và như đã mô tả ở đây được đề xuất, hoặc mảnh có chức năng của chúng, được cải biến nhờ ít nhất hai phân tử của axit plamitic liên kết cộng hoá trị với các đầu tận cùng N và C của peptit kháng nguyên này hoặc mảnh có chức năng của chúng, và nhờ hoàn nguyên trong chất mang liposom.

Theo một phương án của sáng chế, các peptit hoặc các mảnh trong các thể tiếp hợp được kết hợp riêng biệt với bốn phân tử của axit plamitic; vì vậy chúng được tetrapalmitoyl hoá.

Theo một phương án của sáng chế, hai phân tử của axit plamitic được kết hợp với đầu tận cùng N và hai phân tử của axit plamitic được kết hợp với đầu tận cùng C của peptit hoặc mảnh của nó.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất peptit kháng nguyên theo sáng chế và như được mô tả ở đây, hoặc mảnh có chức năng của chúng, được cải biến nhờ kết hợp với gốc ưa chất béo hoặc kỵ nước như, ví dụ, axit plamitic và hoàn nguyên trong liposom, trong đó chế phẩm liposom có thể còn chứa chất phụ trợ như, ví dụ, lipit A, phèn, canxi phosphat, intolokin 1, và/hoặc các vi nang của polysacarit và các protein, nhưng đặc biệt là lipit A đã khử độc tố, như monophosphoryl hoặc diphosphoryl lipit A, hoặc phèn tạo ra cấu trúc siêu phân tử kháng nguyên.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến cấu trúc siêu phân tử của sáng chế và như được mô tả ở đây, cấu trúc này bao gồm trên một phân tử chất mang một hoặc nhiều các peptit kháng nguyên, đặc biệt là hai hoặc nhiều peptit kháng nguyên, theo sáng chế và như được mô tả ở đây, hoặc mảnh có chức năng của chúng.

Theo một phương án của sáng chế, phân tử chất mang này là liposom.

Theo một phương án của sáng chế, hai hoặc nhiều peptit kháng nguyên là các peptit giống nhau hoặc khác nhau, đặc biệt là các peptit được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, và SEQ ID NO: 9 hoặc các mảnh có chức năng của chúng và các peptit biến dị.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến cấu trúc siêu phân tử của sáng chế và như được mô tả ở đây, cấu trúc này bao gồm trên một phân tử chất mang

tổ hợp của hai hoặc nhiều peptit kháng nguyên có SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 4, hoặc các mảnh có chức năng của chúng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể, đặc biệt là kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể bất kỳ tương đương về mặt chức năng hoặc các mảnh có chức năng của chúng, kháng thể này nhận dạng và gắn kết với cấu hình riêng protein tau bệnh lý được phosphoryl hoá hoặc các phần của cấu hình riêng này gây ra các đặc tính bệnh lý của cấu hình riêng này, cụ thể là phospho-epitop bệnh lý của protein tau.

Cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể bất kỳ tương đương về mặt chức năng hoặc các mảnh có chức năng của chúng, kháng thể này nhận biết và gắn kết với cấu hình riêng protein tau bệnh lý, được phosphoryl hoá hoặc các các phần của cấu hình riêng này gây ra các đặc tính bệnh lý của cấu hình riêng này, cụ thể là phospho-epitop bệnh lý của protein tau, với tính đặc hiệu cao.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể bất kỳ tương đương về mặt chức năng hoặc các mảnh có chức năng của chúng theo sáng chế gắn kết với cấu hình riêng protein tau bệnh lý hoặc các phần của cấu hình riêng tạo ra các đặc tính bệnh lý của cấu hình riêng này với ái lực cao hơn ít nhất là 40%, đặc biệt là ít nhất 50%, đặc biệt là ít nhất 60%, đặc biệt là ít nhất 70%, đặc biệt là ít nhất 80%, đặc biệt là ít nhất 90%, đặc biệt là ít nhất 95% và tới 100% so với ái lực gắn kết của cấu hình riêng tau không được phosphoryl hoá, không bệnh lý.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể bất kỳ tương đương về mặt chức năng hoặc các mảnh có chức năng của chúng theo sáng chế được đề xuất, chúng gắn kết đặc hiệu với các mô rối sợi thần kinh (NFTs) và các sợi mạng thần kinh ở các não người bệnh Alzheimer.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất các kháng thể, đặc biệt là các kháng thể đơn dòng hoặc các mảnh có chức năng của chúng, mà gắn kết trực tiếp và đặc hiệu với epitop trên protein tau, hoặc với tổ hợp của các epitop, đặc biệt là với epitop đặc hiệu với cấu hình riêng protein tau bệnh lý, được phosphoryl hoá, đặc biệt là phospho-epitop bệnh lý của protein tau như, ví dụ, epitop như được thể hiện bởi hoặc bao gồm trong trình tự peptit được chọn từ nhóm gồm có các trình tự như nêu trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, và SEQ ID NO: 9 và các mảnh biến dị của chúng.

Cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm kháng thể tương đương về mặt chức năng bất kỳ hoặc các mảnh có chức năng của chúng, đặc biệt là kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương về mặt chức năng bất kỳ hoặc các mảnh có chức năng của chúng mà có thể thu được bằng cách tạo miễn dịch cho động vật thích hợp bằng peptit kháng nguyên, đặc biệt là chế phẩm peptit theo sáng chế và như được mô tả trên đây, đặc biệt là chế phẩm bao gồm peptit kháng nguyên chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, và SEQ ID NO: 9, bao gồm mảnh có chức năng hoặc mảnh biến dị của chúng.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể, đặc biệt là kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương về mặt chức năng bất kỳ hoặc các mảnh có chức năng của chúng, kháng thể này có các tính chất đặc trưng của kháng thể được tạo ra bởi dòng tế bào lai ACI-41-Ab1 được lưu giữ vào ngày 3 tháng 3, 2010 dưới dạng DSM ACC3043. Đặc biệt hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể, đặc biệt là kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương về mặt chức năng bất kỳ hoặc các mảnh có chức năng của chúng được tạo ra bởi dòng tế bào lai ACI-41-Ab1 được lưu giữ vào ngày 3 tháng 3, 2010 dưới dạng DSM ACC3043.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể, đặc biệt là kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương về mặt chức năng bất kỳ hoặc các mảnh có chức năng của chúng, kháng thể này có các tính chất đặc trưng của kháng thể được tạo ra bởi dòng tế bào lai 2B6 được lưu giữ vào ngày 10 tháng 3, 2010 dưới dạng DSM ACC3044. Đặc biệt hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể, đặc biệt là kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương về mặt chức năng bất kỳ hoặc các mảnh có chức năng của chúng được tạo ra bởi dòng tế bào lai 2B6 được lưu giữ vào ngày 10 tháng 3, 2010 dưới dạng DSM ACC3044.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể, đặc biệt là kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương về mặt chức năng bất kỳ hoặc các mảnh có chức năng của chúng, kháng thể này có các tính chất đặc trưng của kháng thể được tạo ra bởi dòng tế bào lai 3A8 được lưu giữ vào ngày 10 tháng 3, 2010 dưới dạng DSM ACC3045. Đặc biệt hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể, đặc biệt là kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương về mặt chức năng bất kỳ hoặc các mảnh có chức năng của chúng được tạo ra bởi dòng tế bào lai 3A8 được lưu giữ vào ngày 10 tháng 3, 2010 dưới dạng DSM ACC3045.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể, đặc biệt là kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương về mặt chức năng bất kỳ hoặc các mảnh có chức năng của chúng, kháng thể này có các tính chất đặc trưng của kháng thể được tạo ra bởi dòng tế bào lai 4C1 được lưu giữ vào ngày 10 tháng 3, 2010 dưới dạng DSM ACC3046. Đặc biệt hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể, đặc biệt là kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương về mặt chức năng bất kỳ hoặc các mảnh có chức năng của chúng được tạo ra bởi dòng tế bào lai 4C1 được lưu giữ vào ngày 10 tháng 3, 2010 dưới dạng DSM ACC3046.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể, đặc biệt là kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương về mặt chức năng bất kỳ hoặc các mảnh có chức năng của chúng, kháng thể này có các tính chất đặc trưng của kháng thể được tạo ra bởi dòng tế bào lai 5D10A3 được lưu giữ vào ngày 10

tháng 3, 2010 dưới dạng DSM ACC3047. Đặc biệt hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể, đặc biệt là kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương về mặt chức năng bất kỳ hoặc các mảnh có chức năng của chúng được tạo ra bởi dòng tế bào lai 5D10A3 được lưu giữ vào ngày 10 tháng 3, 2010 dưới dạng DSM ACC3047.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể, đặc biệt là kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương về mặt chức năng bất kỳ hoặc các mảnh có chức năng của chúng, kháng thể này có các tính chất đặc trưng của kháng thể được tạo ra bởi dòng tế bào lai 6C10 được lưu giữ vào ngày 10 tháng 3, 2010 dưới dạng DSM ACC3048. Đặc biệt hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể, đặc biệt là kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương về mặt chức năng bất kỳ hoặc các mảnh có chức năng của chúng được tạo ra bởi dòng tế bào lai 6C10 được lưu giữ vào ngày 10 tháng 3, 2010 dưới dạng DSM ACC3048.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể, đặc biệt là kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương về mặt chức năng bất kỳ hoặc các mảnh có chức năng của chúng, kháng thể này có các tính chất đặc trưng của kháng thể được tạo ra bởi dòng tế bào lai 6H1 được lưu giữ vào ngày 10 tháng 3, 2010 dưới dạng DSM ACC3049. Đặc biệt hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể, đặc biệt là kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương về mặt chức năng bất kỳ hoặc các mảnh có chức năng của chúng được tạo ra bởi dòng tế bào lai 6H1 được lưu giữ vào ngày 10 tháng 3, 2010 dưới dạng DSM ACC3049.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể, đặc biệt là kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương về mặt chức năng bất kỳ hoặc các mảnh có chức năng của chúng, kháng thể này có các tính chất đặc trưng của kháng thể được tạo ra bởi dòng tế bào lai 7C2 được lưu giữ vào ngày 10 tháng 3, 2010 dưới dạng DSM ACC3050. Đặc biệt hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể, đặc biệt là kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương về mặt chức

năng bất kỳ hoặc các mảnh có chức năng của chúng được tạo ra bởi dòng tế bào lai 7C2 được lưu giữ vào 10 tháng 3, 2010 dưới dạng DSM ACC3050.

Kháng thể có thể được đề xuất dưới dạng kháng thể dạng khảm hoặc kháng thể được làm giống như của người vẫn có các đặc tính gắn kết đặc hiệu như nêu trên.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến dòng tế bào tạo ra kháng thể theo sáng chế như được mô tả ở đây.

Theo một phương án đặc biệt, sáng chế đề cập đến dòng tế bào lai ACI-41-Ab1 được lưu giữ vào ngày 3 tháng 3, 2010 dưới dạng DSM ACC3043.

Theo một phương án đặc biệt khác, sáng chế đề xuất dòng tế bào lai 2B6 được lưu giữ vào ngày 10 tháng 3, 2010 dưới dạng DSM ACC3044.

Theo một phương án đặc biệt khác, sáng chế đề cập đến dòng tế bào lai 3A8 được lưu giữ vào ngày 10 tháng 3, 2010 dưới dạng DSM ACC3045.

Theo một phương án đặc biệt khác, sáng chế đề cập đến dòng tế bào lai 4C1 được lưu giữ vào ngày 10 tháng 3, 2010 dưới dạng DSM ACC3046.

Theo một phương án đặc biệt khác, sáng chế đề cập đến dòng tế bào lai 5D10A3 được lưu giữ vào ngày 10 tháng 3, 2010 dưới dạng DSM ACC3047.

Theo một phương án đặc biệt khác, sáng chế đề cập đến dòng tế bào lai 6C10 được lưu giữ vào ngày 10 tháng 3, 2010 dưới dạng DSM ACC3048.

Theo một phương án đặc biệt khác, sáng chế đề cập đến dòng tế bào lai 6H1 được lưu giữ vào ngày 10 tháng 3, 2010 dưới dạng DSM ACC3049.

Theo một phương án đặc biệt khác, sáng chế đề cập đến dòng tế bào lai 7C2 được lưu giữ vào ngày 10 tháng 3, 2010 dưới dạng DSM ACC3050.

Cũng bao gồm kèm theo đây là các dòng vô tính phụ và các dòng vô tính biến dị của các dòng tế bào lai đặc hiệu nêu trên, nó vẫn tạo ra kháng thể với các đặc tính gắn kết đặc hiệu theo sáng chế.

Theo một phương án đặc biệt, sáng chế đề xuất được phẩm và phương pháp tạo ra được phẩm bao gồm mảnh peptit kháng nguyên, đặc biệt là mảnh peptit kháng nguyên được cải biến nhờ gắn kết với và/hoặc hoàn nguyên trong chất mang, đặc biệt là chất mang liposom, theo sáng chế và như được mô tả ở đây hoặc mảnh có chức năng của chúng, cùng với chất mang và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá được được dụng, để duy trì hoặc cải thiện, đặc biệt là phục hồi hoàn toàn khả năng nhớ liên quan đến nhận thức của động vật, đặc biệt là động vật có vú hoặc người, bị suy giảm trí nhớ.

Theo một phương án, được phẩm được đề xuất chứa kháng thể bao gồm kháng thể tương đương về mặt chức năng bất kỳ hoặc các mảnh có chức năng của chúng đặc biệt là kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương về mặt chức năng bất kỳ hoặc các mảnh có chức năng của chúng theo sáng chế với lượng hữu hiệu cùng với chất mang và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá được được dụng.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất được phẩm theo sáng chế và như được mô tả ở đây, và/hoặc phương pháp, để điều trị các bệnh và các rối loạn gây ra bởi hoặc liên quan đến sự hình thành của các thương tổn sợi thần kinh, bệnh lý não nổi bật ở bệnh tau bao gồm nhóm hỗn tạp các bệnh hoặc các rối loạn thoái hoá thần kinh bao gồm các bệnh hoặc các rối loạn có sự tồn tại đồng thời các bệnh lý tau và amyloid bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh Alzheimer, bệnh Creutzfeldt-Jacob, sa sút trí tuệ chấn thương não, hội chứng Down, bệnh Gerstmann-Straussier-Scheinker, viêm cơ thể vùi, bệnh mạch máu prion protein amyloid ở não và tổn thương chấn thương não và các bệnh hoặc các rối loạn khác không thể hiện bệnh lý amyloid khác biệt bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phức hợp xơ cứng cột bên teo cơ/parkinson-sa sút trí tuệ của Guam, bệnh tế bào thần kinh vận động không phải Guamanian có các mớ rối sợi thần kinh, sa sút trí tuệ nhuộm độc bạc màu nhuộm, thoái hoá dưới vỏ não, các mớ rối sợi thần kinh lan toả có sự vôi hoá, sa sút trí tuệ trán thái dương với bệnh

Parkinson liên kết với nhiễm sắc thể 17, bệnh Hallevorden-Spatz, chứng teo đa hệ, bệnh Niemann-Pick, kiểu C, bệnh Pick, chứng tăng thân kinh đệm dưới vỏ tiền triển, chứng liệt trên nhân tiền triển, viêm não xơ cứng bán cấp, sự sa sút trí tuệ có duy nhất mới rồi, hội chứng Parkinson, chứng loạn dưỡng trương cơ lực, phương pháp này bao gồm cung cấp cho động vật, đặc biệt là động vật có vú hoặc người, hoặc được phẩm theo sáng chế và như được mô tả ở đây với lượng hữu hiệu cùng với chất mang và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá dược được dụng.

Theo một phương án đặc biệt sáng chế đề xuất được phẩm theo sáng chế và như được mô tả ở đây, và/hoặc phương pháp, để duy trì hoặc làm tăng khả năng nhớ liên quan đến nhận thức nhưng đặc biệt là để khôi phục hoàn toàn khả năng nhớ liên quan đến nhận thức của động vật, đặc biệt là động vật có vú hoặc người, bị suy giảm trí nhớ, phương pháp này bao gồm cung cấp cho động vật, đặc biệt là động vật có vú hoặc người, hoặc được phẩm theo sáng chế và như được mô tả ở đây với lượng hữu hiệu cùng với chất mang và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá dược được dụng.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất được phẩm và phương pháp tạo ra chế phẩm này, cũng như phương pháp để kích thích đáp ứng miễn dịch ở động vật, đặc biệt là động vật có vú hoặc người bị bệnh và rối loạn gây ra bởi hoặc liên quan đến sự hình thành của các thương tổn sợi thần kinh, bằng cách cung cấp cho động vật hoặc người đã nêu được phẩm theo sáng chế với lượng hữu hiệu cùng với chất mang và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá dược được dụng.

Theo một phương án của sáng chế, phương pháp được đề xuất để kích thích đáp ứng miễn dịch ở động vật, đặc biệt là động vật có vú hoặc người bị các thương tổn sợi thần kinh tạo ra bệnh tau, tới mức độ để duy trì hoặc cải thiện các triệu chứng liên quan đến bệnh hoặc tình trạng này như, ví dụ, suy giảm trí nhớ có thể đạt được, đặc biệt là hồi phục hoàn toàn tình trạng ban đầu.

Được phẩm bao gồm peptit kháng nguyên theo sáng chế và như được mô tả ở đây khi cung cấp cho động vật, đặc biệt là động vật có vú, nhưng đặc biệt là người, về cơ bản tạo ra các kháng thể thuộc các kiểu phụ không viêm Th2 như, ví dụ, isotyp IgG1 và IgG2b và/hoặc các kháng thể thuộc nhóm phụ IgG độc lập với tế bào T như, ví dụ, IgG3 và/hoặc không làm tăng đáng kể các chỉ số viêm ở não, đặc biệt là các chỉ số viêm được chọn từ nhóm gồm có IL-1 β , IL-6, IFN- γ và TNF α .

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, được phẩm bao gồm peptit kháng nguyên theo sáng chế và như được mô tả ở đây có thể được sử dụng để kích thích đáp ứng miễn dịch độc lập với tế bào T nhờ điều trị bệnh, tình trạng hoặc rối loạn ở bệnh nhân, đặc biệt là động vật hoặc người bệnh, đặc biệt là bệnh nhân cần đáp ứng miễn dịch độc lập với tế bào T này, như, ví dụ, bệnh nhân dung nạp miễn dịch hoặc bệnh nhân hoạt hoá tế bào T trong đó peptit kháng nguyên này được cải biến nhờ gắn kết với và/hoặc hoàn nguyên trong chất mang, đặc biệt là chất mang liposom sao cho kháng nguyên có mặt trên bề mặt của chất mang, đặc biệt là liposom.

Theo một phương án, chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế như được mô tả ở đây có tác dụng như chất kích thích miễn dịch.

Theo một phương án đặc biệt của sáng chế, peptit kháng nguyên này có mặt dưới dạng dây lặp lại ở mức độ cao trên bề mặt của liposom. Theo một phương án đặc biệt khác, kháng nguyên này không chứa epitop tế bào T.

Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế như được mô tả ở đây được sử dụng để điều trị cho bệnh nhân dung nạp miễn dịch hoặc bệnh nhân hoạt hoá tế bào T, đặc biệt là bệnh nhân bị tổn thương miễn dịch, đặc biệt là bệnh nhân bị bệnh tự miễn dịch, đặc biệt là bệnh nhân bị thiếu hụt tế bào T, mà gây ra bởi sự suy kiệt ở các bệnh nhân đã nêu có các tế bào CD4 T và/hoặc biểu hiện của CD14 và/hoặc CD40L giảm trên các tế bào CD4 T.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng trong phương pháp chẩn đoán bệnh hoặc tình trạng có liên quan đến protein tau ở bệnh nhân bao gồm phát hiện gắn kết miễn dịch đặc hiệu của kháng thể hoặc mảnh hoạt hoá của chúng với epitop của protein tau trong mẫu hoặc *in situ*, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(a) đưa mẫu hoặc phần cơ thể đặc hiệu hoặc vùng cơ thể nghi ngờ chứa protein tau vào tiếp xúc với kháng thể đã nêu, kháng thể này gắn kết với epitop của protein tau;

(b) cho phép kháng thể gắn kết với protein tau để tạo ra phức chất miễn dịch;

(c) phát hiện sự hình thành của phức chất miễn dịch; và

(d) tạo tương quan về sự có mặt hoặc vắng mặt của phức chất miễn dịch với sự có mặt hoặc vắng mặt của protein tau trong mẫu hoặc phần hoặc vùng cơ thể đặc hiệu.

Theo một phương án, phương pháp được đề xuất để chẩn đoán bệnh chất với bệnh hoặc tình trạng có liên quan đến protein tau ở bệnh nhân bao gồm phát hiện gắn kết miễn dịch đặc hiệu của kháng thể đơn dòng hoặc mảnh hoạt hoá của chúng với epitop của protein tau trong mẫu hoặc *in situ*, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(a) đưa mẫu hoặc phần cơ thể đặc hiệu hoặc vùng cơ thể nghi ngờ chứa protein tau vào tiếp xúc với kháng thể theo sáng chế và như được mô tả trên đây, kháng thể này gắn kết với epitop của protein tau;

(b) cho phép kháng thể gắn kết với protein tau để tạo ra phức chất miễn dịch;

(c) phát hiện sự hình thành của phức chất miễn dịch; và

(d) tạo tương quan về sự có mặt hoặc vắng mặt của phức chất miễn dịch với sự có mặt hoặc vắng mặt của kháng nguyên tau trong mẫu hoặc phần hoặc vùng cơ thể đặc hiệu.

(e) so sánh lượng phức chất miễn dịch đã nêu với giá trị đối chứng bình thường, trong đó sự gia tăng lượng chất kết tụ đã nêu so với giá trị đối chứng bình thường chứng tỏ rằng bệnh nhân này bị hoặc có nguy cơ phát triển bệnh hoặc tình trạng liên quan đến protein tau.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp để theo dõi mức độ bệnh còn lại tối thiểu ở bệnh nhân sau khi điều trị bằng kháng thể hoặc được phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm đã nêu, trong đó phương pháp này bao gồm:

(a) đưa mẫu hoặc phần cơ thể đặc hiệu hoặc vùng cơ thể nghi ngờ chứa protein tau vào tiếp xúc với kháng thể theo sáng chế và như được mô tả trên đây, kháng thể này gắn kết với epitop của protein tau;

(b) cho phép kháng thể gắn kết với protein tau để tạo ra phức chất miễn dịch;

(c) phát hiện sự hình thành của phức chất miễn dịch; và

(d) tạo tương quan về sự có mặt hoặc vắng mặt của phức chất miễn dịch với sự có mặt hoặc vắng mặt của kháng nguyên tau trong mẫu hoặc phần hoặc vùng cơ thể đặc hiệu.

(e) so sánh lượng phức chất miễn dịch đã nêu với giá trị đối chứng bình thường, trong đó sự gia tăng lượng chất kết tụ đã nêu so với giá trị đối chứng bình thường chứng tỏ rằng bệnh nhân này vẫn bị bệnh ở mức độ tối thiểu.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp để dự đoán độ đáp ứng của bệnh nhân được điều trị bằng kháng thể hoặc được phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm đã nêu bao gồm:

(a) đưa mẫu hoặc phần cơ thể đặc hiệu hoặc vùng cơ thể nghi ngờ chứa protein tau vào tiếp xúc với kháng thể theo sáng chế và như được mô tả trên đây, kháng thể đó gắn kết với epitop của protein tau;

(b) cho phép kháng thể gắn kết với protein tau để tạo ra phức chất miễn dịch;

(c) phát hiện sự hình thành của phức chất miễn dịch; và

(d) tạo tương quan về sự có mặt hoặc vắng mặt của phức chất miễn dịch với sự có mặt hoặc vắng mặt của kháng nguyên tau trong mẫu hoặc phần hoặc vùng cơ thể đặc hiệu.

(e) so sánh lượng phức chất miễn dịch đã nêu trước và sau khi bắt đầu điều trị, trong đó mức giảm lượng chất kết tụ đã nêu chứng tỏ rằng bệnh nhân này có khả năng đáp ứng rất cao với việc điều trị.

Theo phương án khác của sáng chế, kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng trong kit thử nghiệm để phát hiện và chẩn đoán các bệnh và tình trạng liên quan đến tau.

Đặc biệt, kit thử nghiệm được đề xuất để phát hiện và chẩn đoán các bệnh và tình trạng liên quan đến protein tau bao gồm các kháng thể theo sáng chế, đặc biệt là kit thử nghiệm bao gồm đồ chứa để chứa một hoặc nhiều các kháng thể theo sáng chế và các chỉ dẫn để sử dụng các kháng thể nhằm mục đích gắn kết với kháng nguyên tau để tạo ra phức chất miễn dịch và phát hiện sự hình thành của phức chất miễn dịch sao cho sự có mặt hoặc vắng mặt của phức chất miễn dịch tương quan với sự có mặt hoặc vắng mặt của kháng nguyên tau.

Các mục đích đó và các mục đích khác, các đặc điểm và lợi ích của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng sau khi xem xét mô tả chi tiết dưới đây về các phương án đề xuất và các yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1a: Thể hiện các kháng thể IgG kháng Tau5-20 [pY18] ở chuột kiểu dại (WT) được gây miễn dịch bằng ACI-33. Phân tích về các kháng thể IgG kháng Tau5-20 [pY18] trong huyết thanh của chuột kiểu dại C57BL/6 được tiêm ba lần ACI-33 vào d0, d13 và d28 và được lấy máu vào d-1, d27 và d47. Các kết quả được biểu hiện là giá trị trung bình O.D + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm gồm 6 con chuột.

Fig.1b: Thể hiện các kháng thể IgG kháng Tau5-20 [pY18] ở chuột TKO được gây miễn dịch bằng ACI-33. Phân tích về các kháng thể IgG kháng Tau5-20 [pY18] trong huyết thanh của chuột kiểu dại C57BL/6 được tiêm ba lần ACI-33 vào d0, d13 và d28 và được lấy máu vào d-1, d27 và d47. Các kết quả được biểu hiện là giá trị trung bình O.D + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm gồm 6 con chuột.

Fig.2a: Thể hiện các kháng thể IgG kháng Tau393-408 [pS396/pS404] ở chuột WT được gây miễn dịch bằng ACI-35. Phân tích về các kháng thể IgG kháng Tau393-408 [pS396/pS404] trong huyết thanh của chuột kiểu dại C57BL/6 được tiêm năm lần ACI-35 vào d0, d16, d30, d99 và d113 và được lấy máu vào d-1, d28, d42, d98 và d126. Các kết quả được biểu hiện là giá trị trung bình O.D + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm gồm 6 con chuột.

Fig.2b: Thể hiện các kháng thể IgG kháng Tau393-408 [pS396/pS404] ở chuột TKO được gây miễn dịch bằng ACI-35. Phân tích về các kháng thể IgG kháng Tau393-408 [pS396/pS404] trong huyết thanh của chuột TKO được tiêm năm lần ACI-35 vào d0, d16, d30, d99 và d113 và được lấy máu ở d-1, d28, d42, d98 và d126. Các kết quả được biểu hiện là giá trị trung bình O.D + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm gồm 6 con chuột.

Fig.3a: Thể hiện các kháng thể IgG kháng Tau401-418 [pS404/S409] ở chuột WT được gây miễn dịch bằng ACI-36. Phân tích về các kháng thể IgG kháng Tau401-418 [pS404/S409] trong huyết thanh của chuột kiểu dại C57BL/6 được tiêm ba lần AC I-36 vào d0, d13 và d28 và được lấy máu vào d-1, d27 và

d47. Các kết quả được biểu hiện là giá trị trung bình O.D + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm gồm 6 con chuột.

Fig.3b: Thể hiện các kháng thể IgG kháng Tau401-418 [pS404/S409] ở chuột TKO được gây miễn dịch bằng ACI-36. Phân tích về các kháng thể IgG kháng Tau401-418 [pS404/S409] trong huyết thanh của chuột TKO được tiêm ba lần ACI-36 vào d0, d13 và d28 và được lấy máu vào d-1, d27 và d47. Các kết quả được biểu hiện là giá trị trung bình O.D + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm gồm 6 con chuột trong d-1/d27 và ở nhóm gồm 5 con chuột trong d47.

Fig.4a/4b: Thể hiện các kháng thể IgG kháng Tau206-221 [pT212/pS214] và kháng Tau 196-211 [pS202/pT205] ở chuột WT được gây miễn dịch bằng ACI-41. Phân tích về các kháng thể IgG kháng Tau206-221 [pT212/pS214] và kháng Tau 196-211 [pS202/pT205] trong huyết thanh của chuột kiểu đại C57BL/6 được tiêm ba lần ACI-41 vào d0, d20, d35 và được lấy máu vào d-1, d34, d48. Các kết quả được biểu hiện là giá trị trung bình O.D + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm gồm 6 con chuột. Huyết thanh mẫu được thử nghiệm với cả hai pTau peptit.

Fig.4c/4d: Thể hiện các kháng thể IgG kháng Tau206-221 [pT212/pS214] và kháng Tau196-211 [pS202/pT205] ở chuột TKO được gây miễn dịch bằng ACI-41. Phân tích về các kháng thể IgG kháng Tau206-221 [pT212/pS214] và kháng Tau196-211 [pS202/pT205] trong huyết thanh của chuột TKO được tiêm ba lần ACI-41 vào d0, d20, d35 và được lấy máu vào d-1, d34, d48. Các kết quả được biểu hiện là giá trị trung bình O.D + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm gồm 6 con chuột. Huyết thanh mẫu được thử nghiệm với cả hai pTau peptit.

Fig.5a: Thể hiện các isotyp IgG và các kháng thể IgM kháng Tau5-20 [pY18] ở chuột WT được gây miễn dịch bằng ACI-33. Phân tích về các kháng thể IgG1, 2a, 2b, 3 và IgM kháng Tau5-20 [pY18] trong huyết thanh của chuột C57BL/6 47 ngày sau khi tạo miễn dịch ACI-33 lần thứ nhất. Các kết quả được biểu hiện là O.D. với tỷ lệ pha loãng 1/100 (IgG1), 1/100 (IgG2a), 1/100

(IgG2b), 1/100 (IgG3) và 1/3200 (IgM) thể hiện giá trị trung bình + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm gồm 6 con chuột.

Fig.5b: Thể hiện các isotyp IgG và các kháng thể IgM kháng Tau5-20 [pY18] ở chuột TKO được gây miễn dịch bằng ACI-33. Phân tích về các kháng thể IgG1, 2a, 2b, 3 và IgM kháng Tau5-20 [pY18] trong huyết thanh của chuột TKO 47 ngày sau khi tạo miễn dịch ACI-33 lần thứ nhất. Các kết quả được biểu hiện là O.D. với tỷ lệ pha loãng 1/100 (IgG1), 1/100 (IgG2a), 1/100 (IgG2b), 1/100 (IgG3) và 1/3200 (IgM) thể hiện giá trị trung bình + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm gồm 6 con chuột.

Fig.6a: Thể hiện các isotyp IgG và các kháng thể IgM kháng Tau393-408 [pS396/pS404] ở chuột WT được gây miễn dịch bằng ACI 35. Phân tích về các kháng thể IgG1, 2a, 2b, 3 và IgM kháng Tau393-408 [pS396/pS404] trong huyết thanh của chuột C57BL/6 42 ngày sau khi tạo miễn dịch ACI-35 lần thứ nhất. Các kết quả được biểu hiện là O.D. với tỷ lệ pha loãng 1/100 (IgG1), 1/1600 (IgG2a), 1/1600 (IgG2b), 1/800 (IgG3) và 1/1600 (IgM) thể hiện giá trị trung bình + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm gồm 6 con chuột.

Fig.6b: Thể hiện các isotyp IgG và các kháng thể IgM kháng Tau393-408 [pS396/pS404] ở chuột TKO được gây miễn dịch bằng ACI 35. Phân tích về các kháng thể IgG1, 2a, 2b, 3 và IgM kháng Tau393-408 [pS396/pS404] trong huyết thanh của chuột TKO 42 ngày sau khi tạo miễn dịch ACI-35 lần thứ nhất. Các kết quả được biểu hiện là O.D. với tỷ lệ pha loãng 1/100 (IgG1), 1/1600 (IgG2a), 1/1600 (IgG2b), 1/800 (IgG3) và 1/1600 (IgM) thể hiện giá trị trung bình + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm gồm 6 con chuột.

Fig.7a: Thể hiện các isotyp IgG và các kháng thể IgM kháng Tau401-418 [pS404/S409] ở chuột WT được gây miễn dịch bằng ACI 36. Phân tích về các kháng thể IgG1, 2a, 2b, 3 và IgM kháng Tau401-418 [pS404/S409] trong huyết thanh của chuột C57BL/6 47 ngày sau khi tạo miễn dịch ACI-36 lần thứ nhất. Các kết quả được biểu hiện là O.D. với tỷ lệ pha loãng 1/100 (IgG1), 1/400

(IgG2a), 1/400 (IgG2b), 1/100 (IgG3) và 1/400 (IgM) thể hiện giá trị trung bình + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm gồm 6 con chuột.

Fig.7b: Thể hiện các isotyp IgG và các kháng thể IgM kháng Tau401-418 [pS404/S409] ở chuột TKO được gây miễn dịch bằng ACI 36. Phân tích về các kháng thể IgG1, 2a, 2b, 3 và IgM kháng Tau401-418 [pS404/S409] trong huyết thanh của chuột TKO 47 ngày sau khi tạo miễn dịch ACI-36 lần thứ nhất. Các kết quả được biểu hiện là O.D. với tỷ lệ pha loãng 1/100 (IgG1), 1/100 (IgG2a), 1/100 (IgG2b), 1/100 (IgG3) và 1/400 (IgM) thể hiện giá trị trung bình + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm gồm 5 con chuột.

Fig.8a: Thể hiện các isotyp IgG và các kháng thể IgM kháng Tau196-211 [pS202/pT205] ở chuột WT được gây miễn dịch bằng ACI 41. Phân tích về các kháng thể IgG1 2a, 2b, 3 và IgM kháng Tau 196-211 [pS202/pT205] trong huyết thanh của chuột C57BL/6 48 ngày sau khi tạo miễn dịch ACI-41 lần thứ nhất. Các kết quả được biểu hiện là O.D. với tỷ lệ pha loãng 1/100 (IgG1), 1/100 (IgG2a), 1/3200 (IgG2b), 1/1600 (IgG3) và 1/3200 (IgM) thể hiện giá trị trung bình + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm gồm 6 con chuột.

Fig.8b: Thể hiện các isotyp IgG và các kháng thể IgM kháng Tau 196-211 [pS202/pT205] ở chuột TKO được gây miễn dịch bằng ACI 41. Phân tích về các kháng thể IgG1, 2a, 2b, 3 và IgM kháng Tau 196-211 [pS202/pT205] trong huyết thanh của chuột TKO 48 ngày sau khi tạo miễn dịch ACI-41 lần thứ nhất, Các kết quả được biểu hiện là O.D. với tỷ lệ pha loãng 1/100 (IgG1), 1/100 (IgG2a), 1/3200 (IgG2b), 1/1600 (IgG3) và 1/3200 (IgM) thể hiện giá trị trung bình + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm gồm 6 con chuột.

Fig.9a/9b: Thể hiện các dịch nổi tế bào lai ACI-36 từ các bình T25: tách ELISA TAUPIR và Tau. Fig. 9a. Thể hiện nhuộm TAUPIR ở chuột già biGT nhờ sử dụng dịch nổi không pha loãng. Fig. 9b. Thể hiện phân tích về các hàm lượng peptit kháng pTau T4.5, peptit kháng Tau T4.6, protein kháng pTau và

protein kháng Tau của các mẫu dịch nội dòng vô tính không pha loãng. Các kết quả được biểu hiện là O.D.

Fig.10a/10b/10c: Thể hiện các dịch nội tế bào lai ACI-36 từ các bình T25: tách ELISA TAUPIR và Tau. Fig. 10a. Thể hiện nhuộm TAUPIR ở chuột già biGT nhờ sử dụng dịch nội không pha loãng. Fig. 10b. Thể hiện phân tích về các hàm lượng peptit kháng pTau T8.5, peptit kháng Tau T8.6, protein kháng pTau và protein kháng Tau của các mẫu dịch nội dòng vô tính không pha loãng. Các kết quả được biểu hiện là O.D. Fig. 10c. Thể hiện phân tích về các hàm lượng peptit kháng pTau T9.5, peptit kháng Tau T9.6, protein kháng pTau và protein kháng Tau của các mẫu dịch nội dòng vô tính không pha loãng. Các kết quả được biểu hiện là O.D.

Fig.11: Thể hiện dịch nội tế bào lai trên đĩa được phủ bằng T8. Tau206-221 [pT212/pS214], T9: Tau 196-211 [pS202/pT205] và hP-Tau. Phân tích về các kháng thể kháng Tau206-221 [pT212/pS214], kháng Tau 196-211 [pS202/pT205] và kháng-hP-Tau từ dịch nội chứa các dòng vô tính tế bào lai. Các kết quả được biểu hiện là O.D. Cùng dịch nội đó được thử nghiệm không pha loãng với cả hai pTau peptit và hP-Tau.

Fig.12: Thể hiện kháng thể dòng vô tính ACI-41-Ab1 (T89-F4) nhuộm các NFT trong não người bị mắc AD. Các lát cắt não từ các đối tượng AD (a, b, và c), PSP (liệt trên nhân tiền triền) (d, e, và f), và hạn chế sức khỏe (g,h, và i) được nhuộm nhờ sử dụng AT 100 (a, d, và g), hoặc ACI-41-Ab1 (T89-F4) với các tỷ lệ pha loãng 1/1 (b, e, và h) hoặc ở 1/30 (c, f, và i).

Fig.13: Thể hiện kháng thể 5D10 nhuộm các NFT trong não người bị mắc AD.

Các lát cắt vỏ não từ các đối tượng bị mắc AD được nhuộm nhờ sử dụng các kháng thể 5D10 (a) hoặc AT100 (b).

Fig.14: Thể hiện các kháng thể IgG kháng Tau393-408 [pS396/pS404] ở chuột được gây miễn dịch bằng ACI-35. Phân tích về các kháng thể IgG kháng Tau393-408 [pS396/pS404] trong huyết tương của chuột C57BL/6 được tiêm ba lần ACI-35 vào d0, d14 và d28 và được lấy máu vào d-7, d7, d21, d35 và d56. Các kết quả được biểu hiện là giá trị trung bình O.D. + độ lệch chuẩn thu được ở các nhóm có 10 con chuột.

Fig.15: Thể hiện các kháng thể isotyp IgG kháng Tau393-408 [pS396/pS404] ở chuột được gây miễn dịch bằng ACI-35. Phân tích về các kháng thể IgG1, 2a, 2b và 3 kháng Tau393-408 [pS396/pS404] trong huyết tương của chuột C57BL/6 35 ngày sau khi gây miễn dịch ACI-35 lần thứ nhất. Các kết quả được biểu hiện là O.D. với tỷ lệ pha loãng không bão hòa là 1/1600 (IgG1), 1/3200 (IgG2a), 1/3200 (IgG2b) và 1/800 (IgG3) thể hiện giá trị trung bình + độ lệch chuẩn thu được ở các nhóm có 10 con chuột.

Fig.16a: Thể hiện các kháng thể IgM kháng Tau393-408 [pS396/S404] ở chuột được gây miễn dịch bằng ACI-35. Phân tích về các kháng thể IgM Tau393-408 [pS396/S404] trong huyết tương của chuột C57BL/6 35 ngày sau khi gây miễn dịch ACI-35 lần thứ nhất. Các kết quả được biểu hiện là O.D. với tỷ lệ pha loãng 1/6400 thể hiện giá trị trung bình + độ lệch chuẩn thu được ở các nhóm có 10 con chuột.

Fig.16b: Các kháng thể IgG kháng Tau393-408 ở chuột được gây miễn dịch bằng ACI-35. Phân tích về các kháng thể IgG Tau393-408 trong huyết tương của chuột C57BL/6 35 ngày sau khi gây miễn dịch ACI-35 lần thứ nhất. Các kết quả được biểu hiện là O.D. với tỷ lệ pha loãng 1/100 thể hiện giá trị trung bình + độ lệch chuẩn thu được ở các nhóm có 10 con chuột.

Fig.17: Thể hiện quá trình tăng sinh của các tế bào từ lá lách được kích thích lại bằng peptit Con A hoặc pTau/Tau. Phân tích về quá trình tăng sinh tế bào T đặc hiệu với Tau nhờ MTT vào d56. Các tế bào lá lách được tập hợp từ 10

con chuột của mỗi nhóm và được kích thích lại bằng các peptit ConA, Tau393-408 [pS396/S404] hoặc Tau393-408.

Fig.18: Thể hiện quá trình tạo xytokin bằng ELISPOT của các tế bào lá lách được kích thích lại bằng các peptit Tau393-408 [pS396/S404] và Tau393-408. Phân tích ELISPOT về quá trình tạo xytokin bằng các tế bào T đặc hiệu với P-Tau/Taus. Các tế bào lá lách được tập hợp từ 10 con chuột của mỗi nhóm và kích thích lại bằng các peptit Tau393-408 [pS396/S404] và Tau393-408.

Fig.19: Thể hiện các kháng thể IgG kháng Tau5-20 [pY18] ở chuột được gây miễn dịch bằng ACI-33. Phân tích về các kháng thể IgG kháng Tau5-20 [pY18] trong huyết thanh của chuột TPLH được tiêm năm lần ACI-33 vào d0, d13, d28, d91 và d133 và được lấy máu vào d-1, d27, d41, d76, d104 và d135. Các kết quả được biểu hiện là giá trị trung bình O.D + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm chuột, d-1 n=10 con chuột. d27, d41 và d76 n=9 con chuột, 1 con chuột chết do đánh nhau. d104 n=6, 3 con chuột chết do bệnh lý. d135 n=2, 4 con chuột chết do bệnh lý.

Fig.20: Thể hiện các kháng thể IgG kháng Tau393-408 [pS396/pS404] ở chuột được gây miễn dịch bằng ACI-35. Phân tích về các kháng thể IgG kháng Tau393-408 [pS396/pS404] trong huyết thanh của chuột TPLH được tiêm năm lần ACI-35 vào d0, d13, d27, d91 và d133 và được lấy máu vào d-1, d26, d40, d75, d103, d145 và d155. Các kết quả được biểu hiện là giá trị trung bình O.D + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm chuột, d-1, d26 n=10 con chuột. d40 n=9 con chuột. d75 n=6. d103 và d145 n=4. d155 n=3. Tất cả số chuột chết do bệnh lý.

Fig.21: Thể hiện các kháng thể IgG kháng Tau206-221 [pT212, pS214] ở chuột được gây miễn dịch bằng ACI-39. Phân tích về các kháng thể IgG kháng Tau206-221 [pT212, pS214] trong huyết thanh của chuột TPLH được tiêm năm lần ACI-39 vào d0, d13, d28, d91 và d133 và được lấy máu vào d-1, d27, d41, d76, d104 và d135. Các kết quả được biểu hiện là giá trị trung bình O.D + độ

lệch chuẩn thu được ở nhóm chuột, d-1, d27 và d41 n=10 con chuột, d76 n=7 con chuột, d104 n=6, d135 n=2. Tất cả số chuột chết do bệnh lý.

Fig.22: Thể hiện các kháng thể IgG kháng Tau 196-211 [pS202, pT205] ở chuột được gây miễn dịch bằng ACI-40. Phân tích về các kháng thể IgG kháng Tau196-211[pS202, pT205] trong huyết thanh của chuột TPLH được tiêm năm lần ACI-40 vào d0, d13, d28, d91 và d133 và được lấy máu vào d-1, d27, d41, d76, d104 và d135. Các kết quả được biểu hiện là giá trị trung bình O.D + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm chuột, d-1, d27 và d41 n=10 con chuột, d76 n=8 con chuột, d104 n=6, d135 n=5. Tất cả số chuột chết do bệnh lý.

Fig.23: Thể hiện các isotyp IgG và các kháng thể IgM kháng Tau5-20 [pY18] ở chuột được gây miễn dịch bằng ACI-33. Phân tích về các kháng thể IgG1, 2a, 2b, 3 và IgM kháng Tau5-20 [pY18] trong huyết thanh của chuột TPLH vào d41 sau ba lần gây miễn dịch bằng ACI-33. Các kết quả được biểu hiện là O.D. không bão hoà với tỷ lệ pha loãng là 1/100 (IgG1), 1/200 (IgG2a), 1/100 (IgG2b), 1/100 (IgG3) và 1/100 (IgM) thể hiện giá trị trung bình + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm có 9 con chuột.

Fig.24: Thể hiện các isotyp IgG và các kháng thể IgM kháng Tau393-408 [pS396/pS404] ở chuột được gây miễn dịch bằng ACI-35. Phân tích về các kháng thể IgG1, 2a, 2b, 3 và IgM kháng Tau393-408 [pS396/pS404] trong huyết thanh của chuột TPLH vào d40 sau ba lần gây miễn dịch bằng ACI-35. Các kết quả được biểu hiện là O.D. không bão hoà với tỷ lệ pha loãng là 1/100 (IgG1), 1/100 (IgG2a), 1/100 (IgG2b), 1/100 (IgG3) và 1/100 (IgM) thể hiện giá trị trung bình + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm có 9 con chuột.

Fig.25: Thể hiện các isotyp IgG và các kháng thể IgM kháng Tau206-221 [pT212, pS214] ở chuột được gây miễn dịch bằng ACI-39. Phân tích về các kháng thể IgG1, 2a, 2b, 3 và IgM kháng Tau206-221 [pT212, pS214] trong huyết thanh của chuột TPLH vào d41 sau ba lần gây miễn dịch bằng ACI-39. Các kết quả được biểu hiện là O.D. không bão hoà với tỷ lệ pha loãng là 1/100

(IgG1), 1/200 (IgG2a), 1/200 (IgG2b), 1/100 (IgG3) và 1/100 (IgM) thể hiện giá trị trung bình + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm có 10 con chuột.

Fig.26: Thể hiện các isotyp IgG và các kháng thể IgM kháng Tau196-211 [pS202, pT205] ở chuột được gây miễn dịch bằng ACI-40. Phân tích về các kháng thể IgG1, 2a, 2b, 3 và IgM kháng Tau 196-211 [pS202, pT205] trong huyết thanh của chuột TPLH vào d41 sau ba lần gây miễn dịch bằng ACI-40. Các kết quả được biểu hiện là O.D. không bão hoà với tỷ lệ pha loãng là 1/100 (IgG1), 1/400 (IgG2a), 1/200 (IgG2b), 1/800 (IgG3) and 1/100 (IgM) thể hiện giá trị trung bình + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm có 10 con chuột.

Fig.27: Thể hiện các chuẩn độ của các kháng thể IgG đối với các peptit Tau và các protein khác nhau ở chuột được gây miễn dịch bằng ACI-33. Phân tích về các chuẩn độ của các kháng thể IgG trong huyết thanh vào d-1 và d41 của chuột TPLH sau 3 lần tiêm ACI-33. Các kết quả được biểu hiện là O.D. thể hiện giá trị trung bình + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm có 9 con chuột.

Fig.28: Thể hiện các chuẩn độ của các kháng thể IgG đối với các peptit Tau và các protein khác nhau ở chuột được gây miễn dịch bằng ACI-35. Phân tích về các chuẩn độ của các kháng thể IgG trong huyết thanh vào d-1 và d41 của chuột TPLH sau 3 lần tiêm ACI-35. Các kết quả được biểu hiện là O.D. thể hiện giá trị trung bình + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm có 9 con chuột.

Fig.29: Thể hiện các chuẩn độ của các kháng thể IgG đối với các peptit Tau và các protein khác nhau ở chuột được gây miễn dịch bằng ACI-39. Phân tích về các chuẩn độ của các kháng thể IgG trong huyết thanh vào d-1 và d41 của chuột TPLH sau 3 lần tiêm ACI-39. Các kết quả được biểu hiện là O.D. thể hiện giá trị trung bình + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm có 10 con chuột.

Fig.30: Thể hiện các chuẩn độ của các kháng thể IgG đối với các peptit Tau và các protein khác nhau ở chuột được gây miễn dịch bằng ACI-40. Phân tích về các chuẩn độ của các kháng thể IgG trong huyết thanh vào d-1 và d41

của chuột TPLH sau 3 lần tiêm ACI-40. Các kết quả được biểu hiện là O.D. thể hiện giá trị trung bình + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm có 10 con chuột.

Fig.31: Thể hiện thử nghiệm Rotarod ở chuột được gây miễn dịch bằng ACI-33 so với chuột tiêm PBS.

Các thử nghiệm Rotarod được tiến hành vào năm thời điểm khác nhau dựa vào tuổi (các tháng) của chuột TPLH.

Fig.32: Thể hiện mối tương quan giữa các chuẩn độ của kháng thể kháng Tau5-20 [pY18] và thử nghiệm rotarod. Mối tương quan được xác định đối với TPLH được tiêm ACI-33 ở độ tuổi 7,8 tháng. Các chuẩn độ của các kháng thể ở huyết thanh chuột được đo bằng ELISA (O.D.) và thử nghiệm rotarod xác định thời gian các con chuột được giữ trong thiết bị (thời gian).

Fig.33: Thể hiện thử nghiệm Rotarod ở chuột được gây miễn dịch bằng ACI-35 so với chuột được tiêm PBS.

Các kết quả Rotarod của các con chuột TPLH 9,5 tháng tuổi được gây miễn dịch bằng ACI-35 so với nhóm đối chứng PBS. ACI-35 n=5 và PBS n=4 con chuột khác chết do bệnh lý thể hiện bởi mô hình này.

Fig.34: Thể hiện việc xác định số lượng CD3+CD4+ bằng FACS ở chuột trụi và chuột kiểu đại đã được xử lý bằng ACI-33. Phần trăm các tế bào cảnh vệ, được nhuộm dương tính đối với CD3 và CD4, của chuột trụi hoặc chuột kiểu đại hoặc tiêm ACI-33. Hình bên trái: biểu thị dưới dạng sơ đồ phân tích FACS ở hai con chuột trụi và các nhóm kiểu đại. Hình bên phải: Mỗi cột thể hiện giá trị trung bình và SD đối với các nhóm có 6 con chuột. Chuột #5 và 6: chuột trụi; chuột #7 và 8: chuột kiểu đại

Fig.35: Các kháng thể IgG kháng Tau5-20 [pY18] ở chuột trụi và chuột kiểu đại được gây miễn dịch bằng ACI-33. Phân tích về các kháng thể IgG kháng Tau5-20 [pY18] trong huyết thanh của chuột trụi và chuột kiểu đại được tiêm ba lần ACI-33 vào d0, d14 và d28 và được lấy máu vào d2, d7, d21, d35 và

d56. Các kết quả được biểu hiện là giá trị trung bình O.D + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm gồm 6 con chuột.

Fig.36: Các isotyp IgG và các kháng thể IgM kháng Tau5-20 [pY18] ở chuột trụi và chuột kiểu đại được gây miễn dịch bằng ACI-33. Phân tích về các kháng thể IgG1, 2a, 2b, 3 và IgM kháng Tau5-20 [pY18] trong huyết thanh của chuột trụi và chuột kiểu đại vào d35 sau ba lần gây miễn dịch bằng ACI-33. Các kết quả được biểu hiện là O.D. không bão hoà với tỷ lệ pha loãng là 1/100 (IgG1), 1/100 (IgG2a), 1/100 (IgG2b), 1/100 (IgG3) và 1/100 (IgM) thể hiện giá trị trung bình + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm gồm 6 con chuột.

Fig.37: Chuẩn độ của các kháng thể IgG đối với các peptit Tau và các protein khác nhau ở chuột trụi và chuột kiểu đại được gây miễn dịch bằng ACI-33. Phân tích chuẩn độ của các kháng thể IgG trong huyết thanh vào d35 của chuột trụi và chuột kiểu đại sau 3 lần tiêm ACI-33. Các kết quả được biểu hiện là O.D. thể hiện giá trị trung bình + độ lệch chuẩn thu được ở nhóm gồm 6 con chuột.

Fig.38: Sơ đồ thể hiện biểu thời gian miễn dịch ví dụ được sử dụng để tạo ra các kháng thể tau theo các phương án ví dụ hiện tại.

Fig.39: Sơ đồ thể hiện biểu thời gian miễn dịch ví dụ được sử dụng trong thử nghiệm que hình bánh xe theo các phương án ví dụ hiện tại.

Fig.40: Sơ đồ thể hiện biểu thời gian miễn dịch ví dụ được sử dụng trong thử nghiệm que hình bánh xe theo các phương án ví dụ hiện tại.

SEQ ID NO:1 Trình tự axit amin của trình tự kiểm soát T5: Tau 379-408 [pS396, pS404]

SEQ ID NO:2 Trình tự axit amin của trình tự 1 (T1): Tau 5-20 [pY18]

SEQ ID NO:3 Trình tự axit amin của trình tự 8 (T8); Tau 206-221 [pT212, pS214]

SEQ ID NO:4 Trình tự axit amin của trình tự 9 (T9): Tau 196-211
[pS202, pT205]

SEQ ID NO:5 Trình tự axit amin của trình tự 3 (T3): Tau 393-408
(pS396, pS404)

SEQ ID NO:6 Trình tự axit amin của trình tự 4 (T4): Tau 401-418
[pS404, pS409]

SEQ ID NO:7 Trình tự axit amin của trình tự 2 (T2); Tau 200-216
(pS202+ pT205& pT212+pS214)

SEQ ID NO:8 Trình tự axit amin của trình tự 10 (T10): Tau 407-418
[pS409]

SEQ ID NO:9 Trình tự axit amin của trình tự 11 (T11): Tau 399-408
[pS404]

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa các thuật ngữ

Các thuật ngữ "polypeptit", "peptit", và "protein", như được sử dụng ở đây, có thể thay đổi cho nhau và được xác định có nghĩa là phân tử sinh học bao gồm các axit amin được liên kết bởi liên kết peptit.

Thuật ngữ "các peptit," là các chuỗi axit amin (thường là L-axit amin) mà các cacbon alpha của chúng được liên kết nhờ các liên kết peptit được tạo ra bởi phản ứng ngưng tụ giữa nhóm carboxyl của cacbon alpha của một axit amin và nhóm amino của cacbon alpha của axit amin khác. Axit amin kết thúc ở một đầu của chuỗi (tức là đầu tận cùng amino) có nhóm amino tự do, trong khi axit amin kết thúc tại đầu còn lại của chuỗi (tức là đầu tận cùng carboxy) có nhóm carboxy tự do. Theo đúng nghĩa của từ này, thuật ngữ "đầu tận cùng amino" (được viết tắt là đầu tận cùng N) đề cập đến nhóm alpha-amino tự do trên axit amin tại đầu tận cùng amino của peptit, hoặc tới nhóm alpha-amino (nhóm imino khi tham

gia vào liên kết peptit) của axit amin tại bất kỳ vị trí nào khác trong peptit. Tương tự, thuật ngữ "đầu tận cùng carboxy" (được viết tắt là đầu tận cùng C) đề cập tới nhóm carboxyl tự do trên axit amin tại đầu tận cùng carboxy của peptit, hoặc tới nhóm carboxyl của axit amin tại bất kỳ vị trí nào khác trong peptit.

Các thuật ngữ "mảnh của chúng hoặc "mảnh" như được sử dụng ở đây đề cập tới mảnh peptit có chức năng mà về cơ bản có hoạt tính (sinh học) tương tự như các peptit được xác định ở đây (ví dụ như thể hiện trong các SEQ ID NO 2 đến 9 tương ứng), nghĩa là các mảnh này vẫn có khả năng tạo ra tính đặc hiệu ở mức độ cao, đặc biệt là tính đặc hiệu cấu hình, đáp ứng miễn dịch ở cơ thể, đặc biệt là ở động vật có vú hoặc người, nó rất hữu hiệu và có khả năng ngăn ngừa hoặc làm giảm các bệnh tau, hoặc các triệu chứng liên quan đến các bệnh tau. Đặc biệt, các phần này vẫn chứa các epitop hoặc phospho-epitop bệnh lý đặc hiệu của tau peptit, như được sử dụng và được xác định ở đây.

Thông thường, axit amin tạo nên peptit được đánh số theo thứ tự, bắt đầu từ đầu tận cùng amino và tăng lên theo hướng tới đầu tận cùng carboxy của peptit. Vì vậy, khi một axit amin được nói là "kế theo" axit amin khác, thì có nghĩa là axit amin đó được đặt ở vị trí gần kề với đầu tận cùng carboxy của peptit hơn axit amin có trước.

Thuật ngữ "gốc" được sử dụng ở đây đề cập tới axit amin có trong peptit bằng liên kết amit. Theo đúng nghĩa của từ này, axit amin có thể là axit amin có trong tự nhiên hoặc, trừ khi có quy định khác, có thể bao gồm các chất tương tự đã biết của axit amin tự nhiên mà hoạt động theo cách tương tự với axit amin có trong tự nhiên (tức là các chất bắt chước axit amin). Ngoài ra, chất bắt chước liên kết amit bao gồm các cải biến khung chính peptit đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Cụm từ "về cơ bản bao gồm" được sử dụng ở đây để loại trừ bất kỳ thành phần nào mà về căn bản sẽ làm biến đổi các đặc tính chủ yếu của các peptit mà cụm từ đó đề cập tới. Vì vậy, mô tả về peptit "về cơ bản bao gồm. . ." loại trừ sự

thay thế, xen đoạn, hoặc khuyết đoạn axit amin bất kỳ mà về cơ bản sẽ làm biến đổi hoạt tính sinh học của peptit đó.

Hơn nữa, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ nhận ra rằng, như đề cập ở trên, các thay thế, xen đoạn, hoặc khuyết đoạn riêng biệt mà làm biến đổi, bổ sung hoặc bỏ đi một axit amin đơn lẻ hoặc tỷ lệ phần trăm axit amin nhỏ (thông thường nhỏ hơn 5%, thông thường hơn nữa là nhỏ hơn 1%) trong trình tự mã hoá là các biến đổi cải biến bảo toàn trong đó các biến đổi tạo ra sự thay thế của axit amin bằng axit amin tương tự về phương diện hoá học. Các bảng thay thế bảo toàn cung cấp axit amin tương tự về mặt chức năng là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Sáu nhóm dưới đây mỗi nhóm chứa các axit amin mà là các thay thế bảo toàn cho loại khác:

- 1) Alanin (A), Serin (S), Serin (T);
- 2) Axit aspartic (D), axit glutamic (E);
- 3) Asparagin (N), Glutamin (Q);
- 4) Arginin (R), Lysin (K);
- 5) Isoleuxin (I), Leuxin (L), Methionin (M), Valin (V); và
- 6) Phenylalanin (F), Tyrosin (Y), Tryptophan (W),

Các cụm từ "phân lập" hoặc "tinh khiết về mặt sinh học" đề cập tới chất mà về cơ bản hoặc về bản chất không có các thành phần thường đi cùng với nó như được thấy ở trạng thái tự nhiên của nó. Vì vậy, các peptit mô tả ở đây không chứa các chất thường liên quan đến môi trường in situ của chúng. Thông thường, các peptit được phân lập, gây miễn dịch được mô tả ở đây ít nhất là tinh khiết khoảng 80%, thường ít nhất khoảng 90%, và tốt nhất là ít nhất khoảng 95% như được xác định nhờ cường độ vùng trên gel được nhuộm bạc.

Độ tinh khiết hoặc tính đồng nhất protein có thể được chỉ ra bằng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật, như phép điện di trên gel

polyacrylamit của mẫu protein, tiếp theo là làm hiện hình khi nhuộm. Đối với một số mục đích nhất định, thì độ phân giải cao sẽ cần thiết và HPLC hoặc cách tương tự để tinh chế được sử dụng.

Khi các peptit gây miễn dịch tương đối ngắn về độ dài (tức là nhỏ hơn khoảng 50 axit amin) thì chúng thường được tổng hợp nhờ các kỹ thuật tổng hợp peptit hoá học chuẩn.

Tổng hợp pha rắn, trong đó axit amin đầu tận cùng C của trình tự được gắn với nền không hòa tan tiếp theo là bổ sung liên tiếp axit amin còn lại trong trình tự là phương pháp ưu tiên để tổng hợp hoá học các peptit gây miễn dịch được mô tả ở đây. Các kỹ thuật để tổng hợp pha rắn là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Theo cách khác, các peptit gây miễn dịch được mô tả ở đây được tổng hợp nhờ sử dụng phương pháp tái tổ hợp axit nucleic. Thông thường, phương pháp này bao gồm tạo ra trình tự axit nucleic mã hoá peptit, đặt axit nucleic trong casset biểu hiện dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu, biểu hiện peptit ở vật chủ, phân lập peptit hoặc polypeptit biểu hiện, và nếu cần, hồi tính peptit. Các kỹ thuật đủ để chỉ dẫn người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực thông qua toàn bộ các phương pháp mà được thấy trong tài liệu chuyên ngành.

Khi các peptit được biểu hiện, tái tổ hợp có thể được tinh chế theo các phương pháp chuẩn, bao gồm kết tủa amoni sulfat, cột ái lực, phép sắc ký cột, điện di gel và các phương pháp tương tự. Các chế phẩm về cơ bản tinh khiết có độ đồng nhất khoảng từ 50% đến 95% được ưu tiên, và 80% đến 95% hoặc độ đồng nhất lớn hơn là được ưu tiên nhất để sử dụng làm các chất chữa bệnh. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ nhận ra rằng sau khi tổng hợp hoá học, biểu hiện sinh học, các peptit gây miễn dịch có thể có cấu hình về cơ bản khác với các cấu hình tự nhiên của các peptit cấu thành. Trong trường hợp này, thường xuyên cần làm biến tính hoặc khử peptit chống tăng sinh và sau đó làm cho peptit gấp lại thành cấu hình được ưu tiên. Các phương

pháp để khử và làm biến tính các protein và kích thích gấp lại là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật.

Tính kháng nguyên của protein tinh khiết có thể được khẳng định, ví dụ, bằng cách chứng minh phản ứng với huyết thanh miễn dịch, hoặc với huyết thanh miễn dịch tạo ra chống lại chính protein.

Thuật ngữ "một" như được sử dụng ở đây được xác định có nghĩa "một hoặc nhiều" và bao gồm số nhiều trừ khi phạm vi không thích hợp.

Các thuật ngữ "phát hiện" hoặc "được phát hiện" như được sử dụng ở đây có nghĩa là nhờ sử dụng các kỹ thuật đã biết để phát hiện các phân tử sinh học như các phương pháp hoá học miễn dịch hoặc mô học và đề cập tới việc xác định định tính hoặc định lượng nồng độ phân tử sinh học có mặt đang được nghiên cứu.

Thuật ngữ "phân lập" có nghĩa là phân tử sinh học không có ít nhất một số thành phần mà có trong tự nhiên.

Các thuật ngữ "kháng thể", "các kháng thể" hoặc "các mảnh có chức năng của chúng" như được sử dụng ở đây là thuật ngữ đã được chấp nhận trong lĩnh vực kỹ thuật và được hiểu là đề cập tới các phân tử hoặc các mảnh có hoạt tính của các phân tử gắn kết với các kháng nguyên đã biết, đặc biệt là tới các phân tử globulin miễn dịch và tới các phần có hoạt tính miễn dịch của các phân tử globulin miễn dịch, nghĩa là các phân tử chứa vị trí gắn kết miễn dịch đặc hiệu với kháng nguyên. Globulin miễn dịch theo sáng chế có thể là loại bất kỳ (IgG, IgM, IgD, IgE, IgA và IgY) hoặc kiểu (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 và IgA2) hoặc kiểu phụ của phân tử globulin miễn dịch.

"Các kháng thể" được dự tính nằm trong phạm vi của sáng chế bao gồm các kháng thể đơn dòng, các kháng thể đa dòng, dạng khảm, chuỗi đơn, đặc hiệu kép, được làm giống như của khỉ, người và được làm giống như của người cũng như các mảnh có hoạt tính của chúng. Ví dụ về các mảnh có hoạt tính của các

phân tử gắn kết với các kháng nguyên đã biết bao gồm các mảnh Fab và $F(ab')_2$, bao gồm các sản phẩm của thư viện biểu hiện globulin miễn dịch Fab và các mảnh gắn kết epitop của các kháng thể hoặc các mảnh bất kỳ nêu trên. Các mảnh có hoạt tính này có thể thu được từ kháng thể theo sáng chế bằng một số kỹ thuật. Ví dụ, các kháng thể đơn dòng tinh khiết có thể được phân giải bằng enzym, như pepsin, và được xử lý bằng cách lọc gel HPLC. Sau đó các phân đoạn thích hợp chứa các mảnh Fab có thể được thu gom và cô bằng cách lọc màng và các kỹ thuật tương tự. Nhằm mô tả thêm về các kỹ thuật chung để phân lập các mảnh có hoạt tính của các kháng thể, xem ví dụ tài liệu Khaw, B. A. et al. J. Nucl. Med. 23:1011-1019 (1982); Rousseaux et al. Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press, 1986.

Thuật ngữ "kháng thể được làm giống như của người" đề cập tới loại kháng thể được xử lý di truyền có các CDR của nó thu được từ globulin miễn dịch thể cho không phải người, các phần thu được từ globulin còn lại của phân tử thu được từ một (hoặc nhiều) globulin miễn dịch của người.

Kháng thể được làm giống như của người có thể còn đề cập tới kháng thể có vùng biến đổi trong đó một hoặc nhiều vùng khung của nó có các axit amin của người hoặc động vật linh trưởng. Ngoài ra, các gốc hỗ trợ khung có thể được biến đổi để bảo toàn ái lực gắn kết. Các phương pháp để thu được "các kháng thể được làm giống như của người" là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật (xem, ví dụ tài liệu Queen et al., Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson et al., Bio/Technology, 9:421 (1991)).

Thuật ngữ "kháng thể được làm giống như của người" có thể còn thu được bằng phương pháp xử lý di truyền mới có khả năng tạo ra các kháng thể đa dòng tương tự người thành thực ái lực ở các động vật lớn, như, ví dụ, thỏ (<http://www.rctecgiore.com/bioventures/therapeutic.php>).

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" cũng sẽ được nhận biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật và đề cập tới kháng thể được sản xuất lượng lớn trong phòng thí nghiệm từ dòng vô tính đơn và nhận biết chỉ một kháng nguyên. Các kháng thể đơn dòng thường được tạo ra bằng cách dung hợp tế bào B sản xuất kháng thể, tồn tại ngắn với tế bào tăng trưởng nhanh, như tế bào ung thư (đôi khi được đề cập tới là tế bào "bất tử"). Tế bào lai, hoặc khối tế bào lai thu được, sinh sôi nảy nở nhanh chóng, tạo ra dòng vô tính mà sản sinh lượng rất lớn kháng thể.

Thuật ngữ "kháng nguyên" đề cập tới một chất hoặc mảnh của chúng mà có thể kích thích đáp ứng miễn dịch ở cơ thể, đặc biệt là động vật, đặc biệt hơn là động vật có vú bao gồm người. Thuật ngữ này bao gồm các chất sinh miễn dịch và các vùng tạo ra tính kháng nguyên hoặc các yếu tố xác định kháng nguyên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "hòa tan" có nghĩa là hòa tan một phần hoặc hoàn toàn trong dung dịch nước.

Cũng như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "sinh miễn dịch" đề cập tới các chất mà kích thích hoặc tăng cường sản xuất các kháng thể, các tế bào T và các tế bào miễn dịch có khả năng phản ứng khác trực tiếp chống lại tác nhân sinh miễn dịch và góp phần vào đáp ứng miễn dịch ở người hoặc động vật.

Đáp ứng miễn dịch xuất hiện khi một cá thể tạo ra các kháng thể, các tế bào T và các tế bào miễn dịch có khả năng phản ứng khác đủ để chống lại các chế phẩm sinh miễn dịch được sử dụng theo sáng chế để làm chậm hoặc thuyên giảm rối loạn cần được điều trị.

Thuật ngữ "khối tế bào lai" được nhận biết trong lĩnh vực kỹ thuật được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật là đề cập tới tế bào được tạo ra bằng cách dung hợp tế bào tạo kháng thể và tế bào bất tử, ví dụ tế bào đa u tủy. Tế bào lai này có thể tạo ra nguồn cung cấp kháng thể liên tục.

Xem định nghĩa về "kháng thể đơn dòng" nêu trên và các ví dụ dưới đây để mô tả phương pháp dung hợp chi tiết hơn.

Thuật ngữ "chất mang" như được sử dụng ở đây có nghĩa là cấu trúc trong đó peptit kháng nguyên hoặc cấu trúc siêu phân tử có thể được đưa vào hoặc có thể kết hợp với, nhờ đó các peptit kháng nguyên hoặc một phần của peptit có thể tiếp xúc hoặc thể hiện với hệ miễn dịch của người hoặc động vật. Phần tử bất kỳ mà có thể được sử dụng thích hợp trong liệu pháp cho người hoặc động vật như, ví dụ, nang, hạt hoặc thể hạt có thể được sử dụng làm chất mang trong phạm vi của sáng chế.

Thuật ngữ "chất mang" còn bao gồm phương pháp phân phối trong đó các chế phẩm kháng nguyên cấu trúc siêu phân tử chứa peptit kháng nguyên có thể được vận chuyển tới các vị trí mong muốn bằng các cơ chế phân phối. Một ví dụ về hệ phân phối này sử dụng các kim loại keo như vàng dạng keo.

Các protein mang có thể được sử dụng trong các chế phẩm kháng nguyên cấu trúc siêu phân tử theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, protein gắn kết maltoza "MBP"; anbumin huyết thanh bò "BSA"; hemoxyanin hà "KLH"; lòng trắng trứng; flagelin; thyroglobulin; anbumin huyết thanh của loài bất kỳ; globulin gama của loài bất kỳ; các tế bào cùng gen; các tế bào cùng gen mang các kháng nguyên lạ; và các polyme của axit D- và/hoặc L- amin.

Trong "kháng nguyên cấu trúc siêu phân tử" theo sáng chế, liposom có thể có chức năng kép trong đó nó có thể được sử dụng làm chất mang bao gồm cấu trúc siêu phân tử như được mô tả trên đây và, đồng thời hoạt động như chất phụ trợ để làm tăng hoặc kích thích đáp ứng miễn dịch ở động vật đích hoặc người cần điều trị bằng vacxin chữa bệnh theo sáng chế. Cần hiểu rằng các chế phẩm kháng nguyên cấu trúc siêu phân tử theo sáng chế có thể còn bao gồm các chất phụ trợ khác, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, hemoxyanin hà (KLH), anbumin huyết thanh bò (BSA) và các chất phụ trợ khác như, ví dụ, lipid A, phèn, canxi phosphat, interleukin 1, và/hoặc các vi nang của polysacarit và các

protein, nhưng đặc biệt là lipit A đã loại bỏ độc tố, như monophosphoryl hoặc diphosphoryl lipit A, hoặc phèn, các chất bảo quản khác, các chất pha loãng, các chất nhũ hóa, các chất làm ổn định, và các thành phần khác mà đã biết và được sử dụng làm các vacxin trong tình trạng kỹ thuật. Ngoài ra, hệ chất phụ trợ bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế. Các chất phụ trợ này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất phụ trợ Freund không hoàn chỉnh, chất phụ trợ Freund hoàn chỉnh, mannan được axetyl hóa liên kết với β -(1,4) phân tán ("Acemannan"), TITERMAX® (các chất phụ trợ copolyme polyoxyetylen-polyoxypropylen của CytRx Corporation), các chất phụ trợ lipit được cải biến của Chiron Corporation, các chất phụ trợ dẫn xuất saponin của Cambridge Biotech, *Bordetella pertussis* được làm chết, lipopolysacarit (LPS) của vi khuẩn gram âm, các anion polyme lớn như dextran sulfat, và các gel vô cơ như phèn, nhôm hydroxit, hoặc nhôm phosphat.

Hơn nữa, thuật ngữ "lượng hữu hiệu" đề cập tới lượng chế phẩm kháng nguyên/gây miễn dịch mà khi cung cấp nó cho người hoặc động vật tạo ra đáp ứng miễn dịch. Lượng hữu hiệu dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật theo các phương pháp thông thường.

“Bệnh nhân dung nạp miễn dịch” như được sử dụng ở đây đề cập tới động vật hoặc người bệnh có khả năng hạn chế phản ứng lại các kháng nguyên, đặc biệt là các kháng nguyên không tự thân, nhưng đặc biệt là các kháng nguyên mới như, ví dụ các kháng nguyên mới có mặt trong các bệnh mới xuất hiện. Hạn chế này có thể do, ít nhất một phần là do sự lão hoá theo trật tự thời gian của các tế bào CD4⁺ T. Hơn nữa, “bệnh nhân dung nạp miễn dịch” có thể có đáp ứng miễn dịch tế bào CD4⁺ T suy yếu với sự phơi kháng nguyên do các thiếu sót trong quá trình tăng sinh và tiết xytokin của các tế bào trí nhớ T trong các đáp ứng nhớ lại. “Bệnh nhân hoạt hoá tế bào T” như được sử dụng ở đây đề cập tới động vật hoặc người bệnh có sự hoạt hoá tế bào T và trong đó sự kích thích hơn nữa đáp ứng tế bào T sẽ gây nguy hiểm cho sức khoẻ.

"Bệnh nhân bị tổn thương miễn dịch" như được sử dụng ở đây đề cập tới động vật hoặc người bệnh có hệ miễn dịch bị suy yếu do sự lão hoá, bệnh tật như HIV, hoặc bệnh ung thư, hoặc do điều trị như, ví dụ, điều trị chống lại các bệnh viêm nhiễm bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Viêm đa khớp dạng thấp, Bệnh vẩy nến, Ban đỏ toàn thân, Bệnh u hạt Wegener, v.v....

Trong phạm vi của sáng chế, đã chứng minh được rằng kháng thể kích thích đáp ứng với chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế phần lớn không phụ thuộc vào tế bào T. Mô hình chuột trụi được sử dụng trong khía cạnh này và chuột trụi được tiêm chủng và các đáp ứng kháng thể được xác định để đánh giá đáp ứng kháng thể đặc hiệu AB được kích thích bởi chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế ở chuột trụi đã tạo miễn dịch. Chuột trụi mang đột biến Foxn1nu và do vậy, có chức năng tế bào T giảm do thiếu tuyến ức thực sự.

"Lượng hữu hiệu về mặt dược lý" như được sử dụng ở đây đề cập tới liều hoạt chất trong được phẩm thích ứng để chữa bệnh, hoặc ít nhất làm ngừng một phần các triệu chứng của bệnh, rối loạn hoặc tình trạng cần được điều trị hoặc biến chứng bất kỳ đi kèm theo đó.

Theo một phương án đặc biệt, sáng chế khiến cho việc sử dụng đặc tính kháng nguyên, đặc biệt là đối với bề mặt của phân tử chất mang như liposom làm cho sự bộc lộ và ổn định của cấu hình kháng nguyên ưu tiên được tăng cường, cuối cùng nó tạo ra đáp ứng miễn dịch ở mức độ cao, đặc biệt là đáp ứng miễn dịch không phụ thuộc vào tế bào T, và làm phát sinh các kháng thể có các đặc tính duy nhất.

Đặc biệt, peptit kháng nguyên được biểu hiện trên bề mặt của phân tử chất mang dưới dạng dãy lặp lại ở mức độ cao, đặc biệt là dãy lặp lại bao gồm ít nhất 10 đơn vị kháng nguyên lặp lại/phân tử chất mang, đặc biệt là ít nhất 50 đơn vị kháng nguyên lặp lại/phân tử chất mang, đặc biệt là ít nhất 100 đơn vị kháng nguyên lặp lại/phân tử chất mang, đặc biệt là ít nhất 200 đơn vị kháng nguyên lặp lại/phân tử chất mang, đặc biệt là ít nhất 300 đơn vị kháng nguyên lặp

lại/phân tử chất mang; đặc biệt là ít nhất 400 đơn vị kháng nguyên lặp lại/phân tử chất mang, đặc biệt là ít nhất 500 đơn vị kháng nguyên lặp lại/phân tử chất mang.

Kháng nguyên phospho-peptit được cải biến theo sáng chế và như được mô tả ở đây, đặc biệt là kháng nguyên phospho-peptit bắt chước phospho-epitop bệnh lý chính của protein tau, có thể được tổng hợp theo phương pháp cải biến nêu trong tài liệu Nicolau et. al. (2002) Proc Natl. Acad. Sci USA 99, 2332-2337. Phương pháp này bao gồm tập hợp dần dần cấu trúc bằng cách tổng hợp peptit pha rắn trên nhựa amit nhờ sử dụng hoá học Fmoc/tBu chuẩn. Sau đó các nhóm bảo vệ trực giao của các lysin tận cùng được loại bỏ và các nhóm amino tự do được axyl hoá bằng axit plamitic.

Quá trình khử bảo vệ các nhóm bảo vệ mạch bên và quá trình giải phóng đồng thời peptit khỏi nhựa đạt được trong các điều kiện axit, tạo ra phosphopeptit tetrapalmytoyl hoá dưới dạng sản phẩm thô.

Sau đó thu được sản phẩm cuối cùng với độ tinh khiết cao và độ đồng nhất và độ tinh khiết của nó được khẳng định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật như, ví dụ phép phân tích phổ khối điện phun và/hoặc phân tích HPLC.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất các chế phẩm tạo miễn dịch bao gồm kháng nguyên phospho-peptit theo sáng chế và như được mô tả ở đây bắt chước phospho-epitop bệnh lý chính của protein tau, peptit kháng nguyên đó được cải biến sao cho nó có khả năng duy trì và làm ổn định cấu hình đã xác định của kháng nguyên. Cấu hình đã xác định này làm cho quá trình kích thích đáp ứng miễn dịch đặc hiệu cao và mạnh khi đưa vào động vật hoặc người.

Một cách để đạt được sự hình thành và ổn định của cấu hình mong muốn của peptit kháng nguyên là bằng cách cho peptit kháng nguyên gắn kết với, hoặc

kết hợp với hoặc hoàn nguyên, một phần hoặc hoàn toàn, trong chất mang, đặc biệt là chất mang mà có thể có hoạt động như chất phụ trợ.

Chất mang có thể dự tính nằm trong phạm vi của sáng chế, ví dụ là dạng nang, thể hạt hoặc phân tử; các protein màng vi khuẩn, các protein Omp của vi khuẩn đường ruột, các hạt nano, các mixen, các hạt vàng, các vi hạt và/hoặc các thể virus hoặc phương tiện bất kỳ khác mà có thể được sử dụng một cách thích hợp làm chất mang/chất phụ trợ cho peptit kháng nguyên, nhưng đặc biệt là liposom.

Theo một phương án đặc biệt của sáng chế, peptit kháng nguyên được gắn kết với, hoặc đưa vào hoặc hoàn nguyên trong chất mang nhờ các tương tác yếu, như, ví dụ tương tác kỵ nước hoặc tĩnh điện, van der Waal's, hoặc sự kết hợp của hai hoặc nhiều tương tác nói trên, sao cho peptit được thể hiện với cấu hình đặc hiệu, nó được duy trì và làm ổn định bằng cách làm giới hạn peptit kháng nguyên đã nêu trong khả năng chuyển động ba chiều của nó để các thay đổi cấu hình được ngăn cản hoặc giới hạn rất chặt chẽ.

Nếu dạng nang, hạt hoặc thể hạt được sử dụng làm chất mang/chất phụ trợ như, ví dụ liposom, chế phẩm chứa peptit kháng nguyên có thể được chọn sao cho tổng diện tích toàn phần giống hệt với tổng diện tích toàn phần của bề mặt chất mang/chất phụ trợ mà peptit gắn kết với. Lực đẩy tĩnh điện có tác động giữa bề mặt chất mang/chất phụ trợ tích điện giống nhau và peptit kháng nguyên, nhưng đặc biệt là bề mặt chất mang tích điện giống nhau và các gốc axit amin cấu thành peptit kháng nguyên và đặc biệt hơn là bề mặt chất mang tích điện giống nhau và các gốc axit amin tích điện giống nhau có trong peptit kháng nguyên, có thể làm cho peptit kháng nguyên chấp nhận cấu hình đã làm ổn định và đặc hiệu cao, được xác định bảo đảm hoạt tính sinh học cao. Do vậy, peptit kháng nguyên được bộc lộ và thể hiện trong cấu hình có hoạt tính sinh học cao trong đó nó cho phép hệ miễn dịch của cơ thể sinh vật đích tự do tương tác với các yếu tố xác định kháng nguyên có trong cấu trúc kháng nguyên trong cấu

hình có hoạt tính sinh học, mà khi được cung cấp cho động vật hoặc người, tạo ra đáp ứng miễn dịch cấu hình và mạnh, ví dụ tạo ra độ chuẩn kháng thể cao ở cơ thể đích.

Đáp ứng tạo miễn dịch có thể được tăng hơn nữa nhờ sử dụng liposom làm chất mang, liposom này có thể hoạt động như chất phụ trợ để tăng cường hoặc hoặc kích thích đáp ứng miễn dịch ở động vật đích hoặc người cần được điều trị bằng dược phẩm theo sáng chế. Tuy ý, liposom có thể còn chứa chất phụ trợ khác nữa, ví dụ, lipit A, phèn, canxi phosphat, intolokin 1, và/hoặc các vi nang của polysacarit và các protein, như đặc biệt là lipit A đã khử độc tố, như monophosphoryl hoặc diphosphoryl lipit A, hoặc phèn.

Theo một phương án đặc biệt của sáng chế, peptit kháng nguyên theo sáng chế và được mô tả ở đây, đặc biệt là peptit kháng nguyên mà tổng điện tích toàn phần của nó là số âm, được sử dụng hoàn nguyên trong liposom, đặc biệt là liposom mà các thành phần của nó được chọn sao cho tổng điện tích thực của nhóm đứng đầu liposom là số âm. Đặc biệt, liposom cấu thành bởi các thành phần được chọn từ nhóm gồm có dimyristoyl phosphatidyl cholin (DMPG), dimyristoyl phosphatidyl etanolamin (DMPEA), dimyristoyl phosphatidyl glyxerol (DMPG) và cholesterol, và tùy ý, còn chứa monophosphoryl lipit A hoặc chất phụ trợ bất kỳ khác mà có thể được sử dụng một cách thích hợp trong phạm vi của sáng chế như, ví dụ phèn, canxi phosphat, intolokin 1, và/hoặc các vi nang của polysacarit và các protein.

Theo một phương án đặc biệt khác của sáng chế, peptit kháng nguyên được cải biến theo sáng chế và như được mô tả trên đây có thể gắn kết cộng hóa trị với phân tử dạng neo mà có khả năng xen vào chất mang/chất phụ trợ nhờ đó gắn peptit vào chất mang/chất phụ trợ và biểu hiện nó trên hoặc rất gần với bề mặt của phân tử chất mang/chất phụ trợ sao cho các lực tĩnh điện có thể có tác dụng như được mô tả trên đây.

Khi các liposom được sử dụng làm chất mang/chất phụ trợ, thì cấu trúc peptit kháng nguyên thường có đuôi kỵ nước được xen vào màng liposom khi nó được tạo ra. Ngoài ra, các peptit kháng nguyên có thể được cải biến để chứa đuôi kỵ nước để nó có thể được xen vào liposom.

Chế phẩm kháng nguyên theo sáng chế đặc biệt là bao gồm các peptit được cải biến để tăng cường hiệu quả kháng nguyên trong đó các peptit này có thể được cải biến nhờ quá trình pegyl hoá (nhờ sử dụng polyetylen glycol hoặc polyetylen glycol được cải biến), hoặc được cải biến nhờ các phương pháp khác như bằng axit plamic như được mô tả trên đây, các axit poly-amin (ví dụ poly-glyxin, poly-histidin), các poly-sacarit (ví dụ axit polygalacturonic, axit polylactic, polyglycolit, chitin, chitosan), các polyme tổng hợp (các polyamit, các polyuretan, các polyeste) hoặc các co-polyme (ví dụ poly(axit metacrylic) và N-(2-hydroxy) propyl metacrylamit) và các loại tương tự.

Theo một phương án đặc biệt của sáng chế, các peptit kháng nguyên theo sáng chế và như được mô tả trên đây được đề xuất, chúng được cải biến chứa đuôi kỵ nước để các peptit này có thể được xen vào liposom. Đặc biệt, kháng nguyên phospho-peptit theo sáng chế và như được mô tả ở đây bắt chước phospho-epitop bệnh lý chính của protein tau, có thể được cải biến bằng gốc ưa béo hoặc kỵ nước tạo thuận lợi cho việc xen vào lớp kép lipid của chất mang/chất phụ trợ. Các gốc ưa chất béo hoặc kỵ nước theo sáng chế có thể là các axit béo, các triglyxerit và các phospholipit đặc biệt là các axit béo, các triglyxerit và các phospholipit trong đó khung chính cacbon của axit béo có ít nhất 10 nguyên tử cacbon, đặc biệt là các gốc ưa chất béo có các axit béo với khung chính cacbon gồm ít nhất khoảng 14 nguyên tử cacbon và tới khoảng 24 nguyên tử cacbon, với mỗi số trong số các nguyên tử cacbon nằm trong giới hạn này cũng là một phần của sáng chế. Đặc biệt, sáng chế đề cập đến peptit kháng nguyên theo sáng chế và như được mô tả trên đây, chúng được cải biến để chứa đuôi kỵ nước, đặc biệt là đuôi kỵ nước bao gồm các gốc kỵ nước có khung chính

cacbon gồm ít nhất 14 nguyên tử cacbon, nhưng đặc biệt là 16 nguyên tử cacbon. Các ví dụ về các gốc kỵ nước bao gồm, nhưng không giới hạn ở, axit plamitic, axit stearic, axit myristic, axit lauric, axit oleic, axit linoleic, axit linolenic và cholesterol hoặc 1,2-distearoyl-sn-glyxero-3-phosphatidyletanolamin (DSPE). Theo một phương án đặc biệt của sáng chế, các gốc kỵ nước là axit plamitic.

Theo một phương án, peptit kháng nguyên theo sáng chế và như được mô tả ở đây, gắn kết cộng hoá trị với gốc ưa béo hoặc kỵ nước. Trong phạm vi của sáng chế, gắn kết cộng hoá trị của peptit kháng nguyên có thể được tạo ra bởi các gốc axit amin, nó kéo dài các trình tự axit amin tương ứng với các trình tự của peptit kháng nguyên theo sáng chế, đặc biệt là tại (các) đầu tận cùng của chúng, đặc biệt là (các) đầu tận cùng N- và C-, và các gốc axit béo được gắn kết với nó.

Đặc biệt, mỗi thể tiếp hợp bao gồm ít nhất bốn phân tử của axit béo chứa chuỗi cacbon từ C12 đến C24, đặc biệt là chuỗi cacbon C16, trong đó các phân tử axit béo gắn kết cộng hoá trị tại các đầu tận cùng N và C của các peptit kháng nguyên. Các phân bố khác có thể cũng được mô tả, nằm trong trình tự axit amin. Các peptit này cũng gắn kết cộng hoá trị với các phân tử axit béo.

Vì vậy các được phẩm theo sáng chế có thể bao gồm các liposom được tạo ra bằng cách hoàn nguyên các liposom với sự có mặt của các peptit kháng nguyên được cải biến hoặc tinh khiết hoặc tinh khiết một phần theo sáng chế và như được mô tả ở đây. Ngoài ra, các mảnh peptit có thể được hoàn nguyên trong các liposom. Sáng chế cũng bao gồm các mảnh peptit kháng nguyên được cải biến để làm tăng tính kháng nguyên của chúng. Ví dụ, các gốc kháng nguyên và các chất phụ trợ có thể gắn kết với hoặc kết hợp với peptit. Các ví dụ về các gốc kháng nguyên và các chất phụ trợ, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các dẫn xuất dipeptit muramyl ưa chất béo, các polyme phong bế không ion, chất phụ trợ nhôm hydroxit hoặc nhôm phosphat, và các hỗn hợp của chúng.

Các liposom mà có thể được sử dụng trong các chế phẩm theo sáng chế bao gồm các loại đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Lipit bất kỳ trong số các lipit chuẩn hữu ích để tạo ra các liposom có thể được sử dụng. Lớp kép và các liposom đa lớp chuẩn có thể được sử dụng để tạo ra các chế phẩm theo sáng chế. Trong khi phương pháp bất kỳ tạo ra các liposom đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng, các liposom ưu tiên nhất được tạo ra theo phương pháp Alving et al., *Infect. Immun.* 60:2438-2444, 1992, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Liposom có thể tùy ý chứa chất phụ trợ hoặc chất điều biến miễn dịch hoặc cả hai. Chất điều biến miễn dịch được ưu tiên là lipit A, đặc biệt là lipit A đã khử độc tố như, ví dụ, monophosphoryl hoặc diphosphoryl lipit A.

Các liposom có thể được tạo ra bằng kỹ thuật bơm dòng giao nhau như được mô tả, ví dụ trong tài liệu Wagner et al (2002) *Journal of Liposom Research* Vol 12(3), pp 259 -270. Trong quá trình bơm các dung dịch lipit vào hệ đệm nước, các lipit có xu hướng tạo ra "các chất kết tủa", tiếp theo tự sắp xếp thành các nang. Kích cỡ nang thu được tùy thuộc vào các nhân tố như nồng độ lipit, tốc độ khuấy, tốc độ bơm và việc lựa chọn các lipit. Hệ thống điều chế có thể bao gồm modul tiêm dòng giao nhau, các ống cho pha phân cực (ví dụ dung dịch đệm PBS), các lọ dung dịch etanol/lipit và thiết bị điều áp, nhưng đặc biệt là thiết bị điều áp nitơ. Khi dung dịch nước hoặc phân cực được bơm bằng modul bơm dòng giao nhau thì dung dịch etanol/lipit được bơm vào pha phân cực cùng với thay đổi các áp suất ứng dụng.

Theo một phương án, peptit kháng nguyên được cải biến theo sáng chế và như được mô tả ở đây vì vậy có thể được cải biến hơn nữa bằng cách hoàn nguyên trong các liposom gồm có các phospholipit và cholesterol (phosphatidyletanol amin, phosphatidyl glyxerol, cholesterol) với các tỷ số mol biến đổi. Các phospholipit khác có thể được sử dụng. Lipit A được sử dụng với nồng độ khoảng 40 ug/pmol các phospholipit.

Liposom có thể có chức năng kép do nó có thể được sử dụng làm chất mang bao gồm cấu trúc siêu phân tử như được mô tả trên đây và, đồng thời hoạt động như chất phụ trợ để làm tăng hoặc kích thích đáp ứng miễn dịch ở động vật đích hoặc người cần điều trị bằng vacxin chữa bệnh theo sáng chế. Tuy ý, liposom có thể, ngoài ra, chứa chất phụ trợ hoặc chất điều biến miễn dịch khác nữa hoặc cả hai như, ví dụ lipit A, phèn, canxi-phosphat, intolokin 1, và/hoặc các vi nang của polysacarit và các protein, nhưng đặc biệt là lipit A, đặc biệt hơn là lipit A đã khử độc tố, như monophosphoryl hoặc diphosphoryl lipit A, hoặc phèn.

Theo một phương án đặc biệt của sáng chế, các liposom có lipit A được sử dụng làm chất phụ trợ để bào chế được phẩm theo sáng chế. Dimyristoylphosphatidyl-cholin, -glyxerol và -cholesterol được kết hợp, đặc biệt là với tỷ số mol bằng 9:1:7. Chất điều biến miễn dịch mạnh như, ví dụ, monophosphoryl lipit A sau đó được thêm vào với nồng độ thích hợp, đặc biệt là với nồng độ từ 20 mg đến 50 mg cho mỗi mmol, đặc biệt hơn là với nồng độ từ 30 mg đến 40 mg cho mỗi mmol của các phospholipit. Sau đó peptit kháng nguyên được cải biến được thêm vào với tỷ số mol peptit so với các phospholipit từ 1:30 đến 1:200, đặc biệt là với tỷ số mol từ 1:50 đến 1:120, đặc biệt hơn là 1:100. Các dung môi được loại bỏ, ví dụ bằng cách làm bay hơi, và màng thu được được hydrat hoá bằng dung dịch đậm đặc trùng như, ví dụ PBS.

Theo một phương án đặc biệt của sáng chế, peptit kháng nguyên theo sáng chế và như được mô tả ở đây được đề xuất cải biến bởi ít nhất hai phân tử của axit palmitic liên kết cộng hoá trị với các đầu tận cùng N- và C- của peptit kháng nguyên này và bằng cách hoàn nguyên trong chất mang liposom.

Quá trình palmitoyl hoá, khi tạo neo cho peptit trong lớp liposom kép, do độ dài của gốc axit béo $C_{16:0}$ giảm tương đối khiến cho peptit được thể hiện tiếp xúc với hoặc rất gần với bề mặt liposom.

Dược phẩm theo sáng chế bao gồm peptit kháng nguyên theo sáng chế và như được mô tả ở đây, đặc biệt là phospho-peptit bắt chước các phospho-epitop bệnh lý chủ yếu của protein tau, đặc biệt là với lượng hữu hiệu về mặt dược lý, có thể được bào chế dưới dạng dung dịch lỏng, hoặc huyền phù có thể tiêm, hoặc nếu không dưới dạng rắn thích hợp để làm hoà tan trước khi tiêm trong phạm vi, ví dụ, kit để tạo ra cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế, như được mô tả dưới đây.

Các chất mang, các chất pha loãng và/hoặc các tá dược được dụng là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm, ví dụ, các dung dịch nước muối đậm phosphat, nước, nhũ tương như nhũ tương dầu/nước, các loại khác nhau của các chất làm ẩm, các dung dịch tiệt trùng, v.v..

Việc bào chế dược phẩm theo sáng chế có thể đạt được nhờ sử dụng phương pháp chuẩn đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Dược phẩm theo sáng chế bao gồm peptit kháng nguyên theo sáng chế và như được mô tả ở đây, đặc biệt là phospho-peptit bắt chước các phospho-epitop bệnh lý chủ yếu của protein tau, đặc biệt là với lượng hữu hiệu về mặt dược, có thể được cung cấp cho người hoặc động vật bị bệnh thoái hoá thần kinh, hoặc các triệu chứng liên quan đến bệnh thoái hoá thần kinh, để kích thích đáp ứng miễn dịch ở người hoặc động vật đã nêu để làm giảm bớt các triệu chứng liên quan đến bệnh hoặc để phục hồi lại tình trạng được thấy ở các cá nhân khoẻ mạnh không bị tác động bởi bệnh.

Các chế phẩm theo sáng chế được cung cấp cho người hoặc động vật theo cách sử dụng chuẩn thích hợp bất kỳ dưới dạng chất rắn, chất lỏng hoặc sol khí với liều hữu hiệu, thích hợp. Nói chung, chế phẩm có thể được cung cấp tại chỗ, qua đường miệng, trực tràng, mũi hoặc ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, trong tĩnh mạch, dưới da, hoặc trong cơ). Ngoài ra, chế phẩm có thể còn được đưa vào các chất nền giải phóng duy trì như các polyme có thể thoái biến sinh học, các

polyme được cấy ghép vào vùng lân cận nơi muốn phân bố thuốc, ví dụ tại vị trí khối u. Phương pháp bao gồm cung cấp liều đơn, cung cấp các liều nhắc lại vào các khoảng thời gian đã xác định trước, và cung cấp duy trì trong khoảng thời gian đã xác định trước.

Theo một phương án đặc biệt của sáng chế, cấu trúc kháng nguyên theo sáng chế, đặc biệt là chế phẩm vacxin bao gồm cấu trúc kháng nguyên dưới dạng được dụng, được cung cấp dưới dạng các liều nhắc lại, đặc biệt với 1 đến 15 liều, đặc biệt hơn với 2 đến 10 liều, đặc biệt hơn là với 3 đến 5 liều và thậm chí đặc biệt hơn là với 3 liều, trong các khoảng thời gian từ 1 tuần đến 20 tuần, đặc biệt là trong các khoảng thời gian từ 1 đến 10 tuần, đặc biệt là trong các khoảng thời gian từ 1 đến 6 tuần, đặc biệt hơn trong các khoảng thời gian từ 1 đến 4 tuần, và thậm chí đặc biệt hơn là trong các khoảng thời gian từ 2 đến 3 tuần. Đáp ứng miễn dịch có thể được theo dõi bằng cách lấy các mẫu huyết thanh/huyết tương vào thời gian thích hợp sau khi chủng củng cố, đặc biệt là từ 3 đến 10 ngày sau khi chủng củng cố, đặc biệt hơn là từ 4 đến 8 ngày sau khi chủng củng cố và đặc biệt hơn là 7 ngày sau khi chủng củng cố và xác định tính gây miễn dịch của cấu trúc kháng nguyên nhờ sử dụng phương pháp đã biết, đặc biệt là một trong các thử nghiệm miễn dịch thường được sử dụng, ví dụ thử nghiệm ELISA.

Đặc biệt, chế phẩm peptit kháng nguyên theo sáng chế được cung cấp bằng cách sử dụng ngoài đường tiêu hóa, đặc biệt là bằng cách tiêm vào trong màng bụng, trong tĩnh mạch, dưới da và trong cơ.

Các chế phẩm để sử dụng ngoài đường tiêu hóa bao gồm các dung dịch nước hoặc không nước tiệt trùng, huyền phù và nhũ tương. Các dung môi không nước bao gồm, nhưng không giới hạn ở, propylen glycol, polyetylen glycol, dầu thực vật như dầu oliu, và các este hữu cơ có thể tiêm như etyl oleat. Các dung môi nước có thể được chọn từ nhóm gồm có nước, các dung dịch rượu/nước, nhũ tương hoặc huyền phù bao gồm nước muối và môi trường đệm. Các chất

dẫn sử dụng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch natri clorua, Ringer's dextroza, dextroza và natri: clorua, Ringer's lactat hóa, hoặc dầu không bay hơi. Các chất dẫn sử dụng trong tĩnh mạch bao gồm các chất độn dinh dưỡng và dịch, các chất độn điện phân (như các loại gốc Ringer's dextroza) và các loại khác. Các chất bảo quản có thể cũng có mặt, như, ví dụ các chất kháng vi khuẩn, các chất chống oxy hóa, các chất tạo chelat, các khí trơ, v.v...

Liều của chế phẩm sẽ tùy thuộc vào tình trạng cần điều trị, chế phẩm cụ thể được sử dụng, và các nhân tố lâm sàng khác như trọng lượng, kích thước và tình trạng của bệnh nhân, diện tích bề mặt cơ thể, các dược chất khác được sử dụng đồng thời, và cách sử dụng.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với các chất có hoạt tính sinh học khác và các phương pháp để điều trị bệnh, đặc biệt là các bệnh thoái hóa thần kinh. Các chất có hoạt tính sinh học khác có thể là một phần của chế phẩm tương tự đã bao gồm dược phẩm theo sáng chế, dưới dạng hỗn hợp, trong đó dược phẩm theo sáng chế và chất hoạt tính sinh học khác được trộn lẫn trong hoặc với dung môi và/hoặc chất mang được dùng tương tự hoặc có thể được cung cấp riêng biệt như là một phần của chế phẩm riêng biệt, nó có thể được cung cấp riêng biệt hoặc cùng nhau dưới dạng kit gồm có các phần.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được cung cấp đồng thời với chất hoặc các chất có hoạt tính sinh học, theo cách gián đoạn hoặc liên tục. Ví dụ, dược phẩm theo sáng chế có thể được cung cấp đồng thời với chất có hoạt tính sinh học thứ nhất khác hoặc liên tục sau hoặc trước khi sử dụng dược phẩm, nếu phác đồ sử dụng được chọn, trong đó nhiều hơn một chất có hoạt tính sinh học bổ sung được sử dụng cùng với ít nhất một dược phẩm theo sáng chế, các hợp chất hoặc các chất có thể được cung cấp một phần theo cách đồng thời, một phần theo cách liên tục dưới dạng các tổ hợp khác nhau.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất hỗn hợp của dược phẩm theo sáng chế và, tùy ý, một hoặc nhiều chất có hoạt tính sinh học khác nữa, cũng như tới

các phương pháp sử dụng dược phẩm theo sáng chế, hoặc các hỗn hợp của chúng bao gồm các chế phẩm chứa dược phẩm này hoặc hỗn hợp của dược phẩm để phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh và/hoặc làm giảm bớt các tác động của các bệnh tau, nhóm các bệnh và các rối loạn liên quan đến sự hình thành của các thương tổn sợi thần kinh, bệnh lý não nổi bật trong nhóm các rối loạn thoái hoá thần kinh này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh Alzheimer, bệnh Creutzfeldt-Jacob, sa sút trí tuệ chấn thương não, hội chứng Down, bệnh Gerstmann-Strausser-Scheinker, viêm cơ thể vùi, bệnh mạch máu prion protein amyloid ở não và tổn thương chấn thương não và phức hợp xơ cứng cột bên teo cơ/parkinson-sa sút trí tuệ của Guam, bệnh tế bào thần kinh vận động không phải Guamanian có các mô rối sợi thần kinh, sa sút trí tuệ nhuộm độc bạc màu nhuộm, thoái hoá dưới vỏ não, các mô rối sợi thần kinh lan toả có sự vôi hoá, sa sút trí tuệ trán thái dương với bệnh Parkinson liên kết với nhiễm sắc thể 17, bệnh Hallevorden-Spatz, chứng teo đa hệ, bệnh Niemann-Pick, kiểu C, bệnh Pick, chứng tăng thần kinh đệm dưới vỏ tiến triển, chứng liệt trên nhân tiến triển, viêm não xơ cứng bán cấp, sự sa sút trí tuệ có duy nhất mô rối, hội chứng Parkinson, chứng loạn dưỡng trương cơ lực.

Hỗn hợp theo sáng chế có thể bao gồm, ngoài dược phẩm theo sáng chế, chất có hoạt tính sinh học như, ví dụ, các hợp chất đã biết được sử dụng trong dược phẩm chữa các bệnh tau và/hoặc các chứng thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các bệnh và các rối loạn liên quan đến amyloid hoặc protein tương tự amyloid như dạng protein tinh bột β liên quan đến bệnh Alzheimer.

Theo phương án khác của sáng chế, chất có hoạt tính sinh học hoặc hợp chất khác có thể cũng là tác nhân chữa bệnh mà có thể được sử dụng trong phương pháp điều trị các bệnh và các rối loạn gây ra bởi hoặc liên quan đến amyloid hoặc các protein tương tự amyloid bao gồm chứng thoái hoá dạng tinh bột gây ra bởi amyloid β hoặc có thể được sử dụng trong dược phẩm chữa các rối loạn thần kinh khác.

Chất hoặc hợp chất có hoạt tính sinh học khác có thể thể hiện các tác dụng sinh học của chúng bằng cơ chế tương tự hoặc như nhau làm vaccin chữa bệnh theo sáng chế hoặc bằng cơ chế tác động không liên quan hoặc bằng vô số các cơ chế tác động liên quan và/hoặc không liên quan.

Nói chung, hợp chất có hoạt tính sinh học khác có thể bao gồm các chất tăng cường truyền nơtron, các dược chất tâm lý trị liệu, các chất ức chế axetylcholin esterase, các chất phong bế kênh canxi, các amin có nguồn gốc sinh vật, các thuốc an thần benzodiazepin, chất tổng hợp axetylcholin, các chất tăng cường lưu giữ hoặc giải phóng, các chất chủ vận thụ thể sau synap axetylcholin, các chất ức chế monoamin oxidaza-A hoặc -B, các chất đối kháng thụ thể N-metyl-D-aspartat glutamat, các dược chất chống viêm không steroid, và các chất đối kháng thụ thể tạo serotonin.

Đặc biệt, hỗn hợp theo sáng chế có thể bao gồm ít nhất một hợp chất có hoạt tính sinh học khác được chọn từ nhóm gồm có các hợp chất chống lại áp lực oxy hoá, các hợp chất chống gây chết tế bào, các chất tạo chelat kim loại, các chất ức chế phục hồi ADN như pirenzepin và các chất chuyển hoá, axit 3-amino-1-propansulfonic (3APS), 1,3-propandisulfonat (1.3PDS), các chất hoạt hoá secretaza, các chất ức chế β và γ -secretaza, các protein tau, chất dẫn truyền thần kinh, các chất làm gãy tấm β , các phân tử kháng viêm, hoặc các chất ức chế cholinesteraza (ChEIs) như tacrin, rivastigmin, donepezil, và/hoặc galantamin, và các dược chất khác và các chất bổ sung dinh dưỡng, cùng với vaccin chữa bệnh theo sáng chế và, tùy ý, chất mang và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá dược được dùng.

Theo một phương án khác, các hỗn hợp theo sáng chế có thể bao gồm niacin hoặc memantin cùng với vaccin chữa bệnh theo sáng chế và, tùy ý, chất mang và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá dược được dùng.

Theo một phương án khác nữa của sáng chế, các hỗn hợp được đề xuất bao gồm “các chất chống loạn thần kinh không điển hình” như, ví dụ clozapin,

ziprasidon, risperidon, aripiprazol hoặc olanzapin để điều trị các triệu chứng loạn thần kinh dương tính hoặc âm tính bao gồm ảo giác, ảo tưởng, các rối loạn suy nghĩ (biểu hiện bởi ý nghĩ không mạch lạc đặc trưng, chệch hướng, tiếp xúc hời hợt), và động thái phá rối hoặc kỳ quái, cũng như mất khoái cảm, sự xúc động dịu lại, tính thờ ơ, và sự rút khỏi xã hội, cùng với vacxin chữa bệnh theo sáng chế và, tùy ý, chất mang và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá dược được dụng.

Theo một phương án đặc biệt của sáng chế, các chế phẩm và các hỗn hợp theo sáng chế và như được mô tả trên đây bao gồm được phẩm theo sáng chế và chất có hoạt tính sinh học, tương ứng, với lượng có tác dụng chữa bệnh hoặc phòng bệnh.

Các hợp chất khác mà có thể được sử dụng một cách thích hợp trong các hỗn hợp kết hợp với được phẩm theo sáng chế được mô tả, ví dụ, trong WO 2004/058258 (xem đặc biệt nhất là các trang 18 và 17) bao gồm các đích được chất chữa bệnh (trang 36-39), các axit alkansulfonic và axit alkanolsulfuric (các trang 39-51), các chất ức chế cholinesteraza (các trang 51-56), các chất đối kháng thụ thể NMDA (các trang 56-58), các estrogen (các trang 58-59), các được chất chống viêm không steroid (các trang 60-61), các chất chống oxy hoá (các trang 61-62), các chất chủ vận thụ thể hoạt hoá các chất tăng sinh peroxisom (PPAR) (các trang 63-67), các tác nhân làm giảm cholesterol (các trang 68-75); các chất ức chế amyloid (các trang 75-77), các chất ức chế sự hình thành amyloid (các trang 77-78), các chất càn của kim loại (các trang 78-79), các chất chống loạn thần kinh và chống gây trầm cảm (các trang 80-82), các chất bổ sung dinh dưỡng (các trang 83-89) và các hợp chất làm tăng tính sinh khả dụng của các chất có hoạt tính sinh học ở não (xem các trang 89-93) và các tiền dược chất (các trang 93 và 94), tất cả các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, nhưng đặc biệt là các hợp đã nêu trong các trang chỉ dẫn ở trên.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Các vaccin

Tám trình tự thu được từ phospho protein tau được chỉ định làm kháng nguyên để phát triển vaccin. Peptit gây miễn dịch đã sử dụng trước đó được sử dụng làm đối chứng (Asuni *et al.*, 2007).

Bảng 1: mô tả trình tự Tau

Mô tả	Vacxin	Trình tự
<u>T5</u> : Trình tự điều khiển: Tau 379-408 [pS396, pS404]	ACI-37	RENAKAKTDHGAEIVYKS(p)PWSGDTS(p)PRHL (n = 30) (SEQ ID NO: 1)
<u>T1</u> : Trình tự 1; Tau 5-20 [pY18]	ACI-33	RQEFEVMEDHAGTY(p)GL (n=16) (SEQ ID NO:2)
<u>T8</u> : Trình tự 8: Tau 206-221 [pT212, pS214]	ACI-39	PGSRRT(p)PS(p)LPTPPTR (n=16) (SEQ ID NO:3)
<u>T9</u> : Trình tự 9: Tau 196-211 [pS202, pT205]	ACI-40	GYSSPGS(p)PGT(p)PGSRSR (n = 16) (SEQ ID NO 4)
<u>T3</u> : Trình tự 3: Tau 393-408 [pS396, pS404]	ACI-35	VYKS(p)PWSGDTS(p)PRHL (n = 16) (SEQ ID NO: 5)
<u>T4</u> : Trình tự 4: Tau 401-418 [pS404, pS409]	ACI-36	GDTS(p)PRHLS(p)NVSSTGSID (n = 18) (SEQ ID NO : 6)
<u>T2</u> : Trình tự 2: Tau 200-216 [pS202+ pT205&pT212+pS214]	ACI-34	PGS(p)PGT(p)PGSRRT(p)PS(p)LP (n = 17) (SEQ ID NO:7)
<u>T10</u> : Trình tự 10: Tau 407-418 [pS409]	ACI-42	HLS(p)NVSSTGSID (n = 12) (SEQ ID NO:8)
<u>T11</u> : Trình tự 11: Tau 399-408 [pS404]	ACI-43	VSGDTS(p)PRHL (n = 10) (SEQ ID NO:9)

Ví dụ 2: Điều chế các phospho-peptit được tetrapalmytoyl hoá dẫn xuất từ Tau

Trình tự peptit kháng nguyên nằm bên sườn gần 2 cặp lysin được tập hợp từng bước nhờ tổng hợp peptit pha rắn trên nhựa amit bằng cách sử dụng hoá học Fmoc/tBu chuẩn. Sau đó các nhóm bảo vệ trực giao của các lysin tận cùng được loại bỏ một cách chọn lọc và các nhóm amino tự do được axyl hoá bằng axit plamitic. Quá trình khử bảo vệ các nhóm bảo vệ mạch bên và giải phóng đồng thời peptit khỏi nhựa đạt được trong các điều kiện axit, tạo ra phosphopeptit được tetrapalmytoyl hoá mong muốn dưới dạng sản phẩm thô. Độ đồng nhất và độ tinh khiết được khẳng định hơn nữa bằng phép phân tích phổ khối MALDI-TOF và phân tích HPLC.

Các trình tự của phospho-peptit được tetrapalmytoyl hoá dẫn xuất từ Tau:

T1: H-K(Pal)-K(Pal)- RQEFVMDHAGTY(P)GL-K(Pal)-K(Pal)-NH₂

T2: H-K(Pal)-K(Pal)-PGS(p)PGT(p)PGSRST(p)PS(p)LP-K(Pal)-K (Pal)-NH₂

T3: H-K(Pal)-K(Pal)-VYKS(p)PWSGDT(p)PRHL-K(Pal)-K(Pal)-NH₂

T4: H-K(Pal)-K(Pal)-GDT(p)PRHLS(p)NVSSTGSID-K(Pal)-K(Pal)-NH₂

T8: H-K(Pal)-K(Pal)- PGSRSRT(p)PS(p)LPTPPTR-K(Pal)-K(Pal)-NH₂

T9: H-K(Pal)-K(Pal)-GYSSPGS(p)PGT(p)PGSRSR-K(Pal)-K(Pal)-NH₂

T10: H-K(Pal)-K(Pal)-HLS(p)NVSSTGSID-K(Pal)-K(Pal)-NH₂

T11: H-K(Pal)-K(Pal)-VSGDT(p)PRHL-K(Pal)-K(Pal)-NH₂

2.1: Tổng hợp kháng nguyên peptit T1

Axit amin được bảo vệ trực giao Fmoc-Lys(Mtt)-OH (3 đương lượng) được nạp thủ công vào nhựa amit (nhựa Rink amide MBHA, 1 đương lượng, 0,26 mmol) với sự có mặt của 2 đương lượng DIC/HOBt trong DMF. Sau đó

nhựa được rửa bằng DMF (3 x 1 phút). Sau đó loại nhóm bảo vệ Fmoc đầu tận cùng N bằng piperidin 25% trong DMF (1 x 1 phút và 2 x 15 phút), gốc thứ hai của Fmoc-Lys(Mtt)-OH (3 đương lượng), được tự động kết hợp nhờ sử dụng 5 đương lượng PyBOP/HOBt/DiEA trong DMF (2 x 15 phút). 16 axit amin tiếp theo mang các nhóm bảo vệ mạch bên chuẩn Fmoc được tự động đưa vào nhờ sử dụng phương pháp kết hợp đã mô tả trước đó. Các axit phosphoamin được đưa vào làm monobenzyl este tại nhóm phosphat. Mỗi bước kết hợp tiếp theo là bước rửa bằng DMF (3 x 30 giây), bước loại bỏ Fmoc bằng piperidin 25% trong DMF (3 x 3 phút) và bước rửa thứ hai bằng DMF (6 x 30 giây). Sau khi kết hợp Tyr(PO(OBzl)₂), DBU 0,5% trong DMF được sử dụng cho bước khử bảo vệ Fmoc. Việc tập hợp trình tự peptit được kết thúc bằng cách bổ sung hai Fmoc-Lys(Mtt)-GH cuối nhờ sử dụng 2 đương lượng PyBOP/HOBt/DiEA trong DMF.

Sau đó, các nhóm Mtt của các gốc lysin tận cùng được phân cắt chọn lọc dưới khí nitơ nhờ xử lý nhựa (1 đương lượng, 600 mg, 0,092 mmol) bằng 10 mL hỗn hợp loại khí của TIPS/TFA/DCM (1:1:98) trong một số chu trình 10 phút. Nhựa được rửa bằng DCM (x3) và DMF (x3). Sau đó axit plamitic (20 đương lượng, 473 mg, 1,85 mmol) được kết hợp với các nhóm amino khử bảo vệ đó nhờ sử dụng TBTU (20 đương lượng, 593 mg, 1,85 mmol) và DIEA (40 đương lượng, 643 μ L, 3,70 mmol) trong DCM/DMF (1:1) (6 mL). Nhựa được rửa bằng DCM (x5) và DMF (x5). Sau đó nhóm bảo vệ Fmoc đầu tận cùng N được loại bỏ bằng piperidin loại khí 20% (3 x 10 phút) trong DMF và nhựa được rửa bằng DMF (x3) và DCM (x5). Cuối cùng việc phân cắt nhựa và khử bảo vệ mạch bên đồng thời được tiến hành dưới khí nitơ bằng hỗn hợp loại khí của TFA/TIPS/H₂O/EDT (95:1:2.5:2.5) (4 mL) trong 4,5 giờ. Quá trình nghiền thành bột từ diethyl ete lạnh tạo ra sản phẩm thô T1 dưới dạng chất rắn màu trắng (189 mg, hiệu suất 60%) với độ tinh khiết là 56% (theo phân tích HPLC), phép phân tích phổ khối MALDI-TOF khẳng định độ đồng nhất của sản phẩm chính (m/z theo tính toán: 3427,12 [MH+3, thực tế: 3426,87).

2.2: Tổng hợp kháng nguyên peptit T3

Axit amin được bảo vệ trực giao Fmoc-lys(Mtt)-OH (3 đương lượng) được nạp thủ công vào nhựa amit (nhựa Rink amide MBHA, 1 đương lượng, 0,4 mmol) với sự có mặt của PyBOP/HOBt/DIEA trong DMF. Sau đó nhựa được rửa bằng DMF (3 x 1 phút). Sau khi loại bỏ nhóm Fmoc đầu tận cùng bằng piperidin 25% trong DMF (1 x 1 phút và 2 x 15 phút), gốc thứ hai của Fmoc-Lys(Mtt)-OH (3 đương lượng), được kết hợp nhờ sử dụng các điều kiện nạp giống nhau. 16 axit amin tiếp theo mang các nhóm bảo vệ mạch bên Fmoc chuẩn được thêm thủ công vào nhờ sử dụng phương pháp kết hợp đã mô tả trước đó. Các axit phosphoamin được đưa vào làm các monobenzyl este ở nhóm phosphat. Thời gian kết hợp được xác định bằng thử nghiệm TNBT và thử nghiệm chloranil sau Prolin. Nếu cần, quá trình kết hợp thứ hai được tiến hành với 2 đương lượng Fmoc-axit amin với sự có mặt của DIC/HOBt hoặc HATU/DIEA. Mỗi bước kết hợp tiếp theo là bước rửa bằng DMF (3 x 1 phút). Bước loại bỏ Fmoc bằng piperidin 25% trong DMF (1 x 1 phút và 2 x 15 phút) và bước rửa thứ hai bằng DMF (7 x 1 phút). Sau khi kết hợp Ser(PO(OBzl)OH) thứ nhất, DBU 0,5% trong DMF được sử dụng cho bước khử bảo vệ Fmoc. Việc tập hợp trình tự peptit được kết thúc nhờ bổ sung Fmoc-Lys(Mtt)-OH cuối cùng.

Sau đó, các nhóm Mtt của các gốc lysin tận cùng được phân cắt chọn lọc bằng cách xử lý nhựa (1 đương lượng, 195 mg, 0,01 mmol) với 10 ml TIPS/TFA/DCM (1:1:98) trong vài chu trình 10 phút. Nhựa được rửa bằng DCM (x3) và DMF (x3). Sau đó axit plamitic (20 đương lượng, 51 mg, 0,2 mmol) được kết hợp với các nhóm amino khử bảo vệ đó nhờ sử dụng TBTU (20 đương lượng, 64 mg, 0,2 mmol) và DIEA (40 đương lượng, 70 μ L, 0,4 mmol) trong DCM/DMF (1:1) (2 mL). Nhựa được rửa bằng DCM (x5) và DMF (x5). Sau đó nhóm bảo vệ Fmoc đầu tận cùng N được loại bỏ bằng piperidin 20% trong DMF (3 x 10 phút) và nhựa được rửa bằng DMF (x3) và DCM (x5). Cuối

cùng việc phân cắt nhựa và khử bảo vệ mạch bên đồng thời được tiến hành nhờ sử dụng hỗn hợp của TFA/TIPS/H₂O (95:2,5:2,5) (2 mL) trong 2 giờ. Quá trình nghiền thành bột từ diethyl ete lạnh tạo ra sản phẩm thô T3 dưới dạng chất rắn màu trắng (34 mg, hiệu suất 100%) với độ tinh khiết là 67% (theo phân tích HPLC). Phép phân tích phổ khối MALDI-TOF khẳng định độ đồng nhất của sản phẩm chính (m/z theo tính toán: 3365,15 [MH⁺], thực tế: 3369,66).

2.3: Tổng hợp kháng nguyên peptit T4

Axit amin được bảo vệ trực giao Fmoc-Lys(Mtt)-OH (vượt quá 5 lần) được gắn kết tự động với nhựa Tentagel R RAM amit (0,19mm/g, 750 mg, 0,1425 mmol) nhờ sử dụng DCCI và HOBt làm các chất hoạt hoá trong DMF. Sau khi loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc đầu tận cùng N, gốc thứ hai của Fmoc-Lys(Mtt)-OH (vượt quá 5 lần) được kết hợp với sự có mặt của DCCI và HOBt. 16 axit amin tiếp theo mang các nhóm bảo vệ mạch bên chuẩn được tự động đưa vào nhờ sử dụng các phương pháp kết hợp/khử bảo vệ tương tự. Các axit phosphoamin được đưa vào làm các monobenzyl este tại nhóm phosphat. Các kết hợp kép trong 60 phút được tiến hành đối với tất cả các gốc tiếp theo là bước phủ bằng anhydrit axetic. Việc tập hợp trình tự peptit được kết thúc nhờ bổ sung Fmoc-Lys(Mtt)-OH cuối cùng.

Sau đó, các nhóm Mtt của các gốc lysin được phân cắt chọn lọc nhờ xử lý nhựa (1 đương lượng, 750 mg, 0,075 mmol) bằng 10 mL TIPS/TFA/DCM (1:1:98) trong vài chu trình 10 phút. Nhựa được rửa bằng DCM (x3) và DMF (x3). Sau đó, axit plamitic (20 đương lượng, 51 mg, 0,2 mmol) được kết hợp với các nhóm amino được khử bảo vệ đó nhờ sử dụng (20 đương lượng, 482 mg, 1,5 mmol) và DIEA (40 đương lượng, 536 μ L, 3,0 mmol) trong DCM/DMF (1:1) (7 mL). Nhựa được rửa bằng DCM (x5) và DMF (x5). Sau đó nhóm bảo vệ Fmoc đầu tận cùng N được loại bỏ bằng piperidin 20% trong DMF (3 x 10 phút) và nhựa được rửa bằng DMF (x3) và DCM (x5). Cuối cùng việc phân cắt nhựa và

khử bảo vệ mạch bên đồng thời được tiến hành nhờ sử dụng hỗn hợp của TFA/TIPS/H₂O (95:2,5:2,5) (6 mL) trong 3,5 giờ. Quá trình nghiền thành bột từ diethyl ete lạnh tạo ra sản phẩm thô T4 dưới dạng chất rắn màu trắng (96 mg, hiệu suất 37%) với độ tinh khiết là 50% (theo phân tích HPLC). Phép phân tích phổ khối MALDI-TOF khẳng định độ đồng nhất của sản phẩm chính (m/z theo tính toán: 3455,10 [MH⁺], thực tế: 3456,13).

2.4: Tổng hợp kháng nguyên peptit T8

Axit amin được bảo vệ trực giao Fmoc-Lys(Mtt)-OH (5 đương lượng, 781 mg, 1,25 mmol) được gắn kết thủ công với nhựa Rink amide PEGA (1 đương lượng, 0,33 mmol/g, 758 g) nhờ sử dụng DIPCDI (5 đương lượng, 196 mL, 1,25 mmol) và HOBt (5 đương lượng, 169 mg, 1,25 mmol) trong DMF (5 mL) cho hai kết hợp trong 8 giờ. Sau đó nhựa được rửa bằng DMF (x 5). Sau khi loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc đầu tận cùng N bằng piperidin 20% trong DMF (7 mL x 3 x 5 phút), gốc thứ hai của Fmoc-Lys(Mtt)-OH (10 đương lượng, 1,56 g, 2,5 mmol) được kết hợp với sự có mặt của TBTU (10 đương lượng, 803 mg, 2,5 mmol), HOBt (10 đương lượng, 338 mg, 2,5 mmol) và DIEA (20 đương lượng, 871 mL, 5,0 mmol). 16 axit amin tiếp theo mang các nhóm bảo vệ mạch bên chuẩn được kết hợp thủ công nhờ các chu trình kết hợp/khử bảo vệ/rửa. Cá biệt, các axit phosphoamin được đưa vào làm các monobenzyl este tại nhóm phosphat (10 đương lượng) với TBTU (10 đương lượng), HOBt (5 đương lượng) và DIEA (15 đương lượng) trong DMF. Thời gian kết hợp là 1 giờ được sử dụng trong toàn bộ quá trình tổng hợp. Việc tập hợp trình tự peptit được kết thúc nhờ bổ sung Fmoc-Lys(Mtt)-OH cuối cùng.

Sau đó, các nhóm Mtt của các gốc lysin được phân cắt chọn lọc nhờ xử lý nhựa peptidyl (1 đương lượng, 385 mg, 0,019 mmol) bằng 10 mL TIPS/TFA/DCM (1:1:98) trong vài chu trình 10 phút. Nhựa được rửa bằng DCM (x3) và DMF (x3). Sau đó axit plamitic (20 đương lượng, 968 mg, 3,8

mmol) được kết hợp với các nhóm amino khử bảo vệ đó nhờ sử dụng (20 đương lượng, 1,21 g, 3,8 mmol) và DIEA (40 đương lượng, 1,31 mL, 7,6 mmol) trong DCM/DMF (1:1) (4 mL). Nhựa được rửa bằng DCM (x5) và DMF (x5). Sau đó nhóm bảo vệ Fmoc đầu tận cùng N được loại bỏ bằng piperidin 20% trong DMF (3 x 10 phút) và nhựa được rửa bằng DMF (x3) và DCM (x5). Cuối cùng việc phân cắt nhựa và khử bảo vệ mạch bên đồng thời được tiến hành nhờ sử dụng hỗn hợp của TFA/TIPS/H₂O (95:2,5:2,5) (4 mL) trong 3,5 giờ. Quá trình nghiền thành bột từ diethyl ete lạnh tạo ra sản phẩm thô T8 dưới dạng chất rắn màu trắng (50,2 mg, hiệu suất 10%) với độ tinh khiết là 55% (theo phân tích HPLC). Phép phân tích phổ khối MALDI-TOF khẳng định độ đồng nhất của sản phẩm chính (m/z theo tính toán: 3331,17 [MH⁺], thực tế: 3335,19).

2.5: Tổng hợp kháng nguyên peptit T9

Axit amin được bảo vệ trực giao Fmoc-Lys(Mtt)-OH (3 đương lượng) được nạp thủ công vào nhựa amit (nhựa Rink amide MBHA. 1 đương lượng, 0,4 mmol) với sự có mặt của PyBOP/HOBt/DIEA trong DMF. Sau đó nhựa được rửa bằng DMF (3 x 1 phút). Sau khi loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc đầu tận cùng N bằng piperidin 25% trong DMF (1 x 1 phút và 2 x 15 phút), gốc thứ hai của Fmoc-Lys(Mtt)-OH (3 đương lượng), được kết hợp nhờ sử dụng các điều kiện nạp giống nhau. 16 axit amin tiếp theo mang các nhóm bảo vệ mạch bên Fmoc chuẩn được kết hợp nhờ sử dụng phương pháp kết hợp đã mô tả trước đó. Các axit phosphoamin được đưa vào làm các monobenzyl este tại nhóm phosphat. Thời gian kết hợp được xác định bằng thử nghiệm TNBT hoặc thử nghiệm chloranil sau Prolin. Nếu cần, quá trình kết hợp lần thứ hai được tiến hành với 2 đương lượng Fmoc-axit amin với sự có mặt của DIC/HOBt hoặc HATU/DIEA. Mỗi bước kết hợp tiếp theo là bước rửa bằng DMF (3 x 1 phút). Bước loại bỏ Fmoc bằng piperidin 25% trong DMF (1 x 1 phút và 2 x 15 phút) và bước rửa thứ hai bằng DMF (7 x 1 phút). Sau khi kết hợp Thr(PO(OBzl)OH), DBU 0,5%

trong DMF được sử dụng cho bước khử bảo vệ Fmoc. Việc tập hợp trình tự peptit được kết thúc nhờ bổ sung Fmoc-Lys(Mtt)-OH cuối cùng.

Sau đó, các nhóm Mtt của các gốc lysin được phân cắt chọn lọc nhờ xử lý nhựa (1 đương lượng, 650 mg, 0,156 mmol) bằng 10 mL TIPS/TFA/DCM (1:1:98) trong vài chu trình 10 phút. Sau khi rửa bằng DCM (x3) và DMF (x3), axit plamitic (20 đương lượng, 1,01 g, 3,15 mmol) được kết hợp với các nhóm amino được khử bảo vệ đó nhờ sử dụng (20 đương lượng, 814 mg, 3,15 mmol) và DIEA (40 đương lượng, 1,1 mL, 6,30 mmol) trong DCM/DMF (1:1) (6 mL). Nhựa được rửa kỹ bằng DCM (x5) và DMF (x5). Sau đó nhóm bảo vệ Fmoc đầu tận cùng N được loại bỏ bằng piperidin 20% trong DMF (3 x 10 phút) và nhựa được rửa lại bằng DMF (x3) và DCM (x5). Cuối cùng việc phân cắt nhựa và khử bảo vệ mạch bên đồng thời được tiến hành nhờ sử dụng hỗn hợp của TFA/TIPS/H₂O (95:2,5:2,5) (9 mL) trong 3 giờ. Quá trình nghiền thành bột từ diethyl ete lạnh tạo ra sản phẩm thô T9 dưới dạng chất rắn màu trắng (291 mg, 59% hiệu suất) với độ tinh khiết là 69% (theo phân tích HPLC). Phép phân tích phổ khối MALDI-TOF khẳng định độ đồng nhất của sản phẩm chính (m/z theo tính toán: 3172,98 [MH⁺], thực tế: 3172,90).

2.6: Tổng hợp kháng nguyên peptit T10

Peptit được tetrapalmitoyl hoá T10 được tạo ra theo phương pháp tương tự như đối với T9 (tỷ lệ tổng hợp peptit: 0,25 mmol). Ngoài ra, prolin giả [psi(Gly-Ser)] được sử dụng như cấu trúc sẵn trước trình tự vấn đề Asn-Val-Ser-Ser. Sản phẩm thô T10 thu được dưới dạng chất rắn màu trắng (809 mg, hiệu suất định lượng) với độ tinh khiết là 56% (theo phân tích HPLC). Phép phân tích phổ khối MALDI-TOF khẳng định độ đồng nhất của sản phẩm chính (m/z theo tính toán: 2761,9 [MH⁺], thực tế: 2759,2).

2.7: Tổng hợp kháng nguyên peptit T11

Peptit được tetrapalmitoyl hoá T11 được tạo ra theo phương pháp tương tự như đối với T9 (tỷ lệ tổng hợp peptit: 0,25 mmol). Sản phẩm thô T11 thu được dưới dạng chất rắn màu trắng (495 mg, hiệu suất 76%) với độ tinh khiết là 80% (theo phân tích HPLC). Phép phân tích phổ khối MALDI-TOF khẳng định độ đồng nhất của sản phẩm chính (m/z theo tính toán: 2613,8 [MH⁺], thực tế: 2612,2).

Ví dụ 3: Bào chế vaccin (Quy trình A)

Phosphopeptit được tetrapalmitoyl hoá dẫn xuất từ Tau được đem cân (xem bảng 2 dưới đây về số lượng), và đặt vào bình thủy tinh đáy tròn dung tích 250 ml. Sau đó, Dimyristoyl phosphatidylcholin (DMPC), Dimyristoyl phosphatidylglycerol (DMPG), Cholesterol và Monophosphoryl Lipit A phụ trợ (all Avanti Polar Lipids inc. AL, USA) được đem cân và thêm vào với tỷ số mol là 9:1:7:0,2 tương ứng. Sau đó, Clorofom được thêm vào để tạo ra dung dịch trong với các hạt mịn. Sau khi khuấy nhẹ trong 15 phút, dung môi hữu cơ được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm ở 40°C và sau đó trong chân không trong 3 giờ. Màng mỏng thu được được hydrat hoá lại bằng cách bổ sung PBS tiệt trùng trong vỏ bọc dạng tấm và khuấy nhẹ ở nhiệt độ trong phòng trong 18 giờ. Tỷ số mol peptit/phospholipit cuối cùng là 1:100. Sau đó huyền phù liposom được chia vào các ống falcon tiệt trùng dung tích 15 ml (5 ml sản phẩm/ống) trước khi giữ ở 2-8°C. Nồng độ peptit cuối cùng là 40 µM.

Ví dụ 4: Mô tả các vaccin Tau liposom

4.1. Các phương pháp

4.1.1 Xác định số lượng peptit, DMPC và cholesterol bằng HPLC

Để phân tích về các vaccin tau liposom (ACI-33, ACI-35, ACI-36, ACI-39, ACI-40 và ACI-41 tất cả đã được điều chế theo quy trình A được thể hiện trong Ví dụ 3), các mẫu được điều chế bằng cách bổ sung nước (20 µl) vào mẫu

vacxin (20 μ l) trong lọ thuỷ tinh HPLC, tiếp theo là isopropanol (140 μ l) và TFA (20 μ l). Mẫu pha loãng gấp 5 lần được tạo xoáy trong thời gian ngắn trước khi tiêm (20 μ l). Phân tích được tiến hành nhờ sử dụng cột đảo pha Zorbax 300SB-B3 C3 (250 x 4,6mm, 5 μ m, 300Å, Agilent) điều khiển nhiệt tới 75°C, trong khi dò ở 207 và 214 nm. Các dung môi rửa giải là như sau: dung môi B, 95% isopropanol, 5% Nước, 0,1% TFA; dung môi A, 10% Axetonitril, 90% Nước, 0,1% TFA. Gradient từ 40% B đến 60% B được áp dụng trong 20 phút với tốc độ chảy là 1 ml/phút. Các mức chuẩn của các peptit tau (T1, T3, T4, T8 và T9) và DMPC/Cholesterol được sử dụng riêng biệt với các nồng độ khác nhau cho các mục đích kiểm chuẩn. Đối với các peptit tau, dung dịch gốc chứa 1 mg/ml trong TFA/iPrOH/H₂O (1:7:2) được điều chế và pha loãng theo bậc (1:1) từ 400 μ g/ml tới 12,5 μ g/ml. Đối với các lipid, dung dịch gốc chứa 8,0 mg/ml DMPC và 3,5 mg/ml Cholesterol trong 70% isopropanol và 30% nước và được pha loãng (1:5), (1:10) và (1:50) với hỗn hợp tương tự.

4.1.2 Xác định số lượng MPLA bằng HPLC

MPLA trong vacxin tau liposom được xác định số lượng bằng HPLC trong khi dò UV tiếp theo là tạo dẫn xuất của chất phụ trợ bằng nhóm mang màu hoạt hoá UV 3,5-Dinitrobenzyloxyamin (DNBA). Một cách vắn tắt, 20 μ l các cấu trúc tau liposom được thêm vào dung dịch chứa DNBA trong pyridin (10 mg/ml, thể tích tổng 100 μ l), gia nhiệt ở 60°C trong 3 giờ và sau đó pyridin được loại bỏ bằng cách làm bay hơi. Hạt thu được được hoà tan lại trong Clorofom/metanol (2:1, thể tích/thể tích) để phân tích HPLC. MPLA (Avanti Polar Lipids) được sử dụng cho các mục đích kiểm chuẩn với bốn nồng độ khác nhau và được tạo dẫn xuất và phân tích như đối với các cấu trúc tau liposom. Phân tích HPLC được tiến hành nhờ sử dụng cột đảo pha Agilent XDB-C18 (250x4,6 mm, 120 Å, 5 μ), điều chỉnh nhiệt độ tới 50°C, trong khi dò ở 254 nm. Các dung môi rửa giải là như sau: dung môi A, 95% Axetonitril, 5% nước, 4,8

mM axit phosphoric; dung môi B, 95% Isopropanol, 5% Nước, 4,8 mM axit phosphoric. Gradient từ 10% B đến 70% B được ứng dụng trong 30 phút với tốc độ chảy là 1 ml/phút.

4.1.3 Điện thế của bề mặt liposom

Các mẫu cấu trúc tau liposom được pha loãng 100 lần bằng PBS. Phân tích được tiến hành nhờ sử dụng Zetasizer Nano (Malvern, USA) ở 25°C. Khoảng thời gian đo và việc lựa chọn điện áp được tiến hành theo dạng tự động, với điện áp ứng dụng thông thường là 50 mV. Dữ liệu được biến đổi bằng phương trình Smoluchowski tự động nhờ sử dụng phần mềm DTS 5.0 (Malvern) để tính toán thế zeta. Đối với các cấu trúc tau liposom bao gồm hỗn hợp của DMPC/DMPG/ Cholesterol/MPLA với tỷ số mol bằng 9:1:7:0,2; điện tích tổng là số âm.

4.1.4 Phân tích cấu hình bằng tính lưỡng hướng sắc vòng

Các cấu trúc tau liposom được pha loãng (1:1) với PBS để tạo ra nồng độ peptit cuối cùng là 18 μM . Các liposom với chế phẩm đồng nhất nhưng không có peptit tau được sử dụng làm dung dịch trắng cho phép trừ chuẩn. Phổ CD thu được bằng phổ phân cực kế Jasco-815 với ống thạch anh có độ dài đường dẫn là 0,1 cm (Hellma, Germany) ở 23°C. Các số đo được đánh giá ở giới hạn độ dài bước sóng 195-250 nm với băng tần 1,0 nm và độ phân giải 0,5 nm. Tốc độ quét là 50 nm/phút với thời gian đáp ứng là 1 giây được sử dụng. Phổ trắng (từ 8 lần quét) được tính trung bình và lấy giá trị trung bình của 8 lần quét mỗi phổ mẫu trừ đi. Phổ thu được ($[\theta]_{\text{obs}}$, các mức) là bằng phẳng sau khi được biến đổi thành tính elip phân tử gam trung bình gốc ($[\theta]$, các mức $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) với phương trình $[\theta] = ([\theta]_{\text{obs}} \times (\text{MRW}/10lc))$, trong đó MRW là phân tử lượng trung bình gốc ($\text{MW}/\text{số các gốc}$), l là độ dài quang trình (cm) và c là nồng độ (g/cm^3).

4.1.5 Thử nghiệm huỳnh quang ThT

Các số đo huỳnh quang ThT đạt được nhờ đầu đọc vi đĩa vô cực M200 (Tecan Group Ltd, Switzerland). Để làm phương pháp chung, các cấu trúc tau liposom được pha loãng tới các nồng độ khác nhau với PBS (Bảng 2). Các liposom của chế phẩm tương tự nhưng thiếu peptit tau được pha loãng tương tự được sử dụng làm đối chứng âm tính (mẻ ACI-35-081015-B). Thêm ThT (2 μ l, 1,2 mM trong nước) vào 98 μ l của từng vacxin hoặc dung dịch trắng để tạo ra nồng độ cuối cùng là 24 μ M. Sau khi tạo xoáy ngắn, phần nhỏ từ mỗi mẫu (70 μ l) được thêm vào đĩa vi chuẩn độ Perkin Elmer 384 giếng chắn sáng đen và sự phát huỳnh quang được đo ở 485 nm sau 30 phút nhờ kích thích ở 440 nm. Độ rộng dải kích thích là 9 nm và độ rộng dải phát xạ là 20 nm. γ -cyclodextrin được sử dụng làm đối chứng trong. Các dung dịch pha loãng gấp hai lần theo bậc trong PBS được tạo thành từ 640 mM dung dịch gốc trong PBS để thu được 320, 160, và 80 mM dung dịch đối chứng γ -cyclodextrin.

Bảng 2: các mẫu được điều chế cho thử nghiệm ThT

Peptit	Vacxin	Mẻ	Mức pha loãng	Peptit đặc (µg/ml)
T1	ACI-33	ACI-33-081031-A	2 lần	23
		ACI-33-081031-A	3 lần	15
		ACI-33-081031-A	4 lần	7,7
		ACI-33-081031-A	12 lần	3,8
T3	ACI-35	ACI-35-081015-A	2 lần	39
		ACI-35-081015-A	3 lần	26
		ACI-35-081015-A	4 lần	20
		ACI-35-081015-A	12 lần	5
T4	ACI-36	ACI-36-081110-A	2 lần	16,5
		ACI-36-081110-A	3 lần	11
		ACI-36-081110-A	4 lần	8,3
		ACI-36-081110-A	12 lần	2,1
T8	ACI-39	ACI-39-090202-A	2 lần	24
		ACI-39-090202-A	3 lần	16
		ACI-39-090202-A	4 lần	12
		ACI-39-090202-A	12 lần	4
T9	ACI-40	ACI-40-090202-A	2 lần	30
		ACI-40-090202-A	3 lần	20
		ACI-40-090202-A	4 lần	15
		ACS-40-090202-A	12 lần	5
T8+T9	ACI-41	ACI-41-081204-A	2 lần	11,5
		ACI-41-081204-A	3 lần	7,7
		ACI-41-081204-A	4 lần	5,8
		ACI-41-081204-A	12 lần	1,9
Đối chứng âm tính	Đối chứng âm tính	ACI-35-081015-B	2 lần	n/a
		ACI-35-081015-B	3 lần	n/a
		ACI-35-081015-B	4 lần	n/a
		ACI-35-081015-B	12 lần	n/a

4.2. Các kết quả

4.2.1 Xác định số lượng peptit, DMPC và cholesterol bằng HPLC

Biểu đồ sắc ký HPLC ở độ dài bước sóng dò là 207 nm thu được do tiêm các mẫu vaccin thể hiện sự có mặt của peptit tau, DMPC và cholesterol (xem bảng 4). Từ các đường cong chuẩn được xác định nhờ các tiêu chuẩn, số lượng của từng thành phần trong vaccin được tính toán. Hàm lượng peptit tau, DMPC và cholesterol được phát hiện trong các huyền phù tau liposom gần với các giá trị đích.

4.2.1 Xác định số lượng MPLA bằng HPLC

Biểu đồ sắc ký HPLC ở độ dài bước sóng dò là 254 nm thu được do tiêm mẫu vaccin dẫn xuất từ DNBA thể hiện sự có mặt của MPLA đánh dấu (xem bảng 4). Nhờ sử dụng đường cong chuẩn thu được nhờ các tiêu chuẩn, hàm lượng MPLA trong các vaccin tau liposom được tính toán. Hàm lượng MPLA đã phát hiện trong các huyền phù tau liposom gần với các giá trị đích.

4.2.3 Điện thế bề mặt liposom

Thế zeta đã đo của các vaccin tau liposom được thể hiện trong bảng 4.

4.2.4 Phân tích cấu hình về peptit tau trong các vaccin liposom bằng CP

Cấu hình của các vaccin tau liposom theo mô tả trước đó được xác định bằng tính lưỡng hướng sắc vòng. Các kết quả được thể hiện trong bảng 3.

4.2.4 Thử nghiệm ThT của peptit tau trong các vaccin liposom

Các tình trạng kết tụ của các peptit tau trong các vaccin liposom (được điều chế bằng quy trình A mô tả ở trên) được xác định bằng thử nghiệm đo huỳnh quang được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 3: Tóm tắt về các đặc tính của vacxin

Vacxin	Thành phần	Thời gian duy trì	Giá trị đích ($\mu\text{g/ml}$)	Kết quả ($\mu\text{g/ml}$)	Điện thế bề mặt liposom (mV)	Tính lưỡng hướng sắc vòng của cấu hình	Thử nghiệm ThT (kết tụ peptit) tín hiệu huỳnh quang
ACI-33	Peptit T1	19,3 phút	130	46	-18,7	Cấu hình kết hợp tấm beta và vòng xoắn beta	Kết tụ
	Cholesterol	11,2 phút	1027	923			
	DMPC	10,0 phút	2314	2463			
	DMPG	Nd	261	nd			
	MPLA	39,8 phút	135	62			
ACI-35	Peptit T3	19,5 phút	130	78	-19,2	Cấu hình vòng xoắn ngẫu nhiên	Không kết tụ
	Cholesterol	11,6 phút	1046	1438			
	DMPC	10,3 phút	2357	nd			
	DMPG	nd	266	nd			
	MPLA	29,7 phút	135	124			
ACI-36	Peptit T4	20,3 phút	130	33	-17,8	Cấu hình vòng xoắn ngẫu nhiên với một vài đóng góp tấm beta	Kết tụ
	Cholesterol	11,2 phút	1018	1387			
	DMPC	10,0 phút	2296	nd			
	DMPG	nd	259	nd			
	MPLA	29,7 phút	135	83			
ACI-39	Peptit T8	19,3 phút	130	48	-16,8	Cấu hình tấm beta	Không kết tụ
	Cholesterol	11,8 phút	1056	1906			
	DMPC	10,5 phút	2381	4316			

	DMPG	nd	269	Nd			
	MPLA	30,9 phút	135	144			
ACI-40	Peptit T9	21,0 phút	130	60	-14,7	Cấu hình vòng xoắn ngẫu nhiên	Không kết tụ
	Cholesterol	11,8 phút	1109	1655			
	DMPC	10,5 phút	2500	2894			
	DMPG	nd	269	nd			
	MPLA	30,9 phút	135	122			
ACI-41	Peptit T8+T9	18,3 phút + 19,9 phút	65+65	23+34	-17,3	Hỗn hợp của cấu hình vòng xoắn ngẫu nhiên và tấm beta	Không kết tụ
	Cholesterol	11,2 phút	1109	34			
	DMPC	9,9 phút	2500	1574			
	DMPG	nd	282	3829			
	MPLA	30,9 phút	135	80			

Ví dụ 5: Tính sinh miễn dịch của các kháng nguyên Tau được Palmitoyl hoá ở chuột Tau-/- KO và kiểu đại

5.1 Các phương pháp

5.1.1 Chuột bất hoạt (knock out) bằng Tau (TKQ)

Việc bất hoạt (knock out) bằng gen *tau* đạt được nhờ sử dụng vector đích được xen vào ADN bổ trợ EGFP (Enhanced Green Fluorescent protein) trong exon 1 của gen trong khung với codon khởi đầu nội sinh. Quá trình này tạo ra protein dung hợp với 31 aa thứ nhất của tau, tiếp theo là EGFP (được mô tả bởi Tucker KL. et al., *Nature Neuroscience*, 2001). Việc làm khuyết đoạn gen được khẳng định bằng phép thẩm tách Western các dịch tan não toàn phần. Các mức

protein tau nhờ sử dụng một vài kháng thể kháng tau chứng tỏ rằng tất cả các isoform tau không có trong đột biến đồng hợp tử, giảm 50% trong đột biến dị hợp tử. Quá trình đột biến được duy trì nhờ dữ liệu cơ bản C57BL/6.

5.1.2 Bào chế vaccin

Các vaccin được bào chế bằng quy trình A đã mô tả trong Ví dụ 3.

5.1.3 Gây miễn dịch

Chuột C57BL/6 hoặc Tau-/-KO (TKO) được tiêm vào trong màng bụng vaccin (ACI-33, ACI-35, ACI-36 và CI-41) vào ba thời điểm (Sơ đồ 1) (Bảng 4).

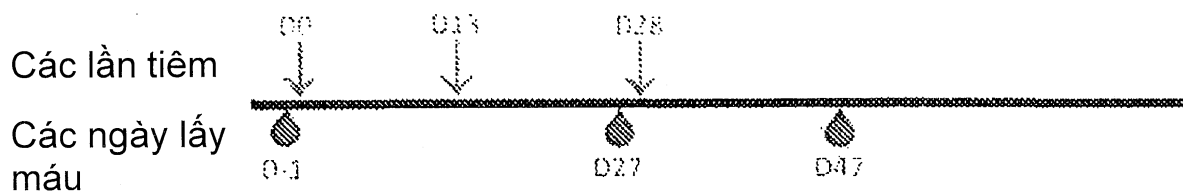
Để gây miễn dịch ACI-33, ACI-35, ACI-36 và ACI-41, ba lần gây miễn dịch được tiến hành cách nhau 2 tuần (ngày (d)0, d13, d28) theo Sơ đồ 1. 1 ngày (d-1) trước các lần gây miễn dịch thứ nhất tiếp theo sau các lần gây miễn dịch thứ hai (d27) và thứ ba (d47) các mẫu máu được thu gom và huyết thanh được bào chế. Huyết thanh được bào chế bằng cách để cho các mẫu máu đông cục qua đêm sau đó lấy phần dịch nổi sau khi ly tâm. Các chuẩn độ kháng thể IgM và IgG đặc hiệu Tau phosphopeptit và các mẫu isotyp IgG được xác định bằng ELISA. Để làm đối chứng, các chuẩn độ kháng thể IgG đặc hiệu không peptit pTau cũng được xác định bằng ELISA.

Bảng 4: Gây miễn dịch cho chuột

Nhóm	Chuột	Tháng tuổi	Số con và giới tính	Điều trị/ thể tích ^a	Mề vaccin	Cách sử dụng	Mức liều Hàm lượng của peptit ug/liều ^c	Hàm lượng của MPLA ug/liều ^c
ACI-33 (peptit T1)	WT	6	3♀ 3♂	ACI-33 0,2 ml	ACI-33-081031-A	i.p.	9	12
	KO	4-5	3♀ 3♂	ACI-33 0,2 ml	ACI-33-081031-A	i.p.	9	12
ACI-35 (peptit T3)	WT	6	3♀ 3♂	ACI-35 0,2 ml	ACI-35-081015-A	i.p.	16	23
	KO	6-8	3♀ 3♂	ACI-35 0,2 ml	ACI-35-081015-A	i.p.	16	23
ACI-36 (peptit T4)	WT	6	3♀ 3♂	ACI-36 0,2 ml	ACI-36-081110-A	i.p.	7	13
	KO	4	3♀ 3♂	ACI-36 0,2 ml	ACI-36-081110-A	i.p.	7	13
ACI-41 (các peptit T8+T9)	WT	7	3♀ 3♂	ACI-41 0,2 ml	ACI-41 - 081204-A	i.p.	5	7
	KO	4	3♀ 3♂	ACI-41 0,2 ml	ACI-41 - 081204-A	i.p.	5	7

^a: thể tích theo lý thuyết^b: i.p: trong màng bụng^c: Hàm lượng đã đo được xác định sau phân tích

Sơ đồ 1: chương trình của các lần gây miễn dịch và lấy máu đối với ACI-33, ACI-35, ACI-36 và CI-41



5.1.4 Xác định số lượng các kháng thể đặc hiệu peptit tau

Các kháng thể đặc hiệu IgG đối với các peptit ptau được xác định bằng ELISA trong 3 mẫu lấy huyết thanh. IgG đặc hiệu peptit tau được xác định trong huyết thanh từ d-1 đến d47. Các kháng thể isotyp IgM và IgG đặc hiệu các peptit pTau được xác định bằng ELISA trong mẫu lấy huyết thanh d47. Các đĩa được phủ bằng 10 ug/ml peptit tau tương ứng qua đêm ở 4°C. Sau khi rửa mỗi giếng bằng PBS-0,05% Tween 20 và phong bế bằng 1% BSA trong PBS-0,05% Tween 20, các dung dịch huyết thanh pha loãng theo bậc được thêm vào các đĩa và ủ ở 37°C trong 2 giờ. Sau khi rửa, các đĩa được ủ bằng kháng thể toàn phần kháng IgG chuột tiếp hợp với phosphatase kiềm (AP) (Jackson Laboratories, Baltimore, PA, USA) hoặc các kháng thể đặc hiệu isotyp (IgM kháng chuột tiếp hợp với peroxidaza cây cải ngựa (HRP), IgG1 kháng chuột tiếp hợp với AP, IgG2a và IgG3 kháng chuột tiếp hợp với biotin, do Pharmingen BD, San Diego, CA, USA cung cấp và IgG2b kháng chuột tiếp hợp với HRP do Zymed Laboratories, San Francisco, CA cung cấp) trong 2 giờ ở 37°C. Sau khi rửa, các đĩa được ủ bằng pNPP (para-nitro-phenyl-phosphat), chất nền phosphatase đối với AP, hoặc ABTS (2,2'-azino-bis(axit 3-etylbenzthiazolin-6-sulphonic)), chất nền đối với HRP và đọc ở 405 nm nhờ sử dụng đầu đọc đĩa ELISA. Bước bổ sung được tiến hành cho các kháng thể tiếp hợp biotin trong đó các đĩa được ủ trong 45 phút trong streptavidin-HRP (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) trước khi phát hiện nhờ sử dụng ABTS. Các kết quả được biểu hiện là O.D. (mật

độ quang học) ở lần pha loãng thứ nhất và pha loãng không bão hoà cho IgG và ở O.D. không bão hoà cho các isotyp IgG và IgM.

5.1.5 Gắn kết của các kháng thể kháng Tau với các mớ rối Tau trên các lát cắt não từ động vật chuyển gen (TAUPIR)

Việc gắn kết của các kháng thể có mặt trong huyết thanh của động vật đã được tiêm chủng với các mớ rối trên các lát cắt não được tiến hành bằng hoá học mô miễn dịch TAUPIR.

Các lát cắt não đã sử dụng từ động vật chuyển gen Tau P301L (TPLH: isoform dài nhất (441 aa) của người có Tau với đột biến P301L) ở giai đoạn cuối và từ chuột biGT chuyển gen hai lần già (>15 tháng) (chuột chuyển gen GSK-3 lai chéo với chuột TPLH).

Các lát cắt não được rửa trong 5 phút trong PBS tiếp theo được ủ trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng trong 1,5% H₂O₂ trong PBS.MeOH (1:1) để phong bế peroxidaza nội sinh. Sau khi rửa các lát cắt 3 lần trong PBST (PBS/0,1% TritonX100) chúng được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng trong PBST+dung dịch phong bế FCS 10% (huyết thanh thai bò). Quá trình ủ với huyết thanh chứa các kháng thể kháng Tau được tiến hành qua đêm ở 4°C. Huyết thanh được pha loãng trong PBST/10% FCS nhờ một vài tỷ lệ pha loãng khác nhau từ 1/2.500 đến 1/10.000. Các lát cắt được rửa 3 lần trong PBST trước khi ủ với kháng thể thứ cấp để kháng chuột tiếp hợp với HRP trong PBST/10% FCS (do Dako, Glostrup, Denmark cung cấp) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Trước khi phát hiện, các lát cắt được rửa 3 lần bằng PBST và ủ trong 50 mM Tris/HCl pH7,6 trong 5 phút. Quá trình dò tìm được tiến hành nhờ ủ các lát cắt trong 3 phút trong Diaminobenzidin (DAB: 1 viên trong 10 ml 50 mM Tris.HCl + 3 ul H₂O₂ 30%) (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). Các phản ứng được hãm bằng cách rửa các lát cắt 3 lần trong PBST. Sau đó các lát cắt được chuyển lên các đĩa thuỷ tinh silan hoá và làm khô bằng không khí trên đĩa ẩm ở

50°C trong 2 giờ. Việc nhuộm màu ngược được tiến hành nhờ ủ với Mayers hematoxylin (Fluka Chemie, Buchs, Switzerland) trong 1 phút tiếp theo là bước rửa trong 4 phút trong nước máy đang chảy. Các lát cắt được khử hydrat hoá bằng cách chuyển qua bể etanol 50%, 70%, 90% và hai lần 100% sau đó trong Xylol trong 2 lần 1 phút. Cuối cùng các lát cắt được làm tiêu bản bằng DePeX (BDH Chemicals Ltd., Poole, England) dưới các lá kính dày thuỷ tinh.

5.1.6 Phép thâm tách Western (WB)

Việc gắn kết các kháng thể có mặt trong huyết thanh của động vật đã tiêm chủng với pTau trong chất chiết não của động vật chuyển gen được tiến hành bằng WB.

Quá trình đồng nhất hoá não chuột bất hoạt (TKO) bằng FVB, TPLH, biGT và Tau kiểu dại được tiến hành trong chất đệm dưới đây: 25 mM Tris/HCl pH7,6, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 30 mM NaF, 0,2 mM Na₃VO₄, 1 nM axit Okadaic, 1 mM phenylmethylsulfonyl florua (PMSF), 5 mM Na₄P₂O₇, 1 viên hỗn hợp chất ức chế proteaza hoàn chỉnh (CPIC) trong toàn bộ 12 ml. Để thu được dịch não đồng nhất toàn bộ, não được làm đồng nhất trên đá với 1 thể tích/khối lượng bán cầu não (ml/g) bằng (ống thuỷ tinh/chày teflon) tương tự potter được dẫn động bằng động cơ với tốc độ 700 vòng phút.

Dịch não đồng nhất toàn bộ được pha loãng một nửa trong chất đệm mẫu (125 mM Tris/HCl pH6,8, 4% (khối lượng/thể tích) natri dodexyl sulfat (SDS), 20% glyxerol, 0,01% xanh bromophenol) + 5% beta-mercapto-etanol, sau đó gia nhiệt nhanh tới 95°C. Các mẫu được giữ 5 phút, pha loãng ¼ trong chất đệm mẫu, gia nhiệt lại tới 95°C sau đó làm lạnh xuống và quay với vận tốc 14000 vòng phút trong 5 phút thành các mảnh vụn sạch không tan được. Các dịch nổi được thu gom và nạp vào gel SDS-PAGE. Việc chuyển hoá với màng nitroxenluloza (Hybond-ECL) được tiến hành trong chất đệm trao đổi (25 mM Tris pH 8,6, 190 mM Glyxin, 20% metanol). Màng được chuyển thành dung

dịch phong bế (0,1% Tween trong TBS (50 mM Tris.HCl, pH7,6, 150 mM NaCl) + bột sữa 5%) trước khi ủ qua đêm ở 4°C với huyết thanh chuột pha loãng trong dung dịch phong bế. Quá trình ủ với kháng thể thứ cấp dê kháng thỏ tiếp hợp với HRP (Dako, Glostrup, Denmark) pha loãng 1/10.000 trong dung dịch phong bế được tiến hành ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Quá trình dò tìm được tiến hành nhờ sử dụng các chất phản ứng dò tìm thâm tách Western ECl của GE Healthcare.

5.2. Các kết quả

5.2.1 Tính đặc hiệu của kháng thể từ huyết thanh của chuột đã tiêm chủng

Huyết thanh của chuột đã tiêm chủng được thử nghiệm về tính đặc hiệu của các kháng thể của chúng trong thử nghiệm ELISA chống lại cả pTau và Tau peptit, các mô rối tau trong TAUIR và pTau trong phép thâm tách Western.

Vacxin ACI-33 kích thích đáp ứng IgG kháng Tau5-20 [pY18] sau khi tiêm vào trong màng bụng. Sau 2 lần gây miễn dịch (d27), đáp ứng IgG vẫn giữ được trạng thái ổn định không tăng với lần gây miễn dịch thứ ba (d47) (Fig.1a: chuột WT, 1-way Anova $P < 0,05$ d-1 so với d27, $P_{0,001}$ d-1 so với d47 và Fig.1b: Chuột TKO, 1-way Anova $P < 0,001$ d-1 so với d27/47).

Vacxin ACI-35 kích thích đáp ứng IgG kháng Tau393-408 [pS396/pS404] mạnh sau khi tiêm vào trong màng bụng. Sau 2 lần gây miễn dịch (d28), đáp ứng IgG vẫn giữ được trạng thái ổn định không tăng với lần gây miễn dịch thứ ba (d42) và không giảm ở các lần lấy máu trước, giữa và sau khi chủng củng cố (Fig.2a: chuột WT: 1-way Anova $P < 0,0001$ d-1 so với d28/42/98/126 và Fig.2b: chuột TKO: 1-way Anova $P < 0,0001$ d-1 so với d28/42/98/126).).

Vacxin ACI-36 kích thích đáp ứng IgG Tau401-418 [pS404/S409] sau khi tiêm vào trong màng bụng. Sau 2 lần gây miễn dịch (d27), đáp ứng IgG vẫn giữ

được trạng thái ổn định không tăng với lần gây miễn dịch thứ ba (d47) (Fig.3a: chuột WT: 1-way Anova $P < 0,001$ d-1 so với d27, $P < 0,0001$ d-1 so với d47 và (Fig.3b: chuột TKO: 1-way Anova $P < 0,0001$ d-1 so với d27/47).

Vacxin ACI-41 kích thích đáp ứng IgG mạnh sau khi tiêm vào trong màng bụng đối với cả hai peptit Tau206-221 [pT212/pS214] và Tau196-211 [pS202/pT205]. Sau 2 lần gây miễn dịch (d34), đáp ứng IgG vẫn giữ ổn định (d48) không tăng sau lần gây miễn dịch thứ ba (d48) (Fig.4a: chuột WT, kháng Tau206-221 [pT212/pS214]-IgG, 1-way Anova $P < 0,0001$ d-1 so với d34/48) (Fig.4b: chuột WT, kháng Tau196-211 [pS202/pT205]-IgG, 1-way Anova $P < 0,0001$ d-1 so với d34/48). (Fig.4c: chuột TKO, kháng Tau206-221 [pT212/pS214]-IgG, 1-way Anova $P < 0,0001$ d-1 so với d34/48) (Fig.4d: chuột TKO, kháng Tau196-211 [pS202/pT205]-IgG, 1-way Anova $P < 0,0001$ d-1 so với d34/48).

Huyết thanh của chuột đã tiêm chủng được kiểm tra thêm về tính đặc hiệu của các kháng thể kháng tau trong TAUPIR hoá học mô miễn dịch và phép thấm tách Western. Dữ liệu của tất cả các cấu trúc liposom và đối với mỗi mô hình chuột được tóm tắt trong bảng 5 dưới đây.

Bảng 5: Bản tóm tắt về tính đặc hiệu kháng thể của chuột đã tiêm chủng

Vacxin	Chuột	ELISA (dương tính/tổng số chuột)	TAUPIR (dương tính/ tổng số chuột)	Phép thấm tách Western (dương tính/ tổng số chuột)
ACI-33	WT	4/6	2/6	1/6
	KO	5/6	2/6	2/6
ACI-35	WT	5/6; 1+	5/6 ; 1+	5/6 ; 1+
	KO	6/6	3/6	6/6

ACI-36	WT	5/6	4/6	1/6
	KO	5/6; 1+	3/6 ; 1+	1/6 ; 1+
ACI-41	WT	6/6	4/6	4/6
	KO	6/6	1/6	3/6

5.2.2 Phân tích về đáp ứng isotyp của chuột đã gây miễn dịch kiểu đại C57BL/6 và Tau-/- KO (TKO)

ACI-33

Vacxin ACI-33 kích thích ở các độ chuẩn kháng thể chuột WT đối với tất cả các isotyp IgG2a, 2b và 3 cũng như IgM sau 3 lần gây miễn dịch bằng cách tiêm vào trong màng bụng (Fig.5a: chuột WT). Hầu như không có IgG1 và có sự khác biệt đáng kể giữa IgG1 và IgG2b và 3 (Fig.5a: chuột WT; 1-way Anova $P < 0,05$ IgG1 so với IgG3 , $P < 0,001$ IgG1 so với IgG2b). Vacxin ACI-33 kích thích ở các độ chuẩn kháng thể chuột TKO đối với tất cả các isotyp IgG2a, 2b và 3 cũng như IgM sau 3 lần gây miễn dịch bằng cách tiêm vào trong màng bụng (Fig.5b; Chuột TKO). Hầu như không có IgG1 với sự khác biệt đáng kể giữa nhóm phụ này và các isotyp IgG khác (Fig.5b, 1-way Anova $P < 0,05$ IgG1 so với IgG2a/IgG3 , $P < 0,001$ IgG1 so với IgG2b).

ACI-35

Vacxin ACI-35 kích thích ở các độ chuẩn kháng thể chuột WT cao đối với tất cả các isotyp IgG cũng như IgM sau 3 lần gây miễn dịch bằng cách tiêm vào trong màng bụng (Fig.6a; chuột WT). Khác biệt đáng kể duy nhất là đáp ứng IgM cao hơn so với IgG3 (Fig.6a; chuột WT, 1-way Anova $P < 0,05$ IgM so với IgG3).

ACI-35 vacxin kích thích ở các độ chuẩn kháng thể cao ở chuột TKO đối với tất cả các isotyp IgG cũng như IgM sau 3 lần gây miễn dịch bằng cách tiêm vào trong màng bụng (Fig.6b; chuột TKO).

ACI-36

Vacxin ACI-36 kích thích ở các độ chuẩn kháng thể chuột WT đối với các isotyp IgG cũng như IgM sau 3 lần gây miễn dịch bằng cách tiêm vào trong màng bụng (Fig.7a; chuột WT).

Vacxin ACI-36 kích thích ở các độ chuẩn kháng thể chuột TKO đối với tất cả các isotyp IgG cũng như IgM sau 3 lần gây miễn dịch bằng cách tiêm vào trong màng bụng (Fig.7b; chuột TKO). Có mức IgG2b cao hơn đáng kể theo thống kê so với IgG1 (Fig.7b; chuột TKO, 1-way Anova $P < 0,05$ IgG2b so với IgG1).

ACI-41

Vacxin ACI-41 kích thích ở các độ chuẩn kháng thể chuột WT kháng Tau196-211 [pS202/pT205] mạnh đối với tất cả các isotyp IgG cũng như IgM sau 3 lần gây miễn dịch bằng cách tiêm vào trong màng bụng (Fig.8a; chuột WT).

Vacxin ACI-41 kích thích ở các độ chuẩn kháng thể chuột TKO kháng Tau196-211 [pS202/pT205] mạnh đối với tất cả các isotyp IgG cũng như IgM sau 3 lần gây miễn dịch bằng cách tiêm vào trong màng bụng (Fig.8b; chuột TKO).

5.3. Kết luận

Tau vacxin kích thích các độ chuẩn IgG ở toàn bộ chuột. Có đáp ứng kháng thể IgG1 thấp so với IgG2b và IgG3 ở chuột đã gây miễn dịch bằng ACI-

33. Ở toàn bộ chuột đã tiêm chủng tau khác, các độ chuẩn kháng thể được kích thích đối với tất cả các isotyp IgG2a, 2b và 3 cũng như IgM có thể được so sánh.

Các kháng thể được tạo ra từ chuột đã gây miễn dịch bằng vacxin tau gắn kết đặc hiệu pTau bằng gắn kết biên với các peptit tau. Các kháng thể đã hình thành cũng có khả năng nhận dạng các mô rối ở não chuột chuyển gen Tau và pTau từ chất chiết não chuột chuyển gen bằng WB.

Ví dụ 6: Tạo ra và sàng lọc các khối tế bào lai và các kháng thể

Mục đích của nghiên cứu này là để tạo ra và sàng lọc các mAb kháng Tau (các kháng thể đơn dòng). Các khối tế bào lai được tạo ra bằng cách dung hợp lá lách chuột đã gây miễn dịch bằng vacxin tau với dòng tế bào u tủy. Các khối tế bào lai được đánh giá về tính phản ứng chống lại cả protein Tau có độ dài đầy đủ được phosphoryl hoá và không được phosphoryl hoá, cũng như các peptit kháng nguyên tau được phosphoryl hoá và không được phosphoryl hoá trong chế phẩm vacxin. Việc sàng lọc khối tế bào lai cũng được tiến hành đối với tính phản ứng của dịch nổi chứa khối tế bào lai đối với các mô rối tau nhờ sử dụng hoá học miễn dịch cho các lát cắt não chuột chuyển gen Tau.

6.1. Các phương pháp

6.1.1 Dung hợp

Chuột C57BL/6 kiểu đại đã tiêm chủng ACI-33 (Tau5-20 [pY18]) và ACI-35 được sử dụng để tạo ra khối tế bào lai. Chuột được tiêm củng cố bằng vacxin ACI-33 vào ngày 0 sau đó nhắc lại vào ngày 4 và quá trình dung hợp được tiến hành vào ngày 7. 173×10^6 (ACI-33), các tế bào lá lách của chuột đã gây miễn dịch được dung hợp với các tế bào u tủy SP2-0-Ag14 với tỷ lệ 5 tế bào lách/1 tế bào u tủy.

Chuột C57BL/6 kiểu đại đã tiêm chủng ACI-36 (Tau401-418 [pS404/S409]) được sử dụng để tạo ra khối tế bào lai. Chuột được tiêm củng cố bằng vắc xin ACI-36 vào ngày 0 sau đó nhắc lại vào ngày 4 và quá trình dung hợp được tiến hành vào ngày 7. 84×10^6 tế bào lá lách của chuột đã gây miễn dịch được dung hợp với các tế bào u tủy SP2-0-Ag14 với tỷ lệ 5 tế bào lá lách/1 tế bào u tủy.

Chuột C57BL/6 kiểu đại đã tiêm chủng ACI-41 (hỗn hợp của Tau206-221 [pT212/pS214] và Tau196-211 [pS202/pT205]) được sử dụng để tạo ra khối tế bào lai. Chuột được tiêm củng cố bằng vắc xin ACI-41 vào ngày 0 sau đó nhắc lại vào ngày 4 và quá trình dung hợp được tiến hành vào ngày 8. 162×10^6 tế bào lá lách của chuột đã gây miễn dịch được dung hợp với các tế bào u tủy SP2-0-Ag14 với tỷ lệ 5 tế bào lá lách/1 tế bào u tủy.

Ba lần dung hợp trong các đĩa 8x96 giếng và các dòng vô tính đặt tên theo đĩa (1-8) và tiếp theo là hàng (A-G) và cuối cùng là cột (1-12).

6.1.2. Phương pháp sàng lọc để chọn các dòng vô tính

Các đĩa 8x96 giếng được sàng lọc lần đầu hai lần để biểu hiện IgG. Sau đó các dòng vô tính biểu hiện dương tính được chuyển vào các đĩa 24 giếng và các dịch nổi tế bào (=các dòng vô tính) của các tế bào sinh trưởng được thử nghiệm trong sàng lọc Tau ELISA và sàng lọc hoá học mô miễn dịch TAUPIR. Các dịch nổi dương tính trong ELISA và/hoặc TAUPIR được chuyển vào các bình T25 và các dòng vô tính được sàng lọc lại để biểu hiện IgG, sàng lọc Tau ELISA và TAUPIR.

6.1.3 Sàng lọc IgG

Các đĩa Elisa được phủ 50 μ l/giếng kháng thể kháng IgG chuột (CER Groupe, Marloie, Belgium) trong chất đệm phủ trong 16 giờ ở 4°C. Sau khi rửa các đĩa bằng PBS/Tween, 100 μ l/giếng dung dịch phong bế được sử dụng trong

1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. 50 μ l dịch nổi chứa tế bào lai không pha loãng được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau bước rửa, hỗn hợp của IgG1, IgG2a, IgG2b và IgG3 kháng chuột được tiếp hợp peroxidaza cây cải ngựa (HRP) (Ab Serotec, Raleigh, NC, USA) được phết lên các đĩa trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau lần rửa cuối cùng, việc dò tìm được tiến hành với TMB (3-3',5,5'-tetramethylbenzidin), chất nền phosphatasa đối với HRP, và các đĩa được đọc ở 405 nm nhờ sử dụng đầu đọc đĩa ELISA. Các kết quả được biểu hiện là O.D. (Mật độ quang học).

6.1.4 Sàng lọc ELISA các khối tế bào lai Tau

Việc sàng lọc ELISA các khối tế bào lai được tiến hành đối với peptit pTau (ACI-33, T1.5: Tau5-20 [pY18]; ACI-36, T4.5: Tau401-418 [pS404/S409]; ACI-41, T8.5: Tau206-221 [pT212/pS214] và T9.5: Tau196-211 [pS202/pT205] Polypeptit Laboratories, Hillerød, Denmark), peptit Tau tương ứng (ACI-33, T1.6: Tau5-20; ACI-36, T4.6: Tau401-4; ACI-41, T8.6: Tau206-221 và T9.6: Tau 196-211, Polypeptit Laboratories, Hillerød, Denmark), protein Tau được phosphoryl hoá có độ dài đầy đủ (441aa) (pProtein tau, Vandebroek et al., 2005) protein Tau có độ dài đầy đủ (441aa) (Protein tau, SignalChem, Richmond, Canada). Cuối cùng anbumin huyết thanh bò (BSA) được sử dụng làm đối chứng âm tính.

Các đĩa được phủ 10 μ g/ml peptit Tau tương ứng và 1 μ g/ml protein Tau tương ứng qua đêm ở 4°C. Sau khi rửa từng giếng bằng PBS-0,05% Tween 20 và phong bế bằng 1% BSA trong PBS-0,05% Tween 20, dịch nổi chứa tế bào lai không pha loãng hoặc đối chứng âm tính trung bình được thêm vào các đĩa và ủ ở 37°C trong 2 giờ. Sau khi rửa, các đĩa được ủ bằng kháng thể toàn phần kháng IgG chuột được tiếp hợp phosphatasa kiềm (AP) (Jackson Laboratories, Baltimore, PA, USA) trong 2 giờ ở 37°C. Sau khi rửa, các đĩa được ủ bằng pNPP (para-nitro-phenyl-phosphat), chất nền phosphatasa cho AP, và đọc ở 405

nm nhờ sử dụng đầu đọc đĩa ELISA. Các kết quả được biểu hiện là O.D. (Mật độ quang học).

6.1.5 Sàng lọc IHC các khối tế bào lai: Gắn kết các kháng thể kháng tau với các mô rối trong các lát cắt não của chuột chuyển gen (TAUPIR)

Các thử nghiệm TAUPIR được tiến hành theo phương pháp của Ví dụ 5.1.5.

6.1.6 Sàng lọc IgG của các bình T25

Các đĩa Elisa được phủ 5ug/ml kháng thể đặc hiệu kháng mảnh IgG F(ab')₂ chuột (Jackson Laboratories, Baltimore, PA, USA) trong chất đệm phủ cacbonat-bicacbonat pH 9,6 (Sigma, Buchs, Switzerland) qua đêm ở 4°C. Sau khi rửa các đĩa, dịch nổi chứa tế bào lai không pha loãng, kháng thể IgG1 đối chứng dương tính (6E10 với 1 ug/ml: Covance, Emeryville, CA, USA) hoặc đối chứng âm tính (chỉ môi trường nuôi cấy) được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau bước rửa, kháng thể đặc hiệu dê kháng mảnh IgG Fcγ (các nhóm phụ 1+2a+2b+3) chuột được tiếp hợp AP thứ cấp (Jackson Laboratories, Baltimore, PA, USA) được ủ trên các đĩa trong 2 giờ ở 37°C. Sau lần rửa cuối cùng, việc dò tìm được tiến hành với pNPP (para-nitro-phenyl-phosphat), chất nền phosphataza cho AP, và các đĩa được đọc ở 405 nm nhờ sử dụng đầu đọc đĩa ELISA. Các kết quả được thể hiện ở dạng O.D. (Mật độ quang học).

6.2. Các kết quả

Các khối tế bào lai ACI-33

Các dịch nổi chứa tế bào từ các đĩa 8x96 giếng thu được từ thể dung hợp được sàng lọc để tạo ra IgG. Trong 768 giếng (8x96 giếng) thì 277 giếng thử nghiệm là dương tính để biểu hiện IgG và được chuyển vào các đĩa 24 giếng. Trong các đĩa 24 giếng, 79 dòng vô tính sinh trưởng và dịch nổi từ các tế bào đó

được phân tích. Các dòng vô tính dương tính được chuyển thêm vào các bình T25 và các dịch nổi được sàng lọc để tạo ra IgG, ELISA và TAUPIR (Bảng 6).

Bảng 6:

Sàng lọc đĩa 24 giếng		Sàng lọc các bình T25		
Dương tính trong ELISA	Dương tính trong TAUIR	Dương tính trong sàng lọc IgG	Dương tính trong ELISA	Dương tính trong TAUIR
1A7		1A7		
	1A11			
	1C11	1C11		
2C9		2C9		
3C3		3C3	3C3	
3C5		3C5		
3E8		3E8		
3G10	3G10	3G10	3G10	
6C10	6C10	6C10	8C10	6C10
6F3		6F3		
6F8		6F8		

Dòng vô tính 6C10 là dòng vô tính dương tính duy nhất trong 3 lần sàng lọc và được chọn để tách dòng phụ.

Các khối tế bào lai ACI-36

Các dịch nổi chứa tế bào từ các đĩa 8x96 giếng thu được từ thể dung hợp được sàng lọc để tạo ra IgG. Trong 768 giếng (8x96 giếng) thì 333 giếng thử nghiệm là dương tính để biểu hiện IgG và được chuyển vào các đĩa 24 giếng. Trong các đĩa 24 giếng, 75 dòng vô tính sinh trưởng và dịch nổi từ các tế bào đó được phân tích. Các dòng vô tính dương tính được chuyển thêm vào các bình T25 và các dịch nổi được sàng lọc để tạo ra IgG, ELISA và TAUIR (Bảng 7).

Bảng 7

Sàng lọc đĩa 24 giếng		Sàng lọc các bình T25		
Dương tính trong ELISA	Dương tính trong TAUPIR	Dương tính trong sàng lọc IgG	Dương tính trong ELISA	Dương tính trong TAUPIR
2B6	2B6	2B6	2B6	2B6
2F9	2F9	2F9	2F9	2F9
2G1		2G1	2G1	2G1
3A8	3A8	3A8	3A8	3A8
3B9		3B9	3B9	3B9
3F11	3F11	3F11		3F11
	4A3			4A3
4C1		4C1	4C1	4C1
4C12		4C12	4C12	4C12
4E12		4E12	4E12	4E12
5E10		5E10	5E10	
5F5		5F5	5F5	
7D6	7D6	7D6	7D6	7D6
6H1		6H1	6H1	6H1

Để chọn lọc các dòng vô tính cho các bước tiếp theo, việc xếp loại toàn bộ các dịch nổi dương tính đối với các sàng lọc IgG/ELISA/TAUPIR được tiến hành dựa vào các kết quả ELISA và TAUPIR. Việc phân cấp các kết quả ELISA và TAUPIR được tiến hành như được giải thích trong phần của các phương pháp. Việc nhuộm TAUPIR hầu như giống nhau cho 5 dòng vô tính thứ nhất và các kết quả này tương ứng với các kết quả ELISA. 4C12 được loại bỏ khi nó được thấy trong đĩa mẫu như 4C1 mà làm tăng sự hợp lý của 2 dòng vô tính là

giống nhau (nhận dạng epitop giống nhau). 4 dòng vô tính tốt nhất được chọn là 3A8, 2B6, 4C1 và 6H1. 6 dòng vô tính khác (4C12, 2G1, 2F9, 7D6, 3B9, 4E12) được giữ làm bản sao dự phòng.

Việc phân cấp 10 dòng vô tính thể hiện dương tính trong việc sàng lọc ELISA và sàng lọc TAUPIR được tiến hành để chọn các dòng tốt nhất (Bảng 8). Màu xám nổi bật là 5 dòng vô tính tốt nhất.

Bảng 8: Phân cấp đối với các dòng vô tính dương trong ELISA và TAUPIR

Phân cấp đối với ELISA	Phân cấp đối với TAUPIR
3A8	6H1
2B6	4C1
4C1	3A8
6H1	4C12
4C12	2B6
2G1	2F9
2F9	3B9
7D6	2G1
3B9	7D6
4E12	4E12

Các khối tế bào lai ACI-41

Các dịch nổi chứa tế bào từ các đĩa 8x96 giếng thu được từ thể dung hợp được sàng lọc để tạo ra IgG. Trong 768 giếng (8x96 giếng), 215 giếng thử nghiệm là dương tính để biểu hiện IgG và được chuyển vào các đĩa 24 giếng. Trong các đĩa 24 giếng, 81 các dòng vô tính sinh trưởng và dịch nổi từ các tế bào đó được phân tích. Các dòng vô tính dương tính được chuyển thêm vào các bình T25 và các dịch nổi được sàng lọc để tạo ra IgG, ELISA và TAUPIR (bảng 9).

Bảng 9:

Sàng lọc đĩa 24 giếng		Sàng lọc các bình T25		
Dương tính trong ELISA	Dương tính trong TAUPIR	Dương tính trong sàng lọc IgG	Dương tính trong ELISA	Dương tính trong TAUPIR
	3D11		3D11	3D11
4H6		4H6		4H6
5D10	5D10	5D10	5D10	5D10
5E6	5E6			
5F10		5F10		
6B7		6B7	6B7	
7C2	7C2	7C2	7C2	7C2
	8G8			8G8
	8H8	8H8		8H8

Các dòng vô tính 5D10 và 7C2 là các dòng vô tính dương tính duy nhất trong 3 lần sàng lọc và được chọn để tách dòng phụ. Dòng vô tính 5D10 chỉ gắn kết với peptit T8.5, trong khi dòng vô tính 7C2 gắn kết với hai peptit của vacxin ACI-41 (T8.5 và T9.5) (Fig.10).

Dòng vô tính phụ 5D10A4 có nguồn gốc từ 5D10 là đặc hiệu với peptitp Tau.

6.3. Kết luận

Các kháng thể tạo thành có tính đặc hiệu cao với các peptit ptau chỉ có gắn kết rìa với các peptit không được phosphoryl hoá.

Từ 3 thể dung hợp (ACI-33, ACI-36 và ACI-41), toàn bộ 7 dòng vô tính được lưu giữ ở DSMZ (bảng 10) và được chọn để tách dòng phụ thêm.

Bảng 10: Danh sách các khối tế bào lai được lưu giữ

Kháng nguyên	Vaccin	Tên tế bào lai	Số hiệu lưu giữ	Ngày lưu giữ
T8: Tau206-221 [pT212/pS214] + T9: Tau 196-211 [pS202/pT205]	ACI-41	ACI-41-Ab1	DSM ACC3043	3 tháng 3, 2010
T4: Tau 401-418 [pS404, pS409]	ACI-36	2B6	DSM ACC3044	10 tháng 3, 2010
T4: Tau 401--418 [pS404, pS409]	ACI-36	3A8	DSM ACC3045	10 tháng 3, 2010
T4: Tau 401-418 [pS404, pS409]	ACI-36	4C1	DSM ACC3046	10 tháng 3, 2010
T8 :Tau206-221 [pT212/pS214]+ T9: Tau196-211 [pS202/pT205]	ACI-41	5D10A3	DSM ACC3047	10 tháng 3, 2010
T1: Tau 5-20 [pY18]	ACI-33	6C10	DSM ACC3048	10 tháng 3, 2010
T4:Tau 401-418 [pS404, pS409]	ACI-36	6H1	DSM ACC3049	10 tháng 3, 2010
T8 :Tau206-221 [pT212/pS214] + T9: Tau196-211 [pS202/pT205]	ACI-41	7C2	DSM ACC3050	10 tháng 3, 2010

Ví dụ 7: Nhuộm đặc hiệu lát cắt não người AD bằng hai kháng thể (ACI-41-Ab1 và 5D10), thu được từ chuột đã tiêm chủng ACI-41

Mục đích của thử nghiệm này là để nhuộm các mớ rối sợi thần kinh (NFTs) ở não người mắc bệnh Alzheimer (AD) bằng kháng thể ACI-41-Ab1 (T89-F4 dòng vô tính phụ 9H3) và 5D10, được tạo ra từ hai thể dung hợp khác nhau của chuột được gây miễn dịch bằng vaccin ACI-41. Đối với thử nghiệm này, thử nghiệm nhuộm tính phản ứng miễn dịch phospho-protein Tau (TAUPIR) bằng các lát cắt não người AD, được sử dụng.

7.1. Các phương pháp

7.1.1 Tạo ra kháng thể 5D10

5D10 được tạo ra như được thể hiện trong Ví dụ 9.

7.1.2. Tạo ra ACI-41-Ab1

7.1.2.1 Dung hợp

Chuột kiểu đại C57BU6 đã tiêm chủng ACI-41 (Vaccin ACI-41 chứa hỗn hợp của hai phospho-peptit tau, Tau206-221 [pT212/pS214] và Tau 196211 [pS202/pT205]) được sử dụng để tạo ra khối tế bào lai. Chuột được củng cố bằng peptit ACI-41 5 ngày trước khi dung hợp. 58x10⁶ tế bào lá lách của chuột đã gây miễn dịch được dung hợp với các tế bào u tủy SP2/0-O-Ag 14 với tỷ lệ 5 tế bào lá lách/1 tế bào u tủy. Thể dung hợp tạo ra các đĩa 10x96 giếng sau đó được sàng lọc để xác định các dòng vô tính xem xét.

7.1.2.2 Sàng lọc ELISA các khối tế bào lai

Sàng lọc ELISA các khối tế bào lai được tiến hành đối với T8: Tau206-221 [pT212/pS214], T9: Tau 196-211 [pS202/pT205] hoặc các đĩa được phủ (hP)-Tau được tăng phosphoryl hoá (giải thích trong phần thẩm tách Western).

Các đĩa được phủ 2 ug/ml hP-Tau qua đêm ở nhiệt độ trong phòng (RT). Sau khi rửa từng giếng bằng PBS và phong bế bằng 2% FCS trong PBS, dịch nổi chứa tế bào lai được thêm vào các đĩa và được ủ trong 1 giờ ở RT. Sau bước rửa, các đĩa được ủ bằng Ig toàn phần Dê Kháng chuột AffiniPure được tiếp hợp peroxidaza (Detection of IgG + IgM, Dako Glostrup, Denmark) trong PBS 1% FCS trong 1 giờ ở RT. Các đĩa được hiện hình với TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin). Phản ứng được hãm bằng H₂SO₄ 2N và đọc ở 450nm nhờ sử dụng đầu đọc đĩa ELISA. Các kết quả được thể hiện theo độ quang học (O.D.) đối với từng dòng vô tính của tế bào lai.

Đối với các peptit, các đĩa được phủ 10 ug/ml Tau206-221 [pT212/pS214] hoặc Tau 196-211 [pS202/pT205] qua đêm ở 4°C. Sau khi rửa bằng PBS và phong bế bằng 2% NHS trong PBS, dịch nổi chứa tế bào lai được thêm vào các đĩa và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng (RT). Sau bước rửa, các đĩa được ủ bằng IgG kháng chuột biotinyl hoá (do Vector labs cung cấp) trong PBS 1% NHS trong 1 giờ ở RT. Bước bổ sung được tiến hành đối với các kháng thể được tiếp hợp biotin và các đĩa được ủ trong 30 phút trong streptavidin-HRP (ABC kit, Vector labs) trước khi dò tìm. Sau bước rửa, các đĩa được triển khai với TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin). Phản ứng được hãm bằng 2N H₂SO₄ và đọc ở 450nm nhờ sử dụng đầu đọc đĩa ELISA. Các kết quả được biểu hiện theo mật độ quang học (O.D.) cho từng dòng vô tính của tế bào lai.

7.1.2.3 Sàng lọc IHC các khối tế bào lai: Gắn kết các kháng thể kháng tau với các mô rối ở các lát cắt não của chuột chuyển gen (TAUPIR)

Gắn kết các kháng thể với các mô rối được tạo ra bởi các tế bào lai được tiến hành bằng hoá học mô miễn dịch (IHC) trên các lát cắt não của chuột chuyển gen Tau.

Các lát cắt não của chuột biGT (>20 tháng tuổi) chuyển gen hai lần (chuột chuyển gen GSK-3 lai chéo với TPLH (isoform người Tau dài nhất (441aa) với chuột biểu hiện đột biến P301L) và từ chuột gây mê bằng Tau (TKO) làm đối chứng âm tính.

Việc nhuộm TAUIR được tiến hành theo phương pháp của Ví dụ 5.1.5.

7.1.2.4 Sàng lọc bằng thấm tách Western các khối tế bào lai (WB)

Việc gắn kết các kháng thể được tạo ra bởi các tế bào lai với pTau trong chất chiết não của động vật chuyển gen và/hoặc chất chiết hP-Tau được tiến hành bằng WB.

Quá trình làm đồng nhất não của chuột được bất hoạt pTau (TKO), FVB kiểu dại, TPLH, biGT được tiến hành trong chất đệm dưới đây: 25 mM Tris/HCl pH7,6, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 30 mM NaF, 0,2 mM Na_3VO_4 , 1 nM axit Okadaic, 1 mM phenylmethylsulfonyl florua (PMSF), 5 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 1 viên hỗn hợp chất ức chế proteaza hoàn toàn trong bảng 1 (CPIC) trên toàn bộ 12 ml. Để thu được dịch não đồng nhất toàn bộ, não được làm đồng nhất trên đá với 10 thể tích/khối lượng bán cầu não (ml/g) bằng (ống thủy tinh/chày teflon) tương tự potter được dẫn động bằng động cơ với tốc độ 700 vòng phút.

Để chiết hP-Tau, não của chuột TPLH và TKO được làm đồng nhất với chất đệm dưới đây: 100 mM MES pH 6,8, 1mM B-mercapto-etanol, 5 mM EDTA, 2 6 mM PMSF, 5 $\mu\text{g/ml}$ tosyl-L-lysin clometyl keton (TLCK), 100 mM NaF, 1 nM axit okadaic, 0,2 mM Na_3VO_4 và dung dịch hỗn hợp chất ức chế proteaza hoàn toàn trong bảng 1 (CPIC) trên toàn bộ 12 ml. Não được làm đồng nhất trên đá với 6 thể tích/khối lượng bán cầu não (ml/g) bằng (ống thủy tinh/chày teflon) tương tự potter được dẫn động bằng động cơ với tốc độ 700 vòng phút. Dịch đồng nhất được làm ly tâm với 20000xg (200000m/s^2) 30 phút

ở 4°C và dịch nổi được chuyển và gia nhiệt nhanh tới 95°C trong đó nó được giữ trong 10 phút sau khi làm lạnh nó trong đá đang tan. Bước làm ly tâm được tiến hành trước khi các phân dịch nổi được xử lý và giữ ở -20°C như "hP-Tau".

Dịch đồng nhất não toàn bộ được pha loãng một nửa trong chất đệm mẫu (125 mM Tris/HCl pH6,8, 4% (khối lượng/thể tích) natri dodecyl sulfat (SDS), 20% glyxerol, 0,01% xanh bromophenol) + 5% beta-mercapto-etanol sau đó gia nhiệt nhanh tới 95°C. Các mẫu được giữ 5 phút, pha loãng ¼ trong chất đệm mẫu, gia nhiệt lại tới 95°C và sau đó làm lạnh xuống và quay với vận tốc 14000 vòng phút trong 5 phút thành các mảnh vụn sạch không tan được. Các dịch nổi được thu gom và nạp vào gel SDS-PAGE. Việc chuyển hoá với màng nitroxenluloza (Hybond-ECL) được tiến hành trong chất đệm trao đổi (25 mM Tris pH 8,6, 190 mM Glyxin, 20% metanol). Màng được chuyển thành dung dịch phong bế (0,1% Tween trong TBS (50 mM Tris.HCl, pH7,6, 150 mM NaCl) + bột sữa 5%) trước khi ủ qua đêm ở 4°C với dịch nổi chứa tế bào lai không pha. Quá trình ủ với kháng thể thứ cấp dê kháng chuột tiếp hợp với HRP (Dako, Glostrup, Denmark) pha loãng 1/10.000 trong dung dịch phong bế được tiến hành ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Quá trình dò được tiến hành nhờ sử dụng các chất phản ứng dò thấm tách Western ECl của GE Healthcare.

7.1.3 Gắn kết của các kháng thể kháng phospho-Tau với các mô rối Tau ở não người bị mắc AD

Các dòng vô tính của kháng thể kháng phospho Tau ACI-41-Ab1 (dòng vô tính phụ 9H3 T89-F4) (isotyp IgM của chuột) và 5D10 (isotyp IgG của chuột) được tạo ra từ hai thể dung hợp riêng biệt của chuột đã tiêm chủng ACI-41. Vacxin ACI-41 chứa hỗn hợp của hai phospho-peptit tau, Tau206-221 [pT212/pS214] và Tau196-211 [pS202/pT205]. Gắn kết kháng thể dòng vô tính T89-F4 với các mô rối trên các lát não của não người AD được tiến hành bằng hoá học mô miễn dịch TAUPIR. Các lát cắt vỏ não của các cá thể bị AD, chứng

liệt trên nhân tiến triển (PSP), và các đối chứng khoẻ mạnh được sử dụng. Các lát cắt não được rửa trong 5 phút trong PBS sau đó được ủ trong 15 phút ở RT trong 1,5% H_2O_2 trong PBS:MeOH (1:1) để phong bế peroxidaza nội sinh. Sau khi rửa các lát cắt 3 lần trong PBST (PBS/0,1% TritonX100), chúng được ủ trong 30 phút ở RT trong dung dịch phong bế PBST+10% FCS (huyết thanh thai bò). Quá trình ủ với các kháng thể sơ cấp (dòng vô tính 9H3 T89-F4, 5D10 và T100 làm đối chứng dương tính) được tiến hành qua đêm ở 4°C. Các lát cắt được rửa 3 lần trong PBST trước khi ủ với kháng thể thứ cấp để kháng chuột tiếp hợp với HRP (do Dako, Glostrup, Denmark cung cấp) trong PBST/10% FCS trong 1 giờ ở RT. Trước khi dò, các lát cắt được rửa 3 lần bằng PBST và được ủ trong 50 mM Tris/HCl pH7,6 trong 5 phút. Quá trình dò được tiến hành bằng cách ủ các lát cắt trong 3 phút trong Diaminobenzidin (DAB: bảng 1 trong 10 ml 50 mM Tris.HCl + 3 μ l H_2O_2 30%; MP Biomedicals, Solon, OH, USA). Phản ứng được hãm bằng cách rửa các lát cắt 3 lần trong PBST. Sau đó các lát cắt được chuyển lên các đĩa thủy tinh silan hoá và làm khô bằng không khí nhờ các đĩa ấm ở 50°C trong 2 giờ. Việc nhuộm màu ngược được tiến hành nhờ ủ với Mayers hematoxylin (Fluka Chemie, Buchs, Switzerland) trong 1 phút tiếp theo là bước rửa trong 4 phút trong nước máy đang chảy. Các lát cắt được loại parafin bằng cách chuyển qua Xylol 2 lần trong 5 phút và 2 lần trong 1 phút trong EtOH 100%, tiếp theo là rửa 1 phút trong EtOH 90%, 70%, 50% và nước chưng cất. Để truy hồi kháng nguyên, các lát cắt được đun nóng trong 10 phút trong dung dịch axit xitric 0,01 M (pH 6,0) và làm nguội xuống trong 20 phút. Cuối cùng, các lát cắt được làm tiêu bản bằng DePeX (BDH Chemicals Ltd., Poole, England) dưới các lá kính dày thủy tinh. Các lát cắt đã nhuộm được kiểm tra bằng kính hiển vi với camera 3CCD và các mắt chiếu sáng huỳnh quang epi (Leica, Wetzlar, Germany). Các ảnh được thu thập và phân tích nhờ phần mềm chuyên dụng (IM500, Leica).

7.2. Các kết quả

7.2.1 Sàng lọc các khối tế bào lai

Việc sàng lọc ELISA được tiến hành như được thể hiện trong các phương pháp này và 172 các dòng vô tính của tế bào lai được chọn lọc và được chuyển vào các đĩa 12 giếng. Các ELISA tiếp theo được tiến hành để đánh giá tính đặc hiệu của các kháng thể được tạo ra chống lại các peptit pTau Tau206-221 [pT212/pS214], Tau 196-211 [pS202/pT205] và/hoặc chất chiết hP-Tau. Điều này tạo ra 25 dòng vô tính dương tính đối với các peptit pTau và 21 dòng vô tính thể hiện tính đặc hiệu đối với hP-Tau (Fig.11).

Các nghiên cứu hoá học mô miễn dịch được tiến hành song song với phân tích ELISA. Các mẫu nhuộm khác nhau được thấy trong các dòng vô tính được chuyển vào các đĩa 12 giếng, việc nhuộm tế bào thần kinh đệm, nhân và bào chất không đặc hiệu được quan sát thấy đối với một số lát cắt biGT được ủ với dịch nổi không pha loãng từ các dòng vô tính đã chọn.

Dịch nổi từ dòng vô tính 9H3 (ACI-41-Ab1) được nhuộm có các cấu trúc mới rối bào chất có tính đặc hiệu cao

Sàng lọc WB đối với các chất chiết não và hP-Tau của chuột khác nhau được tiến hành nhờ sử dụng dịch nổi không pha loãng từ các khối tế bào lai đã chọn. Không có phản ứng với Tau được thấy đối với bất kỳ dịch nổi chứa tế bào lai nào được thử nghiệm.

7.2.2 Nhuộm các mô rối sợi thần kinh ở các lát cắt não người mắc bệnh Alzheimer

Ái lực của các dòng vô tính kháng thể ACI-41-Ab1 (T89-F4 dòng phụ 9H3) và 5D10 để gắn kết với các NFT ở não người mắc AD được kiểm tra bằng hoá học mô miễn dịch TAUPIR. Dòng vô tính kháng thể Tau kháng phospho T89-F4 gắn kết với các NFT chứa phospho-Tau ở não người mắc AD (Fig.12).

Ái lực của kháng thể 5D10 để gắn kết với các NFT ở các lát cắt vỏ não người mắc AD được kiểm tra bằng hoá học mô miễn dịch TAUIR. Dòng vô tính kháng thể Tau kháng phospho 5D10 gắn kết với các NFT chứa phospho-Tau và các sợi mạng thần kinh ở các lát cắt vỏ não người AD (Fig.13).

7.3. Kết luận

Việc sàng lọc các dòng vô tính của tế bào lai tạo ra ACI-41 bằng ELISA thu được 36 dòng vô tính gắn kết với các peptit được phosphoryl hoá và/hoặc chất chiết hP-Tau có độ dài đầy đủ. Việc sàng lọc bằng TAUIR 36 dòng vô tính đó khẳng định việc nhuộm cấu trúc mới rồi bào chất bằng một dòng vô tính (9H3), ACI-41-Ab1.

Hai kháng thể ACI-41-Ab1 (9H3-F4) và 5D10 thể hiện gắn kết đặc hiệu với các NFT và các sợi mạng thần kinh ở lát cắt não người AD.

Ví dụ 8: Hiệu lực của ACI-35 được tạo ra bởi 2 quy trình khác nhau để kích thích các đáp ứng IgG đặc hiệu pTau sau các lần gây miễn dịch bằng cách sử dụng trong màng bụng hoặc dưới da ở chuột kiểu đại (C57BL/6).

Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá hiệu lực của ACI-35 (Tau393-408 [pS396/pS404]) được tạo ra bởi 2 quy trình khác nhau, ACI quy trình A hoặc ACI quy trình L3 để kích thích các độ chuẩn kháng thể sau khi tiêm dưới da (s.c.) hoặc trong màng bụng (i.p) ở chuột kiểu đại C57BL/6. Chuột được gây miễn dịch 3 lần trong 2 tuần và được lấy máu 1 tuần trước lần tiêm thứ nhất và tiếp theo 1 tuần sau mỗi lần tạo miễn dịch. Các đáp ứng IgG kháng pTau hoàn toàn (Tau393-408 [pS396/pS404]) được đo bằng ELISA. Ngoài ra, các mẫu isotyp của đáp ứng kháng thể được phân tích sau 3 lần gây miễn dịch để đánh giá sự phân bố của các nhóm phụ khác nhau của các IgG cũng như IgM. Các độ chuẩn kháng thể chống lại peptit không pTau (Tau393-408) tương ứng được

phân tích. Các đáp ứng tế bào T được kích thích bởi ACI-35 được phân tích nhờ sử dụng kỹ thuật ELISPOT.

8.1. Các phương pháp

8.1.1 Bào chế vacxin ACI-35 ACI Quy trình A

Các vacxin ACI-35 được bào chế theo phương pháp của Ví dụ 3. Huyền phù liposom (mẻ ACI-35-081103-B) sau đó được chia nhỏ trước khi giữ ở 2-8°C. Tỷ số mol peptit/phospholipit cuối cùng là 1:100.

8.1.2 Bào chế vacxin ACI-35 ACI Quy trình L3

Phosphopeptit được tetrapalmitoyl hoá Tau393-408 [pS396/pS404] được dẫn xuất từ Tau (Tau 393-408 người với nhóm phospho trên S396 và S404) (4,0 mg) được cân cho vào ống thủy tinh dung tích 25 ml, thêm vào đó hexafloisopropanol (HFIP) (5 ml). Sau đó dung dịch sạch này được thêm vào dung dịch đã khuấy chứa Dimyristoyl phosphatidylcholin (DMPC), Dimyristoyl phosphatidylglycerol (DMPG), Cholesterol và Monophosphoryl Lipit A phụ trợ (MPLA) (all Avanti Polar Lipids inc. AL, USA) trong Clorofom (35 ml) (tỷ số mol 9:1:7:0,2 tương ứng). Sau đó dung dịch thu được được lọc qua màng lọc kỵ nước PTFE 0,2 um vào bình thủy tinh đáy tròn dung tích 250 ml. Sau đó dung môi hữu cơ được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm ở 40°C và tiếp theo trong chân không trong 3 giờ. Màng mỏng thu được được hydrat hoá lại bằng cách bổ sung PBS (40 ml) và khuấy nhẹ ở RT trong 18 giờ. Huyền phù liposom (mẻ ACI-35-081103-A) sau đó được chia nhỏ trước khi lưu giữ ở 2-8°C. Tỷ số mol peptit/phospholipit cuối cùng là 1:100.

8.1.3 Gây miễn dịch

Chuột C57BL/6 13 tuần tuổi (10 con chuột trên một nhóm) được tiêm vacxin dưới da hoặc trong màng bụng vào ba lần, mỗi lần cách nhau trong

khoảng 2 tuần (ngày (d)0, d14, d28) theo Bảng 11. 1 tuần (d-7) trước các lần gây miễn dịch thứ nhất, tiếp theo 7 ngày sau các lần tiêm (tức là d7, d21, d35), và các mẫu máu chuột đã chết (d56) được thu gom và huyết tương được tạo ra. Các chuẩn độ kháng thể IgM và IgG đặc hiệu Tau393-408 [pS396/pS404] và các mẫu isotyp IgG được xác định bằng ELISA. Để đối chứng, các chuẩn độ kháng thể IgG đặc hiệu không peptit pTau393-408 cũng được xác định bằng ELISA.

Bảng 11: Gây miễn dịch ở chuột

Nhóm	Số chuột và giới tính	Điều trị/thể tích ^a	Mẻ vacxin	Quy trình	Cách sử dụng ^b	Mức liều Khối lượng của peptit tau ug/liều ^c	Khối lượng của MPLA ug/liều ^c
1	10 con cái	ACI-35 0,2 ml	ACI-35-081103-A	ACI L3	i.p.	10	16
2	10 con cái	ACI-35 0,2 ml	ACI-35-081103-A	ACI L3	i.p.	10	16
3	10 con cái	ACI-35 0,2 ml	ACI-35-081103-B	ACI L3	i.p.	13	19
4	10 con cái	ACI-35 0,2 ml	ACI-35-081103-B	ACI L3	i.p.	13	19

^a: thể tích theo lý thuyết

^b: i.p: trong màng bụng

^c: khối lượng đã đo được xác định sau phân tích

8.1.4 Xác định số lượng các kháng thể đặc hiệu peptit Tau

Các kháng thể IgG đặc hiệu đối với Tau393-408 [pS396/pS404] được xác định bằng ELISA trong 5 mẫu huyết tương. Các kháng thể IgG đặc hiệu Tau393-408, các kháng thể isotyp IgM và IgG đặc hiệu Tau393-408 [pS396/pS404] được xác định bằng ELISA trong mẫu huyết tương d35. Các đĩa được phủ 10 ug/ml peptit Tau tương ứng qua đêm ở 4°C. Sau khi rửa từng giếng

bằng PBS-0,05% Tween 20 và phong bế bằng 1% BSA trong PBS-0,05% Tween 20, các dung dịch huyết tương pha loãng theo bậc được thêm vào các đĩa và ủ ở 37°C trong 2 giờ. Sau khi rửa, các đĩa được ủ bằng kháng thể kháng IgG chuột tiếp hợp với phosphatasa kiềm (AP) (Jackson Laboratories, Baltimore, PA, USA) các kháng thể đặc hiệu isotyp (kháng thể kháng IgM chuột tiếp hợp với peroxidaza cây cải ngựa (HRP), kháng thể kháng IgG1 chuột tiếp hợp với AP, kháng thể kháng IgG2a và IgG3 chuột tiếp hợp với biotin, do Pharmingen BD, San Diego, CA, USA cung cấp và kháng thể kháng IgG2b chuột tiếp hợp với HRP do Zymed Laboratories, San Francisco, CA cung cấp) trong 2 giờ ở 37°C. Sau khi rửa, các đĩa được ủ bằng pNPP (para-nitro-phenyl-phosphat), chất nền phosphatasa cho AP, hoặc ABTS (2,2-azino-bis(axit 3-etylbenzthiazolin-6-sulphonic)), chất nền cho HRP và đọc ở 405 nm nhờ sử dụng đầu đọc đĩa ELISA. Bước bổ sung được tiến hành đối với các kháng thể được tiếp hợp biofin trong đó các đĩa được ủ trong 45 phút trong streptavidin-HRP (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) trước khi dò nhờ sử dụng ABTS. Các kết quả được thể hiện ở dạng O.D. (Mật độ quang học) ở lần pha loãng thứ nhất và lần pha loãng không bão hoà đối với IgG và ở dạng O.D. không bão hoà cho các isotyp IgG và IgM.

8.1.5 Xác định số lượng các tế bào T sản xuất xytokin đặc hiệu peptit Tau bằng ELISPOT

Việc sản xuất xytokin của các tế bào T đặc hiệu Tau393-408 [pS396/pS404] và Tau393-408 được đánh giá bằng ELISPOT. Các đĩa nitroxenluloza 96 giếng nhiều rây (Millipore, Molsheim, France) được phủ qua đêm với các kháng thể đơn dòng kháng IFN- γ và IL-4 của chuột theo chỉ dẫn của nhà sản xuất (Pharmingen BD, San Diego, CA, USA). Các huyền phù tế bào đơn được tạo ra từ các lá lách của chuột đã gây miễn dịch và ủ ở các dung dịch pha loãng theo bậc với Tau393-408 [pS396/pS404] và Tau393-408 (10 và 1 $\mu\text{g/ml}$) và Concavalin A (5 $\mu\text{g/ml}$, Amersham) ở 37°C trong CO₂ 5% trong 72

giờ. Sau đó các đĩa được rửa và được ủ trong 1 giờ ở 37°C với các kháng thể đơn dòng kháng IFN- γ và IL-4 của chuột được biotinyl hoá. Sau khi rửa, các đĩa được ủ trong 1 giờ ở 37°C với Streptavidin-HRP và sau khi rửa, các vết được hiện bằng cách bổ sung (chất nền AEC, 3-amino-9-ethylcarbazol). Số các vết trên một giếng được đếm bằng mắt dưới kính hiển vi lập thể và các kết quả được biểu hiện là các vết trên 10^6 tế bào. Lá lách của chuột chưa quen thí nghiệm được sử dụng làm các đối chứng âm tính.

8.1.6 Thử nghiệm tăng sinh tế bào không phóng xạ

Các huyền phù tế bào đơn được tạo ra từ các lá lách của chuột đã gây miễn dịch và ủ trong các dung dịch pha loãng theo bậc với Tau393-408 [pS396/pS404] và Tau393-408 (10 và 1 $\mu\text{g/ml}$) và Concavain A (5 $\mu\text{g/ml}$, Amersham) ở 37°C dưới CO_2 5% trong 72 giờ. Để đánh giá sự tăng sinh, kit thử nghiệm tăng sinh tế bào không phóng xạ (MTT) được sử dụng (Promega, Dubendorf, Switzerland), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Một cách vắn tắt, 15 μl dung dịch thuốc nhuộm được thêm vào từng giếng và các đĩa được ủ trong 4 giờ ở 37°C. Tiếp theo, 100 μl các dung dịch làm ổn định/hãm được thêm vào mỗi giếng và các đĩa được ủ ở 4°C trong tối thiểu thêm 1 giờ. O.D. được xác định ở các độ dài bước sóng là 570 nm và 690 nm.

8.2. Các kết quả

8.2.1 Đánh giá đáp ứng kháng thể được kích thích bởi các vacxin khác nhau

Vacxin ACI-35 kích thích đáp ứng IgG kháng pTau393-408 [pS396/pS404] mạnh sau khi tiêm vào trong màng bụng hoặc dưới da không phụ thuộc vào quy trình sử dụng. Nói chung các độ chuẩn kháng thể mạnh đã có mặt vào 7 ngày sau lần gây miễn dịch bằng vacxin thứ nhất. Đối với cùng quy trình giống nhau có đáp ứng cao hơn đối với tiêm dưới da so với tiêm vào trong màng bụng trong d21 và d35 đối với các con vật đã tiêm chủng ACI. Quy trình L3

(Fig.14, 2-way Anova, $P < 0,001$ d21/d35) trong d21, d35 và d56 đối với các con vật đã tiêm chủng ACI Quy trình A (Fig.14, 2-way Anova, $P < 0,001$ d21/d35, $P < 0,01$ d56). Đối với các con vật đã tiêm vào trong màng bụng, đáp ứng cao hơn với ACI Quy trình L3 so với ACI Quy trình A ngay khi lấy máu ở d7 và d21 (Fig.14, 2-way Anova, $P < 0,001$ d7/d21) trong khi không có sự khác biệt đối với các con vật đã tiêm dưới da. Tóm lại, hai quy trình dường như tương đương khi chúng được tiêm dưới da.

Các phân tích về các kết quả với dung dịch pha loãng O.D. không bảo hoà khẳng định sự khác biệt giữa tiêm vào trong màng bụng và tiêm dưới da của quy trình tiêm chủng ACI-35. Tóm lại, các kết quả vẫn giống nhau chứng tỏ rằng tiêm dưới da tạo ra các độ chuẩn Ab cao hơn khi tiêm vào trong màng bụng và rằng đối với tiêm dưới da không có các khác biệt đáng kể giữa 2 quy trình.

Để xác định các isotyp của các kháng thể kích thích bởi vaccin, huyết tương từ d35 được phân tích bằng ELISA IgG đặc hiệu isotyp. ACI-35 kích thích ở tất cả các nhóm kháng IgG pTau393-408 [pS396/pS404] của các isotyp IgG1, IgG2a, IgG2b và IgG3. IgG2b là isotyp trội với O.D. cao ngay cả với tỷ lệ pha loãng là 1/3200. Đối với nhóm phụ IgG1 có đáp ứng cao hơn cho tiêm dưới da so với tiêm vào trong màng bụng đối với cả hai quy trình (Fig.15, 1-way Anova, $P < 0,05$). Sự khác biệt như nhau được thấy đối với nhóm phụ IgG3. Đối với nhóm phụ IgG2a và 2b không có khác biệt giữa 2 quy trình thử nghiệm hoặc giữa tiêm vaccin dưới da hoặc tiêm vaccin trong màng bụng.

Không có khác biệt giữa 2 quy trình thử nghiệm về các đáp ứng kháng thể IgM kháng pTau393-408 [pS396/pS404] trong khi có các độ chuẩn IgM cao hơn đáng kể khi tiêm vào trong màng bụng so với tiêm dưới da (Fig.16a, 1-way Anova, $P < 0,001$).

Các độ chuẩn kháng thể chống lại Tau393-408 không phospho cũng được phân tích cho tất cả các nhóm. Các kháng thể IgG đặc hiệu kháng Tau393-408

được phát hiện đối với tất cả các nhóm nhưng các độ chuẩn đó thấp hơn kháng pTau393-408 [pS396/pS404]. Không có khác biệt về các độ chuẩn IgG kháng Tau393-408 giữa 2 quy trình hoặc cách tiêm (Fig.16b, 1-way Anova, $P>0,05$).

Giá trị trung bình của ba độ chuẩn IgG thứ nhất đối với các peptit tau khác nhau được thể hiện trong Bảng 12:

Bảng 12: Giá trị trung bình của ba độ chuẩn đầu tiên kháng IgG Tau393-408 [pS396/pS404] (O.D. với tỷ lệ pha loãng 1/100)

Vaccin peptit pTau	Quy trình tạo ra vaccin	Cách tiêm	d7	d21	d35	Số trung bình
Tau393-408 [pS396/pS404]	ACI L3	i.p.	1,899	2,284	1,825	2,003
		s.c.	1,485	2,956	2,444	2,295
	ACI A	i.p.	0,902	1,467	1,708	1,359
		s.c.	1,276	2,964	2,426	2,222

8.2.2 Đánh giá đáp ứng tế bào T được kích thích bởi ACI-35

Việc kích thích lại *in vitro* các tế bào lách bằng ConA, các peptit pTau393-408 [pS396/pS404] hoặc Tau393-408 không tạo ra sự khác biệt về quá trình tăng sinh giữa các nhóm thử nghiệm (Fig.17) trong khi nó dương tính đối với ConA.

Việc kích thích lại nhờ sử dụng 10 ug/ml Tau393-408 [pS396/S404] kích thích tiết xytokin cao hơn đối với các tế bào lách của chuột đã tiêm chủng so với chuột chưa quen thí nghiệm (Fig.18). Chuột được tiêm dưới da ACI Quy trình L3 kích thích cả hai xytokin ở mức cao được phân tích với sự khác biệt không rõ ràng giữa IFN- γ và IL-4. Cách tiêm vào trong màng bụng (i.p) hoặc dưới da (s.c) ACI Quy trình A kích thích tiết xytokin mà chủ yếu là IL-4 và các mức là cao hơn đối với tiêm vào trong màng bụng. Việc kích thích lại nhờ sử dụng 1 ug/ml Tau393-408 [pS396/S404] khiến cho các kết quả có thể so sánh với kích thích lại nhờ sử dụng 10 ug/ml Tau393-408 [pS396/S404].

Việc kích thích lại nhờ sử dụng peptit không pTau939-408 tạo ra các kết quả có thể so sánh với các peptit pTau (Fig.18). Ngoài ra, sử dụng ACI Quy trình A kích thích tiết xytokin mà chủ yếu là IL-4.

8.3. Kết luận

Vacxin ACI-35 kích thích các độ chuẩn IgG mạnh trước hết sau 1 lần gây miễn dịch không phụ thuộc vào quy trình hoặc cách tiêm thử nghiệm. Theo quan điểm so sánh, việc tiêm các vaccin dưới da không phụ thuộc vào quy trình đã sử dụng tạo ra các độ chuẩn của các kháng thể IgG cao hơn. Việc tiêm ACI-35 trong màng bụng ACI Quy trình A làm cho các độ chuẩn IgG1 và IgG3 kém hơn so với nhóm khác. Việc tiêm ACI-35 trong màng bụng làm cho các độ chuẩn IgM cao hơn đáng kể so với tiêm dưới da. Cuối cùng, tất cả các nhóm có các độ chuẩn IgG chống lại peptit không pTau393-408.

Việc kích thích lại nhờ sử dụng pTau hoặc các peptit tau kích thích việc sản xuất xytokin trong thử nghiệm ELISPOT mà chủ yếu là IL-4 đối với chuột đã tiêm chủng ACI Quy trình A.

Ví dụ 9: Tính sinh miễn dịch của vaccin tau ở chuột chuyển gen Tau P3Q1L (TPLH)

Mục đích của nghiên cứu này là để phân tích tính sinh miễn dịch của việc tiêm chủng kháng Tau nhờ tiêm dưới da (s.c.) các vaccin tau liposom (ACI-33, ACI-35, ACI-39 và ACI-40) ở chuột chuyển gen Tau P301L.

9.1. Phương pháp

9.1.1 Chuột chuyển gen Tau P3Q1L (TPLH)

Chuột chuyển gen đồng hợp tử Tau P301L (TPLH) với chất nền FVB/N được sử dụng để thử nghiệm tính hiệu quả của quá trình tiêm chủng dưới da ACI-33 hoặc ACI-35. Các con chuột này biểu hiện isoform tau dài nhất ở người với đột biến P301L dưới sự điều khiển của trình tự khởi đầu thy1 của chuột. Các triệu chứng lâm sàng bắt đầu ở từ 6 đến 7 tháng tuổi, và chuột TPLH lão hoá phát triển bệnh tau suy tàn có sự suy yếu thần kinh tiến triển và hình thành các mớ rối sợi thần kinh (NFT). Trong các giai đoạn kết thúc chúng mất trọng lượng

và chết đột ngột (có lẽ do các vấn đề hô hấp (ngạt), phần lớn trong số đó là từ 9 đến 11 tháng tuổi và không có ngoại lệ trước 12 tháng.

9.1.2 Bào chế vacxin ACI-33 và ACI-35

Các vacxin được bào chế theo quy trình A mô tả trong Ví dụ 3.

Huyền phù liposom (mẻ ACI-33-081031-A và mẻ ACI-35-081015-A + ACS-35-090402-A) sau đó được chia nhỏ trước khi giữ ở 2-8°C. Tỷ số mol peptit/phospholipit cuối cùng là 1:100.

9.1.3 Gây miễn dịch ACI-33, ACI-39 và ACI-40

Chuột TPLH khoảng 21 và 31 tuần (8-10 chuột trên mỗi nhóm: lẫn lộn giữa chuột cái (♀) và chuột đực (♂) đã tiêm dưới da vacxin vào năm thời điểm (Bảng 14). Ba lần gây miễn dịch đầu tiên được tiến hành với khoảng cách mỗi lần tiêm là 2 tuần (ngày(d)0, d13, d28) theo Sơ đồ 1. Sau đó các con chuột được tiêm củng cố một lần mỗi tháng trong hai tháng (d91 và d133). 1 ngày (d-1) trước các lần gây miễn dịch thứ nhất rồi sau các lần gây miễn dịch thứ hai (d27) và thứ ba (d41), các mẫu máu được thu gom. Việc thu thập máu cũng được tiến hành trước, giữa và sau các lần tiêm củng cố (d76, d104, d135). Huyết thanh được tạo ra bằng máu bằng cách để các mẫu đông cục qua đêm sau đó lấy dịch nổi sau khi làm ly tâm. Các chuẩn độ kháng thể IgG và IgM đặc hiệu phosphopeptit tau và các mẫu isotyp IgG được xác định bằng ELISA. Các chuẩn độ của các kháng thể IgG đặc hiệu đối với protein Tau không pTau, protein Tau có độ dài đầy đủ (441 aa) và protein Tau có độ dài đầy đủ (441 aa) được phosphoryl hoá cũng được xác định bằng ELISA.

ACI-35

Chuột TPLH khoảng 22 đến 31 tuần (10 con chuột mỗi nhóm: trộn lẫn giữa (♀) và chuột đực (♂) đã tiêm dưới da vacxin vào năm thời điểm (Bảng 13).

Ba lần gây miễn dịch đầu tiên được tiến hành với khoảng cách giữa mỗi lần tiêm là 2 tuần (ngày(d)0, d13, d27) theo Sơ đồ 1. Sau đó, các con chuột được tiêm củng cố mỗi tháng một lần trong hai tháng (d91 và d133). 1 ngày (d-1) trước các lần gây miễn dịch thứ nhất rồi sau các lần gây miễn dịch thứ hai (d26) và thứ ba (d40), các mẫu máu được thu gom. Việc thu thập máu cũng được tiến hành trước, giữa và sau các lần tiêm củng cố (d75, d103, d145, d155). Huyết thanh được tạo ra bằng máu bằng cách để các mẫu đông cục qua đêm sau đó lấy dịch nổi sau khi làm ly tâm. Các chuẩn độ kháng thể IgG và IgM đặc hiệu Tau393-408 [pS396/pS404] và các mẫu isotyp IgG được xác định bằng ELISA. Các chuẩn độ của các kháng thể IgG đặc hiệu đối với protein Tau không pTau393-408, có độ dài đầy đủ (441 aa) và protein Tau có độ dài đầy đủ (441 aa) được phosphoryl hoá cũng được xác định bằng ELISA.

Bảng 13: Gây miễn dịch cho chuột

Nhóm	Số chuột và giới tính	Điều trị/thể tích ^a	Mẻ vacxin	Cách sử dụng ^b	Mức liều Khối lượng của peptit ug/liều ^c	Khối lượng của MPLA ug/liều ^c
1	5♀	ACI-33	ACI-33-081031-A	s.c.	9	12
	5♂	0,2 ml				
	5♀	PBS	N.A	dưới da	N.A	N.A
	5♂	0,2ml				
2	5♀	ACI-35	ACI-35-081015-A	dưới da	16	23
	5♂	0,2 ml	ACI-35-081015-A		8	27

	5♀	PBS	N.A	dưới da	N.A	N.A
	5♂	0,2ml				
3	5♀	ACI-39	ACI-39-090202-A	dưới da	9,6	28,6
	5♂	0,2 ml				27
	5♀	PBS	N.A	dưới da	N.A	N.A
	5♂	0,2ml				
4	5♀	ACI-40	ACI-40-090202-A	dưới da	12	24,4
	5♂	0,2 ml				27
	5♀	PBS	N.A	dưới da	N.A	N.A
	5♂	0,2ml				

N.A. = không áp dụng

^a: thể tích theo lý thuyết

^b: s.c: dưới da:

^c: khối lượng đã đo được xác định sau phân tích

9.1.4 Xác định số lượng các kháng thể đặc hiệu peptit Tau

Đối với chuột đã xử lý ACI-33, ACI-39 và ACI-40, các kháng thể IgG đặc hiệu đối với Tau5-20 [pY18], Tau206-221 [pT212, pS214] và Tau196-211 [pS202, pT205] tương ứng được xác định bằng ELISA trong 6 mẫu huyết thanh. IgG đặc hiệu Tau5-20, protein Tau có độ dài đầy đủ (441 aa) và protein Tau có độ dài đầy đủ (441 aa) được phosphoryl hoá được xác định trong huyết thanh từ d-1 và d41. Các kháng thể isotyp IgM và IgG đặc hiệu phospho-peptit tau được xác định bằng ELISA trong mẫu huyết thanh d41.

Đối với chuột đã xử lý ACI-35, các kháng thể IgG đặc hiệu đối với Tau393-408 [pS396/pS404] được xác định bằng ELISA trong 7 mẫu huyết thanh. IgG đặc hiệu Tau393-408, protein Tau có độ dài đầy đủ (441 aa) và protein Tau có độ dài đầy đủ (441 aa) được phosphoryl hóa được xác định trong huyết thanh từ d-1 và d40. Các kháng thể isotyp IgM và IgG đặc hiệu Tau393-408 [pS396/pS404] được xác định bằng ELISA trong mẫu huyết thanh d40.

Các đĩa được phủ 10 ug/ml peptit Tau tương ứng và 1 ug/ml peptit Tau tương ứng qua đêm ở 4°C. Sau khi rửa mỗi giếng bằng PBS-0,05% Tween 20 và phong bế bằng 1% BSA trong PBS-0,05% Tween 20, các dung dịch huyết thanh pha loãng theo bậc được thêm vào các đĩa và ủ ở 37°C trong 2 giờ. Sau khi rửa, các đĩa được ủ bằng kháng thể toàn bộ kháng IgG chuột tiếp hợp với phosphatasa kiềm (AP) (Jackson Laboratories, Baltimore, PA, USA) hoặc các kháng thể đặc hiệu isotyp (kháng IgM chuột tiếp hợp với peroxidaza cây cải ngựa (HRP), kháng IgG1 chuột tiếp hợp với AP, kháng IgG3 chuột tiếp hợp với biotin, do Pharmingen BD San Diego, CA, USA cung cấp; kháng IgG2a chuột tiếp hợp với biotin do Invitrogen CA, USA cung cấp và kháng IgG2b chuột tiếp hợp với HRP do Zymed Laboratories, San Francisco, CA cung cấp) trong 2 giờ ở 37°C. Sau khi rửa, các đĩa được ủ bằng pNPP (para-nitro-phenyl-phosphat), chất nền phosphatasa đối với AP, hoặc ABTS (2,2'-azino-bis(axit 3-etylbenz-thiazolin-6-sulphonic)), chất nền đối với HRP và đọc ở bước sóng 405 nm nhờ sử dụng đầu đọc đĩa ELISA. Bước bổ sung được tiến hành cho các kháng thể tiếp hợp với biotin, trong đó các đĩa được ủ trong 45 phút trong streptavidin-HRP (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) trước khi dò bằng ABTS. Các kết quả được thể hiện ở dạng O.D. (Mật độ quang học) với O.D. không bão hoà đối với các isotyp IgG, IgG và IgM.

9.1.5 Gắn kết của các kháng thể kháng Tau với các mô rối Tau trên các lát cắt não của động vật chuyển gen (TAUPIR)

Gắn kết của các kháng thể có mặt trong huyết thanh của các con vật đã tiêm chủng ACI-33, ACI-35, ACI-39 và ACI-40 với các mớ rối Tau trên các lát cắt não được tiến hành bằng TAUIR.

Việc nhuộm TAUIR được tiến hành theo phương pháp từ Ví dụ 5.1.5.

9.1.6 Thẩm tách Western (WB)

Phép thẩm tách Western được tiến hành theo phương pháp của Ví dụ 5.1.6 ngoại trừ bước rửa được tiến hành trước khi dò với dung dịch tiếp hợp Qdot 625 streptavidin (Invitrogen, CA, USA) trong 30-60 phút ở nhiệt độ trong phòng.

9.2. Các kết quả

9.2.1 Đáp ứng của kháng thể IgG

Tất cả các cấu trúc vacxin tạo ra các độ chuẩn kháng thể IgG đặc hiệu.

Vacxin ACI-33 kích thích đáp ứng IgG đặc hiệu sau khi tiêm dưới da. Sau 2 lần gây miễn dịch (d27), đáp ứng IgG vẫn giữ ổn định mà không tăng khi gây miễn dịch lần ba (d41) (Fig.19 1-way Anova $P < 0,001$ d-1 so với d27, $P > 0,05$ d27 so với d41). Các chuẩn độ kháng thể giảm được thấy ở d76 (Fig.19, 1-way Anova $P < 0,001$ d41 so với d76) và việc tiêm củng cố cho các con chuột làm tăng lại một chút các chuẩn độ ở d104.

Vacxin ACI-35 kích thích đáp ứng IgG kháng-Tau393-408 [pS396/pS404] sau khi tiêm dưới da. Sau 2 lần gây miễn dịch (d26), đáp ứng IgG không tăng khi gây miễn dịch lần ba (d40) (Fig.20 1-way Anova $P < 0,001$ d-1 so với d26 và d40). Việc tiêm củng cố các con chuột làm tăng lại các chuẩn độ ở d103 (Fig.20, 1-way Anova $P < 0,05$ d-1 so với d104 và $P < 0,001$ d-1 so với d145).

Vaxxin ACI-39 kích thích đáp ứng IgG kháng Tau206-221 [pT212, pS214] sau khi tiêm dưới da. Sau 2 lần gây miễn dịch (d27), đáp ứng IgG vẫn giữ ổn định mà không tăng khi gây miễn dịch lần ba (d41) (Fig.21 1-way Anova $P < 0,001$ d-1 so với d26/d41). Có sự giảm các chuẩn độ ở d76 và việc tiêm củng cố các con chuột khôi phục các chuẩn độ tới mức tương tự sau 3 lần gây miễn dịch (Fig.21, 1-way Anova $P < 0,05$ d-1 so với d76 và $P > 0,05$ d-41 so với d104).

Phân tích các kết quả ở tỷ lệ pha loãng O.D. không bão hoà thể hiện các kết luận tương tự như tỷ lệ pha loãng ở mức 1/100 bão hoà (1-way Anova $P < 0,05$ d-1 so với d27/d41/d104 và $P > 0,05$ d-1 so với d76).

Vaxxin ACI-40 kích thích đáp ứng IgG kháng Tau 196-211 [pS202, pT205] sau khi tiêm dưới da. Sau 2 lần gây miễn dịch (d27), đáp ứng IgG vẫn giữ ổn định mà không tăng khi gây miễn dịch lần thứ ba (d41) (Fig.22 1-way Anova $P < 0,001$ d-1 so với d27, $P > 0,05$ d27 so với d41). Sự giảm các chuẩn độ được thấy ở d76 (Fig.22, 1-way Anova $P < 0,001$ d41 so với d76) và việc tiêm củng cố các con chuột làm tăng lại một chút các chuẩn độ ở d104.

Phân tích các kết quả ở tỷ lệ pha loãng O.D. không bão hoà thể hiện các kết luận tương tự như tỷ lệ pha loãng 1/100 bão hoà (1-way Anova $P < 0,001$ d-1 so với d27 và $P > 0,05$ d-27 so với d41 và $P < 0,01$ d.41 so với d76).

9.2.2. Phân tích isotyp

Tiêm chủng ACI-33 kích thích các chuẩn độ kháng thể mà chủ yếu là thuộc các nhóm phụ Ig2a và 2b sau 3 lần gây miễn dịch dưới da (Fig.23). Mức IgG1, IgG3 và IgM thấp và có sự khác biệt đáng kể giữa các mức IgG2a/2b và IgG1/IgM (Fig.23, 1-way Anova $P < 0,05$ IgG1 so với IgG2a/2b, $P < 0,001$ IgM so với IgG2a/2b).

Tiêm chủng ACI-35 kích thích các chuẩn độ kháng thể mà chủ yếu là thuộc các nhóm phụ IgG2a và 2b sau 3 lần gây miễn dịch dưới da (Fig.24). Mức

IgG1 thấp hơn với sự khác biệt đáng kể giữa IgG1 và IgG2a (Fig.24, 1-way Anova $P < 0,05$ IgG1 so với IgG2a). Mức IgG3 và IgM thấp và có sự khác biệt đáng kể giữa các mức IgG2a/2b và IgG3 /IgM (Fig.24, 1-way Anova $P < 0,05$ IgG3 /IgM so với IgG2b, $P < 0,0001$ IgG3 /IgM so với IgG2a).

Tiêm chủng ACI-39 kích thích các chuẩn độ kháng thể mà chủ yếu là thuộc các nhóm phụ IgG2a và 2b sau 3 lần gây miễn dịch dưới da (Fig.25). Mức IgG1, IgG3 và IgM thấp hơn đáng kể so với các chuẩn độ IgG2a/2b (Fig.25, 1-way Anova $P < 0,05$ IgG2b so với IgG1/IgG3 , $P < 0,01$ IgG2a so với IgG1/IgG3 , $P < 0,001$ IgG2a/2b so với IgM).

Tiêm chủng ACI-40 kích thích các chuẩn độ kháng thể mà chủ yếu là thuộc nhóm phụ IgG2b sau 3 lần gây miễn dịch dưới da (Fig.26, 1-way Anova $P < 0,05$ IgG2b so với IgG2a và $P < 0,001$ IgG2b so với IgG1/IgG3 /IgM). Các chuẩn độ IgG2a cũng cao hơn IgM (Fig.26, 1-way Anova $P < 0,01$ IgG2a so với IgM).

9.2.3 Tính đặc hiệu kháng thể

Các chuẩn độ IgG kích thích sau 3 lần tiêm dưới da các vacxin tau cũng được phân tích đối với các peptit Tau khác nhau (peptit pTau và peptit Tau) và các protein (kháng protein Tau có độ dài đầy đủ (441 aa) được phosphoryl hoá = kháng protein pTau và kháng protein Tau có độ dài đầy đủ (441 aa) = kháng protein Tau).

Ở chuột đã tiêm chủng ACI-33, máu lấy d-1 được sử dụng làm đối chứng và đối với mỗi chất bao khác nhau có sự khác biệt giữa máu lấy trước và huyết thanh lấy sau 3 lần gây miễn dịch đối với các chất bao Tau5-20 [pY18] và protein Tau (Fig.27, 1-way Anova $P < 0,001$ d-1 so với d41 đối với Tau5-20 [pY18], $P < 0,05$ d-1 so với d41 đối với protein Tau).

Ở chuột đã tiêm chủng ACI-35, máu lấy d-1 được sử dụng làm đối chứng và có sự khác biệt đáng kể giữa d-1 và d40 đối với các chuẩn độ kháng Tau393-408 [pS396/pS404] (Fig.28, 1-way Anova $P < 0,0001$ d-1 so với d40 đối với các chuẩn độ kháng Tau393-408 [pS396/pS404]). Các mức kháng thể d40 thu được đối với peptit Tau393-408 [pS396/pS404] cũng khác biệt đáng kể so với các mức thu được đối với tất cả các chất bao khác (Fig.28, 1-way Anova $P < 0,0001$ d40 kháng Tau393-408 [pS396/pS404] so với d40 kháng Tau393-408/protein pTau/protein Tau).

Ở chuột đã tiêm chủng ACI-39, máu lấy d-1 được sử dụng làm đối chứng và chỉ đối với chất bao Tau206-221 [pT212, pS214] có sự khác biệt giữa máu lấy trước và huyết thanh lấy sau 3 lần gây miễn dịch (Fig.29; 1-way Anova $P < 0,001$ d-1 so với d41 đối với Tau206-221 [pT212, pS214]).

Ở chuột đã tiêm chủng ACI-40, máu lấy d-1 được sử dụng làm đối chứng và có sự khác biệt giữa máu lấy trước và huyết thanh lấy sau 3 lần gây miễn dịch đối với các chất bao Tau 196-211 [pS202, pT205] và Tau 196-211 (Fig.30, 1-way Anova $P < 0,001$ d-1 so với d41 đối với Tau 196-211 [pS202, pT205], $P < 0,05$ d-1 so với d41 đối với Tau 196211).

Huyết thanh chuột còn được sử dụng trong các thử nghiệm TAUPIR để xác định nếu có các kháng thể kháng Tau có mặt trong huyết thanh có thể nhận dạng các mô rối trong các lát cắt não từ động vật chuyển gen Tau.

WB đối với chất chiết não của chuột khác nhau cũng được tiến hành nhờ sử dụng huyết thanh chuột hoặc dò kháng thể đối chứng Tau-5 tất cả dạng Tau (pTau và Tau).

Dữ liệu được tóm tắt trong Bảng 14 dưới đây.

Bảng 14: tóm tắt về thử nghiệm TAUPIR và WB đối với chuột đã tiêm chủng

TPLH

Vaxxin	TAUPIR (dương tính/toàn bộ chuột)	Thẩm tách Western (dương tính/toàn bộ chuột)
ACI-33	6/10	3/9
ACI-35	4/10	0/4
ACI-39	7/10	1/5
ACI-40	10/10	3/7

9.3. Kết luận

Các chuẩn độ kháng thể kháng tau được phân tích về sự gắn kết của chúng với các peptit Tau và pTau khác nhau cũng như protein pTau hoặc Tau có độ dài đầy đủ. Việc gây miễn dịch Tau liposom tạo ra các kháng thể IgG gắn kết đặc hiệu với các peptit pTau và phospho-protein tau với khả năng gắn kết yếu với các protein và peptit không được phosphoryl hoá.

Đối với các isotyp IgG có đáp ứng kháng thể IgG1 thấp so với IgG2b và IgG3. Đáp ứng IgM thấp được thấy tương ứng với kiểu gây miễn dịch (dưới da).

Tính đặc hiệu của các kháng thể được tạo thành bởi chuột đã gây miễn dịch bằng vaxxin tau được thử nghiệm trong TAUPIR và hầu như tất cả huyết thanh chuột thể hiện khả năng gắn kết cao với các mớ rối Tau có mặt trong các lát cắt não đối với các con chuột đột biến Tau.

Ví dụ 10: Hiệu quả ở mô hình chuột chuyển gen Tau P301L sau khi tiêm chủng ACI-33 hoặc ACI-35

Mục đích của thử nghiệm này là để phân tích hiệu quả của tiêm chủng kháng Tau nhờ tiêm dưới da (s.c.) các vaxxin ACI-33 (Tau5-20 [pY18]) hoặc ACI-35 (Tau393-408[pS396/pS404]) ở chuột chuyển gen Tau P301L. Chuột được gây miễn dịch 5 lần và các thay đổi tập tính được phân tích bằng các phân tích rotarod được tiến hành trong suốt thời gian sống của chuột.

10.1 Các phương pháp

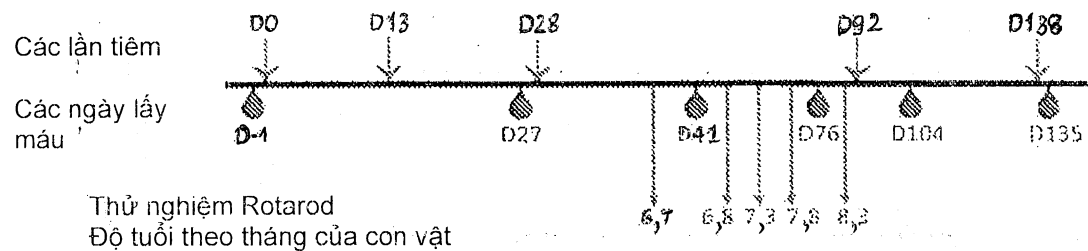
10.1.1 Bào chế vaccin

Các vaccin ACI-33 và ACI-35 được bào chế theo phương pháp của Ví dụ 3.

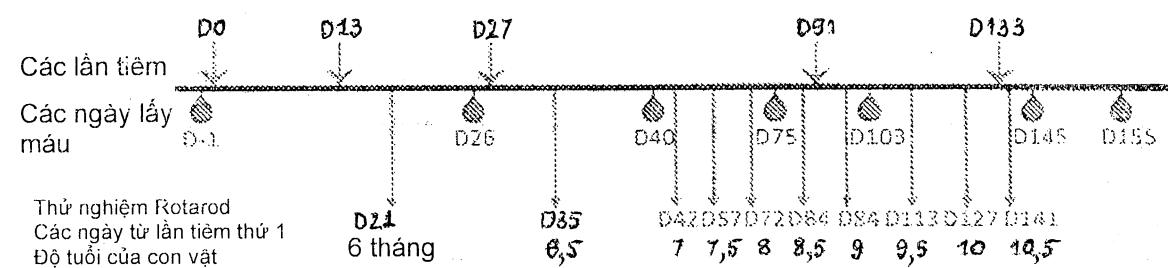
10.1.2 Gây miễn dịch

Các con chuột được gây miễn dịch bằng ACI-33 hoặc ACI-35 theo phương pháp mô tả trong Ví dụ 9 (sơ đồ 2 đối với ACI-33 và sơ đồ 3 đối với ACI-35).

Sơ đồ 2 chương trình gây miễn dịch, lấy máu và thử nghiệm rotarod đối với ACI-33



Sơ đồ 3 chương trình gây miễn dịch, lấy máu và thử nghiệm rotarod đối với ACI-35



10.1.3 Tập tính (rotarod)

Để quan sát tình trạng vận động của các con chuột, thử nghiệm rotarod tự động được tiến hành. Năm con chuột được thử nghiệm đồng thời trên thanh quay vòng (đường kính 3 cm), tách biệt bởi các bộ chia không trong mờ. Trong quá trình thử nghiệm, thanh quay được gia tốc từ 4 đến 40 vòng phút trong 5 phút. Đối với mỗi con chuột, thời gian giữ nguyên trên thanh quay vòng được ghi lại, trong tối đa 5 phút.

10.1 Các kết quả

Để đánh giá tình trạng vận động của TPLH sau khi xử lý bằng ACI-33 hoặc PBS, chuột được chuyển tới thử nghiệm rotarod vào năm thời điểm khác nhau (Fig.31). Khác biệt đáng kể giữa các con chuột được tiêm ACI-33 và PBS được thấy ở độ tuổi 7,3 tháng (Fig.31, 2-way Anova $P < 0,001$ 7,3 tháng tuổi). Hiệu quả của ACI-33 này lên tập tính vận động tương quan với các chuẩn độ kháng thể kháng Tau5-20 [pY18] trong huyết thanh chuột ở 7,8 tháng tuổi (Fig.32, Spearman r $P < 0,001$). Để đánh giá tình trạng vận động các con chuột TPLH sau khi xử lý bằng ACI-35 hoặc PBS, chuột được chuyển tới thử nghiệm rotarod (Fig.33). Mặc dù không có khác biệt đáng kể giữa nhóm điều trị và nhóm đối chứng, nhưng dự đoán về hiệu quả ACI-35 có thể được thấy trong thử nghiệm rotarod tiến hành khi chuột 9,5 tháng tuổi (Fig.33, thử nghiệm Mann-Whitney $P = 0,1905$ 9,5 tháng tuổi).

10.3 Kết luận

Việc tiêm chủng ACI-33 ở chuột TPLH chứng tỏ hiệu quả đối với các thiếu hụt vận động của chuột trong thử nghiệm rotarod so với các con chuột tiêm PBS. Hiệu quả dương tương quan với các độ chuẩn kháng thể kháng Tau ở huyết thanh chuột.

Việc tiêm chủng ACI-35 ở chuột TPLH chứng tỏ xu hướng hiệu quả đối với các thiếu hụt vận động của chuột trong thử nghiệm rotarod ở 9,5 tháng tuổi so các con chuột tiêm PBS.

Ví dụ 11: Đáp ứng kháng thể kháng pTau ở chuột cái trụi

Mục đích của thử nghiệm này là để đánh giá đáp ứng kháng thể kháng pTau được kích thích bằng cách tiêm vacxin ACI-33 (Tau5-20 [pY18]) ở chuột cái trụi. Chuột trụi mang đột biến *Foxn1^{nu}*, có chức năng tế bào T giảm do thiếu tuyến ức có chức năng thích hợp. Vì vậy, mục đích của thử nghiệm này là phân tích có hay không đáp ứng kháng thể kích thích bởi ACI-33 là độc lập với tế bào T.

Chuột trụi với nền C57BL/6 và các con chuột để cùng một lứa kiểu đại tương ứng 11 đến 13 tuần tuổi được tiêm dưới da. Chuột được gây miễn dịch 3 lần với khoảng cách mỗi lần là 2 tuần và được lấy máu 1 tuần sau mỗi lần tạo miễn dịch. Các đáp ứng IgG kháng peptit pTau (Tau5-20 [pY18]) toàn phần được đánh giá bằng ELISA. Ngoài ra, mẫu isotyp của đáp ứng kháng thể được phân tích sau 3 lần gây miễn dịch để đánh giá sự phân bố của các nhóm phụ khác nhau của các IgG cũng như IgM. Các chuẩn độ kháng thể kháng lại protein không pTau (Tau5-20), protein Tau có độ dài đầy đủ (441aa) và protein Tau có độ dài đầy đủ (441aa) được phosphoryl hoá cũng được phân tích.

Để kiểm tra sự vắng mặt của các tế bào hỗ trợ T ở chuột trụi, tỷ lệ phần trăm của các tế bào $CD3^{+}/CD4^{+}$ được đánh giá bằng bộ chọn tế bào hoạt hoá nhờ huỳnh quang (FACS).

11.1 Các phương pháp

11.1.1 Bào chế vacxin ACI-33

Các vacxin ACI-33 được bào chế theo Ví dụ 3.

Huyền phù liposom (mã ACI-33-090818-A) sau đó được phân chia trước khi lưu giữ ở 2-8°C. Tỷ số mol peptit/phospholipit cuối cùng là 1:100. Các vacxin được chuyển tới JSW Life Sciences GmbH (Austria).

11.1.2 Gây miễn dịch

Tại JSW Life Sciences GmbH chuột trụi (B6.Cg-Foxn1nu/J) với nền C57BL/6 và các con chuột để cùng một lứa kiểu đại tương ứng (6 con ♀/nhóm) được tiêm ACI-33 dưới da vào 3 thời điểm với khoảng cách 2 tuần giữa mỗi lần sử dụng (ngày 0, 14, 28) theo Bảng 15. Các mẫu huyết tương được lấy từ tĩnh mạch/động mạch mắt được thu gom 7 ngày trước thời điểm 2, 4, 7, 21, 35 và 56 ngày sau các lần tiêm thứ nhất. Các chuẩn độ kháng thể IgG và IgM đặc hiệu Tau5-20 [pY18] và các mẫu isotyp IgG được xác định bằng ELISA. Các chuẩn độ kháng thể IgG đặc hiệu đối với protein không pTau5-20, protein Tau có độ dài đầy đủ (441aa) và protein Tau có độ dài đầy đủ (441aa) được phosphoryl hoá cũng được xác định bằng ELISA. Các mẫu máu cũng được thu gom vào d-7 cho phân tích FACS để xác định tỷ lệ phần trăm của các tế bào CD3+/CD4+.

11.1.3 Xác định số lượng các kháng thể đặc hiệu peptit Tau

Các kháng thể IgG đặc hiệu đối với Tau5-20 [pY18] được đánh giá bằng ELISA trong 5 mẫu huyết thanh (d2, d7, d21, d35 và d56). Tau5-20-, có độ dài đầy đủ (441 aa). IgG đặc hiệu protein Tau và protein Tau có độ dài đầy đủ (441 aa) được phosphoryl hoá được xác định trong huyết thanh từ d35. Các kháng thể isotyp IgM và IgG đặc hiệu Tau5-20 [pY18] được xác định bằng ELISA trong mẫu huyết thanh d35. Các đĩa được phủ 10 ug/ml Tau peptit tương ứng và 1 ug/ml protein Tau tương ứng qua đêm ở 4°C. Sau khi rửa mỗi giếng bằng PBS-0,05% Tween 20 và phong bế bằng 1% BSA trong PBS-0,05% Tween 20, các dung dịch huyết thanh pha loãng theo bậc được thêm vào các đĩa và ủ ở 37°C trong 2 giờ. Sau khi rửa các đĩa được ủ bằng kháng thể toàn bộ kháng IgG chuột được tiếp hợp phosphatase kiềm (AP) (Jackson Laboratories, Baltimore, PA,

USA) hoặc các kháng thể đặc hiệu isotyp (kháng thể kháng IgM chuột được tiếp hợp với peroxidaza cây cải ngựa (HRP), kháng thể kháng IgG1 chuột được tiếp hợp AP, kháng thể kháng IgG3 chuột được tiếp hợp với biotin, do Pharmingen BD San Diego, CA, USA cung cấp; kháng thể kháng IgG2a chuột được tiếp hợp với biotin do Invitrogen CA, USA cung cấp và kháng thể kháng IgG2b chuột được tiếp hợp HRP do Zymed Laboratories, San Francisco, CA cung cấp) trong 2 giờ ở 37°C. Sau khi rửa các đĩa được ủ bằng pNPP (para-nitro-phenyl-phosphat), chất nền phosphataza đối với AP, hoặc ABTS (2,2'-azino-bis(axit 3-ethylbenzthiazolin-6-sulphonic)), chất nền đối với HRP và đọc ở bước sóng 405 nm nhờ sử dụng đầu đọc đĩa ELISA. Bước bổ sung được tiến hành đối với các kháng thể được tiếp hợp với biotin, trong đó các đĩa được ủ trong 45 phút trong streptavidin-HRP (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) trước khi dò tìm nhờ sử dụng ABTS. Các kết quả được biểu hiện là O.D. (mật độ quang học) ở O.D. không bão hoà cho IgG, các isotyp IgG và IgM.

11.1.4 Xác định số lượng tế bào CD3+/CD4+

Các mẫu máu chuột được làm tan bằng amoni clorua cho tới khi sạch, sau đó làm ly tâm ở 400xg (4000m/s^2) trong 7 phút và các hạt được tạo huyền phù lại trong PBS chứa EDTA. Sau đó các tế bào được phong bế bằng chất phản ứng CD16/CD32 và nhuộm bằng các kháng thể CD4 (thể tiếp hợp PE) và CD3 (PE-Cy5) trong 30 ở 4°C. Các mẫu được rửa bằng PBS, tạo huyền phù lại trong dung dịch định hình (DB Cellfix pha loãng theo tỷ lệ 1:40 trong dòng BD FACS) và thu được bằng tế bào kế BD FACS Calibur. Tỷ lệ phần trăm của các tế bào cảnh vệ, mà được nhuộm dương tính đối với CD3+ và CD4+ (các tế bào hỗ trợ T) được đánh giá.

Bảng 15: Gây miễn dịch chuột

Nhóm	Số con chuột và	Điều trị/thể	Mề vacxin	Quy trình	Cách sử	Mức liều Khối	Khối lượng
------	--------------------	-----------------	--------------	--------------	------------	------------------	---------------

	giới tính	tích ^a			dụng ^b	lượng của T1 ug/liều ^c	của MPLA ug/liều ^c
1	6 ♀ chuột trụi	ACI- 33 0,2 ml	ACI- 33- 090818	ACI-A	s.c.	12,6	15,8
			A				
2	6 ♀ chuột kiểu dại (wt)	ACI- 33 0,2 ml	ACI- 33- 090818- A	ACI-A	s.c	12,6	15,8

^a: thể tích theo lý thuyết

^b: s.c: dưới da:

^c: khối lượng đã đo được xác định sau phân tích

11.2 Các kết quả

11.2.1 Các quan sát chung

Không có con chuột nào chết sớm và không có các tác dụng phụ nào do điều trị được báo cáo. Đối với tất cả các con chuột B6.Cg-Foxn1nu/J, phenotyp trụi thông thường có mặt, trong khi các con chuột đẻ cùng một lứa kiểu dại (wt) có lông bình thường.

11.2.2 Xác định số lượng tế bào CD3+/CD4+

Việc nhuộm CD3+/CD4+ tiếp theo phân tích FACS thể hiện sự giảm đáng kể về tổng số tế bào hỗ trợ T (các tế bào CD3+/CD4+) ở chuột trụi, so với các con chuột wt (Fig.34).

11.2.3 Phân tích đáp ứng miễn dịch

Các chuẩn độ kháng IgG Tau5-20 [pY18] tạo thành nhờ tiêm chủng ACI-33 được phân tích để nghiên cứu tính sinh miễn dịch của vaccin ở chuột wt và chuột trụi. Các chuẩn độ kháng IgG Tau5-20 [pY18] của chuột trụi được phân tích để nghiên cứu tính có hay không đáp ứng được kích thích bởi ACI-33 là độc lập đối với chức năng tế bào T. Vaccin kích thích đáp ứng kháng IgG Tau5-20 [pY18] ở chuột trụi và không có khác biệt đáng kể giữa đáp ứng kháng thể được kích thích với ACI-33 ở chuột wt hoặc chuột trụi vào tất cả các thời điểm thử nghiệm (Fig.35; 2-way ANOVA $P < 0,05$ cho tất cả các mẫu máu giữa chuột wt và chuột trụi).

Vaccin ACI-33 kích thích cả hai loại chuột và đáp ứng kháng IgG Tau5-20 [pY18] sau khi tiêm dưới da đã đạt đỉnh sau 2 lần gây miễn dịch (d27) (Fig.35).

Việc tiêm chủng ACI-33 kích thích các chuẩn độ kháng thể có profin giống nhau đối với nhóm phụ IgG và IgM khác nhau giữa chuột kiểu dại (wt) và chuột trụi dù không có các khác biệt đáng kể giữa hai loại chuột sau 3 lần gây miễn dịch vaccin dưới da (Fig.36, 1-way ANOVA $P > 0,05$ IgG1 ở chuột trụi so với IgG1 ở chuột wt, IgG2a/2b ở chuột trụi so với IgG2a/2b ở chuột wt, IgG3 ở chuột trụi so với IgG3 ở chuột wt, IgM ở chuột trụi so với IgM ở chuột wt). Ở cả hai loại chuột có mức IgG1 thấp hơn đáng kể so với IgG2b và IgM (Fig.36, 1-way ANOVA, chuột trụi: $P < 0,01$ IgG1 so với IgG2b hoặc IgM; chuột Wt: $P < 0,05$ IgG1 so với IgG2b hoặc IgM). Ngoài ra chuột trụi có mức IgG1 giảm đáng kể so với IgG3 (Fig.36, 1-way ANOVA, chuột trụi: $P < 0,05$ IgG1 so với IgG3) và mức IgG2a cũng thấp hơn so với IgG2b, IgG3 và IgM (Fig.36, 1-way ANOVA, chuột trụi: $P < 0,05$ IgG2a so với IgG2b, IgG3 hoặc IgM).

Các chuẩn độ IgG được kích thích sau ba lần tiêm ACI-33 dưới da cũng được phân tích đối với các peptit Tau khác nhau (kháng Tau5-20 [pY18] và kháng Tau5-20) và các protein (kháng protein Tau có độ dài đầy đủ (441aa)

được phosphoryl hoá = kháng protein tau và kháng protein Tau có độ dài đầy đủ (441 aa) = kháng protein Tau (Fig.37). Không có khác biệt về các chuẩn độ đối với các peptit và protein khác nhau giữa chuột trụi và chuột wt, ở nhóm chuột chuột trụi có sự khác nhau đáng kể giữa các chuẩn độ kháng Tau5-20 [pY18] cao hơn các chuẩn độ kháng Tau5-20 (Fig.37, 1-way ANOVA, $P < 0,05$ các chuẩn độ kháng Tau5-20 [pY18] so với các chuẩn độ kháng Tau5-20).

11.3 Kết luận

Mặc dù tỷ lệ phần trăm của các tế bào CD3+ và CD4+ nhỏ ở chuột trụi, thì vacxin ACI-33 vẫn kích thích đáp ứng IgG kháng Tau5-20 [pY18] mạnh. Tính ổn định của đáp ứng kháng thể và phân bố isotyp IgG là giống nhau ở chuột kiểu dại (wt) và chuột trụi đề xuất rằng các thông số này độc lập đối với các tế bào T trong phạm vi tiêm chủng ACI-33. So với chuột có hiệu lực miễn dịch, việc tạo miễn dịch ACI-33 kích thích chuẩn độ kháng thể giống nhau và động lực với profin IgG giống nhau ở chuột thiếu hụt tế bào T. Ngoài ra, các chuẩn độ kháng thể đối với các peptit Tau và protein khác nhau là giống nhau giữa chuột thiếu hụt tế bào T và có hiệu lực miễn dịch. Dữ liệu này chứng tỏ rằng ACI-33 kích thích đáp ứng kháng thể không phụ thuộc tế bào T ở cả chuột trụi và chuột wt.

Các tài liệu tham khảo

- Alving et al.,(1992) Infect. Immun. 60:2438-2444
- Asuni et al., (2007) J Neurosc. 27 (34), 9115-29
- Hodgson et al.,(1991) Bto/Technoloy, 9:421
- Khaw, B. A, etal. (1982) J, Nucl. Med, 23:1011-1019
- Lewis et al., (2000) Nature Genetics, 25 :402-405
- Masliah et al., (2005) Neuron, 46(6), 857-68
- Muhs et al., (2007) Proc Natl Acad Set USA, 104(23), 9810-5
- Muyllaert et al, (2006) Rev Neurol, 162(10), 903-907
- Muyllaert et al, (2008) Genes Brain Behav., Suppl. 1, 57-66
- Nicoiau et. al. (2002) Proc Natl. Acad. Sci USA 99, 2332-2337
- Nicoil et al., (2003) Nature Med, 9, 448-452
- Oddo et al., (2004) Neuron, 43, 321-332
- Queen et al.,(1989) Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032
- Ribe et al., (2005) Neurobiol Dis, 20(3), 814-22
- Roberson et al, (2007) Science, 316 (5825), 750-4
- Rosenmann et al., (2006) Arch Neurol, 63(10), 1459-67
- Rousseaux et al. Methods Enzymology, (1986), Academic Press 121:663-69
- Terwel et al., (2006) J Biol Chem, 280, 3963-3973
- Terwel et al, (2008) Am J pathol., 172(3), 786-98
- Urushitiani et al., (2007) Proc. Natl Acad Sci USA, 104(79, 2495-500
- Wagner et al (2002) Journal of Liposome Research Vol 12(3), pp 259 - 270

Lưu giữ:

Các dòng tế bào lai dưới đây được lưu giữ dưới tên AC IMMUNE S.A. tại "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig, Inhoffenstr. 7B, D-28124 Braunschweig, theo các quy định của Hiệp ước Budapest:

Tên tế bào lai	Số hiệu lưu giữ	Ngày lưu giữ
ACI-41-Ab1	DSM ACC3043	3 Tháng 3, 2010
2B6	DSM ACC3044	10 Tháng 3, 2010
3A8	DSM ACC3045	10 Tháng 3, 2010
4C1	DSM ACC3046	10 Tháng 3, 2010
5D10A3	DSM ACC3047	10 Tháng 3, 2010
6C10	DSM ACC3048	10 Tháng 3, 2010
6H1	DSM ACC3049	10 Tháng 3, 2010
7C2	DSM ACC3050	10 Tháng 3, 2010

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Peptit kháng nguyên có thể thu được từ protein tau được hoàn nguyên trong liposom, trong đó peptit kháng nguyên này được cải biến thông qua liên kết với gốc ưa chất béo hoặc kỵ nước mà tạo thuận tiện cho việc xen đoạn vào lớp kép lipid của liposom sao cho peptit kháng nguyên có mặt trên bề mặt của liposom, và trong đó peptit kháng nguyên bao gồm trình tự axit amin được chọn từ một trong số SEQ ID NO: 2 đến SEQ ID NO: 9, và các mảnh biến thể cải biến của chúng, mảnh biến thể cải biến này được cải biến nhờ thay thế hoặc làm khuyết bảo toàn ít nhất một nhưng không nhiều hơn 5 axit amin.
2. Peptit kháng nguyên theo điểm 1, trong đó peptit này có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch không phụ thuộc tế bào T và/hoặc đặc hiệu cấu hình.
3. Peptit kháng nguyên theo điểm 1, trong đó peptit kháng nguyên là SEQ ID NO: 5.
4. Peptit kháng nguyên theo điểm 1, trong đó gốc ưa chất béo hoặc kỵ nước là axit palmitic, axit stearic, axit myristic, axit lauric, axit oleic, axit linoleic, axit linolenic và cholesterol, hoặc 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidyletanolamin (DSPE).
5. Peptit kháng nguyên theo điểm 4, trong đó gốc ưa chất béo hoặc kỵ nước là axit palmitic.
6. Peptit kháng nguyên theo điểm 1, trong đó peptit kháng nguyên được liên kết với ít nhất bốn gốc ưa chất béo hoặc kỵ nước.
7. Dược phẩm bao gồm peptit kháng nguyên có thể thu được từ protein tau được hoàn nguyên trong liposom và chất mang dược dụng, trong đó peptit kháng nguyên này được cải biến thông qua liên kết với gốc ưa chất béo hoặc kỵ nước mà tạo thuận tiện cho việc xen đoạn vào lớp kép lipid của liposom sao cho peptit kháng nguyên có mặt trên bề mặt của liposom, và trong đó peptit

kháng nguyên bao gồm trình tự axit amin được chọn từ một trong số SEQ ID NO: 2 đến SEQ ID NO: 9, và các mảnh biến thể cải biến của chúng, mảnh biến thể cải biến này được cải biến nhờ thay thế hoặc làm khuyết đoạn bảo toàn ít nhất một nhưng không nhiều hơn 5 axit amin.

8. Được phẩm theo điểm 7, trong đó peptit kháng nguyên là SEQ ID NO: 5.

9. Được phẩm theo điểm 7, trong đó dược phẩm này còn bao gồm chất phụ trợ dược dụng, chất điều biến miễn dịch hoặc tổ hợp của chúng.

10. Được phẩm theo điểm 7, trong đó dược phẩm này còn bao gồm ít nhất một trong số chất pha loãng và tá dược.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> AC Immune SA

KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN

<120> Peptit kháng nguyên thu được từ protein Tau và được phẩm chứa peptit này

<130> P2654 PCT BS

<150> 09157303.0

<151> 2009-04-03

<160> 9

<170> Bảng sáng chế phiên bản 3.4

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> biến thể

<222> (18)..(18)

<223> /thay thế="serin phosphoryl hóa"

<220>

<221> biến thể

<222> (26)..(26)

<223> /thay thế="serin được phosphoryl hóa"

<400> 1

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

1

5

10

15

Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu

20

25

30

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> biến thể

<222> (14)..(14)

<223> / thay thế="tyrosin được phosphoryl hóa "

<400> 2

Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu
 1 5 10 15

<210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <220>
 <221> biến thể
 <222> (7)..(7)
 <223> / thay thế="threonin được phosphoryl hóa "
 <220>
 <221> biến thể
 <222> (9)..(9)
 <223> / thay thế="serin được phosphoryl hóa"
 <400> 3

Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg
 1 5 10 15

<210> 4
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <220>
 <221> biến thể
 <222> (7)..(7)
 <223> / thay thế="serin được phosphoryl hóa"
 <220>
 <221> biến thể
 <222> (10)..(10)
 <223> / thay thế="threonin được phosphoryl hóa"
 <400> 4

Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg
 1 5 10 15

<210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <220>

<221> biến thể
 <222> (4)..(4)
 <223> /thay thế="serin được phosphoryl hóa"
 <220>
 <221> biến thể
 <222> (12)..(12)
 <223> /thay thế="serin được phosphoryl hóa"
 <400> 5

Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu
 1 5 10 15

<210> 6
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <220>
 <221> biến thể
 <222> (4)..(4)
 <223> /thay thế="serin được phosphoryl hóa"
 <220>
 <221> biến thể
 <222> (9)..(9)
 <223> /thay thế="serin được phosphoryl hóa"
 <400> 6

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

<210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <220>
 <221> biến thể
 <222> (3)..(3)
 <223> /thay thế="serin được phosphoryl hóa"
 <220>
 <221> biến thể
 <222> (6)..(6)
 <223> / thay thế="threonin được phosphoryl hóa"
 <220>

<221> biến thể
 <222> (13)..(13)
 <223> / thay thế="threonin được phosphoryl hóa"
 <220>
 <221> biến thể
 <222> (15)..(15)
 <223> / thay thế="serin được phosphoryl hóa"
 <400> 7

Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu
 1 5 10 15
 Pro

<210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <220>
 <221> biến thể
 <222> (3)..(3)
 <223> / thay thế="serin được phosphoryl hóa"
 <400> 8

His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp
 1 5 10

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <220>
 <221> biến thể
 <222> (6)..(6)
 <223> / thay thế="serin được phosphoryl hóa"
 <400> 9

Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu
 1 5 10

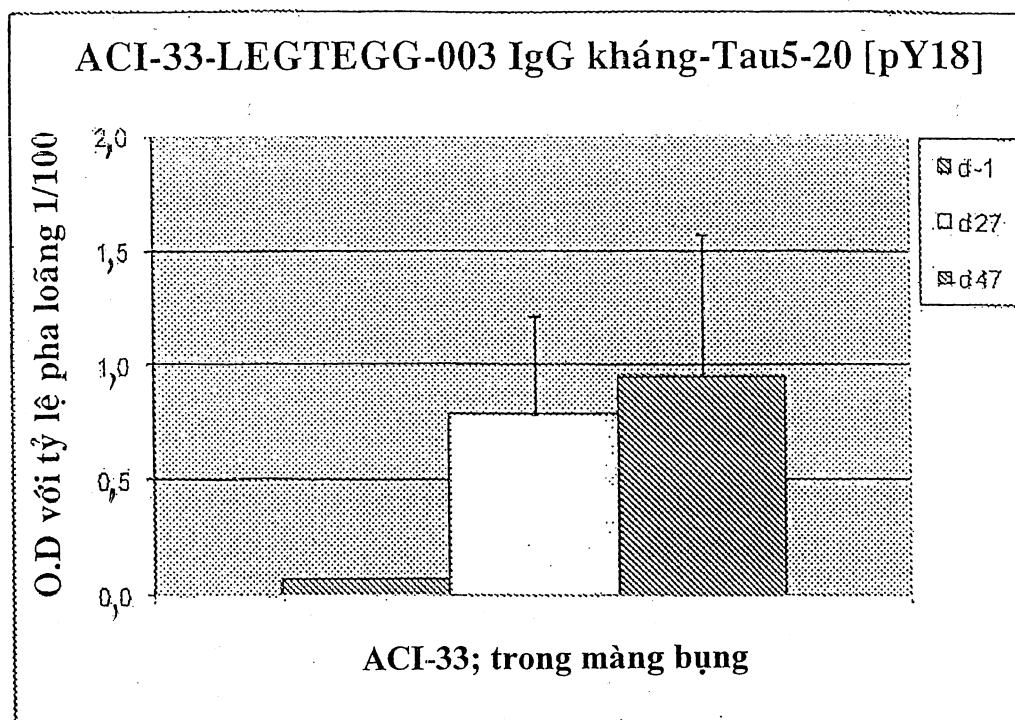


FIG.1a

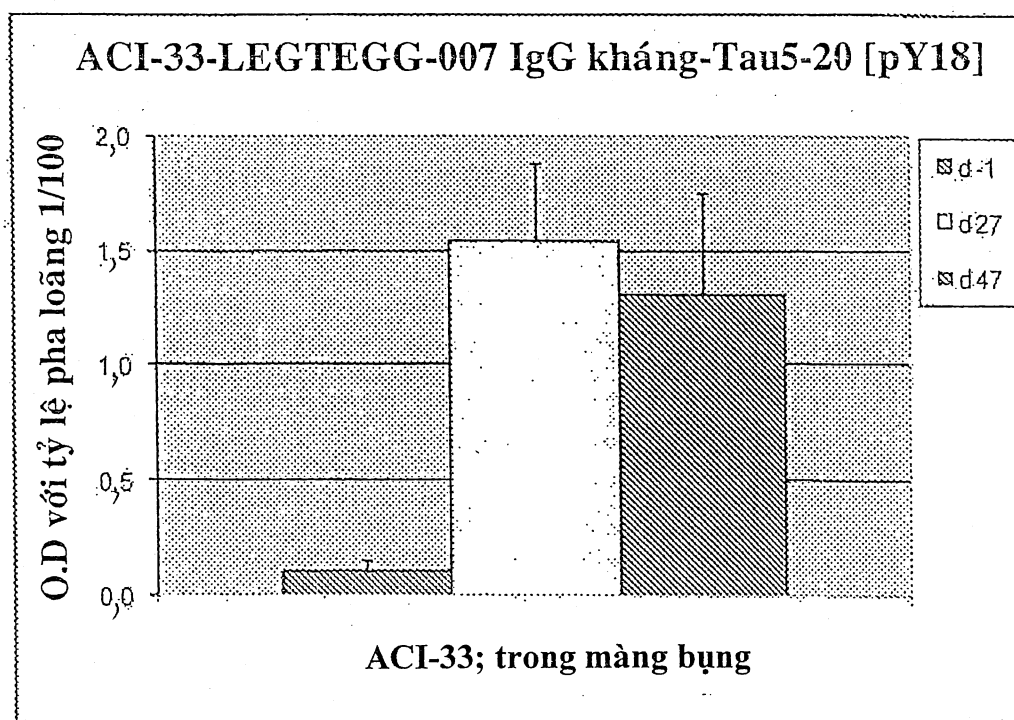


FIG.1b

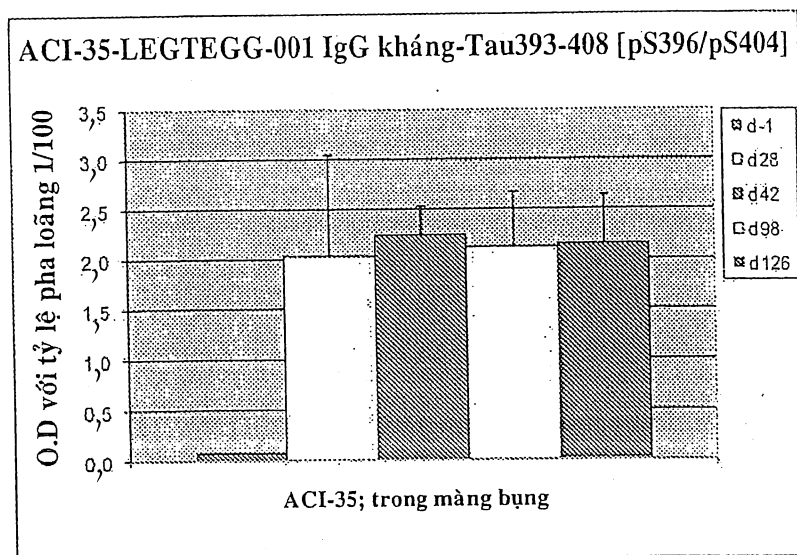


FIG.2a

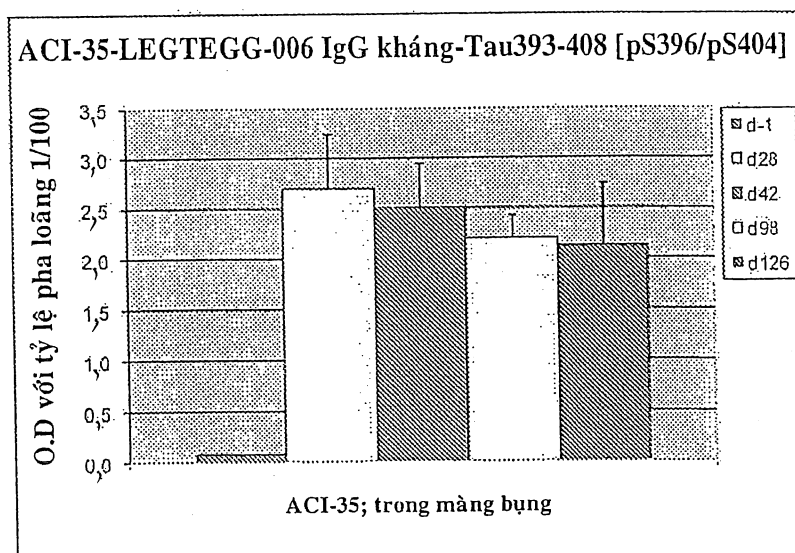


FIG.2b

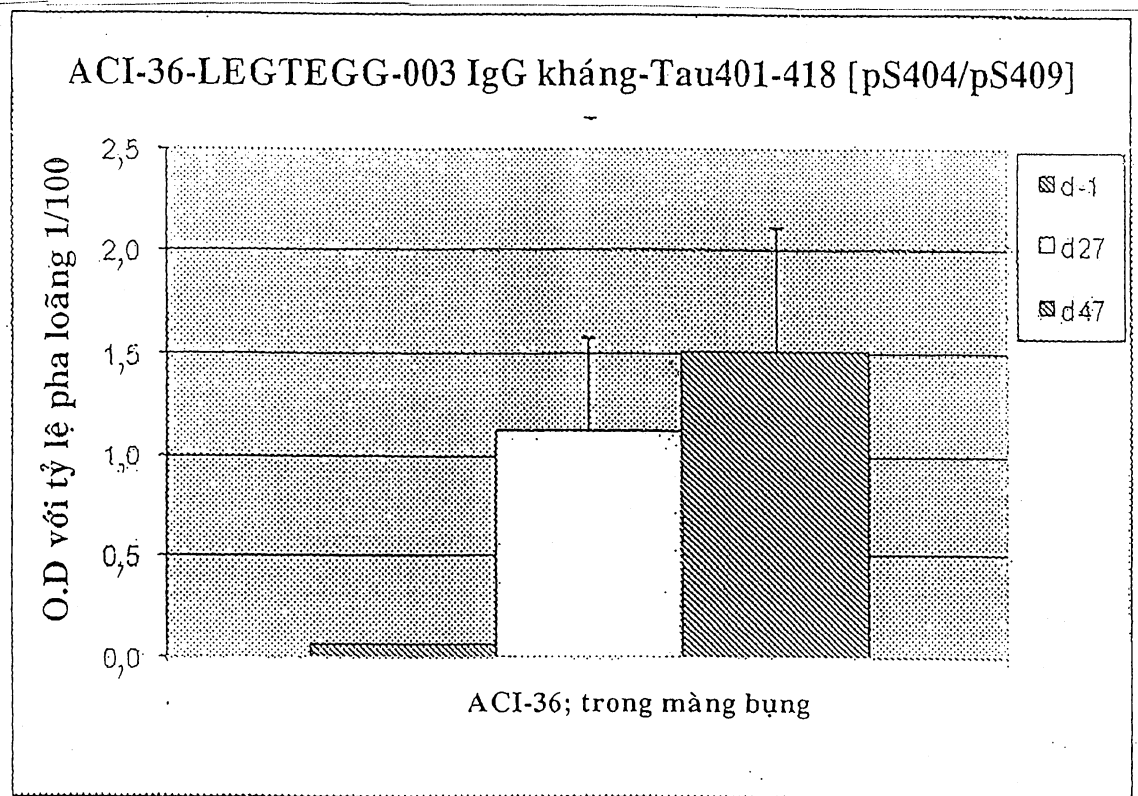


FIG.3a

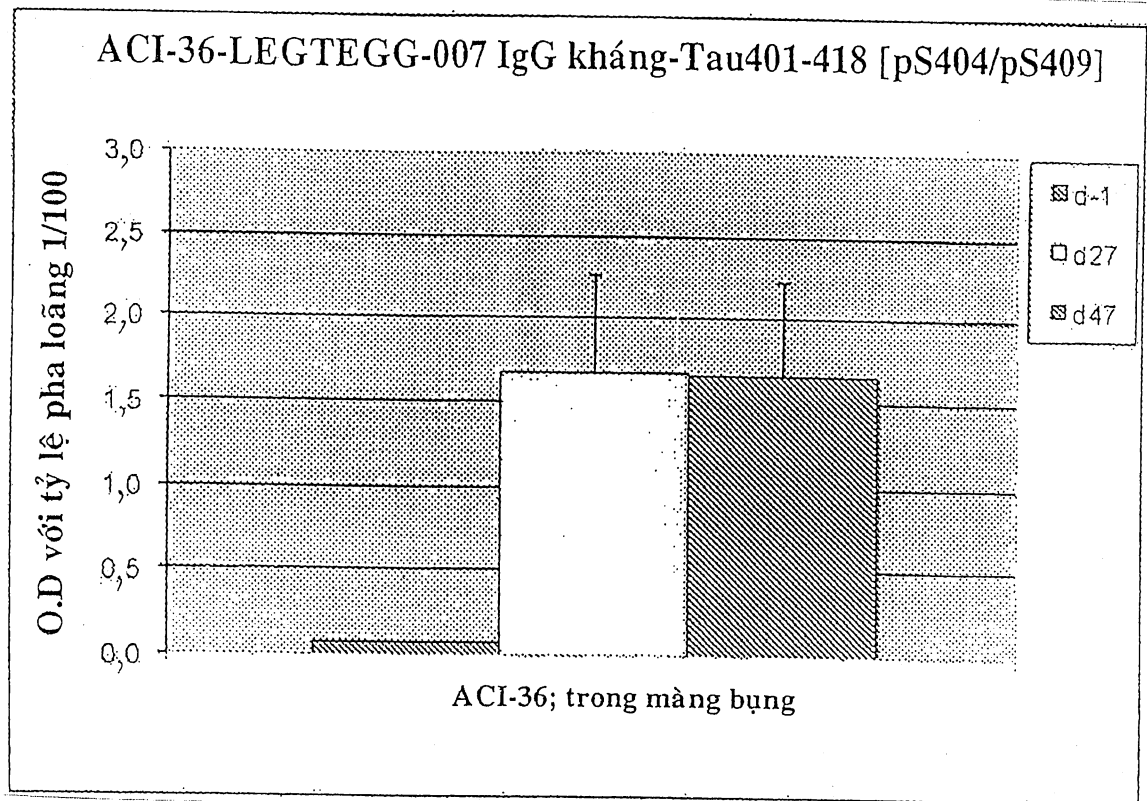


FIG.3b

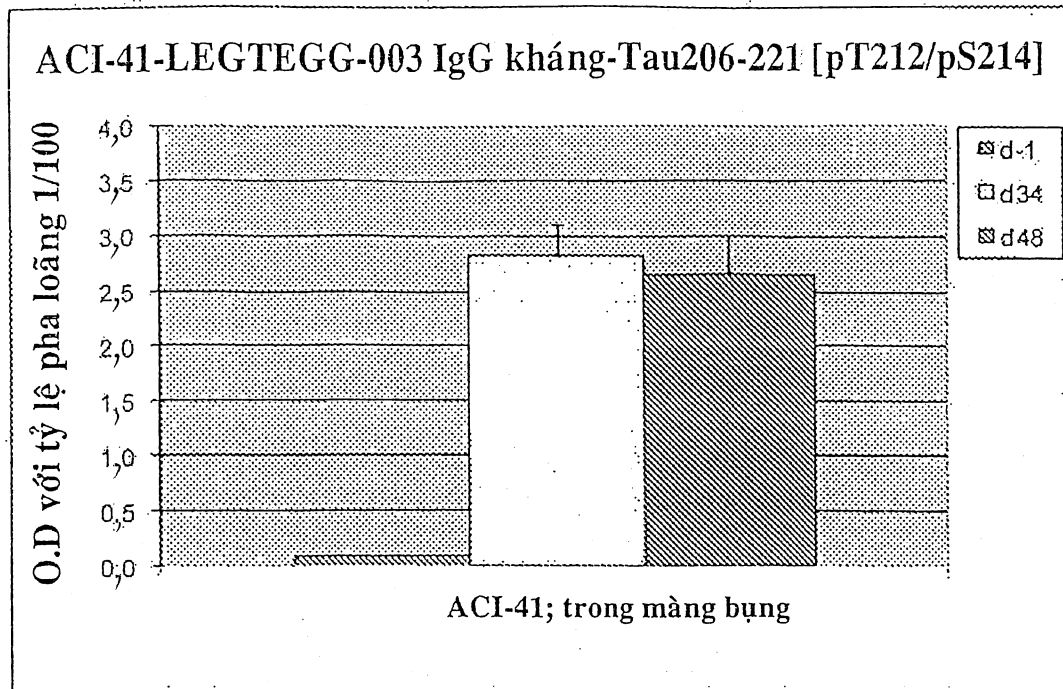


FIG.4a

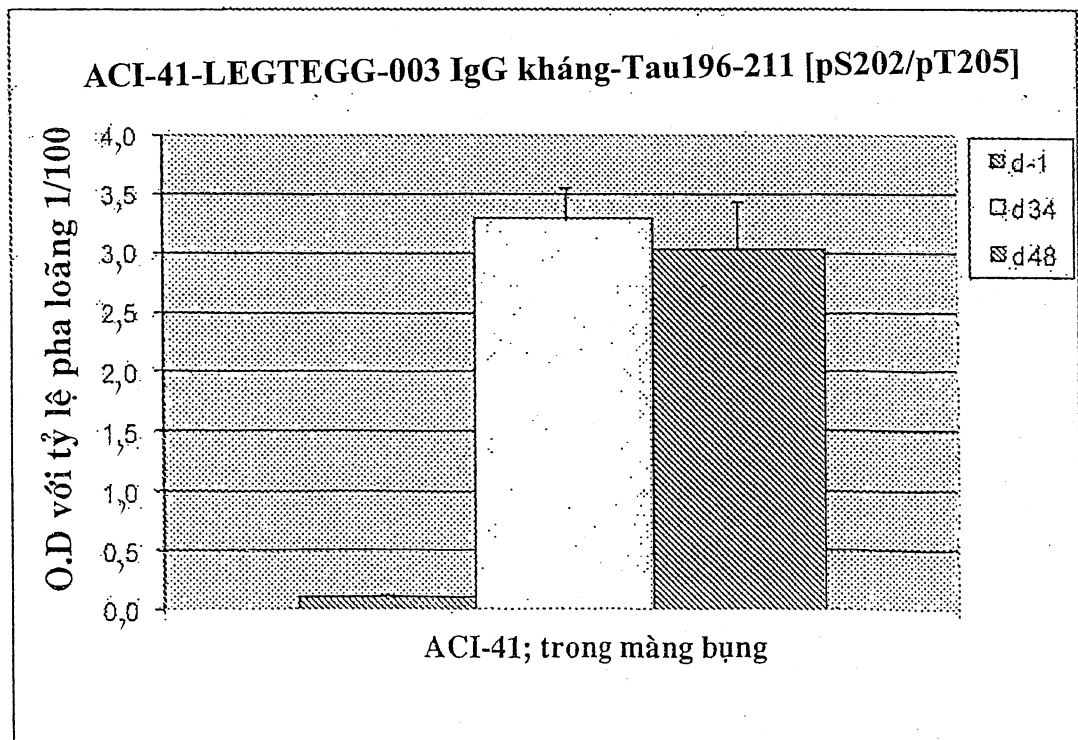


FIG.4b

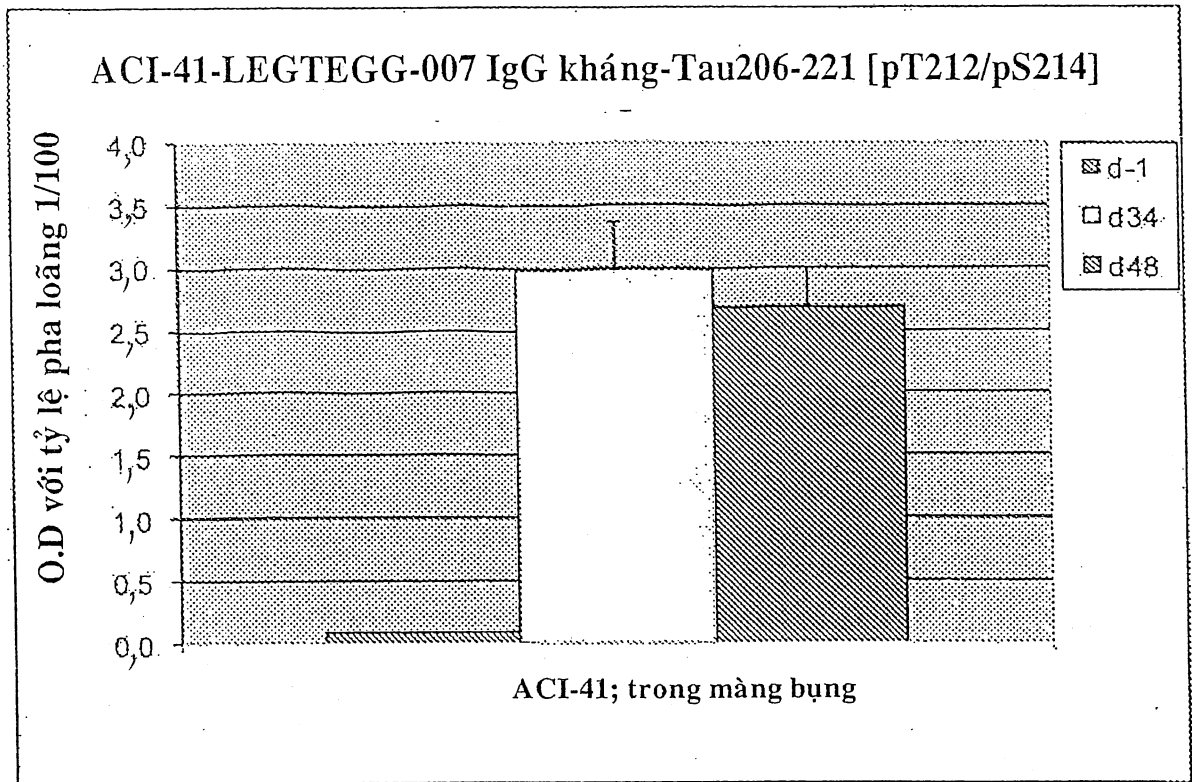


FIG.4c

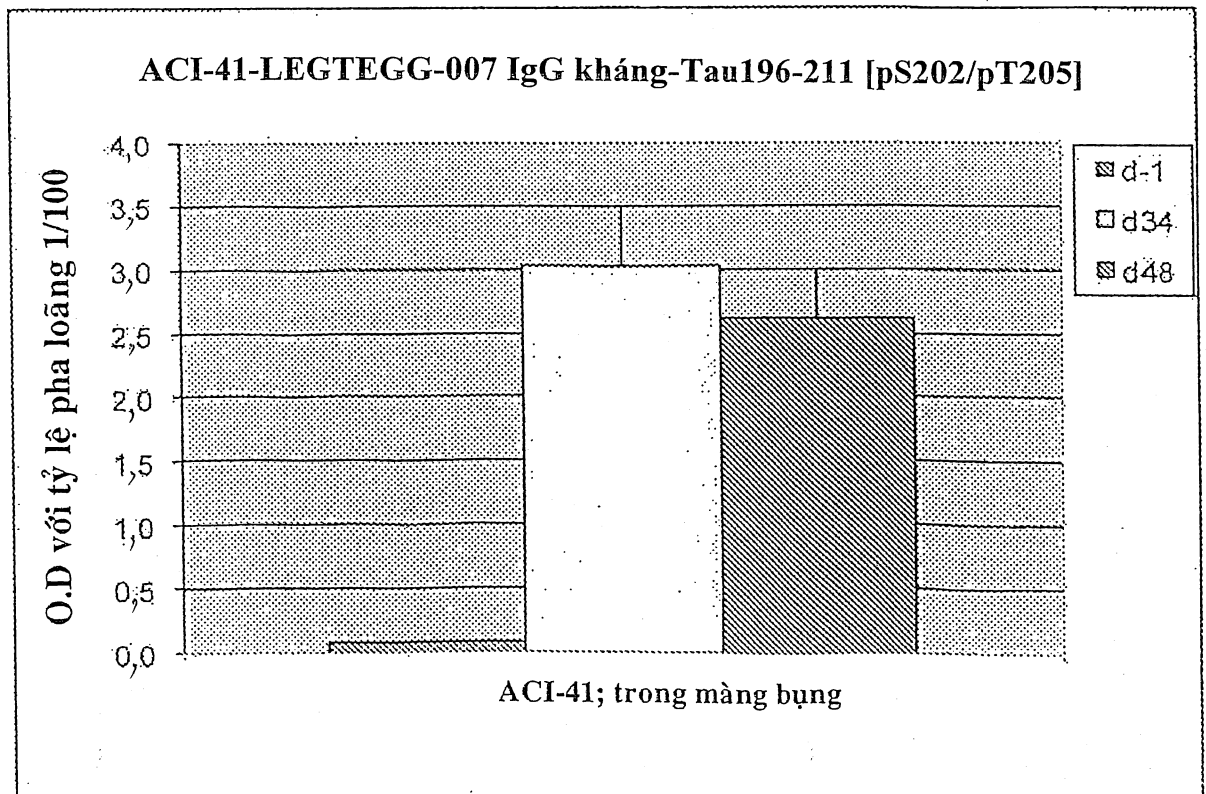


FIG.4d

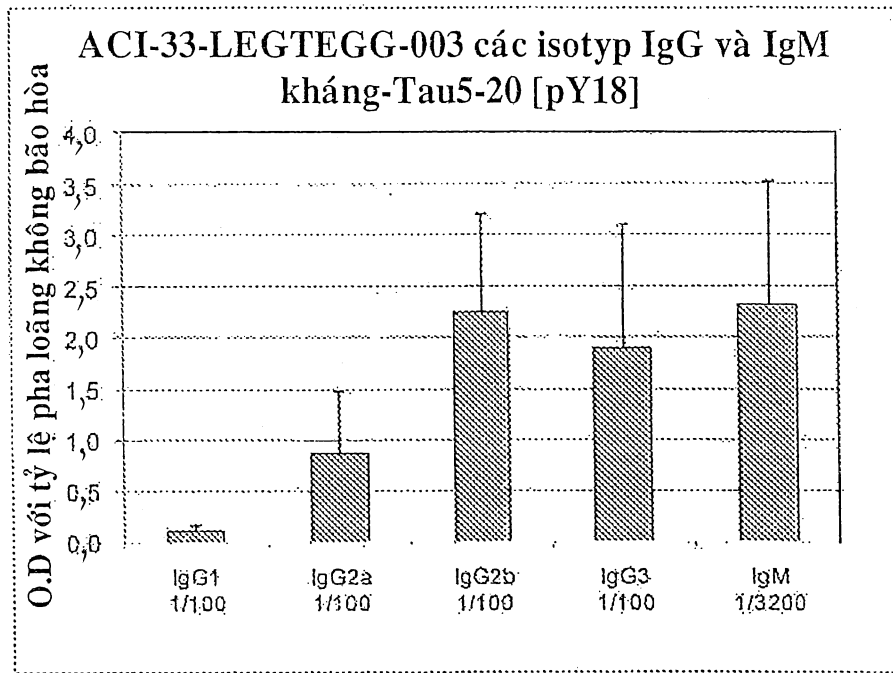


FIG.5a

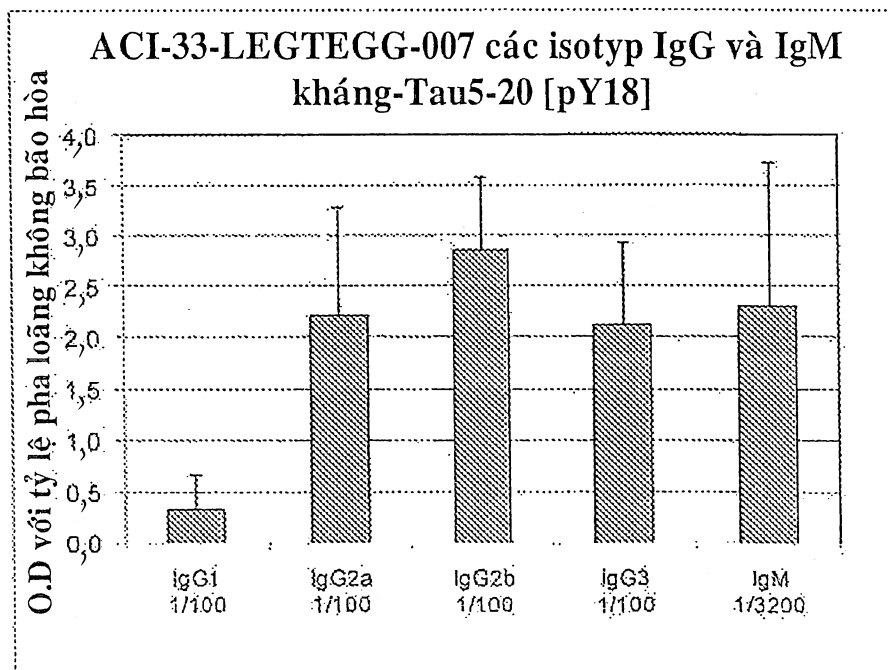


FIG.5b

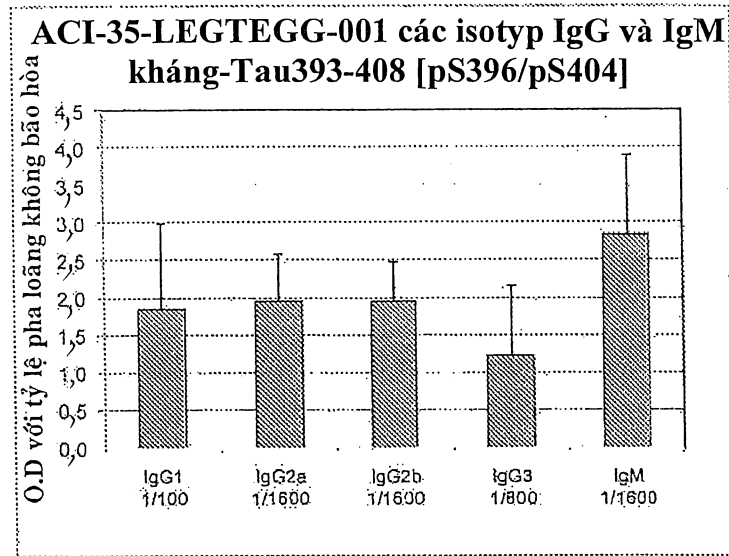


FIG.6a

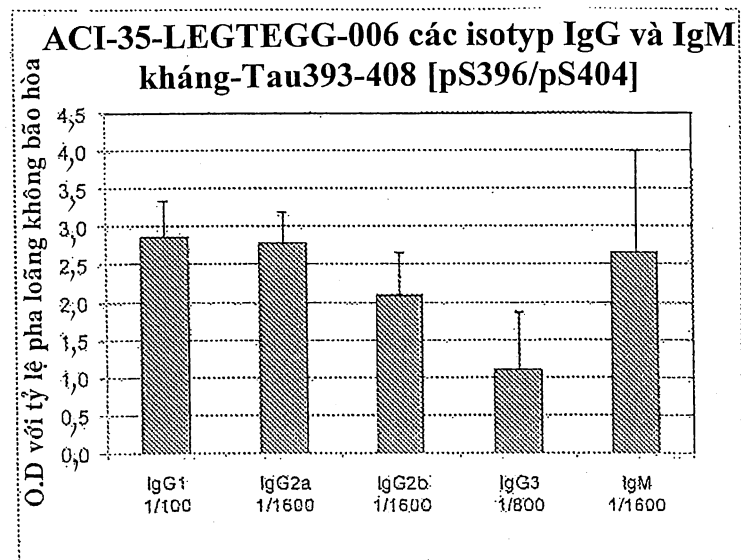


FIG.6b

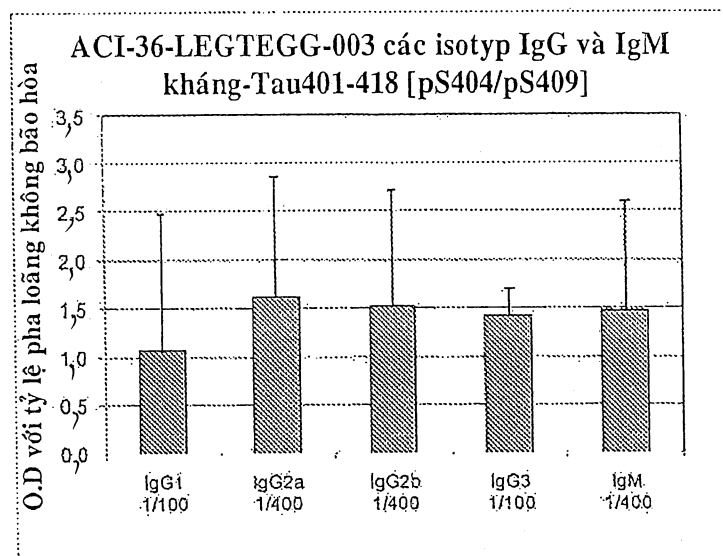


FIG.7a

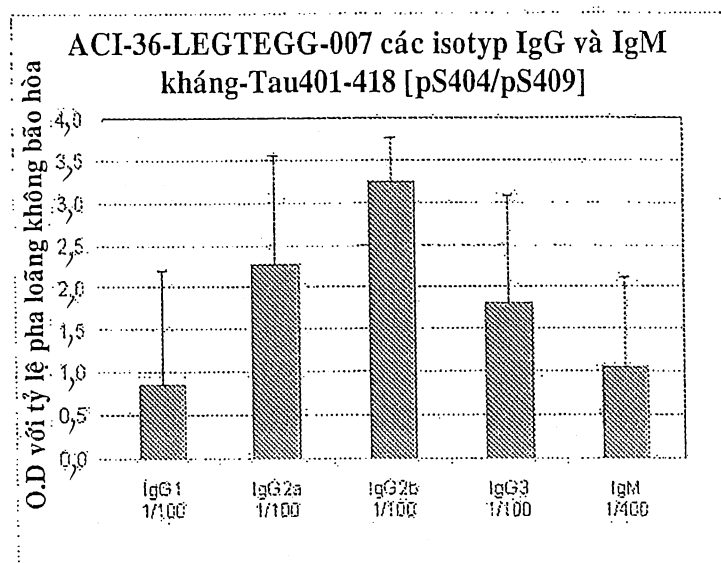


FIG.7b

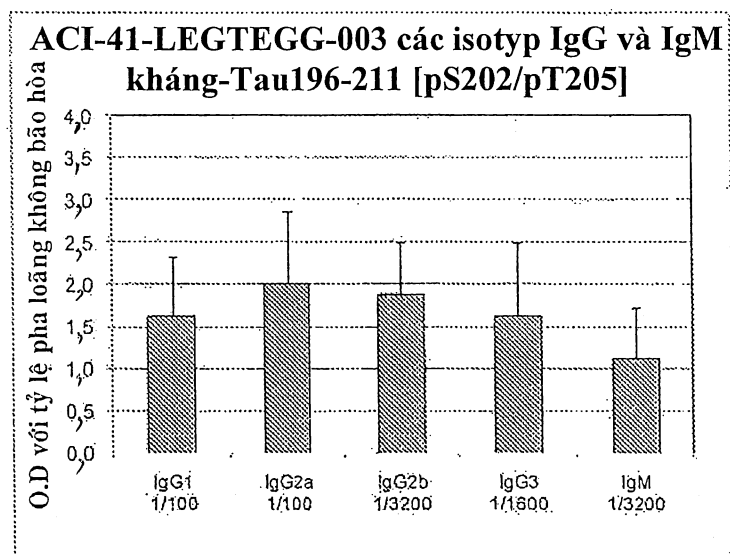


FIG.8a

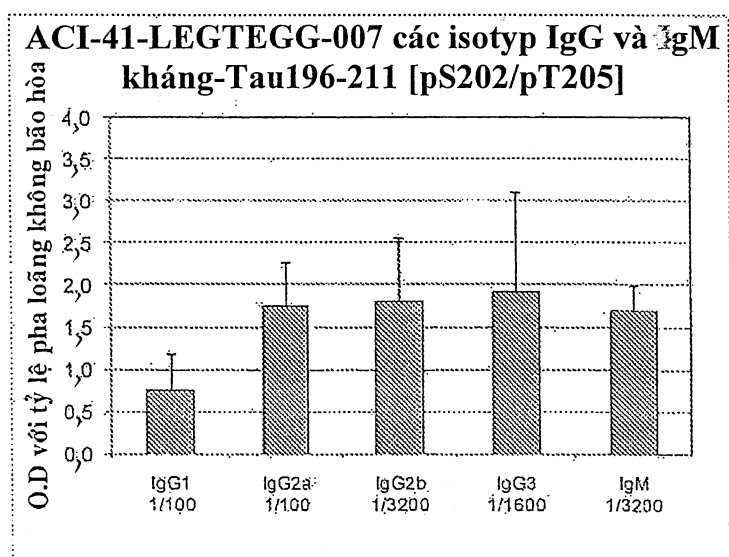


FIG.8b

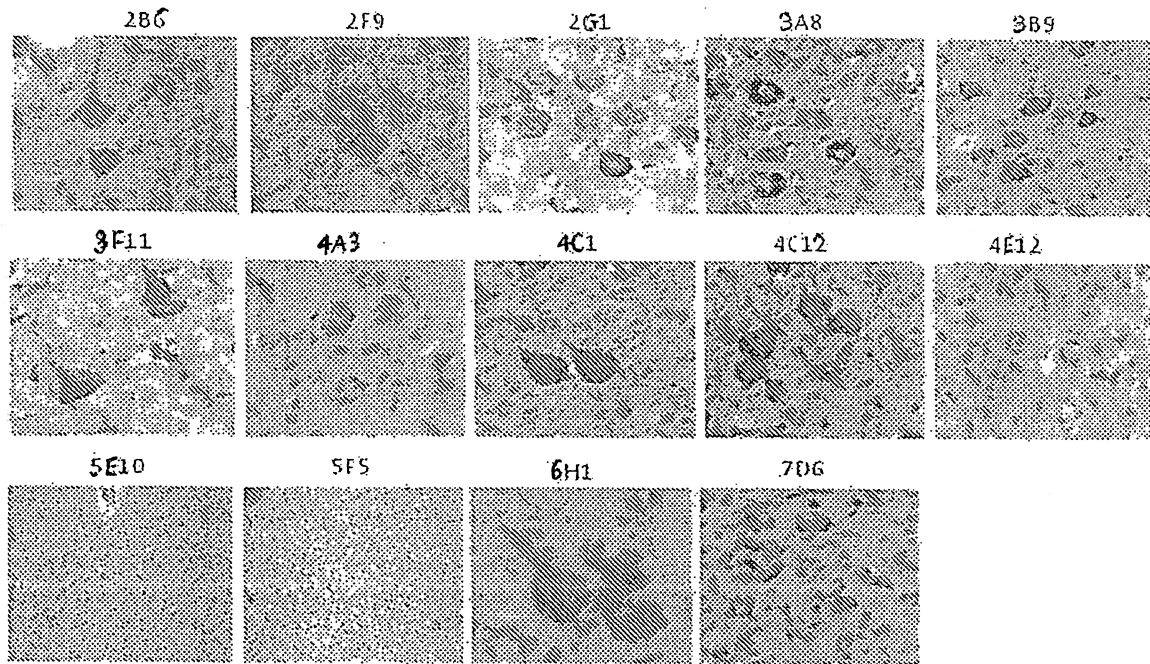


FIG.9a

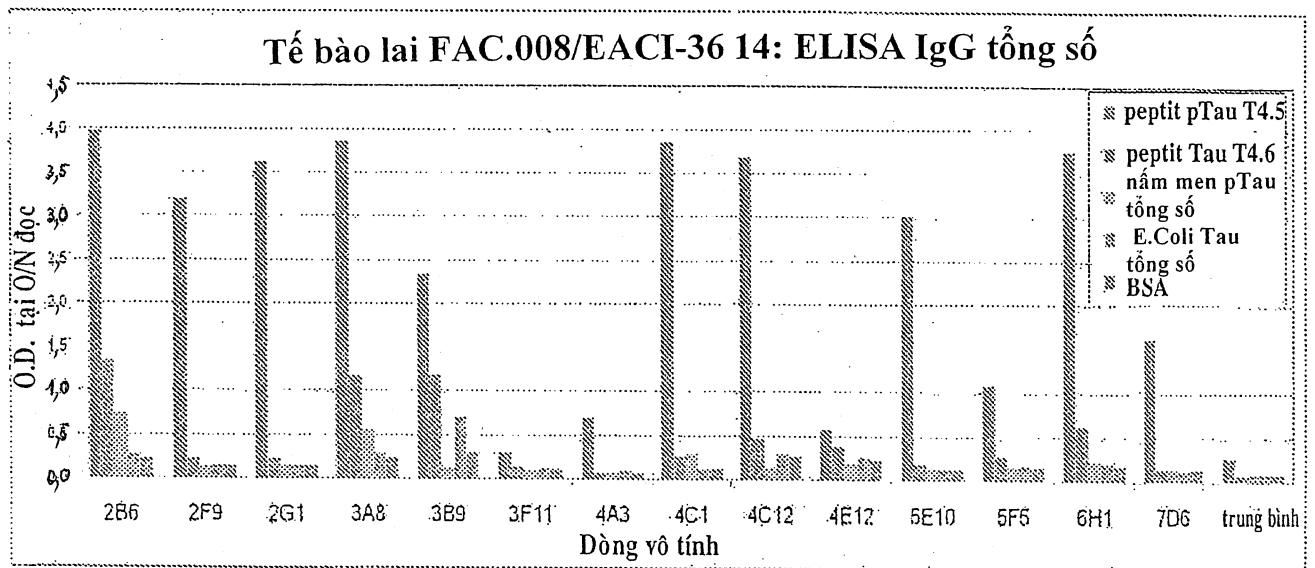


FIG.9b

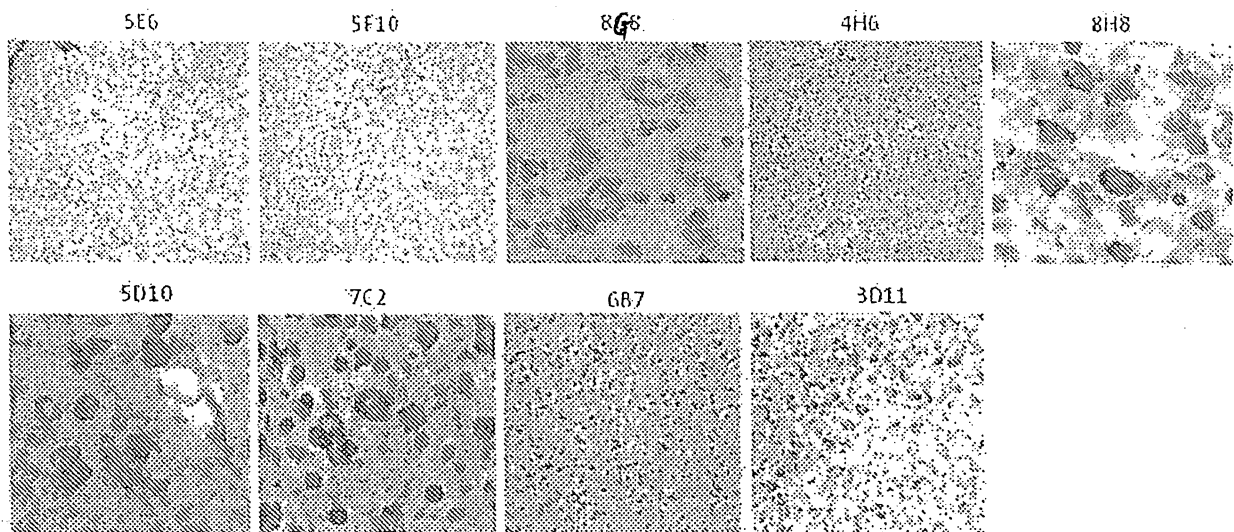


FIG.10a

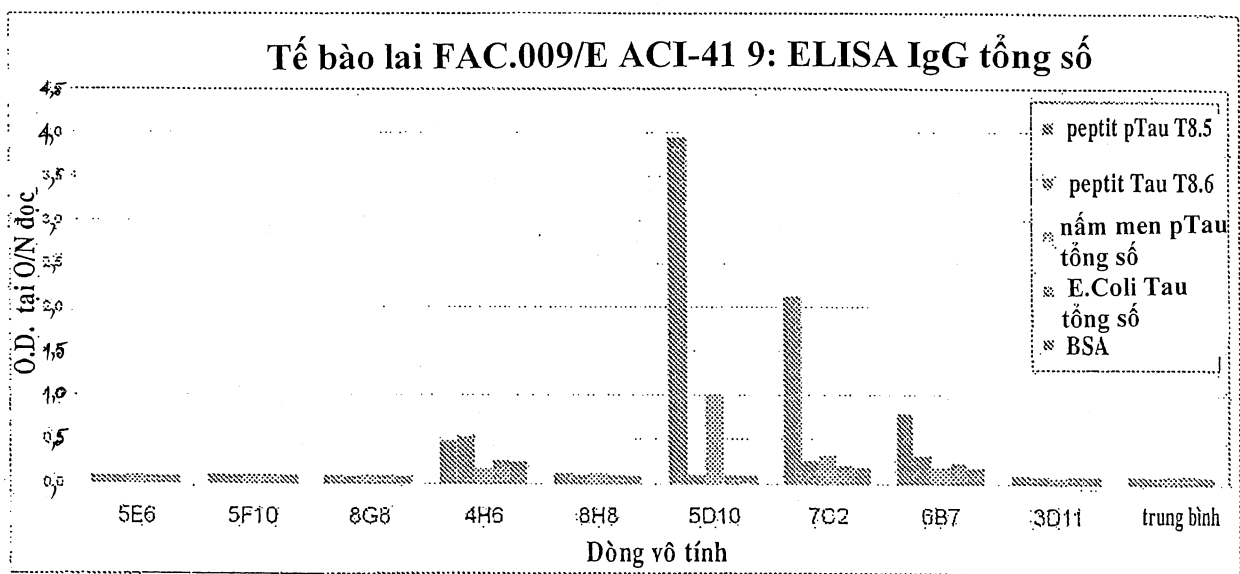


FIG.10b

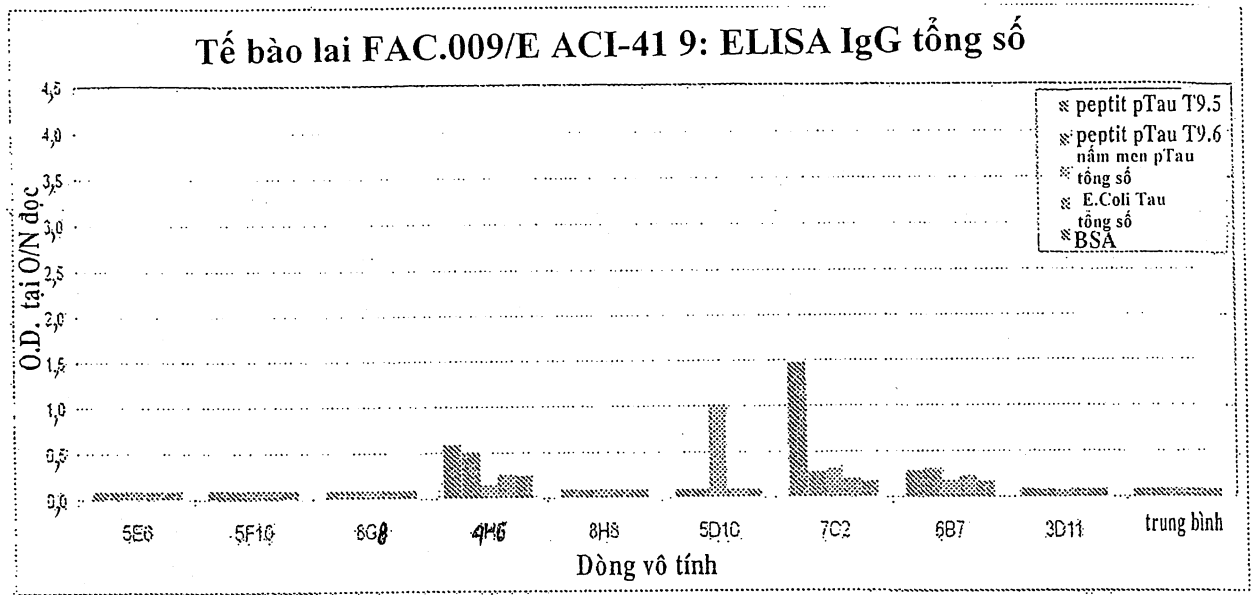


FIG. 10C

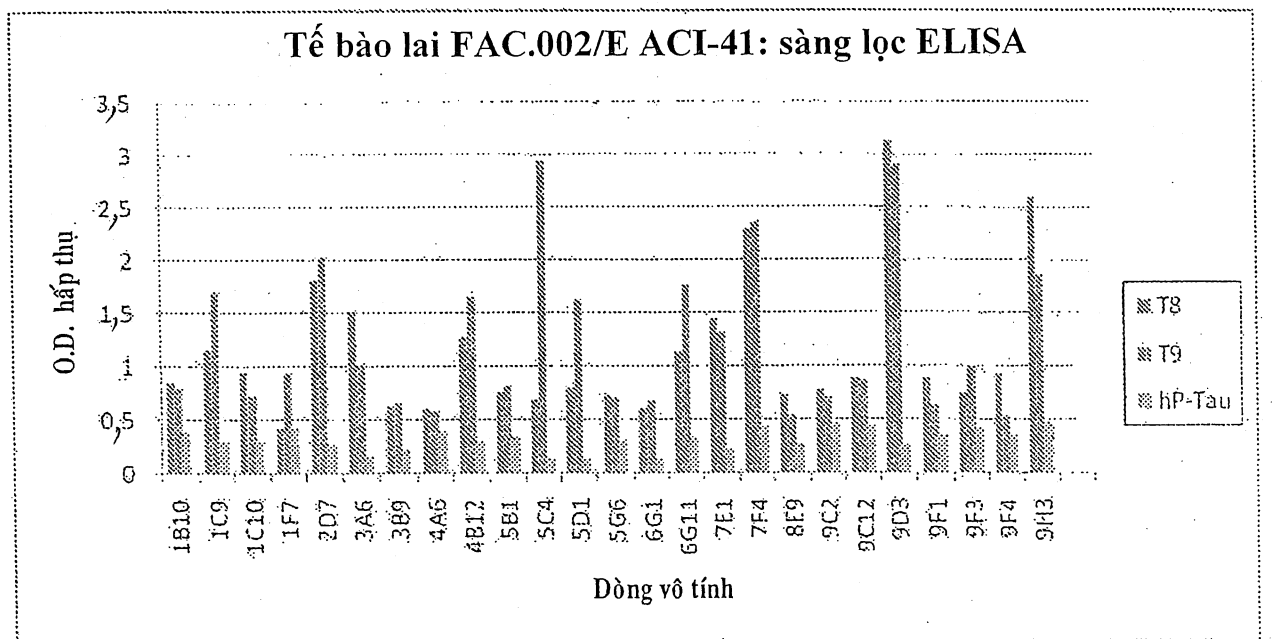
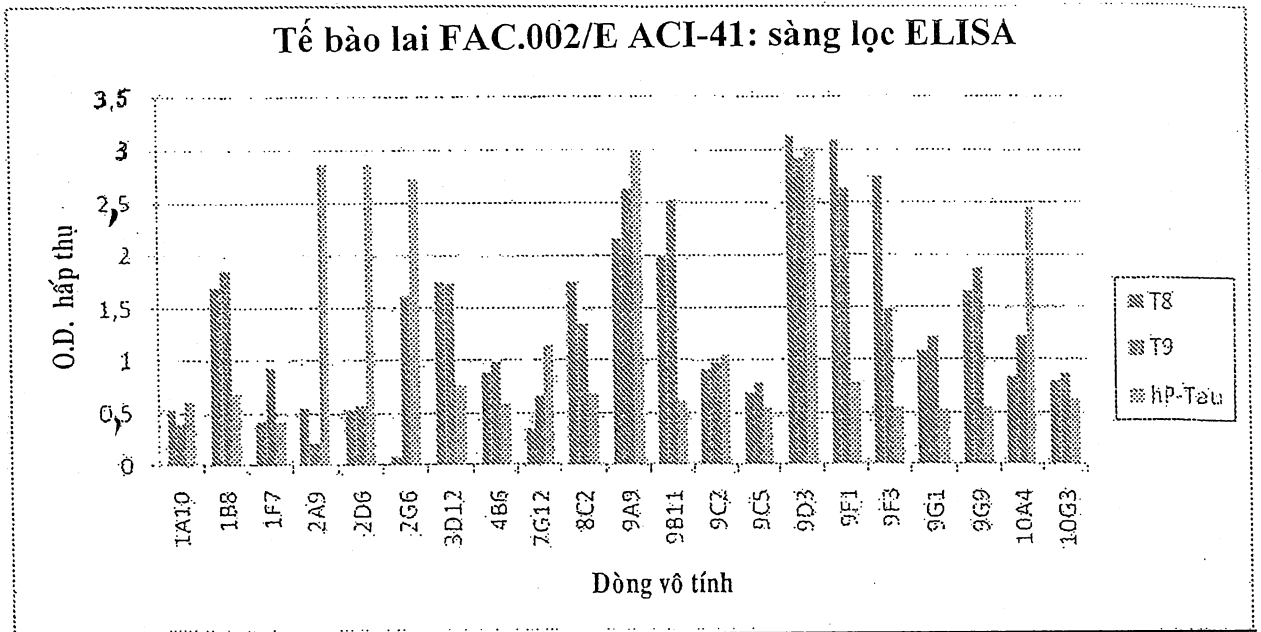


FIG. 11

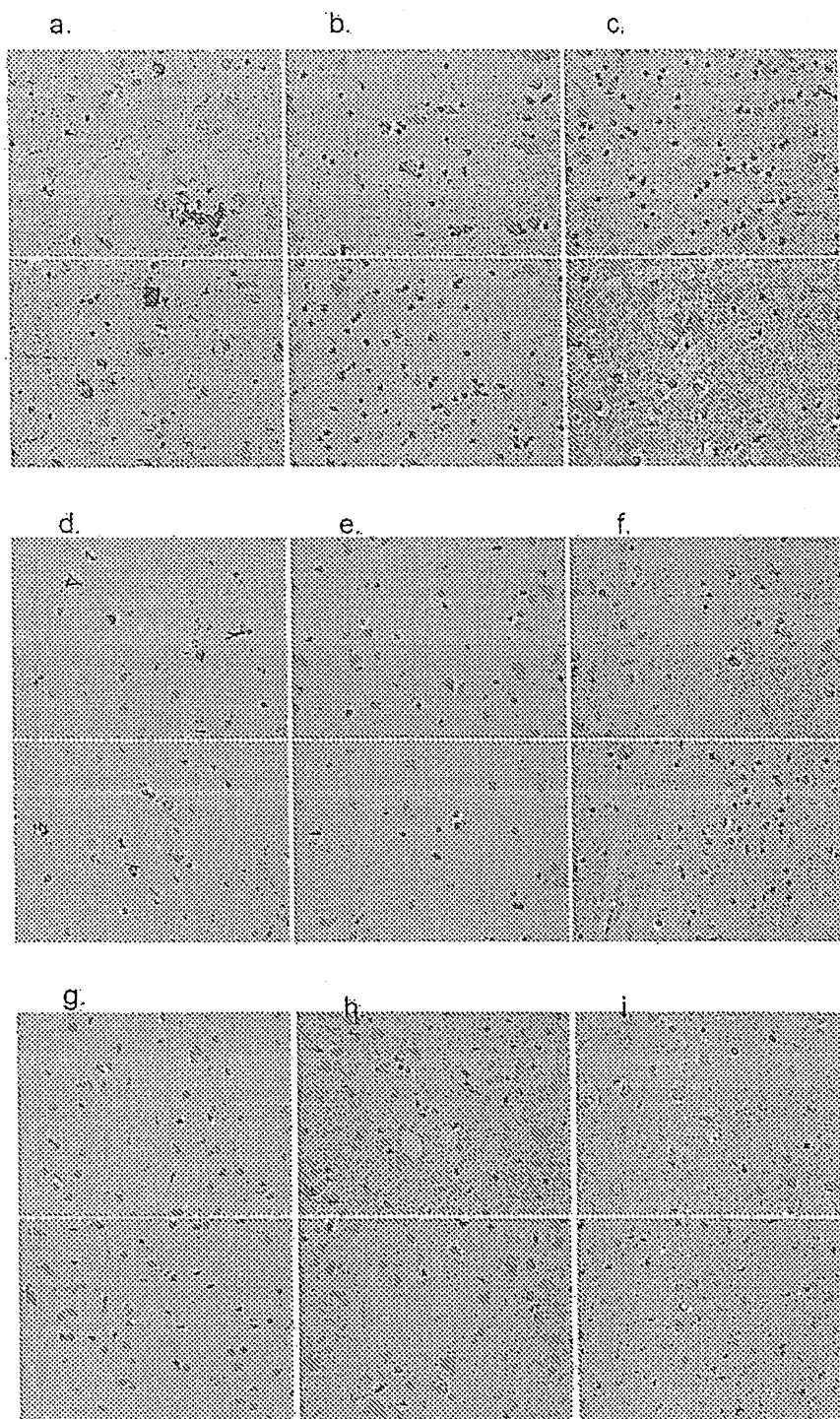
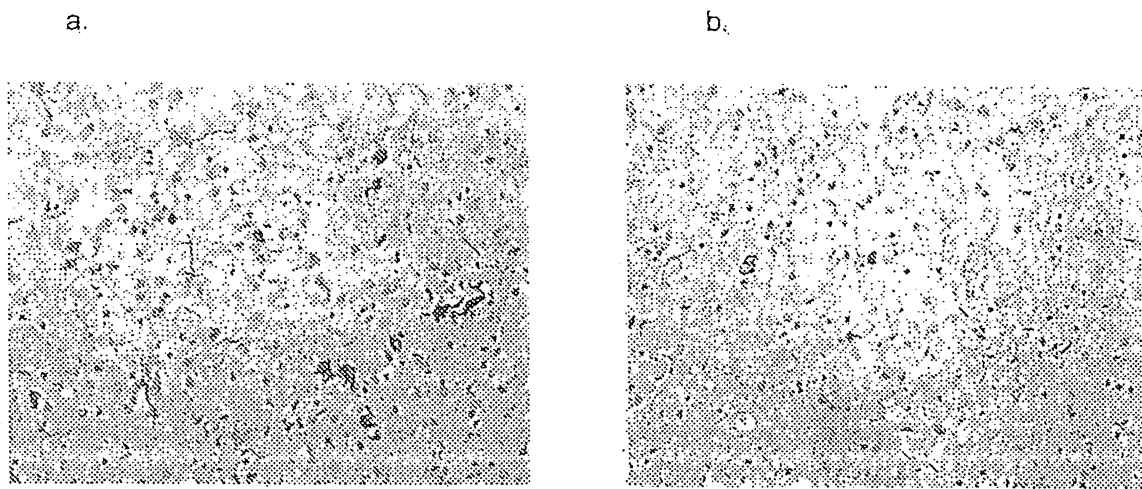


FIG.12

**FIG.13**

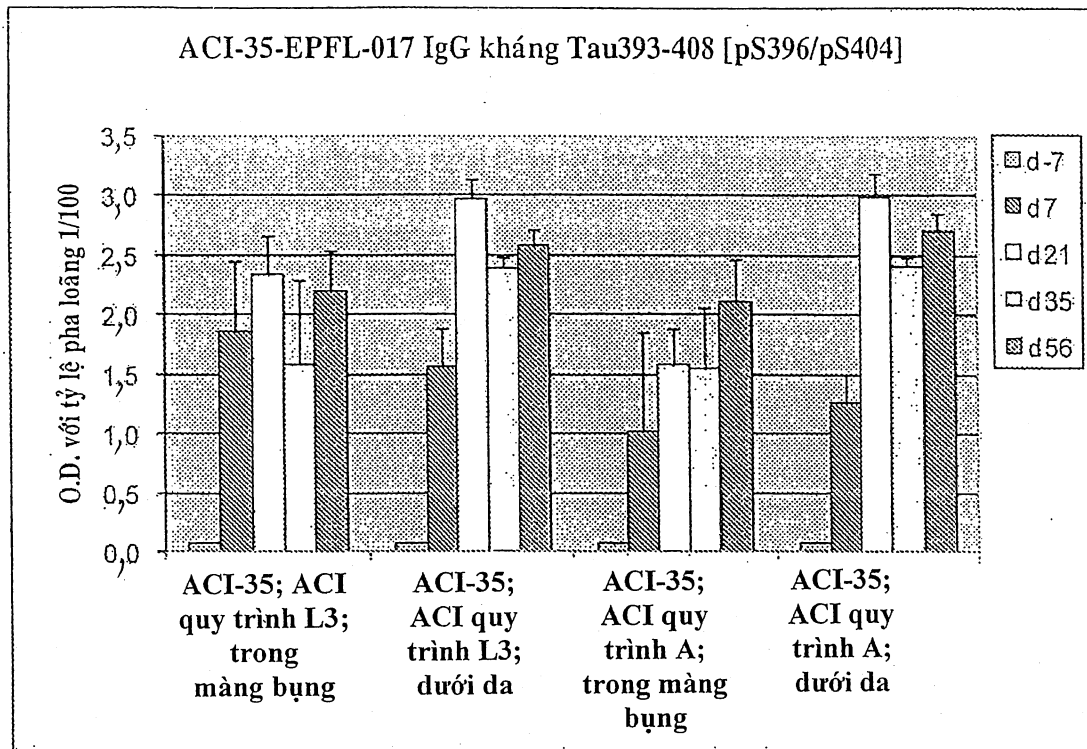


FIG.14

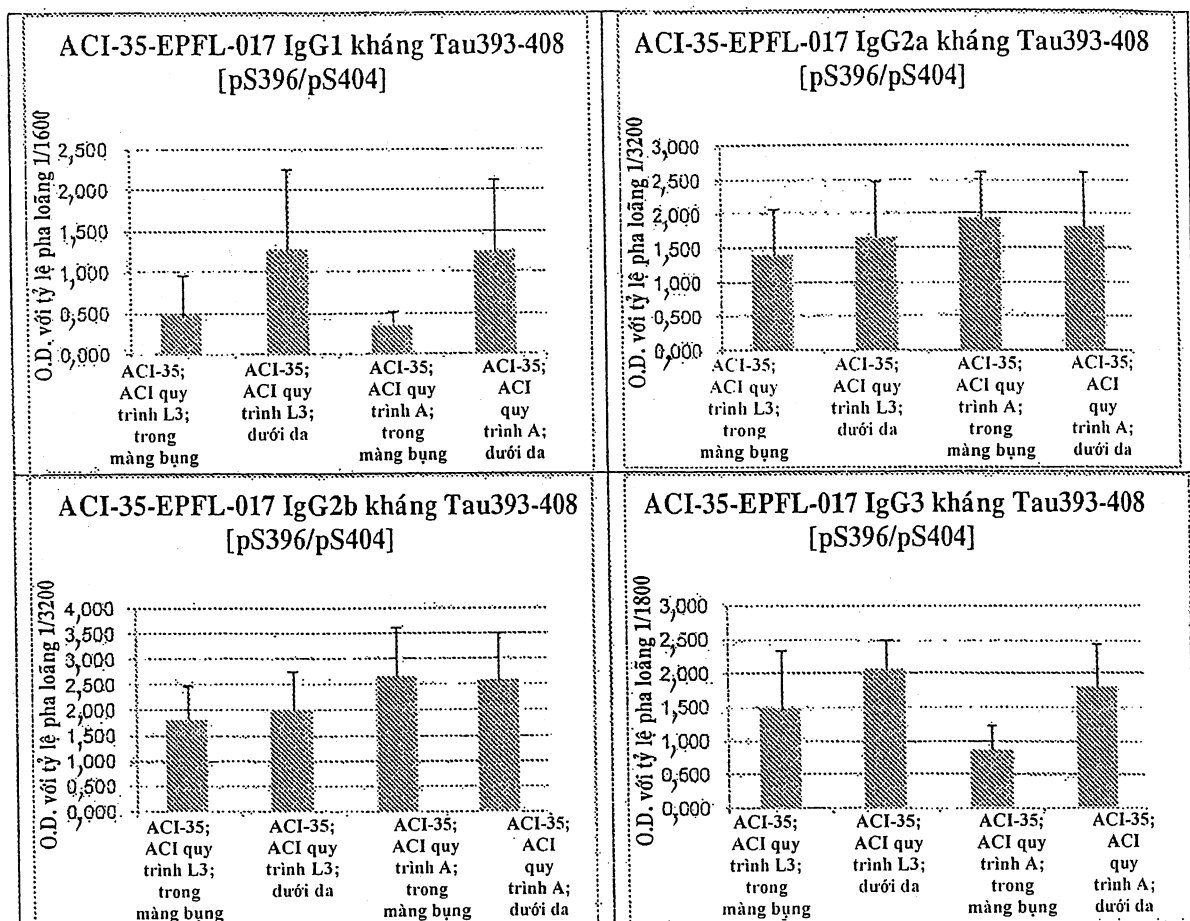


FIG.15

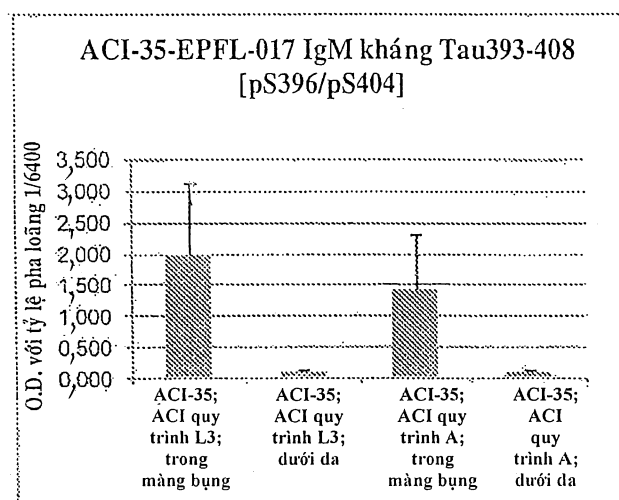


FIG.16a

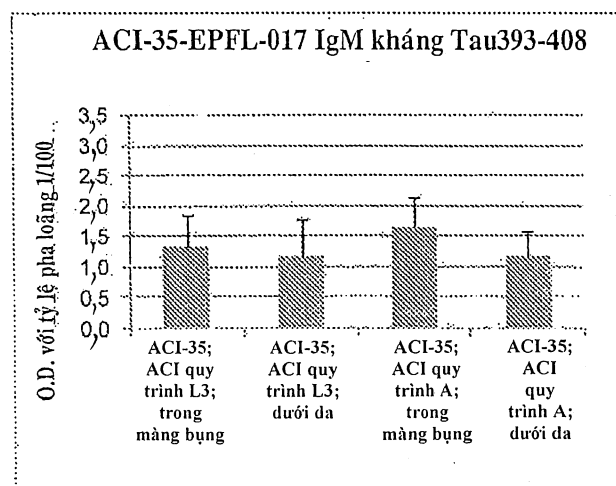


FIG.16b

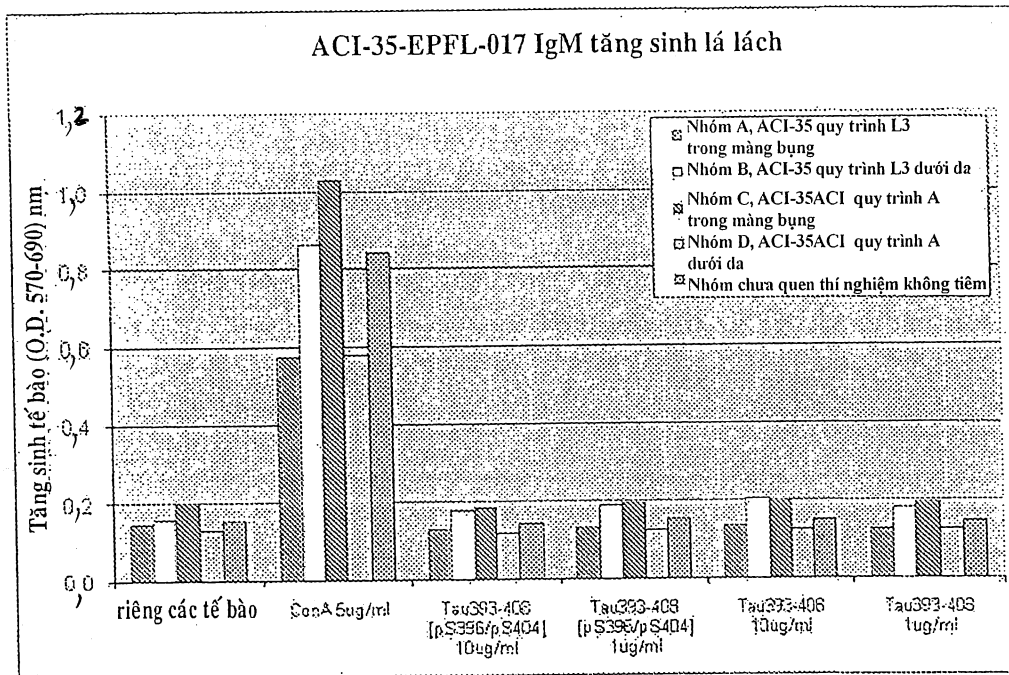


FIG.17

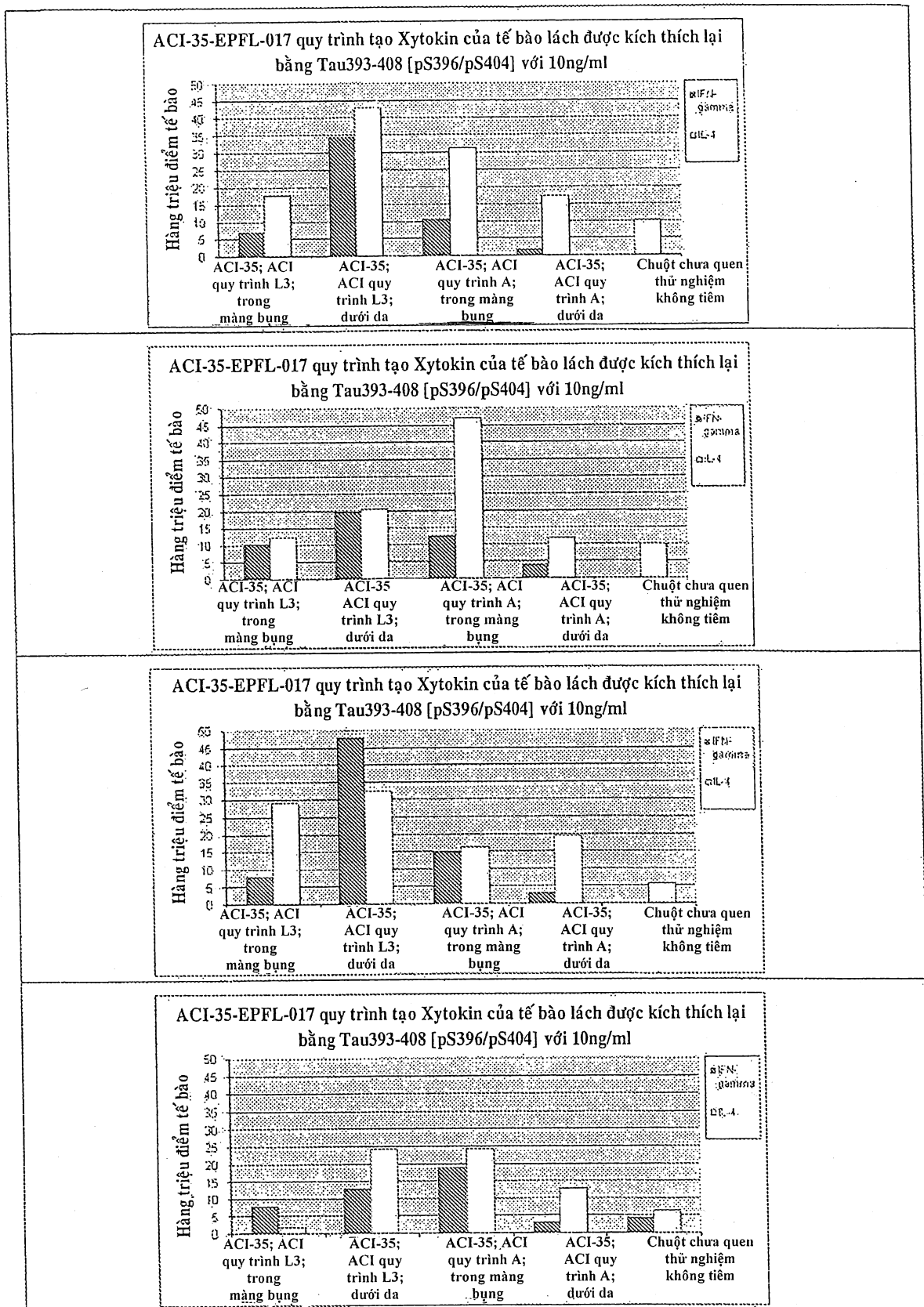


FIG.18

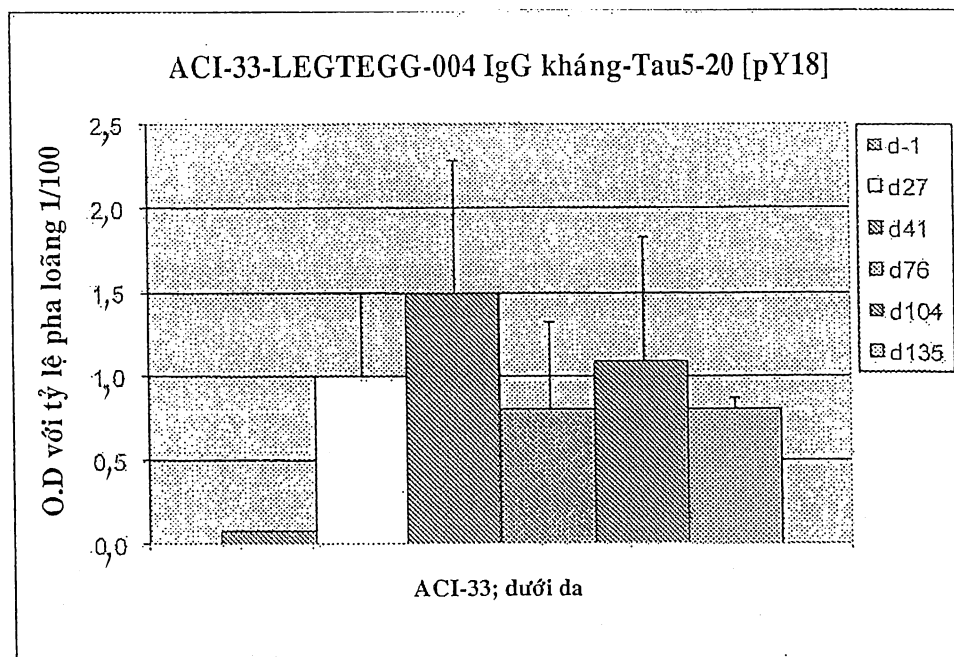


FIG.19

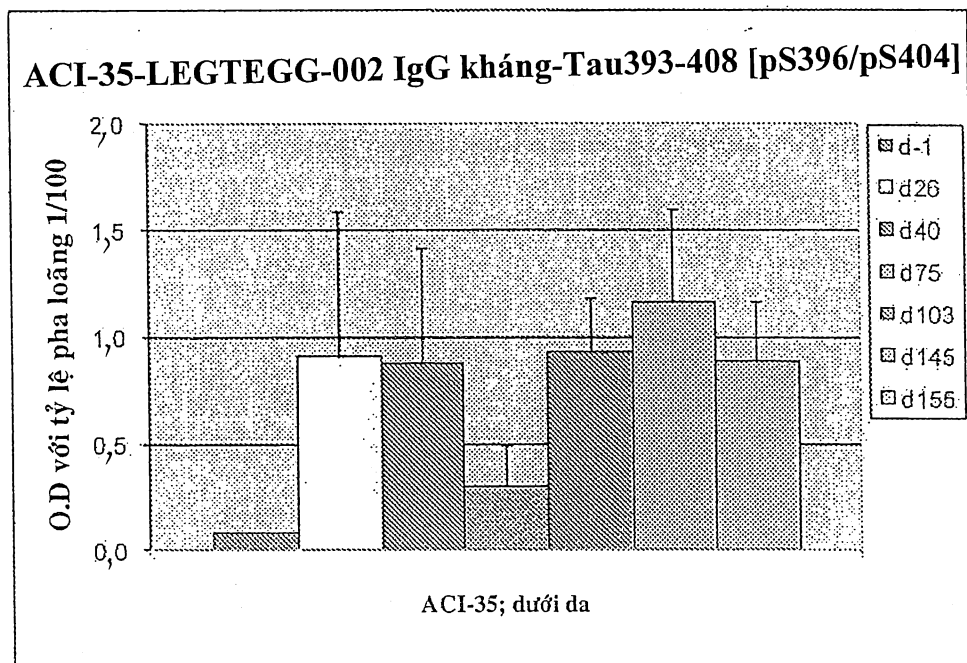


FIG.20

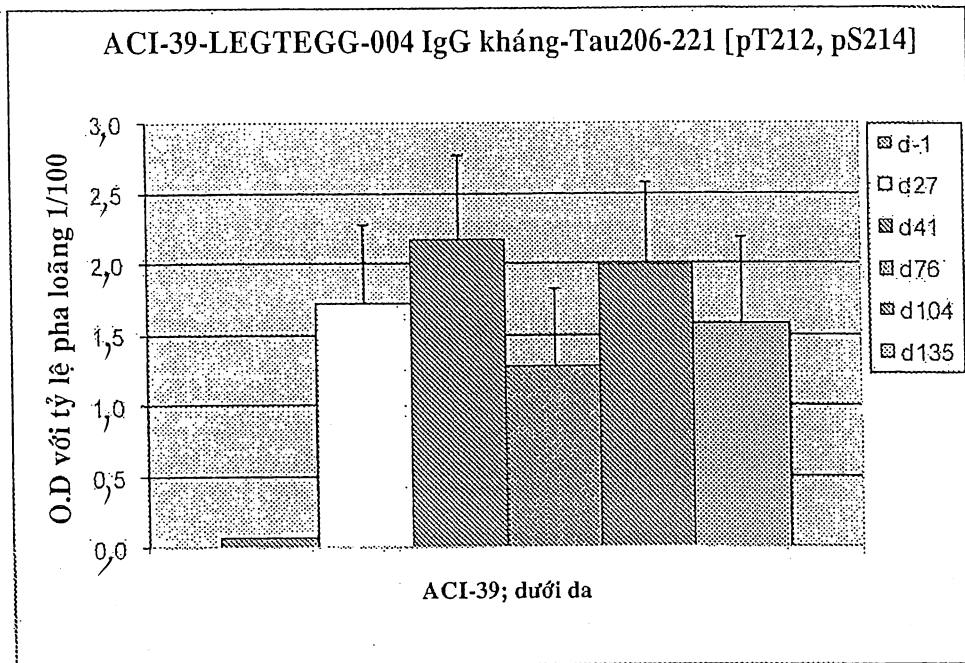


FIG.21

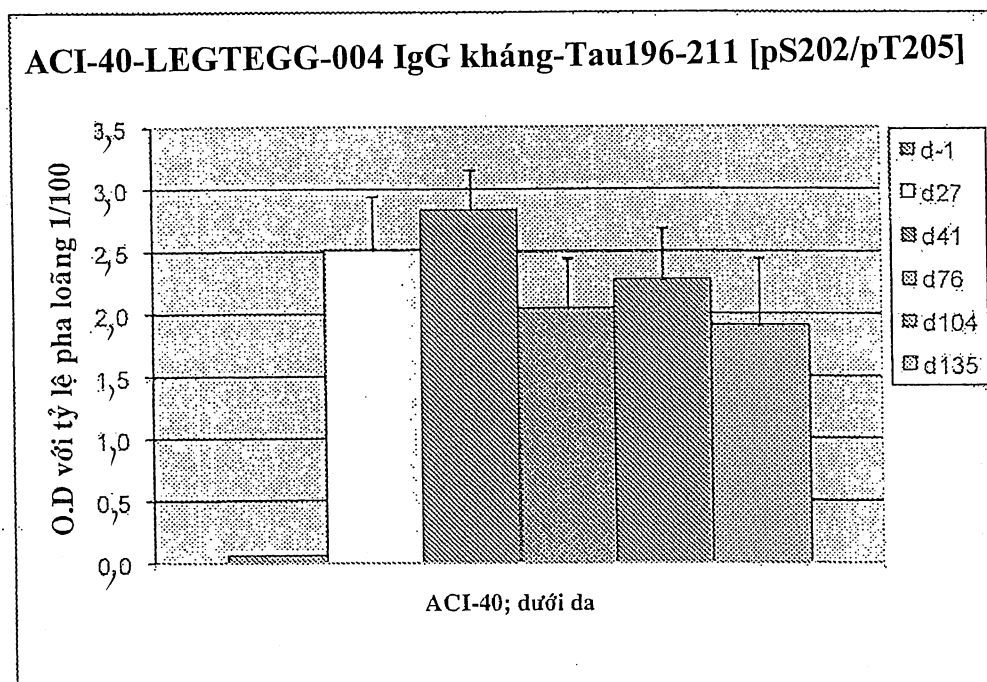


FIG.22

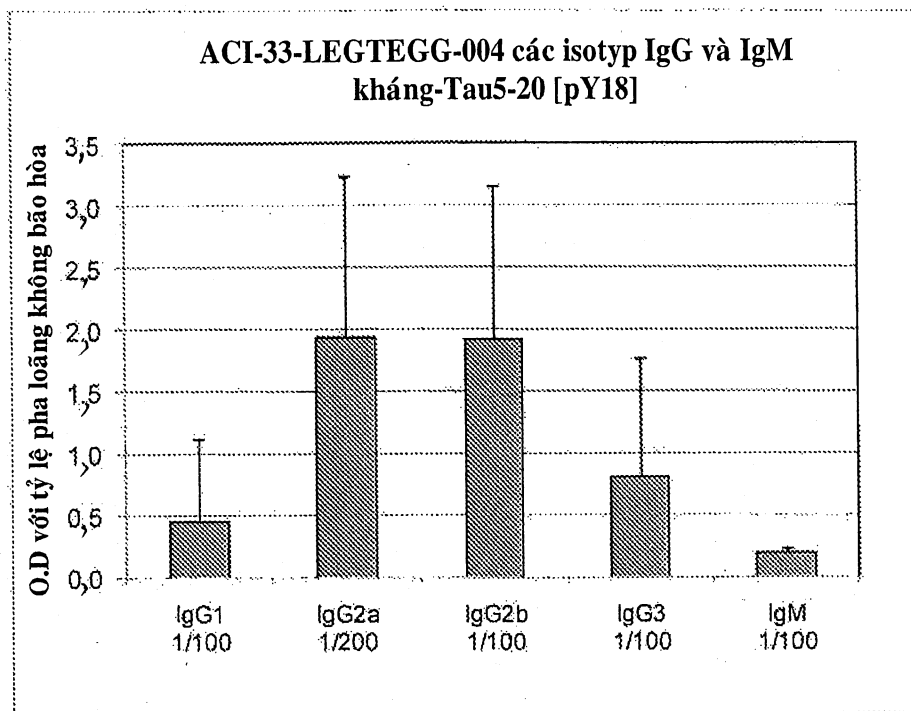


FIG.23

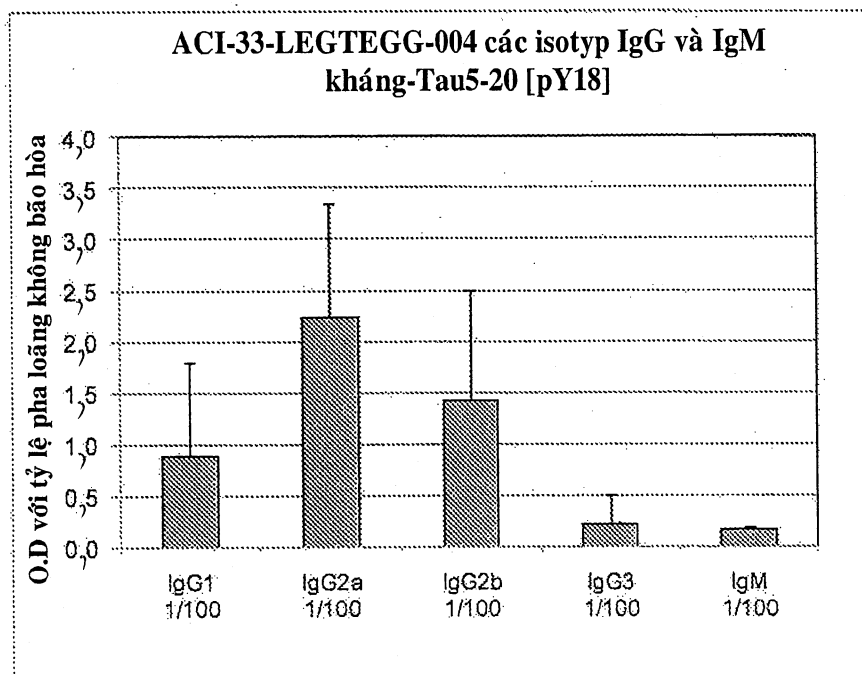


FIG.24

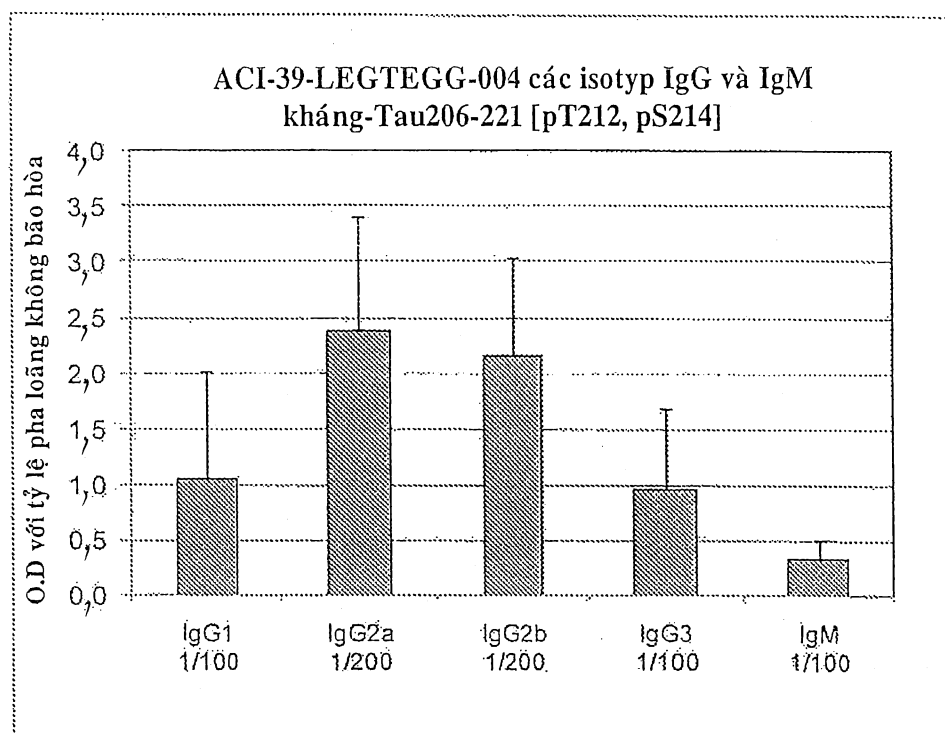


FIG.25

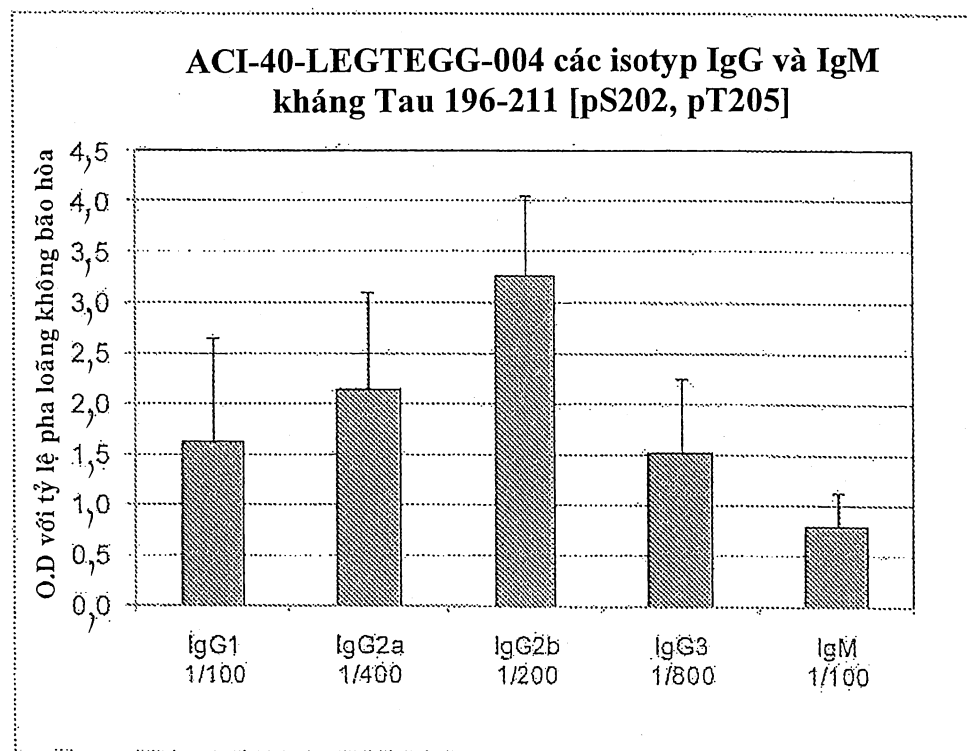


FIG.26

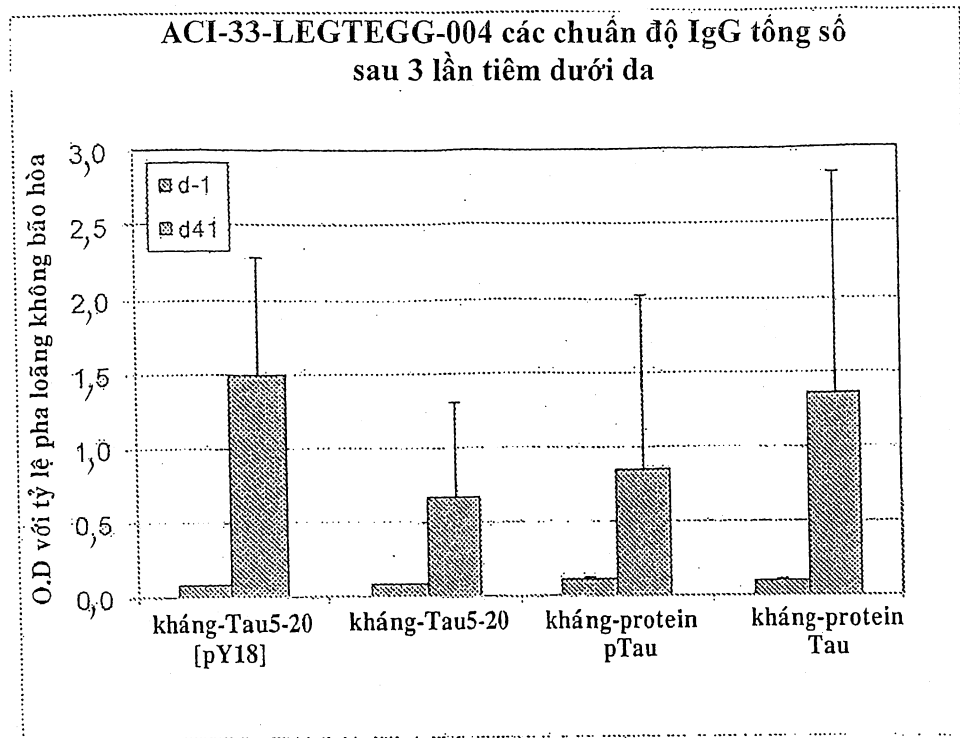


FIG.27

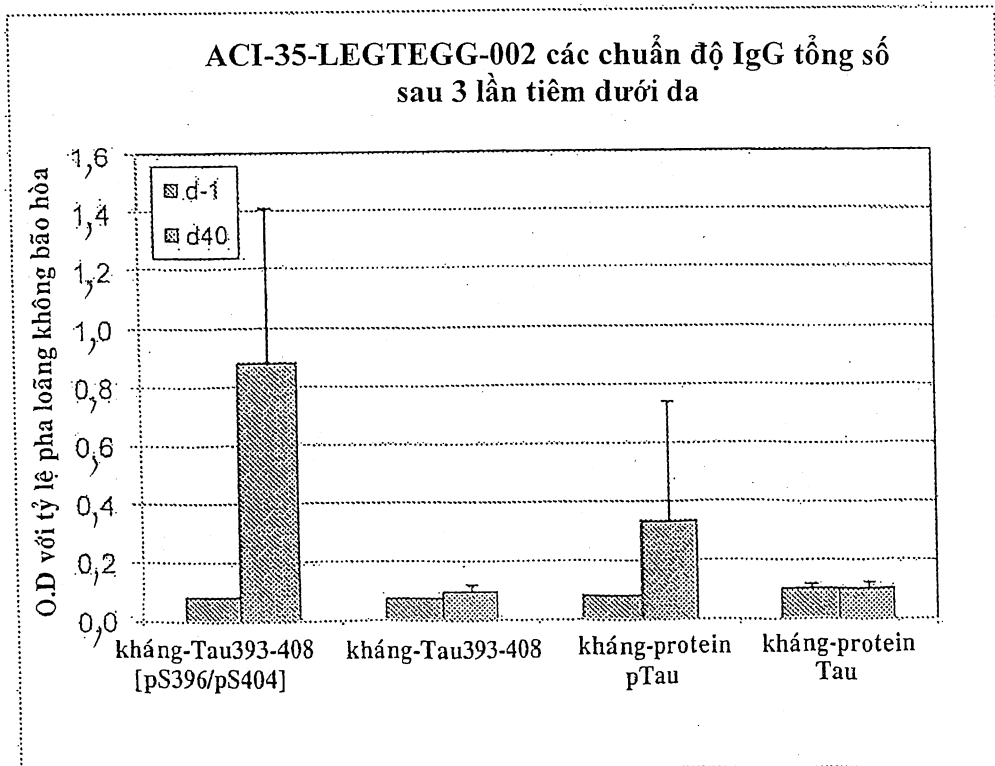


FIG.28

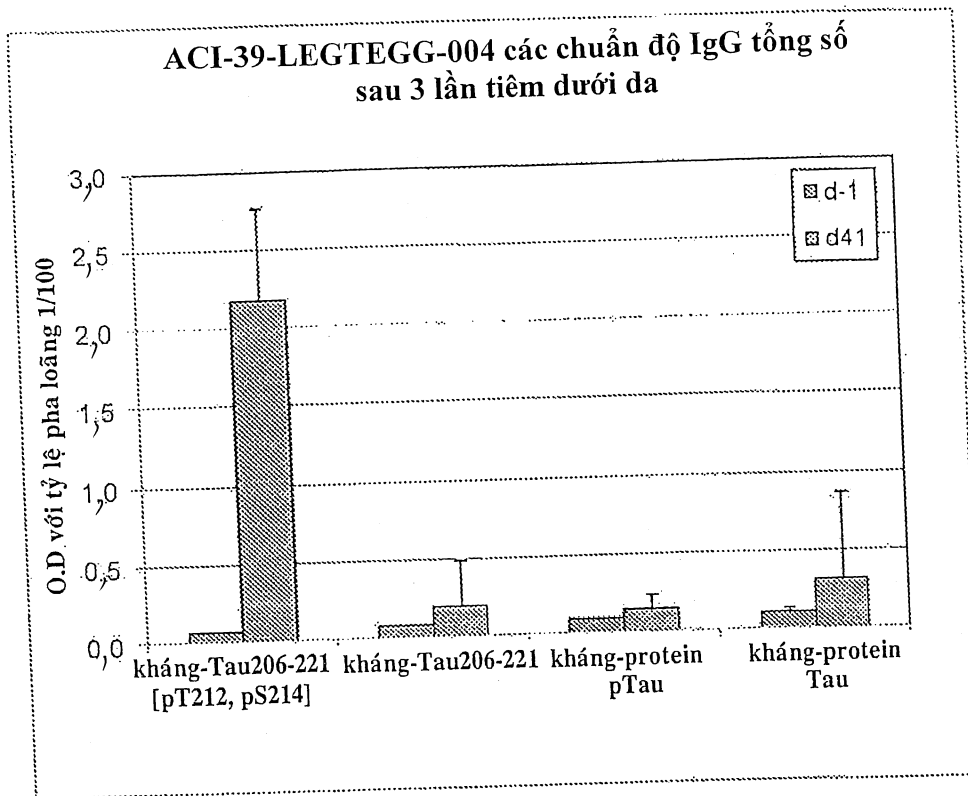


FIG.29

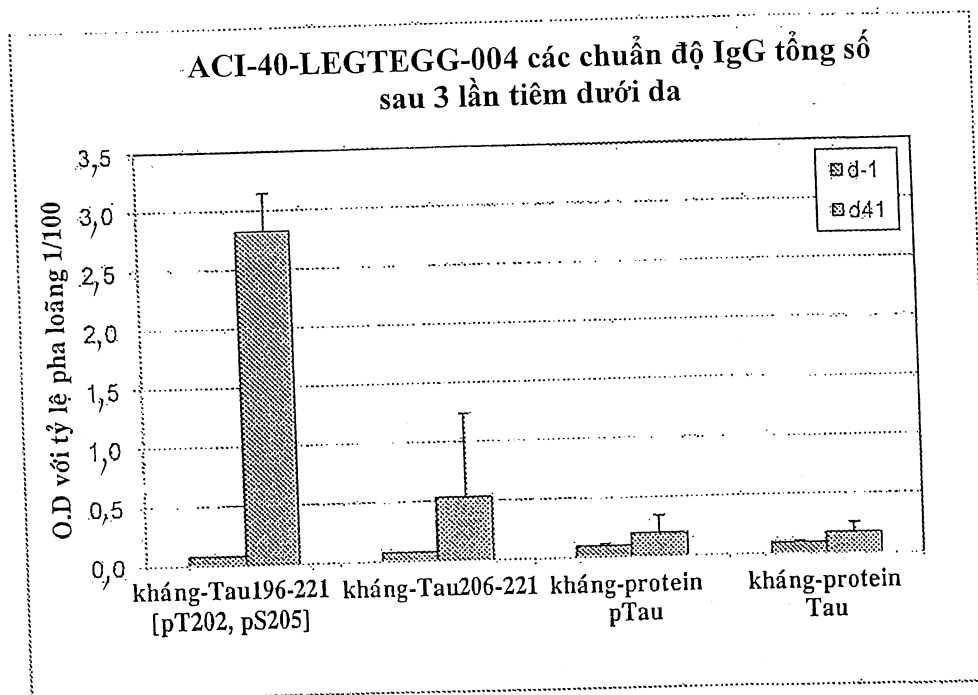


FIG.30

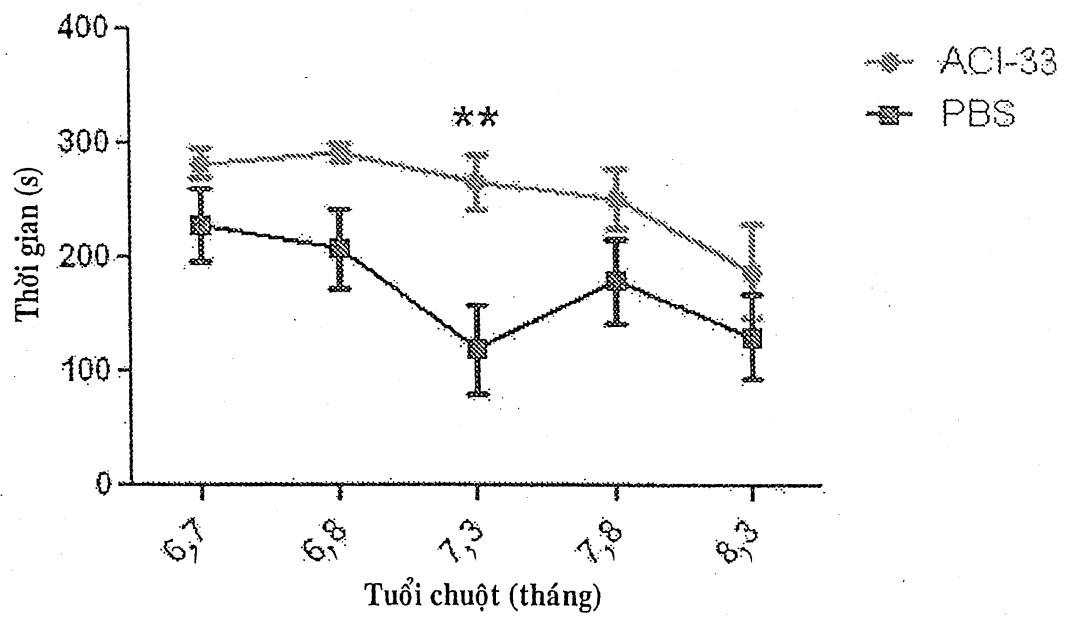


FIG.31

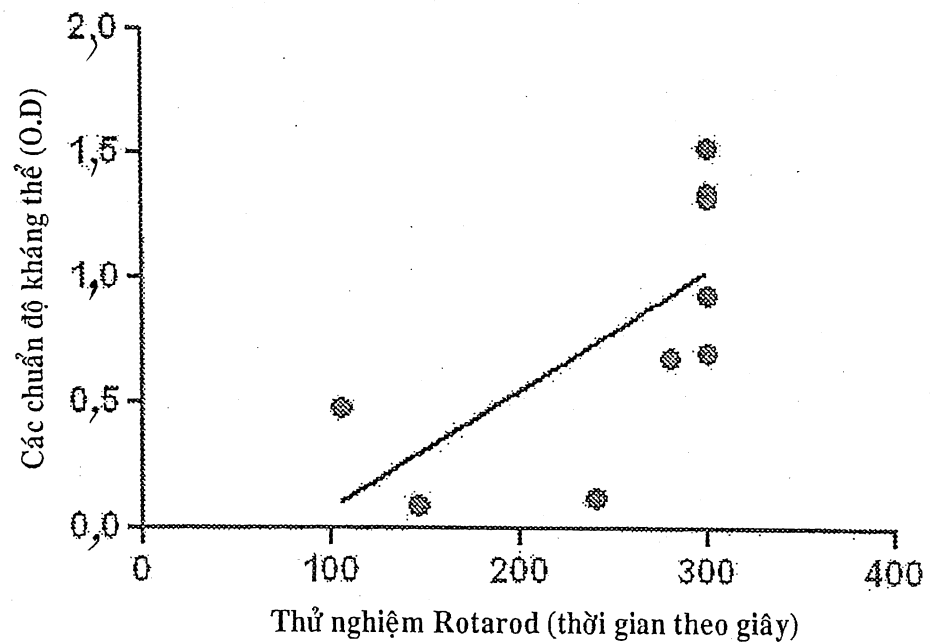


FIG.32

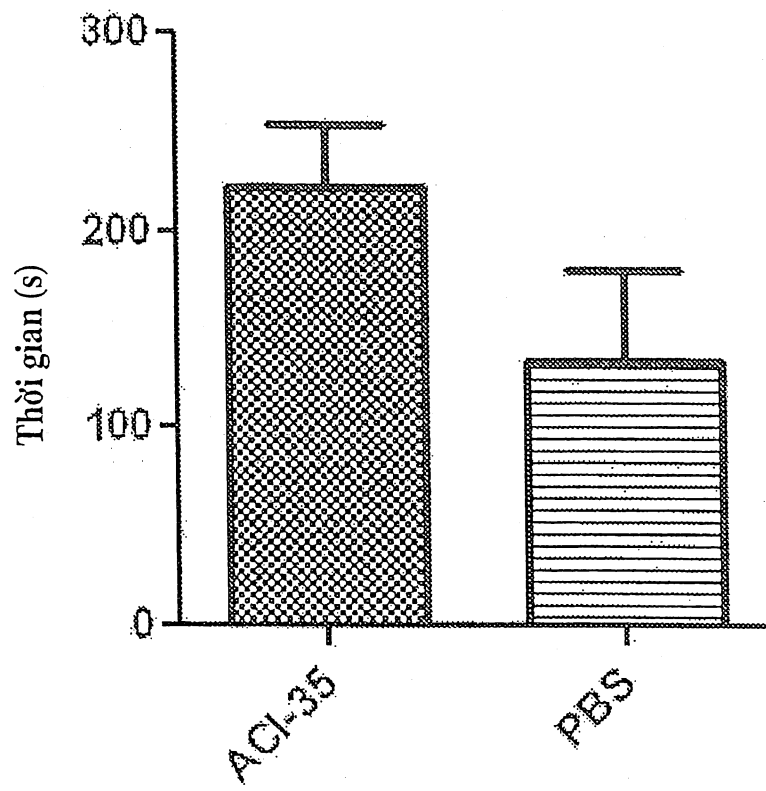


FIG.33

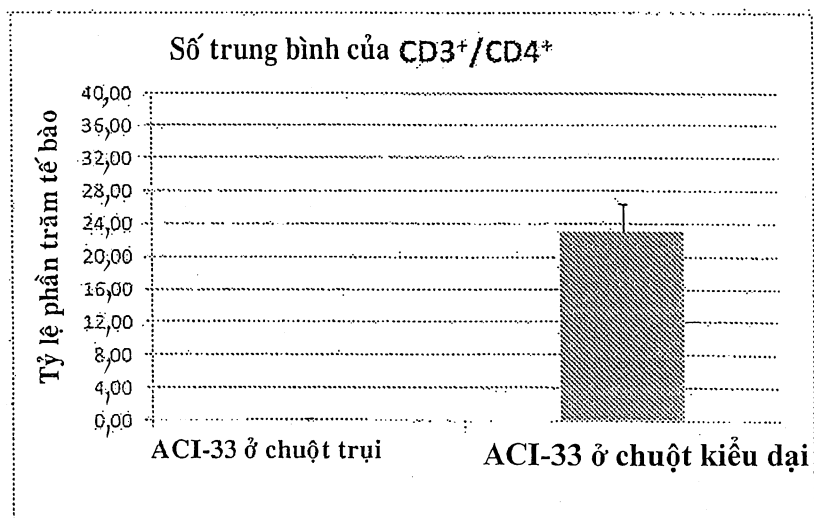
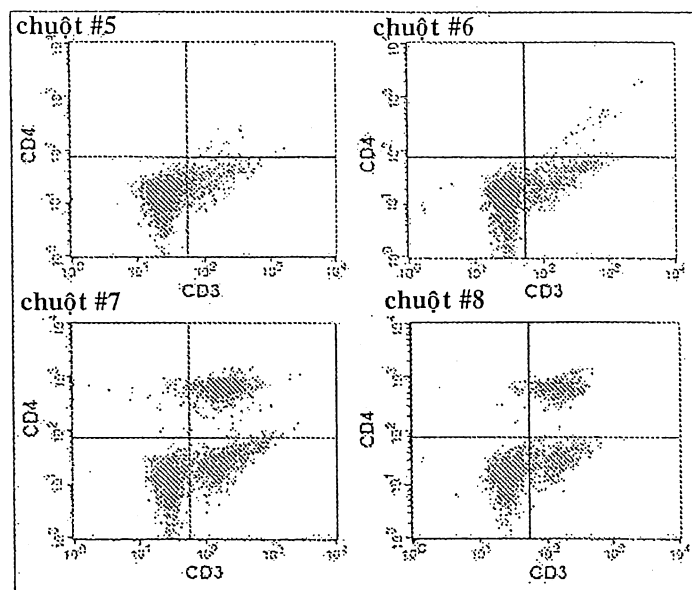


FIG.34

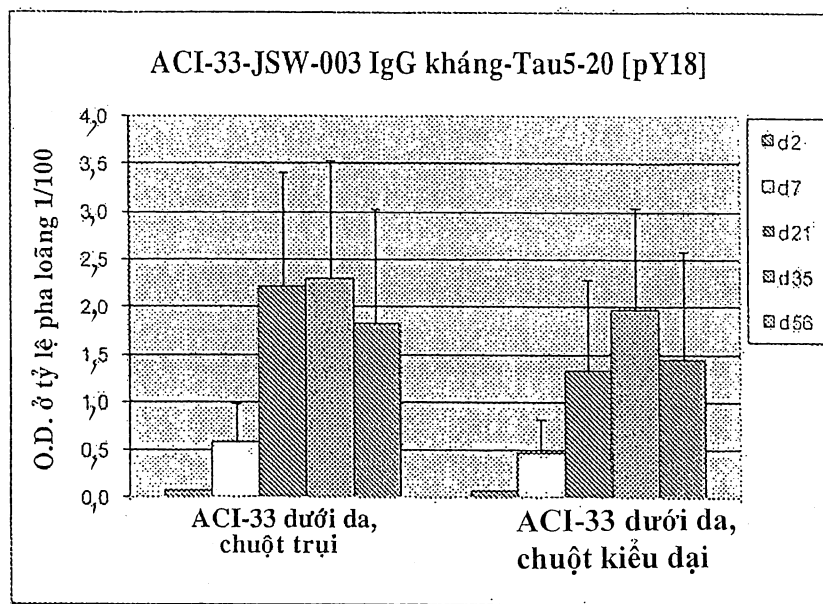


FIG.35

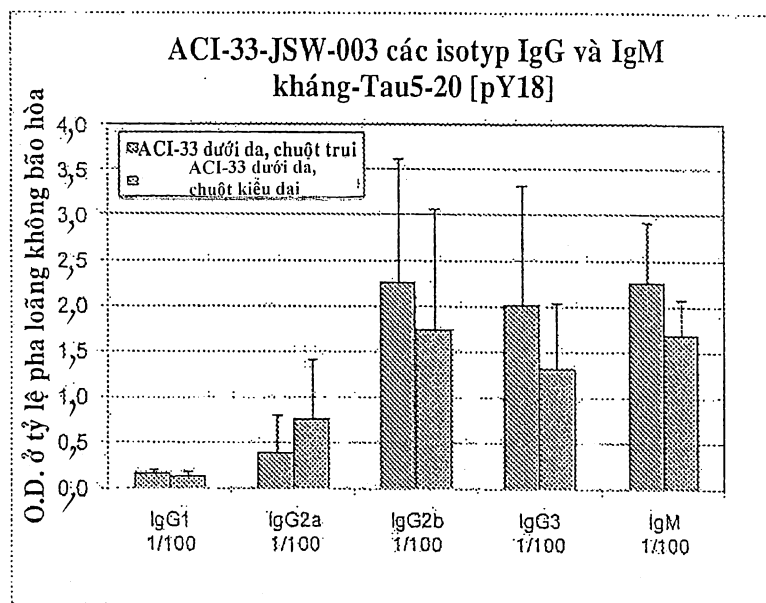


FIG.36

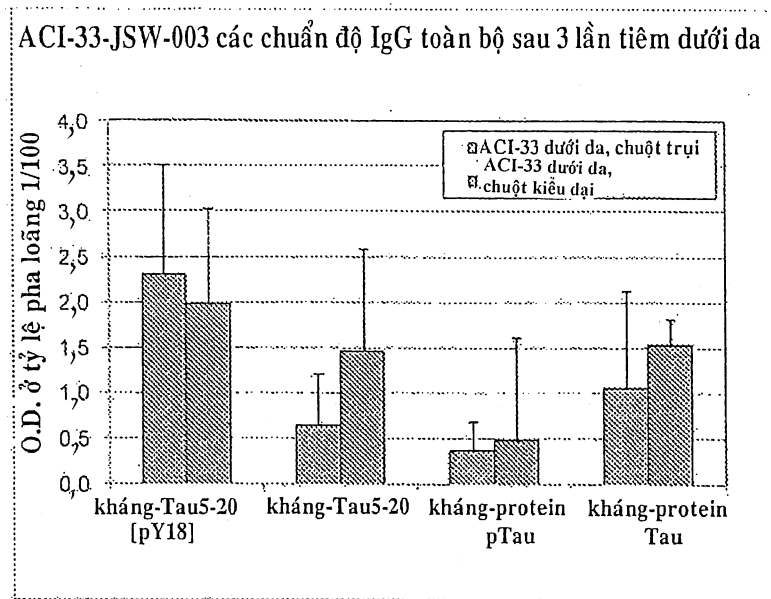


FIG.37

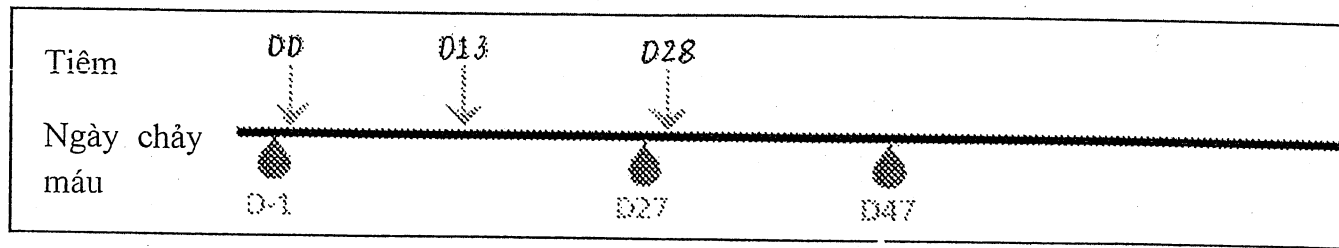


FIG.38

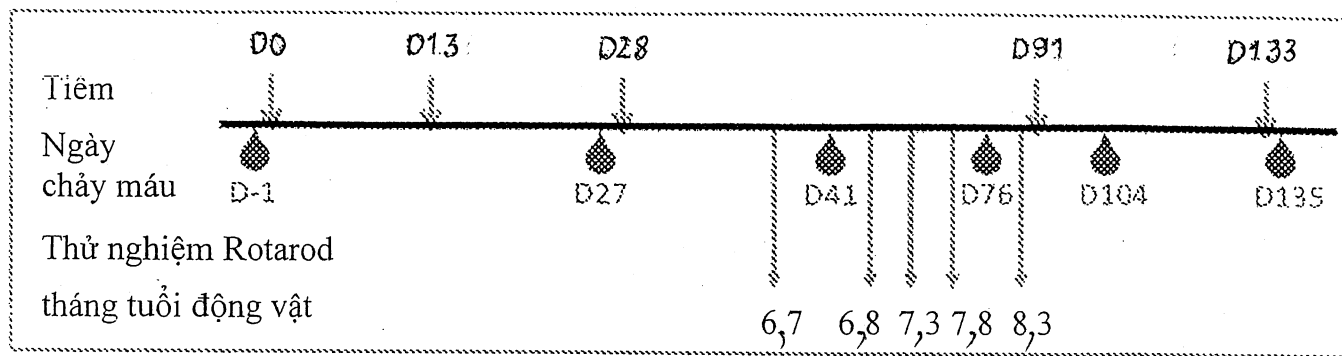


FIG.39

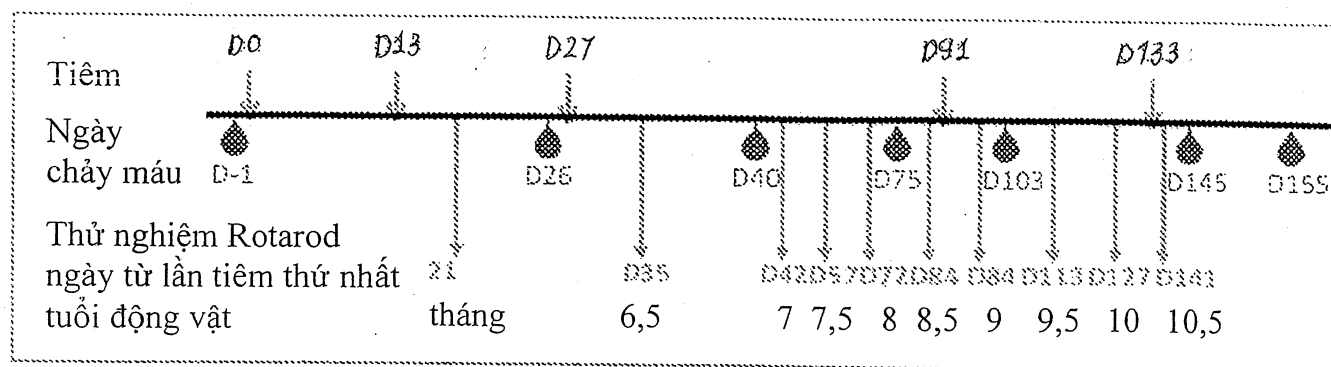


FIG.40