



(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) 
1-0020557

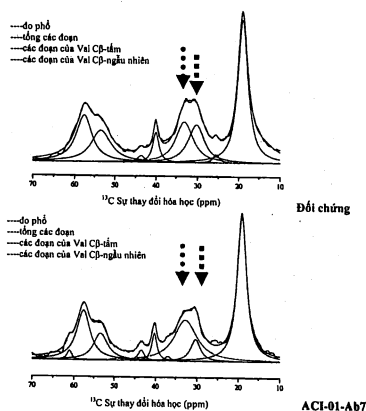
(51)⁷ A61K 39/395, G01N 33/577, C07K
16/18

(13) B

- (21) 1-2008-01736 (22) 08.12.2006
(86) PCT/EP2006/011862 08.12.2006 (87) WO2007/068412A2 21.06.2007
(30) 05027092.5 12.12.2005 EP
06014729.5 14.07.2006 EP
06020766.9 02.10.2006 EP
(45) 25.03.2019 372 (43) 26.04.2010 265
(73) AC IMMUNE SA (CH)
EPFL-PSE Building B, CH-1015 Lausanne, Switzerland
(72) GREFERATH, Ruth (DE), HICKMAN, David (GB), MUHS, Andreas (DE),
PFEIFER, Andrea (DE), NICOLAU, Claude (FR)
(74) Công ty Cổ phần Hỗ trợ phát triển công nghệ Detech (DETECH)

(54) KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG, DÒNG TẾ BÀO LAI VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp và chế phẩm để sử dụng trong điều trị và chẩn đoán các bệnh và các rối loạn do hoặc có liên quan đến các protein dạng tinh bột hoặc tương tự tinh bột bao gồm chứng thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các rối loạn và bất thường liên quan đến protein dạng tinh bột như bệnh Alzheimer. Sáng chế đề xuất các phương pháp và chế phẩm chứa kháng thể có hiệu quả và đặc hiệu có khả năng nhận diện và gắn kết đặc hiệu với các epitop đặc hiệu từ các loại protein dạng tinh bột β . Theo sáng chế, các kháng thể có khả năng được sử dụng để điều trị các bệnh và các rối loạn do hoặc liên quan đến các protein dạng tinh bột hoặc tương tự tinh bột bao gồm chứng thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các bệnh và các rối loạn liên quan đến sự hình thành mảng tinh bột bao gồm chứng thoái hoá dạng tinh bột thứ phát và thoái hoá dạng tinh bột liên quan đến tuổi bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các rối loạn thần kinh như bệnh Alzheimer (AD).



.....> Đoạn đối với β -tâm của ^{13}C -dấu Val12
.....> Đoạn đối với ngẫu hứng được cuộn của ^{13}C -dấu Val12

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các phương pháp và chế phẩm sử dụng trong điều trị và chẩn đoán các bệnh và các rối loạn do hoặc có liên quan đến protein dạng tinh bột hoặc tương tự tinh bột bao gồm chứng thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các rối loạn và bất thường liên quan đến protein dạng tinh bột như bệnh Alzheimer.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chứng thoái hoá dạng tinh bột không phải là một dạng bệnh riêng biệt mà là một nhóm bao gồm nhiều quá trình tiến triển bệnh đặc trưng bởi các chất lắng cặn trong mô ngoại bào gồm sáp, protein tương tự tinh bột gọi là dạng tinh bột, tích tụ ở một hoặc nhiều cơ quan hoặc trong cơ thể. Khi các chất lắng cặn dạng tinh bột tích tụ, chúng sẽ gây cản trở chức năng bình thường của các cơ quan hoặc cơ thể. Có ít nhất 15 loại chứng thoái hoá dạng tinh bột. Các dạng chính là thoái hoá dạng tinh bột nguyên phát không có tiền sử đã biết, thoái hoá dạng tinh bột thứ phát xảy ra sau một số tình trạng khác và thoái hoá dạng tinh bột di truyền.

Thoái hoá dạng tinh bột thứ phát xuất hiện ở người bị bệnh viêm nhiễm hoặc lây nhiễm mãn tính, như bệnh lao, bệnh nhiễm khuẩn gọi là sốt Địa Trung Hải, các bệnh nhiễm khuẩn xương (viêm xương tuỷ), viêm đa khớp dạng thấp, viêm ruột non (viêm hồi tràng u hạt), bệnh Hodgkin và bệnh phong.

Thông thường, các chất lắng cặn dạng tinh bột bao gồm ba thành phần. Các sợi protein mảnh dạng tinh bột, nó chiếm khoảng 90% chất tinh bột, bao gồm một trong số vài loại protein khác nhau. Các protein đó có khả năng gấp nếp gọi là các sợi tấm "xếp nếp", cấu hình protein duy nhất có các điểm gắn kết cho màu đỏ Congo tạo ra các đặc tính nhuộm độc nhất của protein dạng tinh bột. Ngoài ra, các chất lắng cặn dạng tinh bột liên quan mật thiết đến hợp phần tinh bột

(AP) P (năm góc), glycoprotein liên quan đến dạng tinh bột trong huyết thanh bình thường P (SAP), và với các glycosaminoglycan sulfat hoá (GAG), các cacbohydrat phức hợp của mô liên kết.

Nhiều bệnh do tuổi già do hoặc có liên quan đến các protein tương tự tinh bột và được đặc trưng, phần nào bởi sự tích tụ của các chất lắng cặn ngoại bào chứa protein dạng tinh bột hoặc chất tương tự tinh bột có thể góp phần làm phát sinh bệnh, cũng như sự tiến triển của bệnh. Các bệnh đó bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các rối loạn thần kinh như bệnh Alzheimer (AD), bao gồm các bệnh hoặc tình trạng đặc trưng bởi sự mất khả năng nhớ liên quan đến nhận thức, ví dụ như, suy giảm nhận thức nhẹ (MCI), sa sút trí tuệ thể Lewy, hội chứng Down, chứng xuất huyết não di truyền với chứng thoái hoá dạng tinh bột (loại Dutch); bệnh phức hợp Guam Parkinson-Dementia. Các bệnh khác do hoặc liên quan đến các protein tương tự dạng tinh bột như liệt trên nhân tiến triển, bệnh xơ cứng rải rác; bệnh Creutzfeldt Jacob, bệnh Parkinson, sa sút trí tuệ liên quan đến HIV, ALS (xơ cứng cột bên teo cơ), viêm cơ thể vùi ((IBM), bệnh tiểu đường bắt đầu tuổi trưởng thành; thoái hoá dạng tinh bột tim lão suy; các khối u nội tiết, và các bệnh khác, kể cả bệnh thoái hoá điểm vàng.

Mặc dù sự phát sinh của các bệnh có thể thay đổi khác nhau, nhưng các chất lắng cặn đặc trưng của chúng thường có nhiều phân tử thể phân tử chung. Với mức đáng kể, được cho là do hoạt sự hoạt hoá cục bộ của quá trình tiền viêm nên dẫn đến xuất hiện sự lắng đọng của các hợp phần hoạt hoá bổ sung, các chất phản ứng giai đoạn cấp tính, các chất điều hòa miễn dịch và các chất trung gian gây viêm nhiễm khác (McGeer et al., 1994).

Bệnh Alzheimer (AD) là một rối loạn thần kinh về cơ bản được hiểu là do các mảng tinh bột gây nên, sự tích tụ của chất lắng cặn bất thường của các protein trong não. Loại tinh bột thường thấy trong não của cá thể mắc bệnh về cơ bản bao gồm các sợi mảnh A β . Các bằng chứng khoa học đã chứng minh rằng việc gia tăng sự sản sinh và tích tụ protein dạng tinh bột beta trong các mảng gây chết tế bào thần kinh, góp phần vào sự phát triển và tiến triển của

bệnh Alzheimer. Sự suy giảm tế bào thần kinh ở các vùng não chiến lược, kéo theo giảm chất truyền thần kinh suy giảm trí nhớ. Các protein chủ yếu gây ra sự tích tụ mảng bao gồm protein tiền chất tinh bột (APP) và hai presenilin (presenilin I và presenilin II). Sự phân giải liên tiếp của protein tiền chất tinh bột (APP), cơ bản được biểu hiện và dị hoá ở hầu hết các tế bào, bằng các enzym β và secretaza γ dẫn đến việc giải phóng peptit $A\beta$ từ axit amin 39 đến 43. Sự suy thoái APP có khả năng làm tăng xu hướng tập hợp tại các mảng. Cụ thể là phần $A\beta(1-42)$ có xu hướng hình thành các khối kết tụ lớn do hai gốc axit amin rất kỵ nước tại đầu C của nó. Vì thế phần $A\beta(1-42)$ được cho là có liên quan chính và gây ra sự khởi đầu của quá trình hình mảng viêm thần kinh ở bệnh Alzheimer và vì vậy có khả năng bệnh lý cao. Do đó, cần có kháng thể đặc hiệu mà có thể hướng đến và khuếch tán sự hình thành mảng tinh bột.

Các triệu chứng rõ ràng của bệnh Alzheimer tiến triển chậm và triệu chứng đầu tiên có thể chỉ là tính đãng trí. Ở giai đoạn này, các cá thể có thể quên nhiều sự kiện, hoạt động mới xảy ra, tên của mọi người trong gia đình hoặc mọi thứ và có thể không thể giải được các bài toán đơn giản. Khi bệnh tiến triển, các triệu chứng dễ nhận biết hơn và trở nên nghiêm trọng đến mức khiến người bệnh Alzheimer hoặc các thành viên trong gia đình của họ cần đến sự trợ giúp y tế. Các triệu chứng giữa thời kỳ của bệnh Alzheimer bao gồm quên làm các tác vụ đơn giản như cách chải lông ngựa, và ảnh hưởng đến phát âm, hiểu, đọc, hoặc viết. Giai đoạn cuối của bệnh Alzheimer khiến bệnh nhân có thể trở nên lo âu hoặc kích động, có thể bỏ nhà đi lang thang và cuối cùng thì cần sự chăm sóc tuyệt đối.

Hiện nay, chỉ có cách xác định để chẩn đoán bệnh Alzheimer là nhận dạng các mảng và các cụm rối trong mô não khi khám nghiệm tử thi người đã chết. Vì vậy, các bác sỹ chỉ thực hiện chẩn đoán về bệnh Alzheimer là “có nguy cơ” hoặc “có khả năng” nếu người bệnh vẫn còn sống. Nhờ sử dụng các phương pháp hiện tại, các bác sỹ có thể chẩn đoán bệnh Alzheimer đúng đến 90 phần trăm so với việc sử dụng các công cụ khác để chẩn đoán “có khả năng” mắc bệnh

Alzheimer. Các bác sỹ tiến hành các câu hỏi về sức khoẻ cá nhân, tiền sử y học, và lịch sử của các vấn đề mà cá nhân gặp phải khi thực hiện các hoạt động hàng ngày. Các thử nghiệm về tập tính ghi nhớ, cách giải quyết vấn đề, khả năng chú ý, tổng số đếm và ngôn ngữ để đưa ra thông tin về suy giảm nhận thức và thử nghiệm y học như các thử nghiệm máu, nước tiểu, hoặc dịch tuỷ và scan não có thể cung cấp thêm một số thông tin bổ sung.

Việc kiểm soát bệnh Alzheimer bao gồm các cách điều trị dựa vào thuốc và không dựa vào thuốc. Các cách điều trị này giúp thay đổi tiến trình cơ bản của bệnh (làm chậm hoặc đảo ngược tiến trình) trong chừng mực không thành công lớn. Các loại thuốc phục hồi những thiếu hụt (nhược điểm), hoặc sự rối loạn, trong các chất truyền tin hoá học của các tế bào thần kinh (các chất dẫn truyền tín hiệu thần kinh), cụ thể là các chất ức chế cholinesteraza (ChEIs) như tacrin và rivastigmin đã có khả năng cải thiện nhiều triệu chứng. Các ChEI làm cản trở sự thoái hoá enzym của các chất dẫn truyền thần kinh nhờ đó làm tăng lượng các chất truyền tin hoá học có tác dụng truyền các tín hiệu thần kinh ở não.

Đối với một số người ở các giai đoạn sớm và giai đoạn giữa của bệnh, các loại thuốc tacrin (COGNEX[®], Morris Plains, NJ), donepezil (ARICEPT[®], Tokyo, JP), rivastigmin (EXELON[®], East Hanover, NJ), hoặc galantamin (REMINYL[®], New Brunswick, NJ) có thể ngăn ngừa một số triệu chứng không để trở quá nghiêm trọng trong khoảng thời gian nhất định. Dược chất khác, memantin (NAMENDA[®], New York, NY), được chấp thuận để điều trị nhằm giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh Alzheimer. Ngoài ra, một số loại thuốc có thể giúp kiểm soát các triệu chứng hành vi của bệnh Alzheimer như chứng khó ngủ, bồn chồn, lơ đãng, lo âu và trầm cảm. Việc điều trị các triệu chứng đó thường làm cho các bệnh nhân cảm thấy thoải mái hơn và dễ chăm sóc người bệnh dễ hơn. Đáng tiếc, mặc dù việc điều trị được cải thiện đáng kể chứng tỏ rằng các tác nhân này thích hợp hơn các tác nhân trong thuốc trấn an, nhưng bệnh vẫn tiếp tục tiến triển, và tác dụng trung bình đối với chức năng tinh thần chỉ ở mức

vừa phải, ChEIs còn có các tác dụng phụ bao gồm sự rối loạn chức năng dạ dày-ruột non, đặc tính độc trong gan và giảm cân.

Các bệnh khác do hoặc có liên quan đến sự tích tụ và lắng đọng của protein tương tự tinh bột là chứng suy giảm nhận thức nhẹ, sa sút trí tuệ thể Lewy (LBD), xơ cứng cột bên teo cơ (ALS), viêm cơ thể vùi ((IBM) và thoái hoá điểm vàng, cụ thể là thoái hoá điểm vàng có liên quan đến tuổi (AMD).

Chứng suy giảm nhận thức nhẹ (MCI) là thuật ngữ chung nhất thường định nghĩa một rối loạn trí nhớ vừa phải, nhưng khó thấy. Một người bị MCI cảm thấy có nhiều vấn đề về trí nhớ so với mức độ chung trong cùng độ tuổi, nhưng không thể hiện các triệu chứng khác của việc sa sút trí tuệ, như khả năng phán đoán hoặc giảm sút khả năng lập luận. MCI là tình trạng thường xuyên phản ánh giai đoạn tiền lâm sàng của AD.

Sự lắng đọng của tinh bột β ở vỏ entorhinal (EC) được cho là đóng vai trò chính trong quá trình phát triển của chứng suy giảm nhận thức vừa phải (MCI) ở những người lớn tuổi. Đó là đường kẻ được quan sát thấy với các mức CSF-A $A\beta(1-42)$ suy giảm đáng kể khi AD trở nên rõ ràng về mặt lâm sàng. Ngược lại các mức CSF- $A\beta(1-42)$ CSF-tau tăng đáng kể ở giai đoạn MCI, và sau đó các giá trị này tiếp tục gia tăng, điều đó chứng tỏ rằng các mức của CSF-tau cao có thể giúp phát hiện các đối tượng MCI mà dự đoán sẽ phát triển thành AD.

Sa sút trí tuệ thể Lewy (LBD) là rối loạn thoái hoá thần kinh có thể xuất hiện ở người già trên 65 tuổi, nó thường gây ra các triệu chứng suy giảm nhận thức (suy nghĩ) và thay đổi tập tính bất thường. Các triệu chứng có thể bao gồm suy giảm nhận thức, các dấu hiệu thần kinh, các rối loạn ngủ và thiếu khả năng tự chủ. Suy giảm nhận thức là đặc trưng có của LBD ở hầu hết các trường hợp. Các bệnh nhân có các giai đoạn tái phát chứng lú lẫn sẽ có tiên triển xấu hơn. Biến đổi bất thường về khả năng nhận thức thường có liên quan đến mức độ thay đổi sự tập trung và tỉnh táo. Suy giảm nhận thức và các biến đổi bất thường về suy nghĩ có thể xảy ra trong nhiều phút, giờ, hoặc ngày.

Các thể Lewy được tạo ra từ các protein tơ thần kinh được phosphoryl hoá và không được phosphoryl hoá; chúng chứa protein tiếp hợp alpha-synuclein cũng như ubiquitin, nó liên quan đến việc loại bỏ các protein hư hại hoặc bất thường. Ngoài ra các thể Lewy, các sợi trục thần kinh Lewy, thì các thể vùi trong các quá trình tế bào của các tế bào thần kinh, có thể cũng có mặt. Các mảng dạng tinh bột có thể tạo ra ở não của bệnh nhân bị mắc DLB, tuy nhiên chúng thường có xu hướng ít hơn lượng được tìm thấy trong các bệnh nhân bị bệnh Alzheimer. Các rối loạn tơ thần kinh, dấu hiệu phân biệt bệnh vi mô khác của AD, không phải là đặc điểm chính của DLB, nhưng thường có mặt cùng với các mảng dạng tinh bột.

Bệnh xơ cứng cột bên teo cơ (ALS) được đặc trưng bởi sự thoái hoá của các tế bào thần kinh vận động trên và dưới. Ở một số bệnh nhân ALS, chứng sa sút trí tuệ hoặc mất khả năng phát âm có thể xuất hiện (ALS-D). Chứng sa sút trí tuệ trán-thái dương phổ biến nhất (FTD), và nhiều trường hợp trong số các trường hợp đó có các thể vùi dương tính ubiquitin, âm tính tau trong các tế bào thần kinh của các lớp hồi răng và bề mặt của thùy trán và thùy thái dương.

Viêm cơ thể vùi (IBM) là bệnh gây tổn thương ở chân thường được thấy ở người trên 50 tuổi, ở đó các sợi cơ bị viêm nhiễm và bắt đầu teo, nhưng trong đó não không bị ảnh hưởng và bệnh nhân vẫn duy trì được nhận thức đầy đủ. Hai enzym liên quan đến sự sản sinh protein dạng tinh bột β được thấy gia tăng trong các tế bào cơ của bệnh nhân với bệnh cơ tiến triển, thường tìm thấy trong người già, mà tại đó dạng tinh bột β cũng gia tăng.

Bệnh khác do sự tích tụ hoặc lắng đọng của protein tương tự tinh bột gây ra hoặc có liên quan đến là chứng thoái hoá điểm vàng.

Thoái hoá điểm vàng là bệnh mắt thông thường gây ra tổn hại cục bộ, đó là vùng tâm của võng mạc (mô mỏng như giấy ở đằng sau của mắt nơi các tế bào nhạy ánh sáng gửi các tín hiệu thị giác đến não). Khả năng nhìn sắc nét, trong, “thẳng về phía trước” được xử lý bởi điểm vàng này. Sự tổn thương điểm này gây ra điểm mù và khiến nhìn mờ không rõ nét hoặc hình ảnh bị méo mó. Thoái

hoá điểm vàng liên quan đến độ tuổi (AMD) là nguyên nhân chính của sự suy giảm thị lực ở người Mỹ và đối với người trên 65 tuổi thì nó là nguyên nhân chính gây mù ở người Cáp-ca. Khoảng 1,8 triệu người Mỹ lớn hơn hoặc bằng 40 tuổi bị mắc AMD sớm, và 7,3 triệu người khác bị AMD giai đoạn giữa ở giai đoạn nguy hiểm là nguyên nhân chính dẫn đến mất thị lực. Chính phủ dự tính rằng đến năm 2020 sẽ có khoảng 2,9 triệu người bị AMD sớm. Các nạn nhân của AMD thường bất ngờ và thất vọng khi phát hiện ra là biết quá ít về các nguyên nhân và cách điều trị tình trạng mù này.

Có hai dạng thoái hoá điểm vàng: thoái hoá điểm vàng khô và thoái hoá điểm vàng ướt. Dạng khô, trong đó các tế bào điểm vàng bắt đầu từ từ vỡ, được chẩn đoán là chiếm khoảng 85% các trường hợp thoái hoá điểm vàng. Cả hai mắt thường bị tác động bởi AMD khô, mặc dù một mắt có thể mất thị lực trong khi mắt kia vẫn không bị ảnh hưởng. Drusen, là các chất lắng cặn màu vàng dưới võng mạc, thường là các dấu hiệu biểu hiện sớm của AMD khô. Nguy cơ phát triển của AMD khô sớm hoặc AMD ướt tăng khi số lượng hoặc kích cỡ của drusen tăng. Đối với AMD khô nó có thể là làm tăng hoặc gây mất thị lực mà không chuyển thành dạng ướt của bệnh; tuy nhiên, đối với AMD khô giai đoạn sớm thì có thể thay đổi đột ngột thành dạng ướt.

Dạng ướt, mặc dù chỉ chiếm khoảng 15% các trường hợp, nhưng lại chiếm tới 90% bị mù, và được coi là AMD sớm (không phải là giai đoạn sớm hoặc giai đoạn giữa của AMD ướt). AMD ướt thường xảy ra trước dạng khô của bệnh. Khi dạng khô trở nên nặng hơn thì một số người xuất hiện các mạch máu bất thường lớn lên phía sau điểm vàng. Các mạch máu này rất yếu và sẽ bị rò dịch và máu (vì thế gọi là thoái hoá điểm vàng ướt), nhanh chóng gây tổn thương điểm vàng.

Dạng khô của AMD sẽ thường khiến thị lực bị mờ nhẹ. Cụ thể tâm của thị giác bị mờ và vùng này trở nên lớn hơn khi bệnh tiến triển. Không có các triệu chứng được chú ý nếu chỉ một mắt bị ảnh hưởng. Ở dạng AMD ướt, các đường

thăng có thể xuất hiện gọn sóng và việc mất thị giác tâm có thể xuất hiện nhanh chóng.

Sự chẩn đoán bệnh thoái hoá điểm vàng thường bao gồm việc kiểm tra độ co giãn của đồng tử, thử nghiệm độ tinh nhanh của thị lực, và tầm nhìn ngược của mắt nhờ sử dụng phương pháp gọi là soi đáy mắt để giúp chẩn đoán AMD, và - nếu AMD ướt được nghi ngờ thì có thể tiến hành chụp tia X mạch florescein. Nếu AMD khô ở giai đoạn sớm thì không có phương pháp điều trị thông dụng nào để ngăn ngừa mất thị lực. Tuy nhiên, chế phẩm liều cao đặc hiệu chứa các chất chống oxy hoá và kẽm có thể làm chậm trễ hoặc ngăn ngừa AMD giai đoạn giữa từ giai đoạn sớm. Macugen® (dung dịch tiêm truyền natri pegaptanib), liệu pháp quang động và quang đông tụ laze có thể kiểm soát sự hình thành mạch máu bất thường và sự chảy máu trong điểm vàng, nó có ích với một số người bị AMD ướt; tuy nhiên, thị giác đã mất sẽ không phục hồi được bằng các kỹ thuật này. Nếu thị giác đã mất, các phương tiện trợ giúp thị giác kém đã biết có thể giúp cải thiện chất lượng cuộc sống.

Một trong các dấu hiệu sớm của thoái hoá điểm vàng liên quan đến tuổi (AMD) là sự tích tụ của các chất lắng cặn ngoại bào đã biết như drusen giữa phiến nền của epitheli tạo màu võng mạc (RPE) và màng Bruch (BM). Các nghiên cứu mới đây của Anderson và cộng sự đã khẳng định rằng drusen chứa beta dạng tinh bột. (Experimental Eye Research 78 (2004) 243-256).

Nghiên cứu đang triển khai tiếp tục các nghiên cứu thăm dò về các nhân tố môi trường, di truyền và chế độ ăn uống mà có thể gây ra AMD. Các phương pháp điều trị mới cũng được khảo sát, gồm có cấy ghép tế bào võng mạc, các dược chất sẽ ngăn ngừa hoặc làm chậm lại quá trình tiến triển của bệnh, liệu pháp bức xạ, các liệu pháp gen, chip máy tính cấy vào võng mạc để có thể giúp kích thích thị giác và các tác nhân sẽ ngăn ngừa sự hình thành của các mạch máu mới dưới điểm vàng.

Nhân tố quan trọng để cân nhắc khi triển khai các dược chất mới là dễ sử dụng cho các bệnh nhân đích. Dạng phân phối dược chất qua đường miệng, cụ

thể là các viên nén, viên nang và gel mềm, chiếm 70% tất cả các dạng liều sử dụng vì sự tiện lợi cho bệnh nhân. Các chuyên gia đồng ý rằng các bệnh nhân thích cách sử dụng qua đường miệng hơn sử dụng qua đường tiêm truyền hoặc cách khác, cũng như các dạng sử dụng thuốc xâm nhập. Các chế phẩm với các khoảng thời gian liều giải phóng chậm (nghĩa là giải phóng ngày một lần hoặc giải phóng kéo dài) cũng thích hợp. Các kháng thể dễ sử dụng dưới các dạng liều sử dụng qua đường miệng làm tăng sự chấp thuận của bệnh nhân trong quá trình điều trị.

Điều cần thiết là các phương pháp và các chế phẩm hữu hiệu để làm phát sinh các kháng thể rất đặc hiệu và có hiệu quả cao, đó là điều kiện tiên quyết nếu các kháng thể được cung cấp dưới dạng sử dụng qua đường miệng. Tốt hơn nếu các kháng thể đó sẽ nhận dạng các epitop trên các kháng nguyên khác nhau như protein dạng tinh bột.

Vì vậy, điều cần thiết là các chế phẩm và phương pháp hữu hiệu nhằm vào biến chứng có liên quan đến các bệnh và các rối loạn do hoặc hoặc có liên quan đến các protein dạng tinh bột hoặc tương tự tinh bột gồm có chứng thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các bệnh và các rối loạn liên quan đến sự hình thành mảng dạng tinh bột bao gồm thoái hoá dạng tinh bột thứ phát và thoái hoá dạng tinh bột liên quan đến tuổi bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các rối loạn thần kinh như bệnh Alzheimer (AD), bao gồm các bệnh hoặc tình trạng đặc trưng bởi sự mất khả năng trí nhớ liên quan đến nhận thức ví dụ như, suy giảm nhận thức nhẹ (MCI), sa sút trí tuệ thể Lewy, hội chứng Down, xuất huyết não di truyền với thoái hoá dạng tinh bột (dạng Dutch); bệnh phức hợp Guam Parkinson-Dementia; cũng như các bệnh khác căn cứ vào hoặc liên quan đến các protein tương tự dạng tinh bột như bệnh liệt trên nhân tiến triển, bệnh xơ cứng rải rác; bệnh Creutzfeldt Jacob, bệnh Parkinson, sa sút trí tuệ liên quan đến HIV, ALS (xơ cứng cột bên teo cơ), viêm cơ thể vùi (IBM), bệnh tiểu đường bắt đầu tuổi trưởng thành; chứng thoái hoá dạng tinh bột tim lão suy; các khối u nội tiết, và các bệnh khác, kể cả bệnh thoái hoá điểm vàng. Cụ thể điều cần thiết là các

kháng thể có hiệu quả cao và đặc trưng có khả năng chống lại các triệu chứng sinh lý của bệnh như sự hình thành các mảng có liên quan đến sự kết tụ của các sợi peptit dạng tinh bột hoặc tương tự dạng tinh bột.

Các kháng thể kháng dạng tinh bột được tạo ra bằng cách tiêm chủng $A\beta_{1-42}$ trộn cùng tá dược Freund đầy đủ và không đầy đủ được chứng minh là có khả năng làm giảm lượng tinh bột tích tụ ở chuột chuyển gen đối với bệnh Alzheimer ở người (Schenk et al., 1999).

Việc tiêm chủng trong bụng $A\beta_{1-16}$ tetrapalmitoyl hoá hồi phục trong các liposom đối với chuột chuyển gen NORBA tạo chuẩn độ kháng thể kháng tinh bột đáng kể, nó cũng chứng minh rằng có khả năng làm tan các sợi và các mảng dạng tinh bột *in vitro* và *in vivo*. (Nicolau et al., 2002).

Cơ chế thích hợp nhờ đó làm tan các sợi và các mảng dạng tinh bột phát sinh trước tiên được Bard và cộng sự (2000) đề xiaát, người đã đưa ra kết luận, dựa vào thông số của chúng, rằng các kháng thể opsonin hoá các mảng, sau đó chúng bị phá huỷ bởi các đại thực bào của các vi tế bào thần kinh. De Mattos và cộng sự (2001) cho rằng MAb trực tiếp kháng lại vùng tâm của dạng tinh bột β có thể gắn kết và cô lập hoàn toàn tinh bột trong plasma. Họ cho rằng rằng sự có mặt của các mAb đó trong quá trình tuần hoàn làm chuyển rời trạng thái cân bằng của $A\beta$ giữa não và plasma, giúp cho việc làm sạch và đào thải ra ngoài thay vì lắng đọng trong não.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các phương pháp và các dược phẩm bao gồm các kháng thể đặc hiệu và có hiệu quả đối với khả năng nhận dạng và gắn kết đặc hiệu với các epitop đặc hiệu từ các loại kháng nguyên dạng tinh bột β -. Các kháng thể được khả dụng theo sáng chế được cụ thể sử dụng để điều trị các bệnh và các rối loạn do hoặc có liên quan đến các protein dạng tinh bột hoặc dạng tương tự tinh bột, bao gồm chứng thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các bệnh và các rối loạn liên quan đến sự hình thành mảng dạng tinh bột, bao gồm thoái hoá dạng tinh bột thứ

phát và thoái hoá dạng tinh bột liên quan đến tuổi tác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các rối loạn thần kinh như bệnh Alzheimer (AD), bao gồm các bệnh hoặc tình trạng đặc trưng bởi sự mất khả năng trí nhớ liên quan đến nhận thức ví dụ như, suy giảm nhận thức nhẹ (MCI), sa sút trí tuệ thể Lewy, hội chứng Down, xuất huyết não di truyền với thoái hoá dạng tinh bột (dạng Dutch); bệnh phức hợp Guam Parkinson-Dementia; cũng như các bệnh khác dựa trên hoặc liên quan đến protein tương tự dạng tinh bột như bệnh liệt trên nhân tiến triển, bệnh xơ cứng rải rác; bệnh Creutzfeldt Jacob, bệnh Parkinson, sa sút trí tuệ liên quan đến HIV, ALS (xơ cứng cột bên teo cơ), viêm cơ thể vùi ((IBM), bệnh tiểu đường bắt đầu tuổi trưởng thành; thoái hoá dạng tinh bột tim lão suy; các khối u nội tiết, và các bệnh khác, kể cả bệnh thoái hoá điểm vàng, trong số các bệnh khác.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất các phương pháp và chế phẩm để duy trì hoặc làm tăng khả năng nhớ liên quan đến nhận thức ở động vật có vú biểu hiện bệnh hoặc tình trạng liên quan đến dạng tinh bột, bao gồm bước cho động vật, cụ thể là động vật có vú, cụ thể hơn là người cần điều trị này bằng cách sử dụng một lượng điều trị hữu hiệu kháng thể đơn dòng theo sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: Các peptit thu được từ các trình tự A β 1-15, 1-16 và 1-16(Δ 14), 22-35 và 29-40.

Fig.2: Gắn kết của kháng thể đơn dòng mAC1-01-Ab7 C2 với loại tinh bột trong phép thâm tách Western và điểm.

Fig.3: Gắn kết của kháng thể đơn dòng mAC1-01-Ab7 C2 các sợi tinh bột bằng phương pháp hiển vi điện tử truyền qua.

Fig.4: Các kết quả của thử nghiệm đầu nối đầu giữa thử nghiệm huỳnh quang Th-T và NMR trạng thái rắn của peptit dạng tinh bột β 1-42 đánh dấu U- ^{13}C Tyr10 và Val 12-.

SEQ ID NO:1: Peptit kháng nguyên A β ₁₋₁₅.

SEQ ID NO:2: Peptit kháng nguyên A β ₁₋₁₆.

SEQ ID NO:3: Peptit kháng nguyên A β ₁₋₁₆(Δ 14).

SEQ ID NO:4: Peptit kháng nguyên A β ₂₂₋₃₅.

SEQ ID NO:5: Peptit kháng nguyên A β ₂₉₋₄₀.

SEQ ID NO:6: Peptit kháng nguyên A β ₁₋₁₇.

SEQ ID NO:7: Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chuột C2.

SEQ ID NO:8: Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng chuột C2

SEQ ID NO:9: Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chuột C2

SEQ ID NO:10: Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chuột C2 bao gồm các trình tự tín hiệu.

SEQ ID NO:11: Trình tự nucleotit vùng biến đổi chuỗi nặng chuột C2.

SEQ ID NO:12: Trình tự nucleotit vùng biến đổi chuỗi nặng chuột C2 bao gồm các trình tự tín hiệu.

SEQ ID NO:13-20: các thể biến dị trình tự axit amin củ vùng epitop trên peptit A β .

SEQ ID NO:21: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ chuột C2.

SEQ ID NO:22: Trình tự axit amin của chuỗi nặng chuột C2.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế tận dụng các bọc lộ của kháng nguyên làm tăng cường sự tiếp xúc và tính ổn định của cấu hình kháng nguyên ưu tiên, cuối cùng thì nó tạo ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu cao và hình thành các kháng thể có các đặc tính duy nhất.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, hoặc cụ thể hơn, đề cập đến kháng thể đơn dòng gồm có kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, chúng được làm tăng lên kháng lại cấu trúc kháng

nguyên siêu phân tử bao gồm peptit kháng nguyên tương ứng với trình tự axit amin của peptit dạng tinh bột β -, cụ thể là của peptit dạng tinh bột β - $A\beta_{1-15}$, $A\beta_{1-16}$ và $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$, được cải biến bằng các gốc kỵ nước, ví dụ axit palmitic hoặc gốc ưa nước, ví dụ polyetylen glycol (PEG) hoặc hỗn hợp của cả hai, trong đó gốc kỵ nước và ưa nước này tương ứng liên kết cộng hoá trị với từng đầu của peptit kháng nguyên bằng ít nhất một, cụ thể là một hoặc hai axit amin, ví dụ như lysin hoặc axit glutamic và cystein hoặc axit amin bất kỳ thích hợp hoặc chất tương tự axit amin có khả năng sử dụng như công cụ liên kết để kết hợp gốc kỵ nước và ưa nước với phần peptit. Khi PEG được sử dụng làm gốc ưa nước, các đầu PEG được liên kết cộng hoá trị với phosphatidyletanolamin hoặc hợp chất bất kỳ thích hợp để thực hiện chức năng như thành phần neo, ví dụ, để gắn vào cấu trúc kháng nguyên trong lớp kép của liposom.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, nó chấp nhận cấu hình tự nhiên của tinh bột ở chỗ nó liên kết đặc hiệu với các oligome và các sợi tinh bột, nhưng không chuyển thành dạng thẳng với loại tinh bột.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng theo sáng chế và như được mô tả trên đây, kháng thể hoặc phần đó gắn kết với chất đơn phân $A\beta$ bằng ái lực gắn kết ít nhất bằng khoảng từ 1×10^{-6} đến ít nhất khoảng 1×10^{-8} , cụ thể ít nhất khoảng 1×10^{-6} tới ít nhất khoảng 1×10^{-7} , cụ thể hơn ít nhất khoảng 1×10^{-7} đến ít nhất khoảng 1×10^{-8} , thậm chí cụ thể hơn là ít nhất khoảng 1×10^{-7} đến ít nhất khoảng 4×10^{-7} , nhưng tốt hơn nếu không có khả năng phản ứng chéo với protein tiền chất tinh bột (APP).

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng theo sáng chế và như được mô tả trên đây, kháng thể hoặc phần đó gắn kết với sợi, sợi nhỏ hoặc sợi mảnh $A\beta$ bằng ái lực gắn kết bằng ít nhất

khoảng từ 1×10^{-7} đến ít nhất khoảng 1×10^{-9} , cụ thể ít nhất khoảng từ 1×10^{-7} đến ít nhất khoảng 1×10^{-8} , cụ thể hơn là ít nhất khoảng từ 1×10^{-8} đến ít nhất khoảng 1×10^{-9} , thậm chí tốt hơn là ít nhất khoảng từ 1×10^{-8} đến ít nhất khoảng 5×10^{-8} , nhưng tốt hơn là không có liên kết chéo bất kỳ đáng kể với protein tiền chất tinh bột (APP).

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng theo sáng chế và như được mô tả ở trên, kháng thể hoặc phần thể hiện ái lực gắn kết với sợi, sợi nhỏ hoặc sợi mảnh A β cao hơn ít nhất là 5 lần, cụ thể ít nhất là 10 lần, cụ thể hơn ít nhất là 15 lần, so với ái lực gắn kết với chất đơn phân A β .

Các kháng thể theo sáng chế có khả năng ức chế, *in vitro* và *in vivo*, sự kết tụ của các peptit đơn phân tạo tinh bột, cụ thể là các peptit đơn phân dạng tinh bột β -, ví dụ như các peptit đơn phân A β 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, cụ thể là các peptit đơn phân A β_{1-42} , trong các sợi nhỏ hoặc các sợi polyme dạng tinh bột cao phân tử.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó, khi cùng ủ với peptit đơn phân dạng tinh bột, cụ thể là các peptit đơn phân dạng tinh bột β -, ví dụ như các peptit đơn phân A β 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, cụ thể là các peptit đơn phân A β_{1-42} , ức chế sự kết tụ của các chất đơn phân A β trong các sợi nhỏ polyme cao phân tử.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng gồm có kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó, khi cùng ủ, tốt hơn là ủ với tỷ lệ nồng độ mol lên đến 1:100, tốt hơn nữa là với tỷ lệ nồng độ mol khoảng 1:30 và 1:100, nhưng tốt hơn nữa là với tỷ lệ nồng độ mol khoảng 1:100, với các peptit đơn phân dạng tinh bột, tốt hơn là các peptit đơn phân dạng tinh bột β -, ví dụ như các peptit đơn phân A β 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, nhưng cụ thể là các peptit đơn phân

$A\beta_{1-42}$, ức chế sự tích tụ của các chất đơn phân $A\beta$ trong các sợi nhỏ polyme cao phân tử. Cụ thể, các lượng ức chế này ít nhất là 50%, tốt nhất là ít nhất là 65%, tốt hơn ít nhất là 75%, thậm chí tốt hơn ít nhất là 80%, nhưng tốt hơn ít nhất là 85-90%, hoặc nhiều hơn khi so với các chất đơn phân peptit dạng tinh bột tương ứng ủ trong dung dịch đệm (đối chứng).

Cụ thể, quá trình cùng ủ của kháng thể theo sáng chế với các peptit đơn phân dạng tinh bột có thể được tiến hành trong khoảng từ 24 giờ đến 60 giờ, cụ thể là trong khoảng từ 30 giờ đến 50 giờ, tốt hơn là trong 48 giờ ở khoảng 28°C và 40°C, tốt hơn trong khoảng 32°C và 38°C, tốt hơn nữa là ở 37°C.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể, tốt hơn là kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó, khi cùng ủ, cụ thể khi cùng ủ trong 48 giờ ở 37°C với tỷ lệ nồng độ mol 1:100, cùng các peptit đơn phân dạng tinh bột, cụ thể là các peptit đơn phân dạng tinh bột β -, ví dụ như các peptit đơn phân $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, nhưng tốt hơn là các peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$, có khả năng ức chế sự tích tụ của các chất đơn phân dạng tinh bột, cụ thể là sự tích tụ của các peptit đơn phân dạng tinh bột β -, ví dụ như các peptit đơn phân $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, và cụ thể là các peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$ trong các sợi nhỏ hoặc các sợi polyme cao phân tử bằng ít nhất là 85%, cụ thể ít nhất là 89% và cụ thể hơn ít nhất là 95% như so với các chất đơn phân peptit dạng tinh bột tương ứng ủ trong dung dịch đệm (đối chứng).

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, mà thể hiện tính đặc hiệu cao với các peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$, nhưng về cơ bản không có hoặc chỉ có khả năng phản ứng chéo yếu với các peptit đơn phân $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$, và/hoặc $A\beta_{1-41}$, cụ thể là kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng, gồm có kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó nhạy cảm gấp 100 lần, cụ thể từ 50 đến 100 lần, cụ thể hơn là từ 80 đến 100 lần, nhưng cụ thể là 100 lần với peptit dạng

tinh bột $A\beta_{1-42}$ so với $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-41}$ và tới 1000 lần, cụ thể từ 500 đến 1000 lần, cụ thể hơn là từ 800 đến 1000 lần, nhưng cụ thể là 1000 lần với peptit dạng tinh bột $A\beta_{1-42}$ như so với $A\beta_{1-38}$, và vì vậy có khả năng ức chế, *in vitro* và *in vivo*, sự kết tụ của các peptit đơn phân tạo tinh bột, cụ thể là của peptit dạng tinh bột $A\beta_{1-42}$.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề xuất kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng, gồm có kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó có tính nhạy cảm gắn kết cao với peptit dạng tinh bột $A\beta_{1-42}$ và có khả năng phát hiện các sợi $A\beta_{1-42}$ với nồng độ dưới ít nhất $0,01\mu\text{g}$, cụ thể với giới hạn nồng độ nằm trong khoảng $0,5\mu\text{g}$ và $0,01\mu\text{g}$, cụ thể hơn trong khoảng $0,1\mu\text{g}$ và $0,01\mu\text{g}$, cụ thể là với nồng độ là $0,001\mu\text{g}$.

Theo một phương án rất cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng, gồm có kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó có khả năng phát hiện các sợi $A\beta_{1-42}$ với nồng độ dưới ngưỡng là $0,001\mu\text{g}$ và các sợi $A\beta_{1-40}$ với nồng độ dưới ngưỡng là $0,1\mu\text{g}$ và các sợi $A\beta_{1-38}$ với nồng độ dưới ngưỡng là $1\mu\text{g}$ lượng các sợi.

Liên kết của các kháng thể theo sáng chế và như được mô tả trên đây với các peptit đơn phân tạo tinh bột, cụ thể với dạng tinh bột (1-42) dẫn đến ức chế sự tích tụ của các peptit tạo tinh bột đơn phân với các sợi hoặc các sợi tơ phân tử cao. Mặc dù việc ức chế sự kết hợp của các peptit đơn phân tạo tinh bột với các kháng thể theo sáng chế có thể ngăn ngừa hoặc làm chậm lại quá trình hình thành các mảng tinh bột, cụ thể dạng tinh bột (1-42) mà được biết là bắt đầu trở nên không tan bởi sự thay đổi cấu hình thứ cấp và là phần chính của các mảng tinh bột ở não của động vật hoặc người bị bệnh.

Khả năng ức chế sự kết tụ của kháng thể theo sáng chế có thể được xác định bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, cụ thể là bằng cách làm siêu ly tâm tỷ trọng-gradien tiếp theo là phân tích sa lắng SDS-PAGE trên gradien đã tạo ra trước và/hoặc bằng thử nghiệm huỳnh quang thioflavin T (Th-T).

Sáng chế còn đề xuất các kháng thể, kháng thể đó khi cùng ủ với các sợi nhỏ polyme dạng tinh bột cao phân tử tạo ra trước đó hoặc các sợi được tạo ra bằng sự kết tụ của các peptit đơn phân dạng tinh bột, cụ thể là các peptit đơn phân dạng tinh bột β -, ví dụ như các peptit đơn phân $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, cụ thể là các peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$, có khả năng chống lại sự kết tụ các sợi nhỏ hoặc các sợi polyme dạng tinh bột cao phân tử này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó, khi cùng ủ với tỷ lệ nồng độ mol 1:100, cụ thể hơn ở tỷ lệ nồng độ mol trong khoảng 1:30 và 1:100, cụ thể là ở tỷ lệ nồng độ mol là 1:100, với các sợi nhỏ polyme dạng tinh bột cao phân tử tạo ra trước đó hoặc các sợi được tạo ra bằng sự kết tụ của các peptit đơn phân dạng tinh bột, cụ thể các peptit đơn phân dạng tinh bột β -, ví dụ như các peptit đơn phân $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, cụ thể là các peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$, có khả năng chống kết tụ các sợi nhỏ polyme hoặc các sợi đã tạo ra trước đó vào khoảng ít nhất 35%, cụ thể vào khoảng ít nhất 40%, cụ thể hơn vào khoảng ít nhất 50%, thậm chí cụ thể hơn vào khoảng ít nhất 60%, cụ thể là vào khoảng ít nhất 70% hoặc nhiều hơn.

Cụ thể, kháng thể theo sáng chế được cùng ủ với các sợi nhỏ hoặc các sợi polyme dạng tinh bột cao phân tử tạo ra trước đó trong 12 giờ đến 36 giờ, cụ thể trong khoảng 18 giờ đến 30 giờ, cụ thể hơn là 24 giờ ở nhiệt độ khoảng 28°C và 40°C, cụ thể trong khoảng 32°C và 38°C, cụ thể hơn ở 37°C.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó, khi cùng ủ trong 24 giờ ở 37°C ở tỷ lệ nồng độ mol là 1:100 với các sợi nhỏ polyme dạng tinh bột cao phân tử tạo ra trước đó hoặc các sợi được tạo ra bằng sự kết tụ của các peptit đơn phân dạng tinh bột, cụ thể các peptit đơn phân dạng tinh bột β -, ví dụ như các peptit đơn phân $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, cụ thể là các peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$, có khả năng

chống kết tụ các sợi nhỏ hoặc các sợi polyme dạng tinh bột cao phân tử tạo ra trước đó này vào khoảng ít nhất 35%, cụ thể vào khoảng ít nhất 40%, cụ thể hơn vào khoảng ít nhất 50%, thậm chí cụ thể hơn vào khoảng ít nhất 60%, cụ thể là vào khoảng ít nhất 70% hoặc nhiều hơn như so với các sợi nhỏ hoặc các sợi polyme dạng tinh bột được tạo ra trước đó tương ứng được ủ với chất dẫn đối chứng (chỉ dạng tinh bột) (đối chứng).

Khả năng ức chế sự kết tụ của kháng thể theo sáng chế có thể được xác định bằng phương pháp bất kỳ thích hợp đã biết nào trong lĩnh vực kỹ thuật, cụ thể là bằng cách làm siêu ly tâm tỷ trọng-gradien tiếp theo là phân tích sa lắng SDS-PAGE trên gradien đã tạo ra trước và/hoặc bằng thử nghiệm huỳnh quang thioflavin T (Th-T).

Sáng chế còn đề xuất các kháng thể hoặc các phân chức năng của chúng nhạy cảm về mặt cấu hình riêng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng gồm có kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phân chức năng của chúng, kháng thể đó, khi cùng ủ với các sợi nhỏ polyme dạng tinh bột cao phân tử tạo ra trước đó hoặc các sợi được tạo ra bằng sự kết tụ của các peptit đơn phân dạng tinh bột, cụ thể là các peptit đơn phân dạng tinh bột β -, ví dụ như các peptit đơn phân $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, cụ thể là các peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$, có khả năng kích thích sự đồng hoán của cấu hình tám β - hướng về cấu trúc xoắn α và/hoặc cấu trúc xoắn ngẫu nhiên, cụ thể là cấu trúc xoắn ngẫu nhiên, cụ thể là cấu trúc xoắn ngẫu nhiên tại vị trí đã cho trong phân tử, cụ thể trong môi trường Val 12 của protein $A\beta$, nó làm tăng cấu trúc xoắn ngẫu nhiên do cấu hình tám β - tạo ra và tăng cường sự hoà tan của các sợi nhỏ hoặc các sợi polyme dạng tinh bột cao phân tử đã tạo ra trước. Cụ thể làm giảm các lượng cấu hình tám β - đến ít nhất 30%, cụ thể đến ít nhất 35%, cụ thể hơn đến ít nhất 40% và nhiều hơn so với các sợi nhỏ polyme dạng tinh bột đã tạo ra trước đó tương ứng hoặc các sợi ủ trong dung dịch đệm (đối chứng).

Cụ thể, kháng thể theo sáng chế được cùng ủ với các sợi nhỏ hoặc các sợi polyme dạng tinh bột cao phân tử tạo ra trước đó trong 12 giờ đến 36 giờ, cụ thể trong khoảng 18 giờ đến 30 giờ, cụ thể hơn là 24 giờ ở nhiệt độ khoảng 28°C và 40°C, cụ thể trong khoảng 32°C và 38°C, cụ thể hơn ở 37°C.

Cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng, gồm có kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó, khi cùng ủ trong 24 giờ ở 37°C ở tỷ lệ nồng độ mol là 1:100 với các sợi nhỏ polyme dạng tinh bột cao phân tử tạo ra trước đó hoặc các sợi được tạo ra bằng sự kết tụ của các peptit đơn phân dạng tinh bột, cụ thể các peptit đơn phân dạng tinh bột β -, ví dụ như các peptit đơn phân $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, cụ thể là các peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$, có khả năng kích thích sự đồng hoá của cấu hình tấm β - hướng về cấu hình xoắn α và/hoặc cấu hình xoắn ngẫu nhiên, cụ thể là cấu hình xoắn ngẫu nhiên, thậm chí cụ thể hơn là cấu hình xoắn ngẫu nhiên tại vị trí đã cho trong phân tử, cụ thể trong môi trường Val 12 của protein $A\beta$, nó làm tăng cấu hình xoắn ngẫu nhiên do cấu hình tấm β - tạo ra, với loại sau được giảm đến ít nhất 30%, cụ thể ít nhất 35%, và cụ thể hơn ít nhất 40% và nhiều hơn so với các sợi nhỏ polyme dạng tinh bột đã tạo ra trước đó tương ứng hoặc các sợi ủ trong dung dịch đệm (đối chứng).

Khả năng của kháng thể để kích thích sự đồng hoá cấu hình có thể được xác định bằng phương pháp thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, cụ thể bằng phép phổ học trạng thái rắn ^{13}C NMR, cụ thể, bằng cách xác định các cường độ tích hợp của các cấu hình của Val 12 $C\beta$ trong peptit $A\beta$, cụ thể là các peptit $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, cụ thể là trong peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$.

42.

Bằng cách chống sự tích tụ của các sợi nhỏ hoặc các sợi polyme tạo tinh bột, các kháng thể theo sáng chế có khả năng ngăn ngừa hoặc làm chậm lại quá trình hình thành các mảng dạng tinh bột dẫn đến làm giảm các triệu chứng liên quan đến bệnh và làm chậm hoặc đảo ngược quá trình tiến triển của nó.

Vì vậy, phương án khác của sáng chế là đề xuất kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng như được mô tả trên đây, kháng thể đó có khả năng làm giảm lượng tổng của A β trong não của động vật, cụ thể là động vật có vú, cụ thể là người bị bệnh hoặc tình trạng dẫn đến làm tăng nồng độ của A β trong não.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng như được mô tả trên đây, kháng thể đó có khả năng làm đứt gãy các mảng nhờ đó làm giảm sự tích tụ của mảng trong não của động vật, cụ thể là động vật có vú, cụ thể là người bị bệnh hoặc tình trạng dẫn đến làm tăng lượng mảng tích tụ trong não. Kháng thể theo sáng chế bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng làm giảm lượng mảng tích tụ trong não đến ít nhất 20%, cụ thể đến ít nhất 25%, cụ thể hơn đến ít nhất 30%, thậm chí cụ thể hơn là nhiều hơn 30%.

Vẫn theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng như được mô tả trên đây, kháng thể đó có khả năng làm tan các mảng dẫn đến làm giảm lượng các mảng trong não của động vật, cụ thể là động vật có vú, cụ thể là người bị bệnh hoặc tình trạng dẫn đến làm tăng lượng mảng tích tụ trong não. Kháng thể theo sáng chế bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng làm giảm lượng các mảng trong não đến ít nhất 10%, cụ thể đến ít nhất 15%, cụ thể hơn đến ít nhất 20%.

Cần hiểu rằng kháng thể theo sáng chế có thể thể hiện một, hai hoặc nhiều các đặc tính đặc hiệu được mô tả trên đây với các dạng kết hợp khác nhau của chúng.

Ví dụ, theo một phương án, sáng chế đề xuất các kháng thể, cụ thể là các kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, các kháng thể đó có chức năng kép ở chỗ chúng thể hiện

cả đặc tính ức chế sự kết tụ cũng như đặc tính chống kết tụ như được xác định trên đây, cụ thể liên kết với mức độ cao của tính nhạy cảm cấu hình.

Vẫn theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể chức năng kép bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, cụ thể là kháng thể đơn dòng chức năng kép bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó, khi cùng ủ với các peptit đơn phân dạng tinh bột, cụ thể β -các peptit đơn phân dạng tinh bột ví dụ như các peptit đơn phân $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, cụ thể là các peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$, ức chế sự kết tụ của chất đơn phân $A\beta$ với các sợi nhỏ hoặc các sợi polyme cao phân tử và, ngoài ra khi cùng ủ với các sợi nhỏ polyme dạng tinh bột cao phân tử tạo ra trước đó hoặc các sợi được tạo ra bằng sự kết tụ của các peptit đơn phân dạng tinh bột, cụ thể các peptit đơn phân dạng tinh bột β -, ví dụ như các peptit đơn phân $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, cụ thể là các peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$, có khả năng chống kết tụ các sợi nhỏ hoặc các sợi polyme đã tạo ra trước đó.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất quá trình cùng ủ của kháng thể chức năng kép theo sáng chế, cụ thể là của kháng thể chức năng kép đơn dòng theo sáng chế với các peptit đơn phân dạng tinh bột và các sợi nhỏ hoặc các sợi polyme dạng tinh bột cao phân tử tạo ra trước đó tương ứng, diễn ra với tỷ lệ nồng độ mol 1:100, cụ thể với tỷ lệ trong khoảng 1:30 và 1:100, và cụ thể hơn với tỷ lệ 1:100.

Cụ thể, quá trình cùng ủ của kháng thể theo sáng chế với các peptit đơn phân dạng tinh bột được tiến hành trong 24 giờ đến 60 giờ, cụ thể trong 30 giờ đến 50 giờ, cụ thể hơn trong 48 giờ ở nhiệt độ khoảng 28°C và 40°C, cụ thể trong khoảng 32°C và 38°C, cụ thể hơn ở 37°C, trong khi quá trình cùng ủ với các sợi nhỏ hoặc các sợi polyme dạng tinh bột cao phân tử tạo ra trước đó được tiến hành trong 12 giờ đến 36 giờ, cụ thể trong 18 giờ đến 30 giờ, cụ thể hơn trong 24 giờ ở nhiệt độ khoảng 28°C và 40°C, cụ thể trong khoảng 32°C và 38°C, cụ thể hơn ở 37°C.

Vẫn theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề xuất kháng thể chức năng kép theo sáng chế, cụ thể là kháng thể chức năng kép đơn dòng theo sáng chế, bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, có khả năng chống kết tụ các sợi nhỏ polyme hoặc các sợi tạo ra trước đó vào khoảng ít nhất 10%, cụ thể vào khoảng ít nhất 25%, cụ thể hơn vào khoảng ít nhất 35%, thậm chí cụ thể hơn vào khoảng ít nhất 50%, cụ thể là vào khoảng ít nhất 60-70% hoặc nhiều hơn.

Vẫn theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề xuất kháng thể chức năng kép theo sáng chế, cụ thể là kháng thể chức năng kép đơn dòng theo sáng chế, bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, ức chế sự kết tụ của các peptit đơn phân dạng tinh bột, cụ thể các peptit đơn phân dạng tinh bột β -, ví dụ như các peptit đơn phân $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, cụ thể là các peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$ vào khoảng ít nhất 50%, cụ thể vào khoảng ít nhất 65%, cụ thể hơn vào khoảng ít nhất 75%, thậm chí cụ thể hơn vào khoảng ít nhất 80%, cụ thể là vào khoảng ít nhất 85-90%, hoặc nhiều hơn như so với các chất đơn phân peptit dạng tinh bột tương ứng u trong dung dịch đệm (đối chứng).

Cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể, cụ thể là kháng thể chức năng kép, cụ thể là kháng thể đơn dòng, cụ thể là kháng thể chức năng kép đơn dòng, bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó tạo ra sự ức chế quá trình polyme hoá của các peptit đơn phân dạng tinh bột, cụ thể là các peptit đơn phân dạng tinh bột β -, ví dụ như các peptit đơn phân $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, cụ thể là các peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$ và/hoặc kích thích quá trình làm tan các sợi nhỏ polyme dạng tinh bột cao phân tử tạo ra trước đó hoặc các sợi được tạo ra bằng sự kết tụ của các peptit đơn phân dạng tinh bột, cụ thể các peptit đơn phân dạng tinh bột β -, ví dụ như các peptit đơn phân $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, cụ thể là các peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$, nhờ sự gắn kết đặc hiệu và trực tiếp của kháng thể với các sợi $A\beta$, nó tạo ra sự đồng hoán của cấu hình thứ cấp.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể, cụ thể là kháng thể chức năng kép, cụ thể là kháng thể đơn dòng, cụ thể là kháng thể chức năng kép đơn dòng, bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó gắn kết trực tiếp và đặc hiệu với các sợi dạng tinh bột β -, ví dụ như các sợi bao gồm các peptit đơn phân $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, cụ thể là với các sợi bao gồm các peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$ và/hoặc kích thích quá trình làm tan các sợi nhỏ polyme dạng tinh bột cao phân tử tạo ra trước đó hoặc các sợi được tạo ra bằng sự kết tụ của các peptit đơn phân dạng tinh bột, cụ thể các peptit đơn phân dạng tinh bột β -, ví dụ như các peptit đơn phân $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, cụ thể là các peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$, bằng cách nhằm vào và gắn kết đặc hiệu với epitop trong vùng epitop của protein dạng tinh bột β -, cụ thể là vùng epitop của polypeptit $A\beta$ được giới hạn bởi các gốc axit amin aa_n - aa_m với n là số nguyên trong khoảng 2 và 16, cụ thể trong khoảng 5 và 16, cụ thể hơn trong khoảng 8 và 16, thậm chí cụ thể hơn trong khoảng 10 và 16 và m là số nguyên trong khoảng 3 và 25, cụ thể trong khoảng 3 và 23, cụ thể trong khoảng 3 và 20, cụ thể trong khoảng 3 và 17, cụ thể trong khoảng 6 và 17, cụ thể hơn trong khoảng 9 và 17, thậm chí cụ thể hơn trong khoảng 11 và 17, trong đó n và m không thể là các số giống nhau và n phải luôn là số nhỏ hơn m , với hiệu số giữa n và $m \geq 2$.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, n là số nguyên trong khoảng 13 và 15, cụ thể là 14 và m là số nguyên trong khoảng 22 và 24, cụ thể là 23.

Sự gắn kết của kháng thể theo sáng chế có thể làm giảm sự đồng hoán cấu hình trong protein đã nêu, cụ thể là sự đồng hoán của cấu hình tấm β hướng về cấu hình vòng xoắn γ - và/hoặc cấu hình xoắn ngẫu nhiên, cụ thể là cấu hình xoắn ngẫu nhiên, thậm chí cụ thể hơn là cấu hình xoắn ngẫu nhiên tại vị trí đã cho trong phân tử, cụ thể trong môi trường Val 12 của protein $A\beta$.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó kết hợp ít nhất một trong các đặc tính được chọn từ nhóm bao gồm đặc

tính ức chế sự kết tụ, chống kết tụ, kích thích sự đồng hoá cấu hình, nhận dạng và gắn kết trực tiếp với epitop, cụ thể là epitop cấu hình gián đoạn ở vùng 14-23, cụ thể ở vùng 14-20, ngăn chặn hoặc làm chậm lại sự hình thành của các mảng dạng tinh bột, làm giảm lượng tổng của A β tan trong não, làm giảm sự tích tụ của mảng trong não, làm nhỏ lượng các mảng trong não, duy trì hoặc làm tăng khả năng nhớ liên quan đến nhận thức, cụ thể là kết hợp của hai hoặc nhiều các đặc tính nêu trên.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó kết hợp ít nhất 2, cụ thể ít nhất 3, cụ thể hơn ít nhất 4, thậm chí cụ thể hơn ít nhất 5, 6, 7 hoặc 8, cụ thể là toàn bộ các đặc tính nêu trên.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể chức năng kép, cụ thể là kháng thể đơn dòng, cụ thể là kháng thể chức năng kép, gồm có kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, chúng thể hiện tính đặc hiệu cao với các peptit đơn phân A β_{1-42} nhưng về cơ bản không có hoặc chỉ có khả năng phản ứng chéo yếu với các peptit đơn phân A β_{1-38} , A β_{1-39} , A β_{1-40} , và/hoặc A β_{1-41} , cụ thể là kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng, gồm có kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó nhạy cảm gấp 100 lần, cụ thể từ 50 đến 100 lần, cụ thể hơn là từ 80 đến 100 lần, cụ thể là 100 lần với peptit dạng tinh bột A β_{1-42} so với A β_{1-38} , A β_{1-39} , A β_{1-40} , A β_{1-41} và tới 1000 lần, cụ thể từ 500 đến 1000 lần, cụ thể hơn là từ 800 đến 1000 lần, cụ thể là 1000 lần với peptit dạng tinh bột A β_{1-42} như so với A β_{1-38} , và vì vậy có khả năng ức chế, *in vitro* và *in vivo*, sự kết tụ của các peptit đơn phân tạo tinh bột, cụ thể là của peptit dạng tinh bột A β_{1-42} .

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề xuất kháng thể, cụ thể là kháng thể chức năng kép, cụ thể là kháng thể đơn dòng, cụ thể là kháng thể đơn dòng chức năng kép, gồm có kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó có ái lực gắn kết cao với peptit dạng tinh bột

$A\beta_{1-42}$ và có khả năng phát hiện các sợi $A\beta_{1-42}$ với nồng độ dưới ít nhất $0,001\mu\text{g}$, cụ thể với giới hạn nồng độ nằm trong khoảng $0,5\mu\text{g}$ và $0,001\mu\text{g}$, cụ thể hơn trong khoảng $0,1\mu\text{g}$ và $0,001\mu\text{g}$, cụ thể là với nồng độ là $0,001\mu\text{g}$.

Theo một phương án rất cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể, cụ thể là kháng thể chức năng kép, cụ thể là kháng thể đơn dòng, cụ thể là kháng thể đơn dòng chức năng kép, gồm có kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó có khả năng phát hiện các sợi $A\beta_{1-42}$ với nồng độ dưới ngưỡng là $0,001\mu\text{g}$ và các sợi $A\beta_{1-40}$ với nồng độ dưới ngưỡng là $0,1\mu\text{g}$ và các sợi $A\beta_{1-38}$ với nồng độ dưới ngưỡng là $1\mu\text{g}$ lượng các sợi.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc một phần của chúng, chúng có thể nhận dạng và gắn kết với ít nhất một điểm gắn kết độc lập, cụ thể với hai điểm gắn kết độc lập trên protein dạng tinh bột β -.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó nhận dạng và gắn kết với ít nhất một điểm gắn kết độc lập, cụ thể với ít nhất hai điểm gắn kết độc lập trên protein dạng tinh bột β -, trong đó ít nhất một hoặc ít nhất hai điểm gắn kết độc lập nêu trên bao gồm ít nhất một gốc axit amin và ít nhất hai gốc axit amin nối tiếp tương ứng, chủ yếu liên quan đến gắn kết kháng thể, trong đó, theo một phương án cụ thể, ít nhất một gốc bao gồm điểm gắn kết độc lập thứ nhất là Leu và ít nhất hai gốc axit amin nối tiếp bao gồm điểm gắn kết độc lập thứ hai, là -Phe-Phe- gắn vào trình tự lõi dưới đây:

- Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Leu -Xaa₄-Phe-Phe-Xaa₅-Xaa₆- Xaa₇-

trong đó:

Xaa₁ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm His, Asn, Gln Lys, và Arg;

Xaa₂ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Asn và Gln;

Xaa₃ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Lys, His, Asn, Gln và Arg;

Xaa₄ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, norleuxin, Met, Phe, và Ile;

Xaa₅ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, Ser và Ile;

Xaa₆ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp;

Xaa₇ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc một phần của chúng, chúng có thể nhận dạng và gắn kết với ít nhất một điểm gắn kết độc lập, cụ thể với ít nhất hai điểm gắn kết độc lập trên protein dạng tinh bột β -, trong đó ít nhất một hoặc ít nhất hai điểm gắn kết độc lập nêu trên bao gồm ít nhất một gốc axit amin và ít nhất hai gốc axit amin nối tiếp tương ứng, chủ yếu liên quan đến gắn kết kháng thể, trong đó, theo một phương án cụ thể, ít nhất một gốc cấu thành điểm gắn kết độc lập thứ nhất là Leu và ít nhất hai gốc axit amin nối tiếp cấu thành điểm gắn kết độc lập thứ hai, là -Phe-Phe- gắn vào trình tự lõi dưới đây:

- Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Leu -Xaa₄-Phe-Phe-Xaa₅-Xaa₆- Xaa₇-

trong đó:

Xaa₁ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm His, Asn, Gln Lys, và Arg;

Xaa₂ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Asn và Gln;

Xaa₃ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Lys, His, Asn, Gln và Arg;

Xaa₄ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, Norleuxin, Met, Phe và Ile;

Xaa₅ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, Ser và Ile;

Xaa₆ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp,

Xaa₇ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc một phần của chúng, trong đó:

Xaa₁ là His hoặc Arg, cụ thể là His;

Xaa₂ là Gln hoặc Asn, cụ thể là Gln;

Xaa₃ là Lys hoặc Arg, cụ thể là Lys

Xaa₄ là Val hoặc Leu, cụ thể là Val;

Xaa₅ là Ala hoặc Val, cụ thể là Ala;

Xaa₆ là Glu hoặc Asp, cụ thể là Glu; và

Xaa₇ là Asp hoặc Glu, cụ thể là Asp.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc một phần của chúng, mà có thể nhận dạng và gắn kết với ít nhất một điểm gắn kết độc lập, cụ thể với ít nhất hai điểm gắn kết độc lập, cụ thể hơn với ít nhất ba điểm gắn kết độc lập trên protein dạng tinh bột β -, trong đó ít nhất mỗi một hoặc ít nhất hai hoặc ít nhất ba điểm gắn kết độc lập nêu trên bao gồm ít nhất một gốc axit amin, cụ thể ít nhất hai gốc axit amin nối tiếp tương ứng chủ yếu liên quan đến gắn kết của kháng thể.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc một phần của chúng gắn kết với ít nhất hai điểm gắn kết độc lập trên protein dạng tinh bột β -, trong đó ít nhất mỗi hai điểm gắn kết độc lập nêu trên bao gồm ít nhất hai gốc axit amin nối tiếp tương ứng chủ yếu liên quan đến gắn kết của kháng thể, trong đó ít nhất hai điểm gắn kết độc lập được đặt ở vị trí gần với mỗi điểm gắn kết khác trên kháng nguyên, độc lập bởi ít nhất một gốc axit amin không liên quan đến gắn kết kháng thể hoặc đến một mức độ nhỏ hơn đáng kể so với ít nhất hai gốc axit amin nối tiếp này, nhờ đó tạo ra epitop cấu hình không liên tục.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc một phần của chúng, chúng nhận dạng và gắn kết với ít nhất một điểm gắn kết độc lập, cụ

thể với hai điểm gắn kết độc lập, cụ thể hơn với ít nhất ba điểm gắn kết độc lập trên protein dạng tinh bột β -, trong đó các điểm gắn kết độc lập bao gồm ít nhất một và ít nhất hai gốc axit amin nối tiếp, tương ứng, chủ yếu không liên quan đến gắn kết của kháng thể, trong đó ít nhất một và ít nhất hai axit amin nối tiếp, được tách bởi ít nhất một gốc axit amin không liên quan đến gắn kết kháng thể hoặc đến một mức độ nhỏ hơn đáng kể so với các gốc axit amin chủ yếu liên quan đến gắn kết của kháng thể, là -His- và -Lys-Leu- tương ứng, được gắn vào trình tự lõi dưới đây:

-His-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-, trong đó:

Xaa₂ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Asn và Gln;

Xaa₃ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, norleuxin, Met, Phe, và Ile;

Xaa₄ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, norleuxin, Met, Phe, và Ile;

Xaa₅ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, norleuxin, Met, Phe, và Ile;

Xaa₆ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, Ser và Ile;

Xaa₇ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp,

Xaa₈ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp và trong đó các gốc axit amin này Xaa₂, Xaa₃, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈ không liên quan đến gắn kết kháng thể hoặc đến một mức độ nhỏ hơn đáng kể so với điểm gắn kết -His- và -Lys-Leu-.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc một phần của chúng, chúng nhận dạng và gắn kết với ít nhất một điểm gắn kết độc lập, cụ thể với hai điểm gắn kết độc lập, cụ thể hơn với ít nhất ba điểm gắn kết độc lập trên protein dạng tinh bột β -, trong đó các điểm gắn kết độc lập bao gồm ít nhất

một và ít nhất hai gốc axit amin nối tiếp, tương ứng, chủ yếu không liên quan đến gắn kết kháng thể, trong đó ít nhất hai gốc axit amin nối tiếp thể hiện điểm gắn kết thứ nhất là -Phe-Phe- và ít nhất một gốc axit amin là -His- được gắn vào trình tự lõi dưới đây:

Xaa₁-His -Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆- Phe-Phe-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-, trong đó:

Xaa₁ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm His, Asn, Gln, Lys và Arg;

Xaa₃ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Asn và Gln;

Xaa₄ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm His, Asn, Gln, Lys và Arg;

Xaa₅ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, Ser và Ile;

Xaa₆ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu và Ile;

Xaa₇ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu và Ile;

Xaa₈ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp;

Xaa₉ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp, và trong đó các gốc axit amin này Xaa₁, Xaa₃, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈ và Xaa₉, không liên quan đến gắn kết kháng thể hoặc đến một mức độ nhỏ hơn đáng kể so với điểm gắn kết His và -Phe-Phe-.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất gốc axit amin ít nhất của ít nhất hai gốc axit amin nối tiếp chủ yếu liên quan đến gắn kết của kháng thể bao gồm -Lys- và -Leu-, và gốc axit amin thứ hai của ít nhất hai gốc axit amin nối tiếp bao gồm -Phe-Phe- được gắn vào trình tự lõi dưới đây:

- Xaa₁-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₄-Phe-Phe-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-

trong đó:

Xaa₁ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm His, Asn, Gln Lys, và Arg;

Xaa₂ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Asn và Gln;

Xaa₄ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, norleuxin, Met, Phe, và Ile;

Xaa₅ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, Ser và Ile;

Xaa₆ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp;

Xaa₇ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp, và trong đó các gốc axit amin này Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇ không liên quan đến gắn kết kháng thể hoặc đến một mức độ nhỏ hơn đáng kể so với điểm gắn kết -Lys-Leu và -Phe-Phe-.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc một phần của chúng, trong đó:

Xaa₁ là His hoặc Arg, cụ thể là His;

Xaa₂ là Gln hoặc Asn, cụ thể là Gln;

Xaa₃ là Lys hoặc Arg, cụ thể là Lys;

Xaa₄ là Val hoặc Leu, cụ thể là Val;

Xaa₅ là Ala hoặc Val, cụ thể là Ala;

Xaa₆ là Glu hoặc Asp, cụ thể là Glu; và

Xaa₇ là Asp hoặc Glu, cụ thể là Asp.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc một phần của chúng gắn kết với ít nhất ba điểm gắn kết độc lập trên protein dạng tinh bột β -, trong đó ít nhất ba điểm gắn kết độc lập bao gồm ít nhất một gốc axit amin và ít nhất hai gốc axit amin nối tiếp tương ứng, các gốc đó chủ yếu liên quan đến gắn kết của kháng thể, trong đó ít nhất ba điểm gắn kết độc lập được đặt ở vị trí

gắn với mỗi điểm gắn kết khác trên kháng nguyên, độc lập bởi ít nhất một gốc axit amin không liên quan đến gắn kết kháng thể hoặc đến một mức độ nhỏ hơn đáng kể so với ít nhất hai gốc axit amin nối tiếp tương ứng này, nhờ đó tạo ra epitop cấu hình không liên tục.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất gốc axit amin ít nhất của ít nhất hai gốc axit amin nối tiếp chủ yếu liên quan đến gắn kết của kháng thể bao gồm -Lys- Leu-, và gốc axit amin thứ hai của ít nhất hai gốc axit amin nối tiếp bao gồm -Phe- Phe-, gốc thứ ba của ít nhất một gốc amino bao gồm -His- được gắn vào trình tự lõi dưới đây:

-His-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₄-Phe-Phe-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-

trong đó:

Xaa₂ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Asn và Gln;

Xaa₄ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, norleuxin, Met, Phe và Ile;

Xaa₅ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, Ser và Ile;

Xaa₆ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp;

Xaa₇ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp, và trong đó các gốc axit amin này Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇ không liên quan đến gắn kết kháng thể hoặc đến một mức độ nhỏ hơn đáng kể so với điểm gắn kết -His-, -Lys-Leu, và -Phe-Phe-.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc một phần của chúng, trong đó:

Xaa₂ là Gln hoặc Asn, cụ thể là Gln;

Xaa₄ là Val hoặc Leu, cụ thể là Val;

Xaa₅ là Ala hoặc Val, cụ thể là Ala;

Xaa₆ là Glu hoặc Asp, cụ thể là Glu; và

Xaa₇ là Glu hoặc Asp, cụ thể là Asp;

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất gốc axit amin thứ nhất của ít nhất hai gốc axit amin nối tiếp chủ yếu liên quan đến gắn kết kháng thể bao gồm -Lys-Leu-, và gốc axit amin thứ hai của ít nhất hai gốc axit amin nối tiếp bao gồm -Phe- Phe-, và gốc thứ ba của ít nhất một gốc amino bao gồm -Asp- được gắn vào trình tự lõi dưới đây:

Xaa₁-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₄-Phe-Phe-Xaa₅-Xaa₆- Asp-

trong đó:

Xaa₁ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm His, Asn, Gln Lys, và Arg;

Xaa₂ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Asn và Gln;

Xaa₄ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, norleuxin, Met, Phe, và Ile;

Xaa₅ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, Ser và Ile;

Xaa₆ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp, và trong đó các gốc axit amin này Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇ không liên quan đến gắn kết kháng thể hoặc đến một mức độ nhỏ hơn đáng kể so với điểm gắn kết - Asp-, -Lys-Leu, và -Phe-Phe-.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc một phần của chúng, trong đó:

Xaa₁ là His hoặc Arg, cụ thể là His;

Xaa₂ là Gln hoặc Asn, cụ thể là Gln;

Xaa₄ là Val hoặc Leu, cụ thể là Val;

Xaa₅ là Ala hoặc Val, cụ thể là Ala; và

Xaa₆ là Glu hoặc Asp, cụ thể là Glu.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc một phần của chúng gắn kết với 4 điểm gắn kết độc lập trên protein dạng tinh bột β -, trong đó 4 điểm gắn kết độc lập này bao gồm một gốc axit amin và hai gốc axit amin nối tiếp tương ứng, các gốc đó chủ yếu liên quan đến gắn kết kháng thể, trong đó 4 điểm gắn kết độc lập này được đặt ở gần với mỗi điểm gắn kết khác trên kháng nguyên, tách bởi ít nhất một gốc axit amin không liên quan đến gắn kết kháng thể hoặc đến một mức độ nhỏ hơn đáng kể so với một gốc axit amin này và vì vậy hai gốc axit amin nối tiếp này của 4 điểm gắn kết độc lập tạo ra epitop cấu hình không liên tục.

Cụ thể, gốc axit amin thứ nhất của hai gốc axit amin nối tiếp chủ yếu liên quan đến gắn kết kháng thể là -Lys-Leu-, và gốc axit amin thứ hai của ít nhất hai gốc axit amin nối tiếp là -Phe-Phe-, gốc axit amin thứ nhất của các gốc amino đơn là -His- và gốc axit amin thứ hai của các gốc amino đơn là -Asp- được gắn vào trình tự lõi dưới đây:

His - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₄ - Phe - Phe - Xaa₅-Xaa₆- Asp-

trong đó:

Xaa₂ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Asn và Gln;

Xaa₄ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, norleuxin, Met, Phe, và Ile;

Xaa₅ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, Ser và Ile;

Xaa₆ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp, và trong đó các gốc axit amin này Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇ không liên quan đến gắn kết kháng thể hoặc đến một mức độ nhỏ hơn đáng kể so với điểm gắn kết -His-, -Asp-, -Lys-Leu, và -Phe-Phe-.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, các điểm nhận dạng và điểm gắn kết như được xác định trên đây tạo ra epitop cấu hình không liên tục được đặt ở vùng của protein dạng tinh bột β - trong khoảng axit amin gốc 12 đến 24, cụ thể trong khoảng các gốc 14 đến 23, cụ thể hơn trong khoảng các gốc axit amin 14 và 20, trong đó ba điểm nhận dạng và gắn kết độc lập bao gồm 1 và 2 các gốc axit amin tương ứng, được đặt ở vị trí 16, 17, và ở vị trí 19 và 20, và ở vị trí 14, tương ứng, các gốc đó chủ yếu liên quan đến gắn kết của protein dạng tinh bột β - và trong đó ba điểm nhận dạng và gắn kết độc lập này được độc lập bởi một gốc axit amin được đặt ở vị trí 15 và 18 tương ứng, các axit amin không liên quan đến gắn kết của kháng nguyên hoặc, ít nhất, tới một mức về cơ bản là nhỏ.

Theo một phương án cụ thể, các gốc axit amin nối tiếp này, cụ thể là -Lys-Leu- ở vị trí 16 và 17 và -Phe- Phe- ở vị trí 19 và 20, chủ yếu liên quan đến gắn kết của protein dạng tinh bột β -, được gắn vào vùng tâm dưới đây:

Val	His	His	Gln	Lys	Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23

Theo một phương án cụ thể khác nữa, các gốc axit amin nối tiếp này, cụ thể là -Lys- ở vị trí 16 và -Leu- ở vị trí 16 17 và -Phe- Phe- ở vị trí 19 và 20, và -His- ở vị trí 14, chủ yếu liên quan đến gắn kết của protein dạng tinh bột β -, được gắn vào vùng tâm dưới đây:

Val	His	His	Gln	Lys	Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, kháng thể theo sáng chế được làm tăng chống lại phần kháng nguyên không chứa điểm gắn kết độc lập này.

Sự chuyển dịch vùng epitop có thể ít nhất một phần do việc sử dụng cấu trúc siêu phân tử kháng nguyên bao gồm peptit kháng nguyên tương ứng với trình tự axit amin của peptit dạng tinh bột β -, cụ thể là của peptit dạng tinh bột β - A β ₁₋₁₆, được cải biến bằng các gốc ưa nước ví dụ như polyetylen glycol (PEG), trong đó gốc ưa nước này liên kết cộng hoá trị với đầu của peptit kháng

nguyên bằng ít nhất một, cụ thể là một hoặc hai axit amin, ví dụ như lysin, axit glutamic và cystein hoặc axit amin bất kỳ thích hợp hoặc chất tương tự axit amin có khả năng sử dụng như dụng cụ liên kết để kết hợp gốc ưa nước với phần peptit, như được mô tả dưới đây trong quá trình tạo miễn dịch. Khi PEG được sử dụng làm gốc ưa nước, các đầu PEG tự do được liên kết cộng hoá trị với phosphatidyletanolamin hoặc hợp chất bất kỳ thích hợp để thực hiện chức năng như thành phần neo, ví dụ, để gắn vào cấu trúc kháng nguyên trong lớp kép của liposom như được mô tả ở đây.

Cũng sử dụng lipit A là một phần của phương pháp tạo miễn dịch có thể góp phần vào sự chuyển dịch ở vùng epitop.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể, kháng thể đó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự nêu trong SEQ ID NO:7.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự nêu trong SEQ ID NO:7.

Vẫn theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề xuất kháng thể, kháng thể đó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) có trình tự nêu trong SEQ ID NO:8.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, sáng chế đề cập đến vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) có trình tự nêu trong SEQ ID NO:8.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể, kháng thể đó bao gồm cả vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO:8 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO:7.

Cũng là một phần của sáng chế là kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) hoặc cả hai, vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) và vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) tương đồng với peptit bất kỳ trong các peptit nêu trong SEQ ID NO:7 và 8 tương ứng.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc một phần của chúng, theo sáng chế và như được mô tả trên đây trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) có

trình tự axit amin có mức độ tương đồng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc một phần của chúng, theo sáng chế và như được mô tả trên đây trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) có trình tự axit amin có mức độ tương đồng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO:8.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc một phần của chúng, theo sáng chế và như được mô tả trên đây trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) và vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) cùng nhau có trình tự axit amin có mức độ tương đồng 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7 và 8.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có mức độ tương đồng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, sáng chế đề cập đến vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin có mức độ tương đồng 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO:8.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hoá kháng thể theo sáng chế như được mô tả trên đây.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hoá kháng thể theo sáng chế bao gồm:

a) ít nhất trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:9;

b) trình tự nucleotit khác với trình tự nucleotit của (a) trong trình tự codon do sự thoái hoá của mã di truyền;

c) trình tự nucleotit với trình tự bổ trợ cho (a) và (b); hoặc

d) phần của trình tự nucleotit của (a), (b) hoặc (c) bao gồm đoạn nucleotit liền kề được chọn từ nhóm bao gồm có ít nhất 20 nucleotit liền kề, ít nhất 25 nucleotit liền kề, ít nhất 30 nucleotit liền kề, ít nhất 35 nucleotit liền kề, ít nhất 40 nucleotit liền kề, ít nhất 45 nucleotit liền kề, và ít nhất 50 nucleotit liền kề.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hoá kháng thể theo sáng chế như được mô tả trên đây.

a) ít nhất trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:10;

b) trình tự nucleotit khác với trình tự nucleotit của (a) trong trình tự codon do sự thoái hoá của mã di truyền;

c) trình tự nucleotit với trình tự bổ trợ cho (a) và (b); hoặc

d) phần của trình tự nucleotit của (a), (b) hoặc (c) bao gồm đoạn liền kề của các nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm ít nhất 20 nucleotit liền kề, ít nhất 25 nucleotit liền kề, ít nhất 30 nucleotit liền kề, ít nhất 35 nucleotit liền kề, ít nhất 40 nucleotit liền kề, ít nhất 45 nucleotit liền kề, và ít nhất 50 nucleotit liền kề.

Vẫn theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hoá kháng thể theo sáng chế bao gồm:

a) ít nhất trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:11;

b) trình tự nucleotit khác với trình tự nucleotit của (a) trong trình tự codon do sự thoái hoá của mã di truyền;

c) trình tự nucleotit với trình tự bổ trợ cho (a) và (b); hoặc

d) phần của trình tự nucleotit của (a), (b) hoặc (c) bao gồm đoạn liền kề của các nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm ít nhất 20 nucleotit liền kề, ít nhất 25 nucleotit liền kề, ít nhất 30 nucleotit liền kề, ít nhất 35 nucleotit liền kề, ít nhất 40 nucleotit liền kề, ít nhất 45 nucleotit liền kề, và ít nhất 50 nucleotit liền kề.

Vẫn theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hoá kháng thể theo sáng chế bao gồm:

a) ít nhất trình tự nucleotit của chuỗi nặng nêu trong SEQ IDNO:12 hoặc trình tự bổ trợ;

b) trình tự nucleotit khác với trình tự nucleotit của (a) trong trình tự codon do sự thoái hoá của mã di truyền;

c) trình tự nucleotit với trình tự bổ trợ cho (a) và (b); hoặc

d) phần của trình tự nucleotit của (a), (b) hoặc (c) bao gồm đoạn liên kề của các nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm ít nhất 20 nucleotit liên kề, ít nhất 25 nucleotit liên kề, ít nhất 30 nucleotit liên kề, ít nhất 35 nucleotit liên kề, ít nhất 40 nucleotit liên kề, ít nhất 45 nucleotit liên kề, và ít nhất 50 nucleotit liên kề.

Sáng chế cũng bao gồm polynucleotit chứa:

a) trình tự nucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO:9 mã hoá vùng biến đổi chuỗi nhẹ;

b) trình tự nucleotit khác với trình tự nucleotit của (a) trong trình tự codon do sự thoái hoá của mã di truyền;

c) trình tự bổ trợ cho (a) và (b); hoặc

d) phần của trình tự nucleotit của (a), (b) hoặc (c) bao gồm đoạn liên kề của các nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm ít nhất 20 nucleotit liên kề, ít nhất 25 nucleotit liên kề, ít nhất 30 nucleotit liên kề, ít nhất 35 nucleotit liên kề, ít nhất 40 nucleotit liên kề, ít nhất 45 nucleotit liên kề, và ít nhất 50 nucleotit liên kề.

Sáng chế cũng bao gồm polynucleotit chứa:

a) trình tự nucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO:10 mã hoá chuỗi nhẹ;

b) trình tự nucleotit khác với trình tự nucleotit của (a) trong trình tự codon do sự thoái hoá của mã di truyền;

c) trình tự nucleotit với trình tự bổ trợ cho (a) và (b); hoặc

d) phần của trình tự nucleotit của (a), (b) hoặc (c) bao gồm đoạn liên kề của các nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm ít nhất 20 nucleotit liên kề, ít nhất 25

nucleotit liền kề, ít nhất 30 nucleotit liền kề, ít nhất 35 nucleotit liền kề, ít nhất 40 nucleotit liền kề, ít nhất 45 nucleotit liền kề, và ít nhất 50 nucleotit liền kề.

Sáng chế cũng bao gồm polynucleotit chứa:

a) trình tự nucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO:11 mã hoá vùng biến đổi chuỗi nặng;

b) trình tự nucleotit khác với trình tự nucleotit của (a) trong trình tự codon do sự thoái hoá của mã di truyền;

c) trình tự nucleotit với trình tự bổ trợ cho (a) và (b); hoặc

d) phần của trình tự nucleotit của (a), (b) hoặc (c) bao gồm đoạn liền kề của các nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm ít nhất 20 nucleotit liền kề, ít nhất 25 nucleotit liền kề, ít nhất 30 nucleotit liền kề, ít nhất 35 nucleotit liền kề, ít nhất 40 nucleotit liền kề, ít nhất 45 nucleotit liền kề, và ít nhất 50 nucleotit liền kề.

Sáng chế cũng bao gồm polynucleotit chứa:

a) trình tự nucleotit có trình tự nêu trong SEQ IDNO:12 mã hoá chuỗi nặng

b) trình tự nucleotit khác với trình tự nucleotit của (a) trong trình tự codon do sự thoái hoá của mã di truyền;

c) trình tự nucleotit với trình tự bổ trợ cho (a) và (b); hoặc

d) phần của trình tự nucleotit của (a), (b) hoặc (c) bao gồm đoạn liền kề của các nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm ít nhất 20 nucleotit liền kề, ít nhất 25 nucleotit liền kề, ít nhất 30 nucleotit liền kề, ít nhất 35 nucleotit liền kề, ít nhất 40 nucleotit liền kề, ít nhất 45 nucleotit liền kề, và ít nhất 50 nucleotit liền kề.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến trình tự nucleotit lai với:

a) trình tự nucleotit theo sáng chế và như được nêu trong SEQ ID NO: 9, 10, 11 và 12 tương ứng;

b) trình tự nucleotit khác với trình tự nucleotit của (a) trong trình tự codon do sự thoái hoá của mã di truyền;

c) trình tự bổ trợ cho (a) và (b); hoặc

d) phần của trình tự nucleotit của (a), (b) hoặc (c) bao gồm đoạn liên kề của các nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm ít nhất 20 nucleotit liên kề, ít nhất 25 nucleotit liên kề, ít nhất 30 nucleotit liên kề, ít nhất 35 nucleotit liên kề, ít nhất 40 nucleotit liên kề, ít nhất 45 nucleotit liên kề, và ít nhất 50 nucleotit liên kề.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến trình tự nucleotit bất kỳ được lai trong các điều kiện lai thông thường, tốt hơn là trong các điều kiện lai nghiêm ngặt, với trình tự nucleotit theo sáng chế và như nêu trong SEQ ID NO: 9, 10, 11 và 12 tương ứng, cụ thể với đoạn nhiễm sắc bổ trợ của chúng.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến trình tự nucleotit bất kỳ lai với trình tự nucleotit theo sáng chế và như nêu trong SEQ ID NO: 9, 10, 11 và 12 tương ứng, cụ thể đoạn nhiễm sắc bổ trợ của chúng, trong điều kiện lai thông thường, tại đó dung dịch 5xSSPE, 1%SDS, 1xDenhardts được sử dụng làm dung dịch và/hoặc nhiệt độ lai nằm trong khoảng 35°C và 70°C, tốt hơn là 65°C. Sau khi lai, tốt hơn quá trình rửa được tiến hành lần thứ nhất bằng dung dịch 2xSSC, 1% SDS và rồi sau đó bằng 0,2xSSC ở nhiệt độ lai nằm trong khoảng 35°C và 70°C, tốt hơn là ở 65°C (liên quan đến thành phần dung dịch SSPE, SSC và Denhardts, xem tài liệu Sambrook et al. loc. cit.).

Cụ thể, sáng chế đề cập đến trình tự nucleotit bất kỳ lai với trình tự nucleotit theo sáng chế và như nêu trong SEQ ID NO: 9, 10, 11 và 12 tương ứng, cụ thể với đoạn nhiễm sắc bổ trợ của chúng, trong các điều kiện lai nghiêm ngặt như được mô tả trong tài liệu Sambrook et al, nêu trên, cụ thể hơn trong các điều kiện lai nghiêm ngặt mà ở đó quá trình lai và rửa xuất hiện ở 65°C như nêu trên.

Theo một phương án cụ thể sáng chế đề xuất kháng thể, cụ thể là kháng thể chức năng kép, cụ thể là kháng thể đơn dòng, cụ thể là kháng thể chức năng kép

đơn dòng, bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó có các đặc tính đặc trưng của kháng thể được tạo ra bởi dòng tế bào lai được chọn từ nhóm bao gồm FP 12H3, FP 12H3-C2, và FP 12H3-G2 nộp lưu ngày 01/10/2005 và 09/10/2005 là DSM ACC2752, DSM ACC 2750 và DSM ACC2751 tương ứng.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng được tạo ra bởi dòng tế bào lai FP 12H3, nộp lưu ngày 01/12/2005 và 09/12/2005, tương ứng là DSM ACC2752.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng được tạo ra bởi dòng tế bào lai FP 12H3-C2, nộp lưu ngày 01/12/2005 và 09/12/2005, tương ứng là DSM ACC2750.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng được tạo ra bởi dòng tế bào lai FP 12H3-G2, nộp lưu ngày 01/12/2005 và 09/12/2005, tương ứng là DSM ACC2751.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề xuất kháng thể, cụ thể là kháng thể chức năng kép, cụ thể là kháng thể đơn dòng, cụ thể là kháng thể chức năng kép đơn dòng, bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó có các đặc tính đặc trưng của kháng thể được tạo ra bởi dòng tế bào lai ET 7E3 được nộp lưu ngày 08/12/2005 là DSM ACC2755.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng được tạo ra bởi dòng tế bào lai ET 7E3, được nộp lưu ngày 08/12/2005 là DSM ACC2755.

Theo một phương án cụ thể khác sáng chế đề xuất kháng thể, cụ thể là kháng thể chức năng kép, cụ thể là kháng thể đơn dòng, cụ thể là kháng thể chức

năng kép đơn dòng, bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó có các đặc tính đặc trưng của kháng thể được tạo ra bởi dòng tế bào lai EJ 7H3 được nộp lưu ngày 08, 2005 là DSM ACC2756.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng được tạo ra bởi dòng tế bào lai EJ 7H3, được nộp lưu ngày 01/12/2005 là DSM ACC2756.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất các phương pháp và chế phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế và như được mô tả trên đây để ngăn ngừa và/hoặc điều trị và/hoặc làm giảm các tác động của các bệnh và các rối loạn do hoặc có liên quan đến các protein dạng tinh bột hoặc tương tự tinh bột bao gồm chúng thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các bệnh và các rối loạn liên quan đến sự hình thành mảng tinh bột bao gồm chúng thoái hoá dạng tinh bột thứ phát và thoái hoá dạng tinh bột liên quan đến tuổi bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các rối loạn thần kinh như bệnh Alzheimer (AD) và các bệnh và các tình trạng đặc trưng bởi sự mất khả năng trí nhớ liên quan đến nhận thức, ví dụ như, suy giảm nhận thức nhẹ (MCI), sa sút trí tuệ thể Lewy, hội chứng Down, chứng xuất huyết não di truyền với thoái hoá dạng tinh bột (loại Dutch); bệnh phức hợp Guam Parkinson-Dementia cũng như các bệnh khác dựa vào vào hoặc liên quan đến các protein tương tự dạng tinh bột như liệt trên nhân tiến triển, bệnh xơ cứng rải rác; bệnh Creutzfeld Jacob, bệnh Parkinson, sa sút trí tuệ liên quan đến HIV, ALS (xơ cứng cột bên teo cơ), viêm cơ thể vùi ((IBM), bệnh tiểu đường bắt đầu tuổi trưởng thành; thoái hoá dạng tinh bột tim lão suy; các khối u nội tiết, và các bệnh khác, kể cả bệnh thoái hoá điểm vàng, ví dụ bằng cách tạo miễn dịch thụ động cho người hoặc động vật bằng kháng thể theo sáng chế và như được mô tả trên đây.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp sử dụng kháng thể đơn dòng và/hoặc phần chức năng của chúng theo sáng chế và chế phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế và như được mô tả trên đây để chẩn đoán và điều trị các

bệnh và các rối loạn do hoặc có liên quan đến các protein dạng tinh bột hoặc tương tự tinh bột bao gồm chứng thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các bệnh và các rối loạn liên quan đến sự hình thành mảng tinh bột bao gồm chứng thoái hoá dạng tinh bột thứ phát và thoái hoá dạng tinh bột liên quan đến tuổi bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các rối loạn thần kinh như bệnh Alzheimer (AD) và các bệnh và các tình trạng đặc trưng bởi sự mất khả năng trí nhớ liên quan đến nhận thức, ví dụ như, suy giảm nhận thức nhẹ (MCI), sa sút trí tuệ thể Lewy, hội chứng Down, chứng xuất huyết não di truyền với thoái hoá dạng tinh bột (loại Dutch); bệnh phức hợp Guam Parkinson-Dementia cũng như các bệnh khác dựa vào vào hoặc liên quan đến các protein tương tự dạng tinh bột như liệt trên nhân tiến triển, bệnh xơ cứng rải rác; bệnh Creutzfeldt Jacob, bệnh Parkinson, sa sút trí tuệ liên quan đến HIV, ALS (xơ cứng cột bên teo cơ), viêm cơ thể vùi ((IBM), bệnh tiểu đường bắt đầu tuổi trưởng thành; thoái hoá dạng tinh bột tim lão suy; các khối u nội tiết, và các bệnh khác, kể cả bệnh thoái hoá điểm vàng.

Cụ thể, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp sử dụng kháng thể đơn dòng và/hoặc phân chức năng của chúng theo sáng chế và chế phẩm bao gồm kháng thể, cụ thể là kháng thể đặc hiệu kép và hai tác dụng, cụ thể là kháng thể đơn dòng đặc hiệu kép và hai tác dụng theo sáng chế và như được mô tả trên đây để làm giảm và ngăn ngừa sự xuất hiện của các rối loạn thần kinh, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở bệnh Alzheimer.

Các chế phẩm theo sáng chế bao gồm kháng thể, cụ thể là kháng thể đặc hiệu kép và hai tác dụng, theo sáng chế và như được mô tả trên đây bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phân chức năng của chúng, cụ thể với một lượng điều trị hữu hiệu hoặc, cụ thể hơn, kháng thể đơn dòng, cụ thể là kháng thể đơn dòng đặc hiệu kép và hai tác dụng, theo sáng chế và như được mô tả trên đây bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phân chức năng của chúng, cụ thể với một lượng điều trị hữu hiệu và, tùy ý, chất mang được dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá dược.

Cụ thể, chế phẩm theo sáng chế bao gồm kháng thể, cụ thể kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, có khả năng ức chế sự kết tụ của các peptit đơn phân dạng tinh bột, cụ thể là các peptit đơn phân dạng tinh bột β -, ví dụ như các peptit đơn phân $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, cụ thể là các peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$, trong các sợi nhỏ hoặc các sợi polyme dạng tinh bột cao phân tử và, tùy ý, chất mang được dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá dược.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm kháng thể, cụ thể kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó, khi cùng ủ, cụ thể khi cùng ủ với tỷ lệ nồng độ mol 1:100, cụ thể hơn ở tỷ lệ nồng độ mol trong khoảng 1:30 và 1:100, cụ thể là ở tỷ lệ nồng độ mol là 1:100, với các peptit đơn phân dạng tinh bột, cụ thể các peptit đơn phân dạng tinh bột β -, ví dụ như các peptit đơn phân $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, cụ thể là các peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$, ức chế sự kết tụ của chất đơn phân $A\beta$ với các sợi nhỏ hoặc các sợi polyme cao phân tử. Cụ thể, các lượng ức chế đến ít nhất 50%, cụ thể đến ít nhất 65%, cụ thể hơn là đến ít nhất 75%, thậm chí cụ thể hơn là đến ít nhất 80%, cụ thể là đến ít nhất 85%-90%, hoặc nhiều hơn như so với các chất đơn phân peptit dạng tinh bột tương ứng ủ trong dung dịch đệm (đối chứng) và, tùy ý, chất mang được dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá dược.

Cụ thể, quá trình cùng ủ của kháng thể theo sáng chế với các peptit đơn phân dạng tinh bột được tiến hành trong 48 giờ ở nhiệt độ 37°C.

Khả năng ức chế sự kết tụ của kháng thể theo sáng chế có thể được xác định bằng cách làm siêu ly tâm tỷ trọng-gradien tiếp theo là phân tích sa lắng SDS-PAGE trên gradien đã tạo ra trước và/hoặc bằng thử nghiệm huỳnh quang thioflavin T (Th-T).

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm bao gồm kháng thể which có khả năng chống kết tụ các sợi nhỏ hoặc các sợi polyme dạng tinh bột cao phân tử được tạo ra bằng sự kết tụ của các peptit đơn phân dạng tinh bột, cụ thể các peptit đơn

phân dạng tinh bột β -, ví dụ như các peptit đơn phân $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, cụ thể là các peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$ và, tùy ý, chất mang được dùng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá được.

Bằng cách chống sự tích tụ của các sợi nhỏ hoặc các sợi polyme tạo tinh bột, các kháng thể theo sáng chế có khả năng ngăn ngừa hoặc làm chậm lại quá trình hình thành các mảng dạng tinh bột dẫn đến làm giảm các triệu chứng liên quan đến bệnh và làm chậm hoặc đảo ngược quá trình tiến triển của nó.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm kháng thể, cụ thể kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó, khi cùng ở ở tỷ lệ nồng độ mol trong khoảng 1:30 và 1:100, cụ thể ở tỷ lệ 1:100, với các sợi nhỏ polyme dạng tinh bột cao phân tử tạo ra trước đó hoặc các sợi được tạo ra bằng sự kết tụ của các peptit đơn phân dạng tinh bột, cụ thể các peptit đơn phân dạng tinh bột β - ví dụ như các peptit đơn phân $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, cụ thể là các peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$, cụ thể khi cùng ở trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C , có khả năng chống kết tụ các sợi nhỏ hoặc các sợi polyme tạo ra trước đó đến ít nhất 35%, cụ thể đến ít nhất 40%, cụ thể hơn đến ít nhất 50%, thậm chí cụ thể hơn đến ít nhất 60%, cụ thể là đến ít nhất 70% hoặc nhiều hơn và, tùy ý, chất mang được dùng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá được.

Khả năng ức chế sự kết tụ của kháng thể theo sáng chế có thể được xác định bằng cách làm siêu ly tâm tỷ trọng-gradien tiếp theo là phân tích sa lắng SDS-PAGE trên gradien đã tạo ra trước và/hoặc bằng thử nghiệm huỳnh quang thioflavin T (Th-T).

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm bao gồm kháng thể hoặc phần chức năng của chúng, kháng thể đó nhạy cảm về mặt cấu hình riêng, cụ thể là với lượng hữu hiệu, cụ thể hơn với một lượng điều trị hữu hiệu.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ

hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó, khi cùng ủ với các sợi nhỏ polyme dạng tinh bột cao phân tử tạo ra trước đó hoặc các sợi được tạo ra bằng sự kết tụ của các peptit đơn phân dạng tinh bột, cụ thể các peptit đơn phân dạng tinh bột β -, ví dụ như các peptit đơn phân $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, cụ thể là các peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$, cụ thể khi cùng ủ trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C , có khả năng kích thích sự đồng hoán của cấu hình tấm β - hướng về cấu hình xoắn α và/hoặc cấu hình xoắn ngẫu nhiên, cụ thể là cấu hình xoắn ngẫu nhiên, cụ thể là cấu hình xoắn ngẫu nhiên tại vị trí đã cho trong phân tử, cụ thể trong môi trường Val 12 của protein $A\beta$, nó làm tăng cấu hình xoắn ngẫu nhiên do cấu hình tấm β - tạo ra và sự hoà tan cải thiện của các sợi nhỏ hoặc các sợi polyme dạng tinh bột cao phân tử đã tạo ra trước, và tùy ý, chất mang dược dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá dược. cụ thể là làm giảm các lượng cấu hình tấm β - đến ít nhất 30%, cụ thể đến ít nhất 35%, cụ thể hơn đến ít nhất 40% và nhiều hơn so với các sợi nhỏ polyme dạng tinh bột đã tạo ra trước đó tương ứng hoặc các sợi ủ trong dung dịch đệm (đối chứng).

Khả năng của kháng thể để kích thích sự đồng hoán ở cấu trúc thứ cấp được xác định bằng phép phổ học trạng thái rắn ^{13}C NMR, cụ thể, bằng cách xác định các cường độ tích hợp của các cấu hình của Val 12 $C\beta$ trong peptit $A\beta_{1-42}$.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm bao gồm kháng thể, cụ thể kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, cụ thể với một lượng điều trị hữu hiệu, kháng thể đó có chức năng kép ở chỗ nó thể hiện cả đặc tính ức chế sự kết tụ cũng như đặc tính chống kết tụ như được xác định trên đây, cụ thể cùng với mức độ cao của tính nhạy cảm cấu hình và, tùy ý, chất mang dược dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá dược.

Vẫn theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm kháng thể chức năng kép, cụ thể là kháng thể chức năng kép đơn dòng, bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó, khi cùng ủ với các peptit đơn phân dạng tinh bột, cụ thể các peptit đơn phân

dạng tinh bột β -, ví dụ như các peptit đơn phân $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, cụ thể là các peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$, ức chế sự kết tụ của chất đơn phân $A\beta$ với các sợi nhỏ polyme cao phân tử và, ngoài ra, khi cùng ủ với các sợi nhỏ polyme dạng tinh bột cao phân tử tạo ra trước đó hoặc các sợi được tạo ra bằng sự kết tụ của các peptit đơn phân dạng tinh bột, cụ thể các peptit đơn phân dạng tinh bột β -, ví dụ như các peptit đơn phân $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, cụ thể là các peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$, có khả năng chống kết tụ các sợi nhỏ hoặc các sợi polyme tạo ra trước đó và, tùy ý, chất mang được dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá dược.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất quá trình cùng ủ của kháng thể chức năng kép theo sáng chế, cụ thể là của kháng thể chức năng kép đơn dòng theo sáng chế với các peptit đơn phân dạng tinh bột và các sợi nhỏ polyme dạng tinh bột cao phân tử tạo ra trước đó hoặc các sợi, tương ứng, diễn ra với tỷ lệ nồng độ mol 1:100, cụ thể với tỷ lệ trong khoảng 1:30 và 1:100, và cụ thể hơn với tỷ lệ 1:100.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, sáng chế đề xuất quá trình cùng ủ với các peptit đơn phân dạng tinh bột và các sợi nhỏ polyme dạng tinh bột cao phân tử tạo ra trước đó hoặc các sợi được tiến hành trong 48 giờ và 24 giờ tương ứng, ở nhiệt độ 37°C .

Vẫn theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm kháng thể chức năng kép theo sáng chế, cụ thể là kháng thể chức năng kép đơn dòng theo sáng chế có khả năng chống kết tụ các sợi nhỏ hoặc các sợi polyme tạo ra trước đó đến ít nhất 10%, cụ thể đến ít nhất 25%, cụ thể hơn đến ít nhất 35%, thậm chí cụ thể hơn đến ít nhất 50%, cụ thể là đến ít nhất 60-70% hoặc nhiều hơn và, tùy ý, chất mang được dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá dược.

Vẫn theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm kháng thể chức năng kép theo sáng chế, cụ thể là kháng thể chức năng kép đơn dòng theo sáng chế ức chế sự kết tụ của các peptit đơn phân dạng tinh bột, cụ

thể các peptit đơn phân dạng tinh bột β -, ví dụ như các peptit đơn phân $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, cụ thể là các peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$ vào khoảng ít nhất 50%, cụ thể vào khoảng ít nhất 65%, cụ thể hơn vào khoảng ít nhất 75%, thậm chí cụ thể hơn vào khoảng ít nhất 80%, cụ thể là vào khoảng ít nhất 85-90%, hoặc nhiều hơn như so với các chất đơn phân peptit dạng tinh bột tương ứng ở trong dung dịch đệm (đối chứng) và, tùy ý, chất mang dược dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá dược.

Cụ thể, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm kháng thể, cụ thể kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó tạo ra sự ức chế quá trình polyme hoá của các peptit đơn phân dạng tinh bột, cụ thể là các peptit đơn phân dạng tinh bột β -, ví dụ như các peptit đơn phân $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, cụ thể là các peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$ và/hoặc kích thích quá trình làm tan các sợi nhỏ polyme dạng tinh bột cao phân tử tạo ra trước đó hoặc các sợi được tạo ra bằng sự kết tụ của các peptit đơn phân dạng tinh bột, cụ thể các peptit đơn phân dạng tinh bột β -, ví dụ như các peptit đơn phân $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, cụ thể là các peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$, nhờ sự gắn kết đặc hiệu và trực tiếp của kháng thể với các sợi $A\beta$, nó tạo ra sự đồng hoán của cấu hình thứ cấp, và, tùy ý, chất mang dược dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá dược.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm bao gồm kháng thể, cụ thể kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó gắn kết trực tiếp và đặc hiệu với các sợi dạng tinh bột β -, ví dụ như các sợi bao gồm các peptit đơn phân $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, cụ thể là với các sợi bao gồm $A\beta_{1-42}$ các peptit đơn phân và/hoặc kích thích quá trình làm tan các sợi nhỏ polyme dạng tinh bột cao phân tử tạo ra trước đó hoặc các sợi được tạo ra bằng sự kết tụ của các peptit đơn phân dạng tinh bột, cụ thể các peptit đơn phân dạng tinh bột β -, ví dụ như các peptit đơn phân $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42, hoặc 1-43, cụ thể là các peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$, bằng cách nhằm vào và gắn kết đặc hiệu với vùng epitop của protein dạng tinh bột β -, cụ

thể là vùng epitop của polypeptit A β được giới hạn bởi các gốc axit amin aa_n-aa_m với n là số nguyên trong khoảng 2 và 15, cụ thể trong khoảng 5 và 15, cụ thể hơn trong khoảng 8 và 15, thậm chí cụ thể hơn trong khoảng 10 và 15 và m là số nguyên trong khoảng 3 và 17, cụ thể trong khoảng 6 và 17, cụ thể hơn trong khoảng 9 và 17, thậm chí cụ thể hơn trong khoảng 11 và 17, trong đó n và m không thể là các số giống nhau và n phải luôn là số nhỏ hơn m, với hiệu suất giữa n và m ≥ 2 và, tùy ý, chất mang được dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá được.

Sự gắn kết của kháng thể theo sáng chế có thể làm giảm sự đồng hoán cấu hình trong protein đã nêu, cụ thể là sự đồng hoán của cấu hình tâm β hướng về cấu hình vòng xoắn α - và/hoặc cấu hình xoắn ngẫu nhiên, cụ thể là cấu hình xoắn ngẫu nhiên, thậm chí cụ thể hơn là cấu hình xoắn ngẫu nhiên tại vị trí đã cho trong phân tử, cụ thể trong môi trường Val 12 của protein A β .

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó kết hợp ít nhất một trong các đặc tính nêu trên, đó là đặc tính ức chế sự kết tụ, chống kết tụ, kích thích sự đồng hoán cấu hình, nhận dạng và gắn kết trực tiếp với vùng epitop 4-16 và/hoặc 14 đến 23, cụ thể là vùng epitop 14-20, cụ thể là kết hợp của hai hoặc nhiều các đặc tính nêu trên và, tùy ý, chất mang được dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá được.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể, cụ thể là kháng thể chức năng kép, cụ thể là kháng thể đơn dòng, cụ thể là kháng thể đơn dòng chức năng kép, gồm có kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, chúng thể hiện tính đặc hiệu cao với các peptit đơn phân A β ₁₋₄₂ nhưng về cơ bản không có hoặc chỉ có khả năng phản ứng chéo yếu với các peptit đơn phân A β ₁₋₃₈, A β ₁₋₃₉, A β ₁₋₄₀, và/hoặc A β ₁₋₄₁, cụ thể là kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng, gồm có kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó nhạy cảm gấp 100 lần, cụ thể từ 50 đến 100 lần, cụ thể hơn là từ 80 đến 100 lần, cụ thể là 100 lần với peptit dạng tinh

bột $A\beta_{1-42}$ so với $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-41}$ và tới 1000 lần, cụ thể từ 500 đến 1000 lần, cụ thể hơn là từ 800 đến 1000 lần, cụ thể là 1000 lần với peptit dạng tinh bột $A\beta_{1-42}$ như so với $A\beta_{1-38}$, và vì vậy có khả năng ức chế, *in vitro* và *in vivo*, sự kết tụ của các peptit đơn phân tạo tinh bột, cụ thể là của peptit dạng tinh bột $A\beta_{1-42}$ và, tùy ý, chất mang được dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá được.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm kháng thể, cụ thể là kháng thể chức năng kép, cụ thể là kháng thể đơn dòng, cụ thể là kháng thể đơn dòng chức năng kép, gồm có kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó có tính nhạy cảm gắn kết cao với peptit dạng tinh bột $A\beta_{1-42}$ và có khả năng phát hiện các sợi $A\beta_{1-42}$ với nồng độ dưới ít nhất 0,001 μ g, cụ thể với giới hạn nồng độ nằm trong khoảng 0,5 μ g và 0,001 μ g, cụ thể hơn trong khoảng 0,1 μ g và 0,001 μ g, cụ thể là với nồng độ là 0,001 μ g, và tùy ý, chất mang được dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá được.

Theo một phương án rất cụ thể, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm kháng thể, cụ thể là kháng thể chức năng kép, cụ thể là kháng thể đơn dòng, cụ thể là kháng thể đơn dòng chức năng kép, gồm có kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, kháng thể đó có khả năng phát hiện các sợi $A\beta_{1-42}$ với nồng độ dưới ngưỡng là 0,001 μ g và các sợi $A\beta_{1-40}$ với nồng độ dưới ngưỡng là 0,1 μ g và các sợi $A\beta_{1-38}$ với nồng độ dưới ngưỡng là 1 μ g lượng các sợi, và tùy ý, chất mang được dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá được.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến chế phẩm bao gồm kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng kháng thể đó có các đặc tính đặc trưng của kháng thể được tạo ra bởi dòng tế bào lai được chọn từ nhóm bao gồm FP 12H3, FP 12H3-C2, và FP 12H3-G2 nộp lưu ngày 01/12/2005 và 09/12/2005 tương ứng, là DSM ACC2752, DSM ACC2750 và DSM ACC2751, và, tùy ý, chất mang được dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá được.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến chế phẩm bao gồm kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng được tạo ra bởi dòng tế bào lai FP 12H3, nộp lưu ngày 01/12/2005 và 09/12/2005, tương ứng là DSM ACC2752 và, tùy ý, chất mang được dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá được.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến chế phẩm bao gồm kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng được tạo ra bởi dòng tế bào lai FP 12H3-C2, nộp lưu ngày 01/12/2005 và 09/12/2005, tương ứng là DSM ACC2750 và, tùy ý, chất mang được dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá được.

Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm bao gồm kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng được tạo ra bởi dòng tế bào lai FP 12H3-G2, lưu giữ vào 01/12/2005 và 09/12/2005, tương ứng là DSM ACC2751 và, tùy ý, chất mang được dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá được.

Theo một phương án cụ thể khác sáng chế đề cập đến chế phẩm bao gồm kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng kháng thể đó có các đặc tính đặc trưng của kháng thể được tạo ra bởi dòng tế bào lai ET 7E3 được nộp lưu ngày 01/12/2005 là DSM ACC2755 và, tùy ý, chất mang được dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá được.

Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm bao gồm kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng được tạo ra bởi dòng tế bào lai ET 7E3, được nộp lưu ngày 01/12/2005 là DSM ACC2755 và, tùy ý, chất mang được dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá được.

Theo một phương án cụ thể khác sáng chế đề cập đến chế phẩm bao gồm kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần

chức năng của chúng kháng thể đó có các đặc tính đặc trưng của kháng thể được tạo ra bởi dòng tế bào lai EJ 7H3 được nộp lưu ngày 01/12/2005 là DSM ACC2756 và, tùy ý, chất mang được dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá được.

Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm bao gồm kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng được tạo ra bởi dòng tế bào lai EJ 7H3, được nộp lưu ngày 01/12/2005 là DSM ACC2756 và, tùy ý, chất mang được dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá được.

Kháng thể, cụ thể kháng thể đơn dòng theo sáng chế bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng có thể được cung cấp kết hợp với các chất có hoạt tính sinh học khác và các phương pháp để điều trị các bệnh. Các chất có hoạt tính sinh học khác có thể là một phần của chế phẩm tương tự đã chứa kháng thể theo sáng chế, dưới dạng hỗn hợp, trong đó kháng thể và chất có hoạt tính sinh học khác được trộn lẫn trong hoặc với dung môi và/hoặc chất mang được dụng tương tự hoặc có thể được cung cấp độc lập như là một phần của chế phẩm độc lập, có thể được cung cấp độc lập hoặc cùng nhau dưới dạng bộ dụng cụ gồm các phần.

Kháng thể, cụ thể kháng thể đơn dòng theo sáng chế bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng có thể được cung cấp đồng thời với chất hoặc các chất có hoạt tính sinh học khác, không liên tục hoặc liên tục. Ví dụ, kháng thể đơn dòng theo sáng chế bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng có thể được cung cấp đồng thời với chất có hoạt tính sinh học bổ sung thứ nhất khác hoặc ngay trước hoặc sau khi cung cấp kháng thể. Nếu sơ đồ sử dụng được chọn trong đó nhiều hơn một chất có hoạt tính sinh học được cung cấp cùng với ít nhất một kháng thể theo sáng chế, thì các hợp chất hoặc các chất có thể được cung cấp từng phần đồng thời, từng phần liên tiếp trong các hỗn hợp khác nhau.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất hỗn hợp các kháng thể bao gồm ít nhất kháng thể theo sáng chế và, tùy ý, một hoặc nhiều chất có hoạt tính sinh học khác, cũng như đề xuất phương pháp sử dụng các kháng thể riêng rẽ, hoặc hỗn hợp của chúng chứa chế phẩm gồm có các kháng thể hoặc các hỗn hợp của các kháng thể để ngăn ngừa và/hoặc điều trị và/hoặc làm giảm các tác động của các bệnh và các rối loạn do hoặc có liên quan đến các protein dạng tinh bột hoặc tương tự tinh bột bao gồm chứng thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các bệnh và các rối loạn liên quan đến sự hình thành mảng tinh bột bao gồm chứng thoái hoá dạng tinh bột thứ phát và thoái hoá dạng tinh bột liên quan đến tuổi già ra bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các rối loạn thần kinh như bệnh Alzheimer (AD) và các bệnh và các tình trạng đặc trưng bởi sự mất khả năng trí nhớ liên quan đến nhận thức, ví dụ như, suy giảm nhận thức nhẹ (MCI), sa sút trí tuệ thể Lewy, hội chứng Down, chứng xuất huyết não di truyền với thoái hoá dạng tinh bột (loại Dutch); bệnh phức hợp Guam Parkinson-Dementia cũng như các bệnh khác dựa vào vào hoặc liên quan đến các protein tương tự dạng tinh bột như liệt trên nhân tiến triển, bệnh xơ cứng rải rác; bệnh Creutzfeldt Jacob, bệnh Parkinson, sa sút trí tuệ liên quan đến HIV, ALS (xơ cứng cột bên teo cơ), viêm cơ thể vùi ((IBM), bệnh tiểu đường bắt đầu tuổi trưởng thành; thoái hoá dạng tinh bột tim lão suy; các khối u nội tiết, và các bệnh khác, kể cả bệnh thoái hoá điểm vàng.

Các hỗn hợp theo sáng chế có thể bao gồm, ngoài kháng thể theo sáng chế, chất có hoạt tính sinh học ví dụ như các hợp chất đã biết khác sử dụng làm thuốc chữa các bệnh và các rối loạn do hoặc có liên quan đến các protein dạng tinh bột hoặc tương tự tinh bột bao gồm chứng thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các bệnh và các rối loạn liên quan đến protein dạng tinh bột và tương tự tinh bột như protein A β liên quan đến bệnh Alzheimer.

Theo một phương án khác của sáng chế, chất có hoạt tính sinh học khác hoặc hợp chất cũng có thể là tác nhân điều trị có thể được sử dụng để điều trị các bệnh và các rối loạn do hoặc có liên quan đến các protein dạng tinh bột hoặc

tương tự tinh bột bao gồm chúng thoái hoá dạng tinh bột do β dạng tinh gây ra hoặc có thể được sử dụng làm thuốc chữa các rối loạn thần kinh khác.

Chất hoặc hợp chất có hoạt tính sinh học khác có thể đưa hiệu quả sinh học của nó vào sử dụng cũng theo cơ chế đó hoặc cơ chế tương tự như kháng thể theo sáng chế hoặc cơ chế không liên quan đến tác động hoặc bằng vô số các cơ chế liên quan và/hoặc không liên quan đến tác động.

Nói chung, hợp chất có hoạt tính sinh học có thể bao gồm các chất tăng cường dẫn truyền nơtron, các dược chất chữa bệnh, các chất ức chế esteraza axetylcholin, các chất phong bế kênh canxi, các amin nguồn gốc sinh vật, các thuốc an thần benzodiazepin, các chất tổng hợp axetylcholin, các chất tăng cường tích lũy hoặc giải phóng, các chất đối kháng thụ thể axetylcholin sau khớp thần kinh, 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, các chất chống oxy hoá, và các chất đối kháng thụ thể tạo serotonin.

Cụ thể, hỗn hợp theo sáng chế có thể bao gồm ít nhất một hợp chất có hoạt tính sinh học khác được chọn từ nhóm bao gồm các hợp chất chống lại áp lực oxy hoá, các hợp chất chống apoptotic, các chất chelat hoá kim loại, các chất ức chế sửa chữa 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 tau protein, các chất dẫn truyền thần kinh, các chất nghiền tằm β -, các phân tử chống 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 vacxin chữa bệnh theo sáng chế và, tùy ý chất mang dược dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá dược.

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

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất các hỗn hợp bao gồm "các thuốc chống tâm thần không điển hình" ví dụ như clozapin, ziprasidon, risperidon, aripiprazol hoặc olanzapin để điều trị các triệu chứng tâm thần dương tính và âm tính bao gồm ảo giác, hoang tưởng, các rối loạn suy nghĩ (bộc lộ bởi ý nghĩa không mạch lạc rõ rệt, chệch hướng, tangentiality), và tập tính kỳ dị hoặc phá rối, cũng như mất khoái cảm, trầm cảm, lãnh đạm, và rút khỏi xã hội, cùng với vacxin chữa bệnh theo sáng chế và, tùy ý, chất mang dược dụng và/hoặc chất pha loãng và tá dược.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất các chế phẩm và các hỗn hợp theo sáng chế và như được mô tả trên đây bao gồm kháng thể và các chất có hoạt tính sinh học tương ứng với một lượng có tác dụng điều trị.

Các hợp chất khác có thể được sử dụng thích hợp trong các hỗn hợp kết hợp với kháng thể theo sáng chế được mô tả, ví dụ, trong WO 2004/058258 (cụ thể xem các trang 16 và 17) bao gồm các thuốc điều trị đích (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), estrogen (các trang 58-59), các dược chất chống viêm không steroid (các trang 60-61), các chất chống oxy hoá (các trang 61-62), các chất đối kháng thụ thể hoạt hoá bằng các chất tăng sinh peroxisom (PPAR) (các trang 63-67), các tác nhân làm giảm cholesterol (các trang 68-75); các chất ức chế dạng tinh bột (các trang 75-77), các chất ức chế hình thành tinh bột (các trang 77-78), các chất chelat hoá kim loại (các trang 78-79), các chất chống thần kinh và các thuốc chống trầm cảm (các trang 80-82), các chất bổ sung dinh dưỡng (các trang 83-89) và các hợp chất làm tăng các chất có hoạt tính sinh học và tính có ích trong 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.

Ngoài ra sáng chế còn đề xuất phương pháp để tạo ra kháng thể, cụ thể là phương pháp để tạo ra kháng thể đơn dòng, gồm có kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, phương pháp đó bao gồm làm tăng

các kháng thể cụ thể là các kháng thể đơn dòng chống lại cấu trúc kháng nguyên siêu phân tử bao gồm peptit kháng nguyên tương ứng với trình tự axit amin của peptit dạng tinh bột β -, cụ thể là peptit dạng tinh bột β - $A\beta_{1-15}$ $A\beta_{1-16}$ và $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$, được cải biến bằng các gốc kỵ nước ví dụ như axit palmitic hoặc gốc ưa nước ví dụ như polyetylen glycol (PEG) hoặc hỗn hợp của cả hai, trong đó gốc kỵ nước và ưa nước tương ứng này được liên kết cộng hoá trị với đầu bao gồm ít nhất một, cụ thể là một hoặc hai, axit amin, ví dụ như lysin hoặc axit amin bất kỳ hoặc chất tương tự axit amin có khả năng sử dụng như thiết bị kết nối hoặc phân tử liên kết để kết hợp gốc kỵ nước và ưa nước, ví dụ như axit glutamic hoặc xystein.

Cũng là một phần của sáng chế là việc sử dụng kháng thể đơn dòng và/hoặc phân chức năng của chúng theo sáng chế và như được mô tả trên đây và/hoặc được phẩm, hoặc hỗn hợp bao gồm kháng thể này, để bào chế thuốc điều trị và làm giảm các tác động của các bệnh và các rối loạn do hoặc có liên quan đến các protein dạng tinh bột hoặc tương tự tinh bột bao gồm chứng thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các bệnh và các rối loạn liên quan đến sự hình thành mảng tinh bột bao gồm chứng thoái hoá dạng tinh bột thứ phát và thoái hoá dạng tinh bột liên quan đến tuổi bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các rối loạn thần kinh như bệnh Alzheimer (AD) và các bệnh và các tình trạng đặc trưng bởi sự mất khả năng trí nhớ liên quan đến nhận thức, ví dụ như, suy giảm nhận thức nhẹ (MCI), sa sút trí tuệ thể Lewy, hội chứng Down, chứng xuất huyết não di truyền với thoái hoá dạng tinh bột (loại Dutch); bệnh phức hợp Guam Parkinson-Dementia cũng như các bệnh khác dựa vào vào hoặc liên quan đến các protein tương tự dạng tinh bột như liệt trên nhân tiến triển, bệnh xơ cứng rải rác; bệnh Creutzfeld Jacob, bệnh Parkinson, sa sút trí tuệ liên quan đến HIV, ALS (xơ cứng cột bên teo cơ), viêm cơ thể vùi ((IBM), bệnh tiểu đường bắt đầu tuổi trưởng thành; thoái hoá dạng tinh bột tim lão suy; các khối u nội tiết, và các bệnh khác, kể cả bệnh thoái hoá điểm vàng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế được phẩm sử dụng kháng thể theo sáng chế và/hoặc phần chức năng của chúng, cụ thể là kháng thể đơn dòng và/hoặc phần chức năng của chúng hoặc kháng thể tương đương chức, được sử dụng để điều trị và làm giảm các tác động của các bệnh và các rối loạn do hoặc có liên quan đến các protein dạng tinh bột hoặc tương tự tinh bột bao gồm chứng thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các bệnh và các rối loạn liên quan đến sự hình thành mảng tinh bột bao gồm chứng thoái hoá dạng tinh bột thứ phát và thoái hoá dạng tinh bột liên quan đến tuổi bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các rối loạn thần kinh như bệnh Alzheimer (AD) và các bệnh và các tình trạng đặc trưng bởi sự mất khả năng trí nhớ liên quan đến nhận thức, ví dụ như, suy giảm nhận thức nhẹ (MCI), sa sút trí tuệ thể Lewy, hội chứng Down, chứng xuất huyết não di truyền với thoái hoá dạng tinh bột (loại Dutch); bệnh phức hợp Guam Parkinson-Dementia cũng như các bệnh khác dựa vào vào hoặc liên quan đến các protein tương tự dạng tinh bột như liệt trên nhân tiến triển, bệnh xơ cứng rải rác; bệnh Creutzfeld Jacob, bệnh Parkinson, sa sút trí tuệ liên quan đến HIV, ALS (xơ cứng cột bên teo cơ), viêm cơ thể vùi ((IBM), bệnh tiểu đường bắt đầu tuổi trưởng thành; thoái hoá dạng tinh bột tim lão suy; các khối u nội tiết, và các bệnh khác, kể cả bệnh thoái hoá điểm vàng bao gồm tạo ra kháng thể theo sáng chế dưới dạng được dụng.

Các kháng thể và/hoặc các phần chức năng của chúng cụ thể là các kháng thể đơn dòng và/hoặc các phần chức năng của chúng hoặc kháng thể tương đương chức và các chế phẩm và các hỗn hợp gồm có kháng thể này theo sáng chế có thể được sử dụng để bào chế thuốc ngăn ngừa, điều trị và làm giảm các tác động của các bệnh và các rối loạn do hoặc có liên quan đến các protein dạng tinh bột hoặc tương tự tinh bột bao gồm chứng thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các bệnh và các rối loạn liên quan đến sự hình thành mảng tinh bột bao gồm chứng thoái hoá dạng tinh bột thứ phát và thoái hoá dạng tinh bột liên quan đến tuổi bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các rối loạn thần kinh như bệnh Alzheimer (AD) và các bệnh và các tình trạng đặc trưng bởi sự mất khả năng trí

nhớ liên quan đến nhận thức, ví dụ như, suy giảm nhận thức nhẹ (MCI), sa sút trí tuệ thể Lewy, hội chứng Down, chứng xuất huyết não di truyền với thoái hoá dạng tinh bột (loại Dutch); bệnh phức hợp Guam Parkinson-Dementia cũng như các bệnh khác dựa vào vào hoặc liên quan đến các protein tương tự dạng tinh bột như liệt trên nhân tiền triển, bệnh xơ cứng rải rác; bệnh Creutzfeldt Jacob, bệnh Parkinson, sa sút trí tuệ liên quan đến HIV, ALS (xơ cứng cột bên teo cơ), viêm cơ thể vùi ((IBM), bệnh tiểu đường bắt đầu tuổi trưởng thành; thoái hoá dạng tinh bột tim lão suy; các khối u nội tiết, và các bệnh khác, kể cả bệnh thoái hoá điểm vàng.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng mảng tích tụ trong não của động vật, cụ thể là động vật có vú, cụ thể là người bị bệnh hoặc tình trạng dẫn đến làm tăng lượng mảng tích tụ trong não bao gồm cho động vật, cụ thể là động vật có vú, cụ thể hơn là người cần sự điều trị này, một lượng điều trị hữu hiệu kháng thể và/hoặc phân chức năng của chúng cụ thể là của kháng thể đơn dòng và/hoặc phân chức năng của chúng hoặc của kháng thể tương đương chức theo sáng chế và như được mô tả trên đây, hoặc chế phẩm hoặc hỗn hợp bao gồm kháng thể này.

Cụ thể, lượng mảng tích tụ bị giảm vào khoảng ít nhất 20 %, cụ thể vào khoảng ít nhất 25%, cụ thể hơn vào khoảng ít nhất 30%, thậm chí cụ thể hơn là giảm tới nhiều hơn 30%.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp làm nhỏ lượng các mảng trong não của động vật, cụ thể là động vật có vú, cụ thể là người bị bệnh hoặc tình trạng dẫn đến làm tăng lượng mảng tích tụ trong não bao gồm cho động vật, cụ thể là động vật có vú, cụ thể hơn là người cần sự điều trị này, sử dụng một lượng điều trị hữu hiệu kháng thể và/hoặc phân chức năng của chúng cụ thể là của kháng thể đơn dòng và/hoặc phân chức năng của chúng hoặc của kháng thể tương đương chức theo sáng chế và như được mô tả trên đây, hoặc chế phẩm hoặc hỗn hợp bao gồm kháng thể này.

Cụ thể, lượng của các mảng trong não được giảm đến ít nhất 10%, cụ thể là đến ít nhất 15%, cụ thể hơn là nhiều hơn 15%.

Vẫn theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng tổng của A β tan trong não của động vật, cụ thể là động vật có vú, cụ thể là người bị bệnh hoặc tình trạng dẫn đến làm tăng các nồng độ A β tan trong não bao gồm cho động vật, cụ thể là động vật có vú, cụ thể hơn là người cần sự điều trị này, một lượng điều trị hữu hiệu kháng thể và/hoặc phân chức năng của chúng cụ thể là của kháng thể đơn dòng và/hoặc phân chức năng của chúng hoặc của kháng thể tương đương chức theo sáng chế và như được mô tả trên đây, hoặc chế phẩm hoặc hỗn hợp bao gồm kháng thể này.

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp để ngăn ngừa, điều trị và làm giảm các tác động của các bệnh và các rối loạn do hoặc có liên quan đến các protein dạng tinh bột hoặc tương tự tinh bột bao gồm chứng thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các bệnh và các rối loạn liên quan đến sự hình thành mảng tinh bột bao gồm chứng thoái hoá dạng tinh bột thứ phát và thoái hoá dạng tinh bột liên quan đến tuổi bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các rối loạn thần kinh như bệnh Alzheimer (AD) và các bệnh và các tình trạng đặc trưng bởi sự mất khả năng trí nhớ liên quan đến nhận thức, ví dụ như, suy giảm nhận thức nhẹ (MCI), sa sút trí tuệ thể Lewy, hội chứng Down, chứng xuất huyết não di truyền với thoái hoá dạng tinh bột (loại Dutch); bệnh phức hợp Guam Parkinson-Dementia cũng như các bệnh trên cơ sở hoặc liên quan đến các protein tương tự dạng tinh bột như liệt trên nhân tiền triển, bệnh xơ cứng rải rác; bệnh Creutzfeldt Jacob, bệnh Parkinson, sa sút trí tuệ liên quan đến HIV, ALS (xơ cứng cột bên teo cơ), viêm cơ thể vùi ((IBM), bệnh tiểu đường bắt đầu tuổi trưởng thành; thoái hoá dạng tinh bột tim lão suy; các khối u nội tiết, và các bệnh khác, kể cả bệnh thoái hoá điểm vàng, bằng cách cung cấp kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng hoặc chế phẩm hoặc hỗn hợp gồm có kháng thể này theo sáng chế cho động vật hoặc người bị tác động bởi rối loạn này bao gồm cho động vật, cụ thể là động vật có vú, cụ thể hơn là người cần sự điều trị này, sử dụng một lượng điều trị

hữu hiệu kháng thể và/hoặc phần chức năng của chúng cụ thể là của kháng thể đơn dòng và/hoặc phần chức năng của chúng hoặc của kháng thể tương đương chức theo sáng chế và như được mô tả trên đây, hoặc chế phẩm hoặc hỗn hợp bao gồm kháng thể này.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp để duy trì hoặc làm tăng khả năng nhớ liên quan đến nhận thức của động vật, cụ thể là động vật có vú hoặc người bị suy giảm trí nhớ bằng cách cho động vật, cụ thể là động vật có vú hoặc người cần sự điều trị này, sử dụng kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng theo sáng chế hoặc chế phẩm hoặc hỗn hợp bao gồm kháng thể này theo sáng chế và như được mô tả trên đây.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế được phẩm sử dụng kháng thể theo sáng chế và/hoặc phần chức năng của chúng cụ thể là kháng thể đơn dòng và/hoặc phần chức năng của chúng hoặc kháng thể tương đương chức để ngăn ngừa, điều trị và làm giảm các tác động của các bệnh và các rối loạn do hoặc có liên quan đến các protein dạng tinh bột hoặc tương tự tinh bột bao gồm chứng thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các bệnh và các rối loạn liên quan đến sự hình thành mảng tinh bột bao gồm chứng thoái hoá dạng tinh bột thứ phát và thoái hoá dạng tinh bột liên quan đến tuổi bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các rối loạn thần kinh như bệnh Alzheimer (AD) và các bệnh và các tình trạng đặc trưng bởi sự mất khả năng trí nhớ liên quan đến nhận thức, ví dụ như, suy giảm nhận thức nhẹ (MCI), sa sút trí tuệ thể Lewy, hội chứng Down, chứng xuất huyết não di truyền với thoái hoá dạng tinh bột (loại Dutch); bệnh phức hợp Guam Parkinson-Dementia cũng như các bệnh khác dựa vào vào hoặc liên quan đến các protein tương tự dạng tinh bột như liệt trên nhân tiền triển, bệnh xơ cứng rải rác; bệnh Creutzfeldt Jacob, bệnh Parkinson, sa sút trí tuệ liên quan đến HIV, ALS (xơ cứng cột bên teo cơ), viêm cơ thể vùi ((IBM), bệnh tiểu đường bắt đầu tuổi trưởng thành; thoái hoá dạng tinh bột tim lão suy; các khối u nội tiết, và các bệnh khác, kể cả bệnh thoái hoá điểm vàng.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp để bào chế được phẩm sử dụng kháng thể theo sáng chế và/hoặc phần chức năng của chúng cụ thể là kháng thể đơn dòng và/hoặc phần chức năng của chúng hoặc kháng thể tương đương chức để duy trì hoặc làm tăng khả năng nhớ liên quan đến nhận thức của động vật, cụ thể là động vật có vú hoặc người, bị suy giảm trí nhớ bằng cách cho động vật, cụ thể là động vật có vú hoặc người, kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng hoặc chế phẩm hoặc hỗn hợp bao gồm kháng thể này theo sáng chế và như được mô tả trên đây.

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

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

Các thuật ngữ "phát hiện" hoặc "được phát hiện" như được sử dụng theo sáng chế có nghĩa là sử dụng các kỹ thuật đã biết để phát hiện các phân tử sinh học như các phương pháp miễn dịch hoá học hoặc mô học và đề cập đến việc xác định số lượng và chất lượng có mặt hoặc nồng độ của phân tử sinh học trong quá trình nghiên cứu.

Thuật ngữ " β , A β dạng tinh bột hoặc dạng tinh bột β " là thuật ngữ được công nhận trong lĩnh vực kỹ thuật và đề cập đến các protein và các peptit dạng tinh bột β , protein tiền chất dạng tinh bột β (APP), cũng như các cải biến, các phần và các thể tương đương chức bất kỳ của chúng. Cụ thể, bằng β hóa dạng tinh bột, như được sử dụng theo sáng chế có nghĩa là phần bất kỳ được tạo ra bằng cách phân giải protein APP, cụ thể là các phần liên quan đến hoặc kết hợp với bệnh học dạng bột bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, A β_{1-38} , A β_{1-39} , A β_{1-40} , A β_{1-41} , A β_{1-42} và A β_{1-43} .

Cấu trúc và các trình tự của các peptit dạng tinh bột β như đề cập ở trên là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật và phương pháp để tạo ra các peptit này hoặc trích từ não và các đặc tả đã được mô tả, ví dụ, trong tài liệu Glenner and Wong, Biochem Biophys Res Comm 129, 885-890 (1984). Ngoài ra, các peptit dạng tinh bột β cũng sẵn có trên thị trường dưới các dạng khác nhau.

Thuật ngữ "sợi nhỏ $A\beta$ " hoặc "sợi tơ $A\beta$ filament" hoặc "các sợi nhỏ dạng tinh bột" là các dạng polyme của protein đơn phân tạo thành các sợi dạng bó hoặc riêng rẽ với đường kính sợi không đổi không tan trong môi trường nước và chứa lượng lớn cấu trúc liên kết chéo β - ở nhân của chúng; phần lớn có các đoạn nhiễm sắc beta liên kết chéo với trục sợi 1,2,3)

Thuật ngữ " $A\beta$ đơn phân" hoặc "chất đơn phân $A\beta$ " là protein dạng tinh bột β hoàn toàn tan, không tích tụ các phức chất trong môi trường nước.

Thuật ngữ "tinh bột tan polyme" và " $A\beta$ oligome" và "oligom $A\beta$ " đề cập đến các chất đơn phân tích tụ của các peptit dạng tinh bột, hoặc của các peptit tương tự dạng tinh bột, hoặc của các peptit dạng tinh bột được cải biến hoặc cắt cụt hoặc của các dẫn xuất khác của các peptit dạng tinh bột tạo ra các cấu trúc oligo hoặc polyme có thể tan cả trong môi trường nước *in vitro* và *in vivo* trong cơ thể người hoặc động vật có vú, cụ thể là trong não, cụ thể là tới các chất đơn phân của các peptit β ($A\beta$) dạng tinh bột hoặc của các peptit cải biến hoặc cắt cụt β ($A\beta$) hoặc các dẫn xuất của chúng, có thể tan trong cơ thể người hoặc động vật có vú cụ thể hơn là trong não tương ứng.

Bằng cách "tách" có nghĩa là phân tử sinh học không có ít nhất một số thành phần với chúng nó xuất hiện tự nhiên.

Các thuật ngữ "kháng thể" "các kháng thể" được sử dụng theo sáng chế là một thuật ngữ kỹ thuật được thừa nhận và được hiểu là đề cập đến các phân tử hoặc các phần hoạt tính của các phân tử gắn kết với các kháng nguyên đã biết, cụ thể là với các phân tử globulin miễn dịch và với các phần hoạt tính miễn dịch

của các phân tử globulin miễn dịch, nghĩa là các phân tử chứa điểm gắn kết kết hợp 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 lớp (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 và IgA2) hoặc các lớp phụ của phân tử globulin miễn dịch.

Thuật ngữ "các kháng thể" 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, khi hoá, người hoặc người hoá cũng như các phần hoạt tính của chúng. Các ví dụ về các phần hoạt tính của các phân tử gắn kết với các kháng nguyên đã biết bao gồm các phần Fab và F(ab')₂, kể cả các sản phẩm của thư viện biểu hiện globulin miễn dịch và các phần gắn kết epitop của các kháng thể và các phân bất kỳ nêu trên.

Các phần hoạt tính đó có thể thu được từ kháng thể bất kỳ theo sáng chế bằng một số kỹ thuật. Ví dụ, các kháng thể đơn dòng tinh sạch có thể được cắt bằng enzym, như pepsin, và được chuyển sang lọc gel HPLC. Sau đó, các phần Fab chứa đoạn thích hợp có thể được thu gom và cô bằng cách lọc màng và các phương pháp tương tự. Để mô tả thêm các kỹ thuật chung để tách các phần hoạt tính của các kháng thể, ví dụ xem 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 đến loại kháng thể được xử lý kỹ thuật có các CDR của nó thu được từ globulin miễn dịch thể cho không phải là người, các phần thu được từ globulin miễn dịch còn lại của phân tử được tạo ra từ một (hoặc nhiều) globulin miễn dịch người. Ngoài ra, các gốc đỡ khung có thể được thay 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)).

“Các kháng thể được làm giống như của người” cũng có thể thu được bằng phương pháp kỹ thuật di truyền có thể tạo ra các kháng thể đa dòng tương tự người trưởng thành ái lực ở động vật lớn, ví dụ như thỏ (<http://www.rctech.com/bioventures/therapeutic.php>).

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" cũng đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật và đề cập đến kháng thể được tạo ra hàng loạt trong thư viện từ dòng đơn tính và được thừa nhận chỉ là một kháng nguyên. Các kháng thể đơn dòng thường được tạo ra bằng cách hợp nhất tế bào tạo ra kháng thể B, tồn tại trong một thời gian ngắn với tế bào sinh trưởng nhanh, như tế bào ung thư (đôi khi được đề cập tới như là tế bào “bất tử”). Tế bào lai thu được, hoặc khối tế bào lai, tăng lên nhiều lần nhanh chóng, tạo ra dòng vô tính sản sinh các số lượng lớn kháng thể.

Đối với mục đích của sáng chế, "kháng thể đơn dòng" cũng bao hàm các kháng thể được tạo ra bởi dòng vô tính gốc chưa đạt tới tính đơn dòng hoàn toàn.

Thuật ngữ "kháng thể tương đương chức" được hiểu nằm trong phạm vi của sáng chế đề cập đến kháng thể về cơ bản có cùng ít nhất một đặc tính chức quan trọng với kháng thể nêu trên và được mô tả ở đây bao gồm: gắn kết đặc hiệu với protein dạng tinh bột β , cụ thể với protein $A\beta_{1-42}$, và cụ thể hơn là gắn với vùng epitop 4-16 của protein $A\beta_{1-42}$, tính phản ứng miễn dịch in vitro, ức chế sự tích tụ của các monome $A\beta_{1-42}$, trong các sợi nhỏ polyme cao phân tử và/hoặc không tích tụ các sợi nhỏ polyme $A\beta_{1-42}$ hình thành trước, và/ hoặc đặc tính làm gãy tấm β và làm giảm bớt các tác động của các rối loạn có liên quan đến thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các bệnh và các rối loạn liên quan đến sự hình thành mảng dạng tinh bột bao gồm thoái hoá dạng tinh bột thứ phát và thoái hoá dạng tinh bột liên quan đến tuổi bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các rối loạn thần kinh như bệnh Alzheimer (AD) và các bệnh và các tình trạng đặc trưng bởi sự mất khả năng trí nhớ liên quan đến nhận thức, ví dụ như, suy giảm nhận thức nhẹ (MCI), sa sút trí tuệ thể Lewy, hội chứng Down, chứng xuất huyết não di

truyền với thoái hoá dạng tinh bột (loại Dutch); bệnh phức hợp Guam Parkinson-Dementia cũng như các bệnh khác dựa vào vào hoặc liên quan đến các protein tương tự dạng tinh bột như liệt trên nhân tiến triển, bệnh xơ cứng rải rác; bệnh Creutzfeld Jacob, bệnh Parkinson, sa sút trí tuệ liên quan đến HIV, ALS (xơ cứng cột bên teo cơ), viêm cơ thể vùi ((IBM), bệnh tiểu đường bắt đầu tuổi trưởng thành; thoái hoá dạng tinh bột tim lão suy; các khối u nội tiết, và các bệnh khác, kể cả bệnh thoái hoá điểm vàng, khi được sử dụng phòng ngừa hoặc điều trị. Các kháng thể có thể là lớp bất kỳ như IgG, IgM, hoặc IgA, v.v.. hoặc lớp phụ bất kỳ như IgG1, IgG2a, v.v.. và các lớp phụ khác nêu trên hoặc đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, cụ thể là lớp IgG2. Ngoài ra, các kháng thể có thể được tạo ra bởi phương pháp bất kỳ, như biểu thị thể thực khuẩn, hoặc được tạo ra trong sinh vật bất kỳ hoặc dòng tế bào, kể cả vi khuẩn, côn trùng, động vật có vú hoặc loại khác của tế bào hoặc dòng tế bào tạo ra các kháng thể với các đặc tính mong muốn, như các kháng thể được người hoá. Các kháng thể có thể cũng được tạo ra bằng cách kết hợp phần Fab và vùng Fc từ loài khác nhau.

Thuật ngữ "đặc hiệu kép" hoặc "chức năng kép" và "hai tác dụng" được sử dụng đồng nghĩa với phạm vi của sáng chế này để đặc trưng hoá kháng thể có cả đặc tính ức chế đối với sự hình thành sợi tinh bột hoặc tương tự tinh bột cũng như đặc tính kết tụ sợi tinh bột hoặc tương tự tinh bột.

Thuật ngữ "kháng nguyên" đề cập đến thực thể hoặc phần của chúng có thể kích thích đáp ứng miễn dịch ở sinh vật, cụ thể động vật, cụ thể hơn là ở động vật có vú kể cả người. Thuật ngữ bao gồm các chất sinh miễn dịch và các vùng tạo ra tính kháng nguyên hoặc các yếu tố di truyền kháng nguyên.

Theo sáng chế, thuật ngữ "hoà tan" có nghĩa là hoà tan một phần hoặc hoàn toàn trong dung dịch nước.

Cũng theo sáng chế, thuật ngữ "tạo miễn dịch" đề cập đến các chất tạo ra hoặc tăng cường sản sinh các kháng thể, các tế bào T và các tế bào miễn dịch phản ứng khác trực tiếp chống lại tác nhân tạo miễn dịch và góp phần vào đáp ứng miễn dịch ở người hoặc động vật.

Đáp ứng miễn dịch xuất hiện khi cá thể tạo ra các kháng thể, các tế bào T và các tế bào miễn dịch phản ứng khác đủ kháng lại các chế phẩm tạo miễn dịch sử dụng theo sáng chế làm nhẹ hoặc giảm bớt rối loạn cần điều trị.

Thuật ngữ "tinh bột tan polyme" đề cập đến các chất đơn phân tích tụ của các peptit dạng tinh bột, hoặc của các peptit tương tự dạng tinh bột, hoặc của các peptit dạng tinh bột được cải biến hoặc cắt cụt hoặc của các dẫn xuất khác của các peptit dạng tinh bột tạo ra các cấu trúc oligome hoặc polyme có thể tan trong cơ thể người hoặc động vật có vú, cụ thể hơn là trong não, cụ thể là tới các chất đơn phân của các peptit β ($A\beta$) dạng tinh bột hoặc của các peptit cải biến hoặc cắt cụt β ($A\beta$) hoặc các dẫn xuất của chúng, có thể tan trong cơ thể người hoặc động vật có vú cụ thể hơn là trong não.

Thuật ngữ "tế bào lai" được thừa nhận trong lĩnh vực kỹ thuật và được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật hiểu rằng đề cập đến tế bào được tạo ra bằng cách hợp nhất tế bào tạo ra kháng thể và tế bào bất tử, ví dụ tế bào u tuỷ. Tế bào lai này có thể tạo ra nguồn cung cấp kháng thể liên tục. Xem định nghĩa "kháng thể đơn dòng" nêu trên và các Ví dụ dưới đây về mô tả chi tiết hơn phương pháp hợp nhất.

Thuật ngữ "chất mang" theo sáng chế có nghĩa là cấu trúc, trong đó peptit kháng nguyên hoặc cấu trúc siêu phân tử có thể đưa vào hoặc có thể kết hợp, nhờ đó thể hiện hoặc bộc lộ các peptit kháng nguyên hoặc một phần của peptit với hệ miễn dịch của người hoặc động vật. Hạt bất kỳ có thể được sử dụng thích hợp trong liệu pháp cho động vật hoặc người, ví dụ như túi nhỏ, 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 các phương pháp để phân phối, trong đó các chế phẩm cấu trúc kháng nguyên siêu phân tử bao gồm peptit kháng nguyên có thể được vận chuyển tới các điểm mong muốn bằng các cơ chế phân phối. Một ví dụ về hệ phân phối này sử dụng các kim loại keo như vàng keo.

Ngoài ra, thuật ngữ "chất mang" còn bao gồm các cơ chế phân phối đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, nhưng không chỉ giới hạn ở, keyhole limpet hemocyanin "KLH", albumin huyết thanh bò "BSA" và các tá dược khác.

Trong cấu trúc kháng nguyên siêu phân tử theo sáng chế, liposom có thể có chức năng kép ở chỗ nó có thể được sử dụng như chất mang bao gồm cấu trúc siêu phân tử như được mô tả trên đây và, đồng thời chức năng như chất phụ trợ để làm tăng hoặc kích thích đáp ứng miễn dịch ở động vật hoặc người đích cần điều trị bằng vacxin chữa bệnh theo sáng chế. Cũng cần hiểu rằng các chế phẩm cấu trúc kháng nguyên siêu phân tử theo sáng chế có thể còn bao gồm các chất phụ trợ khác kể cả, nhưng không chỉ giới hạn ở, ví dụ như lipid A, phèn, canxi phosphat, interleukin 1, và/hoặc các vi nang chứa polysaccharit và protein, cụ thể là lipid giải độc A, như monophosphoryl hoặc diphosphoryl lipid A, hoặc phèn, các chất bảo quản khác, các chất pha loãng, các chất nhũ tương, các chất làm ổn định, và các thành phần khác đã biết và được sử dụng trong các vacxin của giải pháp kỹ thuật đã biết. Ngoài ra, hệ tá dược bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế. Các tá dược này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tá dược Freund không hoàn chỉnh, tá dược Freund hoàn chỉnh, mannan axetyl hoá liên kết β -(1,4) ("Acemannan"), TITERMAX[®] (các chất phụ trợ polyoxyetylen-polyoxypropylen copolyme của CytRx Corporation), các chất phụ trợ lỏng cải biến của Chiron Corporation, các chất phụ trợ dẫn xuất từ saponin của Cambridge Biotech, *Bordetella pertussis* chết, lipopolysaccharit (LPS) của vi khuẩn gram âm, các anion polyme như dextran sulfat, và các gel vô cơ như phèn, nhôm hydroxit, hoặc nhôm phosphat.

Các protein chất mang có thể được sử dụng trong các chế phẩm cấu trúc kháng nguyên siêu phân tử theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, protein gắn kết maltoza "MBP"; albumin huyết thanh bò "BSA"; hemocyanin của con hà "KLH"; lòng trắng trứng; flagellin; thyroglobulin; albumin huyết thanh của loại bất kỳ; gama globulin của loại bất kỳ; các tế bào cùng loại; các

kháng nguyên Ia mang các tế bào cùng loại; và các polyme của các axit amin D- và/hoặc L-.

Ngoài ra, thuật ngữ "lượng hữu hiệu" đề cập đến lượng kháng thể mà khi được cung cấp cho người hoặc động vật, tạo ra đáp ứng miễn dịch đủ để tạo ra hiệu quả điều trị ở người hoặc động vật. Lượng hữu hiệu được xác định nhanh bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật theo các phương pháp thông thường.

Thuật ngữ "mức độ tương đồng" giữa hai trình tự được xác định bằng tính đồng nhất trình tự. Nếu hai trình tự được so sánh với nhau khác nhau về độ dài, thì tốt hơn tính đồng nhất trình tự đề cập đến tỷ lệ gốc nucleotit của trình tự ngắn hơn đồng nhất với các gốc nucleotit của trình tự dài hơn. Tính đồng nhất trình tự có thể được sử dụng thông thường bằng cách sử dụng các chương trình máy tính như chương trình Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711). Bestfit sử dụng thuật toán tương đồng cục bộ của Smith và Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489, để tìm ra đoạn có mức độ tương đồng về trình tự cao nhất giữa hai trình tự. Khi sử dụng chương trình Bestfit hoặc chương trình sắp xếp trình tự khác để xác định có hay không trình tự cụ thể có mức độ tương đồng 95%, chẳng hạn với trình tự tham khảo theo sáng chế, tốt hơn là các thông số được điều chỉnh đến mức tỷ lệ đồng nhất được tính toán nhờ độ dài hoàn toàn của trình tự tham khảo và các thiếu hụt tương đồng lên đến 5% tổng số các nucleotit trong trình tự tham khảo được thừa nhận. Khi sử dụng chương trình Bestfit, tốt hơn cái gọi là các thông số, tùy ý, để theo các giá trị đặt trước của chúng ("mặc định"). Các độ chênh xuất hiện khi so sánh giữa trình tự đã cho và các trình tự mô tả ở trên theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách bổ sung, làm khuyết đoạn, thay thế, xen đoạn hoặc tái kết hợp. Tốt hơn là quá trình so sánh trình tự còn có thể được tiến hành bằng chương trình "fasta20u66" (version 2.0u66, September 1998 by William R. Pearson and the University of Virginia; cũng xem tài liệu W. R. Pearson (1990), *Methods in*

Enzymology 183, 63-98, các ví dụ kèm theo và <http://workbench.sdsc.edu/>). Đối với mục đích này, các điều chỉnh thông số "mặc định" có thể được sử dụng.

Thuật ngữ "lai" theo sáng chế đề cập đến các điều kiện lai thông thường, tốt hơn là các điều kiện lai tại đó dung dịch 5xSSPE, 1%SDS, 1xDenhardt được sử dụng làm dung dịch và/hoặc nhiệt độ lai nằm trong khoảng 35°C và 70°C, tốt hơn là 65°C. Sau khi lai, tốt hơn quá trình rửa được tiến hành lần thứ nhất bằng dung dịch 2xSSC, 1% SDS và rồi sau đó bằng 0,2xSSC ở nhiệt độ lai nằm trong khoảng 35°C và 70°C, tốt hơn là ở 65°C (liên quan đến định nghĩa dung dịch SSPE, SSC và Denhardt (xem tài liệu Sambrook et al. loc. cit.). Các điều kiện lai nghiêm ngặt, ví dụ như được mô tả trong tài liệu Sambrook et al, supra, cụ thể được ưu tiên. Các điều kiện lai nghiêm ngặt cụ thể được ưu tiên, ví dụ có mặt nếu quá trình lai và rửa xuất hiện ở 65°C như nêu trên. Các điều kiện lai không nghiêm ngặt, ví dụ với quá trình lai và rửa xuất hiện ở 45°C hoặc thấp hơn được ưu tiên và ở 35°C hoặc thậm chí thấp hơn.

Sáng chế có thể được hiểu dễ dàng hơn bằng cách tham khảo mô tả chi tiết các phương án cụ thể ở đây. Mặc dù sáng chế được mô tả bằng cách tham khảo chi tiết cụ thể của một số phương án của nó, nhưng các chi tiết đó sẽ không nhằm làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Sáng chế đề xuất các kháng thể và các phân chức năng của chúng là các kháng thể nhạy cấu hình. Các kháng thể đó nhận dạng các epitop đặc hiệu đối với nhiều loại kháng nguyên protein dạng tinh bột. Các kháng thể đó được sử dụng để chẩn đoán và điều trị các bệnh và các rối loạn do hoặc có liên quan đến các protein dạng tinh bột hoặc tương tự tinh bột bao gồm chứng thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các bệnh và các rối loạn liên quan đến protein dạng tinh bột và tương tự tinh bột như protein A β liên quan đến bệnh Alzheimer.

Các kháng thể được cung cấp cho các cá thể để tạo miễn dịch thụ động nhằm kháng lại các bệnh hoặc các rối loạn, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các bệnh liên quan đến protein dạng tinh bột như bệnh Alzheimer.

Các kháng thể được cung cấp ở đây là kháng thể đơn dòng hoặc đa dòng có tính đặc hiệu gắn kết đối với các peptit kháng nguyên đại diện cho các rối loạn khác nhau có liên quan đến protein dạng tinh bột ví dụ như bệnh Alzheimer.

Các kháng thể theo sáng chế được tạo ra bằng cách tạo miễn dịch cho động vật, như chuột nhắt, chuột, thỏ hoặc loại động vật bất kỳ có thể tạo ra các kháng thể nguyên thể hoặc người, bằng chế phẩm cấu trúc kháng nguyên siêu phân tử.

Các cấu trúc kháng nguyên siêu phân tử như đề cập ở đây thường bao gồm các peptit cải biến để tăng cường hiệu quả kháng nguyên trong đó các peptit đó được cải biến bằng cách pegyl hoá (nhờ sử dụng polyetylen glycol hoặc polyetylen glycol cải biến), hoặc cải biến bằng các phương pháp khác như axit axít palmitic, các axit poly-amino (ví dụ poly-glyxin, poly-histidin), các polysacarit (ví dụ axit polygalacturonic, axit polylactic, polyglycolit, chitin, chitosan), các polyme tổng hợp (các polyamit, các polyuretan, polyeste) hoặc các co-polyme (ví dụ poly(axít metacrylic) và N-(2-hydroxy) propyl metacrylamit) và các loại tương tự.

Quá trình cải biến bằng axit palmitic (palmitoyl hoá), trong khi tạo ra neo cho peptit trong lớp kép liposom, do độ dài của gốc axit béo $C_{16:0}$ giảm tương đối dẫn đến peptit hầu như nằm trên bề mặt liposom. Vì vậy, các tế bào xử lý kháng nguyên sẽ phải hấp thụ toàn bộ liposom với peptit, trong phần lớn các trường hợp, nó sẽ làm chậm hơn đáp ứng miễn dịch theo các định nghĩa liên quan.

Theo một phương án của sáng chế, peptit dạng tinh bột cải biến 1-15 được sử dụng để tạo ra kháng thể, cụ thể kháng thể đơn dòng theo sáng chế. Peptit dạng tinh bột cải biến 1-15 có thể tổng hợp theo phương pháp nêu trong tài liệu Nicolau et. al. 2002. Phương pháp nêu trong tài liệu của Nicolau và cộng sự tạo ra cải biến peptit kháng nguyên bằng ghép trên nhựa gốc ưa chất béo hoặc gốc kỵ nước, với các gốc axit amin ở đầu của peptit tạo ra trước đó khiến tăng đáng kể độ tinh sạch của sản phẩm. Cụ thể, axit amin bảo vệ, cụ thể là axit amin bảo vệ bằng Fmoc-, được gắn với nhựa nhờ sử dụng hoá học kết hợp. Nhóm bảo vệ

được loại bỏ và gốc axit amin bảo vệ thứ hai được kết hợp. Phương pháp tổng hợp peptit tự động chuẩn nhờ sử dụng hoá học bảo vệ đã biết, cụ thể là hoá học Fmoc/tBu, và các nhóm bảo vệ mạch bên chuẩn sau đó được sử dụng để tổng hợp peptit kháng nguyên A β_{1-15} bằng cách kết hợp trên các axit amin từ 1 đến 15 của protein dạng tinh bột A β_{1-42} để tạo ra phần peptit với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. Ở bước cuối cùng, hai axit amin bảo vệ khác được kết hợp với phần peptit sinh trưởng. Sau đó, các nhóm Mtt có thể được phân giải chọn lọc và kết hợp với axit palmitic. Sau khi rửa nhựa, nhóm bảo vệ được loại bỏ và nhựa được phân giải đồng thời, tiếp theo là các quá trình khử bảo vệ mạch bên nhờ sử dụng phương pháp chuẩn. Sau đó sản phẩm cuối cùng có thể thu được với độ tinh sạch cao và độ đồng nhất của nó được khẳng định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ như phép đo phổ khối điện phun.

Gốc ưa chất béo hoặc gốc kỵ nước theo sáng chế có thể là axit béo, triglyxerit hoặc phospholipit trong đó khung chính cacbon axit có ít nhất 10 nguyên tử cacbon. Cụ thể, gốc ưa chất béo hoặc gốc kỵ nước là các axit béo với khung chính cacbon gồm ít nhất 14 nguyên tử cacbon và lên đến khoảng 24 nguyên tử cacbon, với mỗi số nguyên tử cacbon riêng rẽ nằm trong giới hạn này cũng là một phần của sáng chế. Cụ thể hơn, gốc ưa chất béo hoặc gốc kỵ nước có khung chính cacbon gồm ít nhất 14 nguyên tử cacbon. Các ví dụ về các gốc kỵ nước bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit palmitic, axit stearic, axit myristic, axit lauric, axit oleic, axit linoleic, axit linolenic và cholesterol hoặc DSPE. Theo một phương án cụ thể sáng chế đề xuất gốc ưa chất béo hoặc gốc kỵ nước là axit palmitic.

Để tăng cường đáp ứng miễn dịch, đoạn đệm/neo có thể được sử dụng thích hợp để hồi phục peptit trong liposom, ví dụ polyetylen glycol (PEG).

PEG được gắn kết cộng hoá trị với liên kết gốc axit amin ở cả hai đầu của peptit, cụ thể là gốc axit amin Glu, Cys hoặc Lys hoặc gốc axit amin bất kỳ có thể được sử dụng thích hợp để liên kết cộng hoá trị PEG với peptit. Tại đầu khác của chuỗi gốc kỵ nước có thể được liên kết cộng hoá trị để hoạt động như thành

phần neo trong lớp kép liposom, ví dụ như phosphatidyl etanol amin (PEA). Vì vậy, liposom vẫn tiếp tục có chức năng như một tá dược và peptit đủ xa lớp kép có thể được xử lý riêng và vì vậy làm tăng tính sinh miễn dịch của nó so với kháng nguyên palmitoyl hoá.

Theo một số phương án, các cấu trúc kháng nguyên siêu phân tử theo sáng chế bao gồm trình tự peptit kháng nguyên như được mô tả trên đây, gắn kết cộng hoá trị với lysin pegyl hoá-ít nhất là mỗi đầu của chúng. Độ dài của chuỗi PEG (polyetylenglycol) có thể thay đổi từ $n=8$ đến $n=150.000$ hoặc lớn hơn, tốt hơn là từ $n = 10$ đến $n = 80.000$, tốt hơn là từ $n = 20$ đến $n = 10.000$. Theo một phương án cụ thể của sáng chế, độ dài của chuỗi PEG không lớn hơn $n = 45$, tốt hơn là khoảng $n = 5$ và $n = 40$, tốt hơn là khoảng $n = 10$ và $n = 30$, và thậm chí tốt hơn là $n = 10$.

Các cấu trúc siêu phân tử được mô tả ở đây có thể được tổng hợp nhờ sử dụng phương pháp tổng hợp peptit tự động và hoá học bảo vệ đã biết, cụ thể là hoá chất Fmoc/tBu, và các nhóm bảo vệ mạch bên chuẩn. Thông thường, quá trình pegyl hoá các peptit tạo ra các hỗn hợp của các chất đồng phân vùng.

Để đạt được sự gắn kết đặc hiệu điểm của thể tiếp hợp PEG-lipit với cả đầu C- và N- của A β thì các peptit bảo vệ một phần có thể được sử dụng. Đối với các trình tự peptit chứa các gốc Lys hoặc His bên trong, Lys(ivDde) bảo vệ trực giao được thêm vào mỗi đầu. Gly bổ sung có thể được thêm vào đầu C để tạo thuận lợi cho quá trình tổng hợp. Nhóm bảo vệ được loại bỏ và N-acetyl hoá nhờ sử dụng axetic anhydrit và tiếp theo là phân giải có chọn lọc các nhóm ivDde.

Nhựa, cụ thể là nhựa 2-chlorotrityl, được ưa thích là nhạy cảm với axit và vì vậy cho phép quá trình tách các peptit bảo vệ.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, phản ứng kết hợp được tiến hành trong pha dung dịch. Quá trình phân giải chọn lọc từ nhựa trong các điều kiện bình thường sau đó giải phóng các peptit bảo vệ bên trong.

Các kết hợp pha lỏng với các peptit thu được từ trình tự protein dạng tinh bột β - đã đạt được kết quả, ví dụ như $A\beta_{1-16}$ (SEQ ID NO:2) với phân tử PEG cải biến bằng axit béo-phosphatidylcholin, ví dụ như DSPE. Quá trình tách các sản phẩm kết hợp một lần và hai lần trước các bước khử bảo vệ mạch bên cuối cùng có thể đạt được nhờ sử dụng phép sắc ký trao đổi cation. Các quá trình khử bảo vệ mạch bên peptit tiếp theo dẫn đến quá trình tách các thể tiếp hợp mong muốn với độ tinh khiết thích hợp. Quá trình tinh chế có thể đạt được bằng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ như HPLC.

Phương pháp này tạo ra các kháng nguyên dạng tinh bột lipit-PEG β - đầu N- và C- nhờ sử dụng các peptit bảo vệ có thể áp dụng được với rất nhiều loại trình tự peptit

Các kháng nguyên liposomal theo sáng chế sau đó có thể được điều chế như được mô tả trong tài liệu của Nicolau và cộng sự, 2002. Peptit kháng nguyên dạng tinh bột $A\beta$ cải biến, cụ thể là peptit kháng nguyên $A\beta_{1-15}$, $-A\beta_{1-16}$, $A\beta_{1-16}(\Delta 14)$, $A\beta_{22-35}$ và $A\beta_{29-40}$ PEG- và palmitoyl hoá cải biến có thể được hồi phục trong cấu trúc gồm có các liposom, cụ thể là các liposom được tạo ra từ dimyristoyl phosphatidyl cholin (DMPC), dimyristoyl phosphatidyl etanolamin (DMPEA), dimyristoyl phosphatidyl glyxerol (DMPG) và cholesterol, tùy ý chứa monophosphoryl lipit A.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, các liposom với lipit A được sử dụng làm tá dược để bào chế vacxin kháng tinh bột. Dimyristoylphosphatidylcholin, -glyxerol và cholesterol được trộn, cụ thể theo tỷ lệ mol là 0,9:1,0:0,7. Chất điều hòa miễn dịch, ví dụ như monophosphoryl lipit A sau đó được bổ sung với nồng độ thích hợp, cụ thể ở nồng độ nằm trong khoảng 30 và 50mg/mmol, cụ thể hơn ở nồng độ 40mg/mmol của các phospholipit. Sau đó peptit kháng nguyên cải biến $A\beta$ được bổ sung với tỷ lệ mol peptit theo lượng phospholipit nằm trong khoảng 1:30 và 1:200, cụ thể với tỷ lệ mol trong khoảng 1:50 và 1:120, cụ thể hơn là 1:100. Các dung môi được loại bỏ, ví dụ bằng cách

làm bay hơi, và màng thu được hydchuột hoá bằng dung dịch đệm tiệt trùng, ví dụ PBS.

Các liposom cũng có thể được điều chế bằng kỹ thuật phun dòng trực giao như được mô tả, ví dụ, trong tài liệu Wagner et al (2002) Journal of Liposome Research Vol 12(3), pp 259 - 270. Trong quá trình phun các dung dịch lipid vào hệ đệm nước, các lipid có xu hướng tạo ra "các chất kết tủa", tiếp theo là tự sắp xếp thành các túi nhỏ. Kích cỡ của túi nhỏ thu được tùy thuộc vào nhiều yếu tố như nồng độ lipid, tốc độ khuấy, tốc độ phun, và việc lựa chọn lipid. Hệ thống bào chế gồm có modul phun dòng giao nhau, các thùng cho pha phân cực (ví dụ dung dịch đệm PBS), thùng chứa dung dịch etanol/lipid và thiết bị tăng áp, cụ thể là thiết bị tăng áp nitơ. Trong khi dung dịch nước hoặc phân cực được bơm qua modul phun dòng giao nhau thì dung dịch etanol/lipid được phun vào pha phân cực bằng cách thay đổi áp suất sử dụng.

Liposom vẫn hoạt động như một tá dược và peptit đủ xa lớp kép có thể được xử lý riêng và vì vậy làm tăng tính sinh miễn dịch của nó so với kháng nguyên được palmitoyl hoá.

Đầu PEG tự do được gắn kết cộng hoá trị với phân tử của phosphatidyl-ethanolamin (trong đó axit béo có thể là: myristic, palmitic, stearic, oleic... hoặc hỗn hợp của chúng) có chức năng như thành phần neo. Cấu trúc siêu phân tử này có thể được neo bằng cách hồi phục trong các liposom gồm có các phospholipit và cholesterol (phosphatidyletanol amin, phosphatidyl glycerol, cholesterol với các tỷ lệ mol khác nhau. Các phospholipit khác có thể được sử dụng. Lipid A được sử dụng ở nồng độ khoảng 40µg/pmol các phospholipit.

Theo một số phương án, các cấu trúc kháng nguyên paimitoyl hoặc pegyl hoá bao gồm peptit trình tự axit amin của dạng tinh bột β -. Các peptit còn có thể bao gồm hoặc tương ứng với toàn bộ peptit beta dạng tinh bột β và các phần hoạt tính của chúng. Ngoài ra, các peptit được sử dụng trong sáng chế còn bao gồm A β ₁₋₁₆ (SEQ ID NO:2); A β ₁₋₁₆(Δ 14); (SEQ ID NO:3); A β ₁₋₁₅ (SEQ ID NO: 1); và các phần hoạt tính của chúng.

Để tạo ra và điều chế các kháng thể và để xác định tính sinh miễn dịch của cấu trúc kháng nguyên cải biến A β , động vật thích hợp được chọn từ nhóm bao gồm chuột nhắt, chuột, thỏ, lợn, chim, v.v., cụ thể là chuột nhắt, cụ thể là chuột nhắt C57BL/6 được tạo miễn dịch bằng peptit kháng nguyên, Tính sinh miễn dịch của cấu trúc kháng nguyên được xác định dò các mẫu huyết thanh trong các khoảng thời gian thích hợp sau khi tạo miễn dịch bằng thử nghiệm miễn dịch, ví dụ như thử nghiệm ELISA.

Các kháng thể đơn dòng của sáng chế có thể được tạo ra nhờ sử dụng các kỹ thuật hợp hợp nhất tế bào và tách dòng đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Chất sinh miễn dịch (kháng nguyên) quan tâm, thường được cung cấp (ví dụ bằng cách tiêm truyền trong bụng) cho chuột nhắt hoang dại và nhân giống (ví dụ chuột nhắt BALB/c hoặc cụ thể là chuột nhắt C57BL/6), chuột, thỏ hoặc loài động vật khác hoặc chuột nhắt chuyển gen có thể tạo ra các kháng thể người hoặc nguyên thể. Chất sinh miễn dịch có thể được cung cấp riêng rẽ, hoặc trộn lẫn với tá dược, hoặc được biểu hiện từ vật truyền (vật truyền replicon VEE, vaccinia), hoặc như ADN, hoặc protein hợp nhất để kích đáp ứng miễn dịch. Các protein hợp nhất bao gồm peptit chống lại nó, một đáp ứng miễn dịch được mong muốn kết hợp với các protein thể mang, ví dụ như beta.-galactosidaza, glutathione S-transferaza, keyhole limpet hemocyanin "KLH", albumin huyết thanh bò "BSA". Trong các trường hợp đó, các peptit được sử dụng như các kháng nguyên không hoàn toàn với các protein thể mang. Sau khi động vật được sử dụng liều tăng, ví dụ, hai hoặc nhiều lần, các tế bào lách được thu gom từ các động vật tạo miễn dịch và các tế bào được tạo ra bằng cách hợp nhất các tế bào lách đã miễn cảm với dòng tế bào u tuỷ, như các tế bào u tuỷ chuột SP2/O (ATCC, Manassas, VA) nhờ sử dụng các phương pháp đã biết rõ của Kohler và Milstein (Nature 256: 495-497 (1975)) và Harlow và Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988)).

Theo một phương án cụ thể sáng chế đề xuất cấu trúc kháng nguyên theo sáng chế, cụ thể tới chế phẩm vacxin bao gồm cấu trúc kháng nguyên này dưới

dạng được dụng, được cung cấp với các liều nhắc lại, cụ thể với từ 1 đến 15 liều, cụ thể hơn với từ 2 đến 10 liều, thậm chí cụ thể hơn với từ 3 đến 7 liều cụ thể là với từ 4 đến 6 liều, với các khoảng thời gian nằm trong khoảng 1 và 10 tuần, cụ thể với các khoảng thời gian nằm trong khoảng 1 và 6 tuần, cụ thể hơn với các khoảng thời gian nằm trong khoảng 1 và 4 tuần, và thậm chí cụ thể hơn với các khoảng thời gian nằm trong khoảng 2 và 3 tuần. Đáp ứng miễn dịch được theo dõi bằng cách lấy các mẫu huyết thanh tại thời điểm thích hợp sau khi dùng tăng liều, cụ thể từ 3 đến 10 ngày sau khi dùng tăng liều, cụ thể hơn là từ 4 đến 8 ngày sau khi sử dụng tăng liều và cụ thể hơn là từ 5 đến 6 ngày sau khi sử dụng tăng liều và xác định tính sinh miễn dịch của cấu trúc kháng nguyên nhờ sử dụng phương pháp đã biết, cụ thể một trong số những thử nghiệm miễn dịch thường sử dụng ví dụ như thử nghiệm ELISA.

Quá trình tạo miễn dịch bằng cấu trúc kháng nguyên theo sáng chế, cụ thể là bằng chế phẩm vacxin bao gồm cấu trúc kháng nguyên theo sáng chế dưới dạng được dụng tạo ra đáp ứng miễn dịch ở động vật được điều trị. Động vật, cụ thể là chuột nhắt với các độ chuẩn điều trị được chọn cho sự hợp nhất của các tế bào tạo ra kháng thể, cụ thể là các lympho bào B- với dòng tế bào bất tử hoặc sinh trưởng liên tục, như dòng tế bào u tuỷ. Các tế bào đó được kích thích để hợp nhất bằng cách bổ sung polyetylen glycol. Độ chuẩn điều trị là độ chuẩn tạo ra kết quả dương tính ở thử nghiệm ELISA ở tỷ lệ pha loãng là 1:4000 và 1:6000, cụ thể trong khoảng 1:4500 và 1:5500, cụ thể hơn là 1:5000.

Sau đó các tế bào lai thu được được tách dòng theo phương pháp thông thường, ví dụ nhờ sử dụng chất pha loãng giới hạn, và các vô tính thu được, tạo ra các kháng thể đơn dòng mong muốn, được nuôi cấy.

Các tế bào lai thu được theo cách đó được chọn lọc hoá học bằng cách dần mỏng các tế bào trong môi trường chọn lọc chứa hypoxanthin, aminopterin và thymidin (HAT).

Sau đó, các tế bào lai được sàng lọc về khả năng tạo ra các kháng thể đơn dòng kháng lại các bệnh hoặc các rối loạn liên quan đến dạng tinh bột đặc hiệu.

Các tế bào lai tạo ra các kháng thể quan tâm được tách dòng, mở rộng và giữ đông lạnh để sản xuất trong tương lai. Các tế bào lai được ưu tiên tạo ra kháng thể đơn dòng có isotyp IgG, tốt hơn là isotyp IgG2.

Kháng thể đa dòng được điều chế bằng cách tạo miễn dịch cho động vật, như chuột nhắt hoặc thỏ, hoặc động vật thích hợp bất kỳ bằng các chế phẩm cấu trúc kháng nguyên siêu phân tử theo sáng chế được mô tả ở trên. Sau đó huyết thanh được thu gom từ động vật, và các kháng thể trong huyết thanh được sàng lọc về tính phản ứng gắn kết chống lại kháng nguyên dạng tinh bột.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được điều chế thành chế phẩm chấp nhận được về mặt sinh lý và có thể bao gồm chất mang dược dụng, chất pha loãng và/hoặc tá dược nhờ sử dụng các kỹ thuật đã biết. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế và như được mô tả trên đây bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng, cụ thể, kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ hoặc các phần chức năng của chúng được kết hợp với chất mang dược dụng, chất pha loãng và/hoặc tá dược để tạo ra chế phẩm chữa bệnh. Các chất mang, các chất pha loãng và/hoặc tá dược được thích hợp là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm, ví dụ, các dung dịch nước muối đệm phosphat, nước, nhũ tương như nhũ tương dầu/nước, các loại chất thẩm ướt khác, các dung dịch tiệt trùng, v.v..

Quá trình bào chế được phẩm theo sáng chế có thể đạt được theo phương pháp chuẩn đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Các chế phẩm theo sáng chế có thể được cung cấp cho đối tượng dưới dạng chất rắn, chất lỏng hoặc sol khí với liều dược dụng hữu hiệu, thích hợp. Các ví dụ về các chế phẩm rắn bao gồm các viên tròn, kem, và các đơn vị có thể cấy dưới da. Các viên tròn có thể được cung cấp qua đường miệng. Kem chữa bệnh có thể được sử dụng khu trú. Các đơn vị có thể cấy dưới da có thể được cung cấp cục bộ, ví dụ, tại điểm khối u, hoặc có thể được cấy ghép để giải phóng có hệ thống chế phẩm chữa bệnh, ví dụ dưới da. Các ví dụ về các chế phẩm lỏng bao gồm các chế phẩm thích ứng để tiêm trong cơ, dưới da, trong tĩnh mạch,

trong động mạch, và các chế phẩm để sử dụng cục bộ và trong mắt. Các ví dụ về các chế phẩm sol khí bao gồm các chế phẩm xịt để cung cấp tới phổi.

Các chế phẩm có thể được cung cấp bằng các cách sử dụng theo đường chuẩn. Nói chung, chế phẩm có thể được cung cấp bằng cách sử dụng cục bộ, qua đường miệng, qua trực tràng, qua mũi, trong da, trong bụng, hoặc ngoài đường tiêu hoá (ví dụ, trong tĩnh mạch, dưới da, hoặc trong cơ). Ngoài ra, chế phẩm có thể được kết hợp thành các chất nền giải phóng kéo dài như các polyme có thể thoái hoá sinh học, các polyme được cấy ghép ở vùng xung quanh nơi mà muốn phân phối thuốc, ví dụ, tại điểm khối u. Phương pháp bao gồm cung cấp liều đơn, cung cấp các liều nhắc lại ở các khoảng thời gian xác định trước, và cung cấp kéo dài trong thời gian định trước.

Chất nền giải phóng duy trì, theo sáng chế, là chất nền được tạo ra từ các chất, thường là polyme có thể thoái biến bằng cách thủy phân enzym hoặc axit/bazơ hoặc bằng cách hoà tan. Khi đưa vào cơ thể, chất nền được hoạt động bằng các enzym và các dịch cơ thể. Chất nền giải phóng kéo dài mong muốn được chọn bằng các chất có thể tương thích sinh học như các liposom, polylactit (axit polylactit), polyglycolit (polyme của axit glycolic), polylactit co-glycolit (copolyme của axit lactic và axit glycolic), polyanhydrit, poly(ortho)este, các polypeptit, axit hyaluronic, collagen, chondroitin sulfat, các axit carboxylic, các axit béo, phospholipit, polysacarit, các axit nucleic, các axit polyamino, các axit amino như phenylalanin, tyrosin, isoleuxin, các polynucleotit, polyvinyl propylen, polyvinylpyrrolidone và silicon. Chất nền có thể thoái biến sinh học ưu tiên là chất nền hoặc của một trong số polylactit, polyglycolit, hoặc polylactit co-glycolit (copolyme của axit lactic và axit glycolic).

Đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật thích hợp rằng liều chế phẩm sẽ tùy thuộc vào nhiều yếu tố, ví dụ như tình trạng được điều trị, chế phẩm cụ thể được sử dụng, và các nhân tố lâm sàng khác như trọng lượng, kích thước, giới tính và tình trạng sức khỏe chung của bệnh nhân,

diện tích bề mặt cơ thể, hợp chất hoặc chế phẩm cụ thể được sử dụng, các dược chất khác được cung cấp đồng thời, và cách sử dụng.

Chế phẩm có thể được cung cấp kết hợp với các chế phẩm khác bao gồm chất có hoạt tính sinh học hoặc hợp chất, cụ thể ít nhất một hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm các hợp chất chống lại stress oxy hoá, các hợp chất chống gây chết tế bào, các chất chelat hoá kim loại, các chất ức chế sửa chữa ADN như pirenzepin và các chất trao đổi, 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 stau, chất dẫn truyền thần kinh, các chất làm gãy tấm β -, các phân tử chống viêm, các thuốc “chống tâm thần không điển hình” ví dụ như clozapin, ziprasidon, risperidon, aripiprazol hoặc olanzapin 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, ví dụ như vitamin B12, xystein, tiền dược chất axetylcholin, lexithin, cholin, Ginkgo biloba, axyetyl-L-carnitin, idebenone, propentofylin, hoặc dẫn xuất xanthin, cùng với kháng thể theo sáng chế và, tùy ý, chất mang dược dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá dược và phương pháp để điều trị các bệnh.

Chất hoạt tính dược có protein có thể có mặt với các lượng trong khoảng từ 1ng và 10mg mỗi liều dùng. Nói chung, chế độ sử dụng sẽ nằm trong khoảng từ 0,1 μ g đến 10mg kháng thể theo sáng chế, cụ thể trong khoảng từ 1,0 μ g đến 1,0mg, và cụ thể hơn nằm trong khoảng từ 1,0 μ g đến 100 μ g, với tất cả các số lượng cụ thể nằm trong phạm vi đó cũng là một phần theo sáng chế. Nếu việc sử dụng gồm cả truyền liên tục liều thích hợp hơn có thể nằm trong giới hạn khoảng 0,01 μ g và 10mg đơn vị trên kilogam trọng lượng cơ thể trên giờ với tất cả các số lượng cụ thể nằm trong phạm vi đó cũng là một phần theo sáng chế.

Nói chung có thể sử dụng ngoài đường tiêu hoá, ví dụ trong tĩnh mạch. Các chế phẩm để sử dụng ngoài đường tiêu hoá bao gồm các dung dịch huyền phù và nhũ tương nước, tiệt trùng hoặc không chứa nước. Các dung môi không chứa nước bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở nó, propylen glycol, polyetylen

glycol, dầu thực vật như dầu oliu, và este hữu cơ thể sử dụng để tiêm như etyl oleat. Các dung môi chứa nước có thể được chọn từ nhóm bao gồm nước, các dung dịch rượu/nước, nhũ tương hoặc huyền phù bao gồm bao gồm môi trường nước muối và đệm. Các chất dẫn sử dụng ngoài đường tiêu hoá bao gồm dung dịch natri clorua, Dextroza Ringer, dextroza và natri clorua, Ringer lact hoá, hoặc dầu không bay hơi. Các chất dẫn dùng trong tĩnh mạch bao gồm các chất làm đặc và dinh dưỡng, các chất làm đặc điện phân (như các chất gốc Dextroza Ringer) và các chất khác. Các chất bảo quản cũng có thể có mặt, ví dụ như các tác nhân diệt vi khuẩn, các tác nhân chống oxy hoá, các tác nhân chelat hoá, các khí trơ, v.v..

Dược phẩm có thể còn bao gồm các chất mang cơ protein ví dụ như anbumin huyết thanh hoặc globulin miễn dịch, cụ thể có nguồn gốc từ người. Ngoài ra, các tác nhân có hoạt tính sinh học có thể có mặt trong dược phẩm theo sáng chế tùy thuộc vào mục đích sử dụng dự định của nó.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất các phương pháp và các bộ dụng cụ để phát hiện và chẩn đoán các bệnh hoặc các tình trạng liên quan đến dạng tinh bột, để chẩn đoán mầm chất tạo ra bệnh hoặc tình trạng liên quan đến dạng tinh bột hoặc theo dõi bệnh còn lại tối thiểu ở bệnh nhân hoặc dự đoán trạng thái đáp ứng của bệnh nhân với việc điều trị bằng kháng thể hoặc chế phẩm vacxin theo sáng chế và như được mô tả trên đây. Các phương pháp đó bao gồm các phương pháp miễn dịch đã biết thường được sử dụng để phát hiện hoặc để xác định số lượng các chất trong các mẫu sinh học hoặc trong tình trạng *in vivo*.

Phương pháp chẩn đoán bệnh hoặc tình trạng liên quan đến dạng tinh bột hoặc của mầm chất tạo ra bệnh hoặc tình trạng liên quan đến dạng tinh bột ở bệnh nhân có thể đạt được bằng cách phát hiện sự gắn kết miễn dịch đặc hiệu của kháng thể đơn dòng hoặc phần hoạt tính của chúng với epitop của protein dạng tinh bột trong mẫu hoặc *in vivo*, phương pháp đó bao gồm đưa mẫu hoặc phần thể đặc hiệu hoặc vùng thể đặc hiệu nghi ngờ chứa kháng nguyên dạng tinh

bột tiếp xúc với kháng thể gắn kết với epitop của protein dạng tinh bột, cho kháng thể gắn kết với kháng nguyên dạng tinh bột để tạo ra một phức hệ miễn dịch, phát hiện sự hình thành của phức hệ miễn dịch và làm tương quan sự có mặt hoặc vắng mặt của phức hệ miễn dịch với sự có mặt hoặc vắng mặt của kháng nguyên dạng tinh bột trong mẫu hoặc phần hoặc vùng thể đặc hiệu, tùy ý so sánh lượng của phức hệ miễn dịch này với giá trị đối chứng thông thường, trong đó việc gia tăng lượng chất tích tụ này so với giá trị đối chứng thông thường chứng tỏ rằng bệnh nhân này bị hoặc có nguy cơ phát triển bệnh hoặc tình trạng liên quan đến dạng tinh bột.

Phương pháp theo dõi bệnh còn lại tối thiểu ở bệnh nhân sau khi điều trị bằng kháng thể hoặc chế phẩm vacxin theo sáng chế có thể đạt được bằng cách phát hiện gắn kết miễn dịch đặc hiệu kháng thể đơn dòng hoặc phân hoạt tính của chúng với epitop của protein dạng tinh bột trong mẫu hoặc *in vivo*, phương pháp đó bao gồm đưa mẫu hoặc phần thể đặc hiệu hoặc vùng thể đặc hiệu nghi ngờ chứa kháng nguyên dạng tinh bột tiếp xúc với kháng thể gắn kết với epitop của protein dạng tinh bột, cho kháng thể gắn kết với kháng nguyên dạng tinh bột để tạo ra phức hệ miễn dịch, phát hiện sự hình thành của phức hệ miễn dịch và làm tương quan sự có mặt hoặc vắng mặt của phức hệ miễn dịch với sự có mặt hoặc vắng mặt của kháng nguyên dạng tinh bột trong mẫu hoặc phần hoặc vùng thể đặc hiệu, tùy ý so sánh lượng của phức hệ miễn dịch này với giá trị đối chứng thông thường, trong đó việc gia tăng lượng chất tích tụ so với giá trị đối chứng thông thường chứng tỏ rằng bệnh nhân này vẫn tiếp tục bị bệnh tối thiểu.

Phương pháp dự đoán trạng thái đáp ứng của bệnh nhân với cách điều trị bằng chế phẩm vacxin theo sáng chế có thể đạt được bằng cách phát hiện sự gắn kết miễn dịch đặc hiệu kháng thể đơn dòng hoặc phân hoạt tính của chúng với epitop của protein dạng tinh bột trong mẫu hoặc *in vivo*, phương pháp đó bao gồm đưa mẫu hoặc phần thể đặc hiệu hoặc vùng thể đặc hiệu nghi ngờ chứa kháng nguyên dạng tinh bột tiếp xúc với kháng thể gắn kết với epitop của protein dạng tinh bột, cho kháng thể gắn kết với kháng nguyên dạng tinh bột để

tạo ra một phức hệ miễn dịch, phát hiện sự hình thành của phức hệ miễn dịch và làm tương quan sự có mặt hoặc vắng mặt của phức hệ miễn dịch với sự có mặt hoặc vắng mặt của kháng nguyên dạng tinh bột trong mẫu hoặc phần hoặc vùng thể đặc hiệu, tùy ý so sánh lượng của phức hệ miễn dịch này trước và sau khi bắt đầu điều trị, trong đó việc giảm lượng chất tích tụ chứng tỏ rằng bệnh nhân này có khả năng đáp ứng cao với việc điều trị.

Các mẫu sinh học có thể được sử dụng để chẩn đoán bệnh hoặc tình trạng liên quan đến dạng tinh bột, để chẩn đoán bản chất tạo ra bệnh hoặc tình trạng liên quan đến dạng tinh bột hoặc theo dõi bệnh còn lại tối thiểu ở bệnh nhân hoặc dự đoán trạng thái đáp ứng của bệnh nhân với các điều trị bằng kháng thể hoặc chế phẩm vacxin theo sáng chế và như được mô tả trên đây, ví dụ là các dịch như huyết thanh, plasma, nước bọt, các chất tiết xuất từ dạ dày, niêm dịch, dịch não tủy, dịch bạch huyết và các dịch tương tự hoặc các mẫu mô hoặc tế bào thu được từ các bộ phận như mô thần kinh, não, tim hoặc mạch. Để xác định sự có mặt hoặc vắng mặt của kháng nguyên dạng tinh bột trong mẫu thử nghiệm miễn dịch đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật (xem tài liệu Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988 555-612)) có thể được sử dụng, ví dụ như các thử nghiệm sử dụng các phương pháp dò gián tiếp nhờ sử dụng các chất phản ứng bậc hai cho các thử nghiệm ELISA và kết tủa miễn dịch và ngưng kết. Việc mô tả chi tiết các thử nghiệm đó, ví dụ được nêu trong WO96/13590 của Maertens and Stuyver, Zrein et al. (1998) và WO96/29605.

Để chẩn đoán *in vivo*, kháng thể hoặc phân chức và có hoạt tính bất kỳ của chúng có thể được cung cấp tới các bộ phận cần được chẩn đoán bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ như tiêm truyền trong tĩnh mạch, trong mũi, trong bụng, sao cho gắn kết đặc hiệu giữa kháng thể theo sáng chế với vùng epitop trên kháng nguyên dạng tinh bột có thể xuất hiện. Phức hệ kháng thể/kháng nguyên có thể được phát hiện bằng chất đồng vị đánh dấu gắn kết với kháng thể hoặc phân chức năng của chúng.

Các thử nghiệm miễn dịch được sử dụng trong các ứng dụng chẩn đoán hoặc trong các ứng dụng để chẩn đoán bản chất tạo ra bệnh hoặc tình trạng liên quan đến dạng tinh bột hoặc theo dõi bệnh còn lại tối thiểu ở bệnh nhân hoặc dự đoán trạng thái đáp ứng của bệnh nhân với cách điều trị bằng kháng thể hoặc chế phẩm vacxin theo sáng chế và như được mô tả trên đây. Thông thường dựa vào các kháng nguyên, các kháng thể đánh dấu, hoặc các chất phản ứng bậc hai để phát hiện. Các protein hoặc các chất phản ứng có thể được đánh dấu bằng các hợp chất thường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật bao gồm các enzym, các chất đồng vị phóng xạ, và các chất huỳnh quang, các chất phát quang và các chất sinh màu bao gồm các hạt tạo màu, như các hạt vàng keo và latex. Trong số đó, chất đồng vị phóng xạ có thể được sử dụng cho hầu hết các loại thử nghiệm và với phần lớn các thể biến dị. Các chất đồng vị kết hợp enzym được sử dụng cụ thể nếu độ phóng xạ phải được tránh hoặc cần có các kết quả nhanh. Các chất gây huỳnh quang, mặc dù cần thiết bị đắt tiền để sử dụng chúng, thì tạo ra phương pháp rất nhạy để dò. Các kháng thể được sử dụng trong các thử nghiệm bao gồm các kháng thể đơn dòng, các kháng thể đa dòng, và các kháng thể đa dòng tinh khiết ái lực.

Theo cách khác, kháng thể có thể được đánh dấu gián tiếp bằng cách phản ứng với các chất đánh dấu có ái lực đối với globulin miễn dịch, như các kháng thể thứ cấp hoặc protein A hoặc G. Kháng thể có thể được kết hợp với chất thứ cấp và được phát hiện bằng chất đánh dấu thứ ba có ái lực đối với chất thứ hai kết hợp với kháng thể. Ví dụ, kháng thể có thể được kết hợp với biotin và thể tiếp hợp kháng thể-biotin được phát hiện nhờ sử dụng avidin hoặc streptavidin đánh dấu. Tương tự, kháng thể có thể được kết hợp với hapten và thể tiếp hợp kháng thể-hapten được phát hiện nhờ sử dụng kháng thể kháng hapten đánh dấu.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ biết rằng các chất đồng vị đó và các chất đồng vị khác thích hợp có thể được sử dụng theo sáng chế. Việc gắn kết các chất đồng vị với các kháng thể hoặc các phần của chúng

có thể đạt được nhờ sử dụng các kỹ thuật chuẩn thường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Các kỹ thuật thông thường được mô tả bởi Kennedy, J. H., et al., 1976 (Clin. Chim. Acta 70:1-31), và Schurs, A. H. W. M., et al. 1977 (Clin. Chim Acta 81 :1-40). Các kỹ thuật kết hợp nêu sau cùng là phương pháp glutaraldehyt, phương pháp periodat, phương pháp dimaleimit, và các phương pháp khác, tất cả các phương pháp này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các thử nghiệm miễn dịch hiện nay sử dụng phương pháp kháng thể kép để phát hiện sự có mặt của chất phân tích, trong đó, kháng thể được đánh dấu gián tiếp bằng tính phản ứng với kháng thể thứ hai được đánh dấu bằng chất đồng vị có thể phát hiện. Tốt hơn là kháng thể thứ hai là kháng thể gắn kết với các kháng thể của động vật từ đó kháng thể đơn dòng thu được. Nói cách khác, nếu kháng thể đơn dòng là kháng thể chuột, sau đó kháng thể thứ hai, đánh dấu là kháng thể kháng chuột. Đối với kháng thể đơn dòng được sử dụng trong thử nghiệm được mô tả dưới đây, tốt hơn nếu chất đồng vị này là hạt bao kháng thể, cụ thể là hạt từ tính. Đối với kháng thể đa dòng được sử dụng trong thử nghiệm miễn dịch mô tả ở đây, tốt hơn nếu chất đồng vị là phân tử có thể phát hiện được như chất phóng xạ, chất huỳnh quang hoặc chất phát quang điện hoá.

Hệ kháng thể kép khác, thường đề cập đến là các hệ định dạng nhanh vì chúng thích ứng với các quá trình xác định nhanh sự có mặt của chất phân tích, còn có thể được sử dụng trong phạm vi của sáng chế. Hệ này cần có ái lực cao giữa kháng thể và chất phân tích. Theo một phương án của sáng chế, sự có mặt của kháng nguyên dạng tinh bột được xác định nhờ sử dụng cặp các kháng thể, mỗi cặp đặc hiệu đối với kháng nguyên dạng tinh bột. Một trong số các cặp kháng thể này được đề cập tới ở đây là "kháng thể dò" và loại khác của cặp các kháng thể được đề cập tới ở đây là "kháng thể giữ". Kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể được sử dụng hoặc là kháng thể giữ hoặc kháng thể dò. Kháng thể đơn dòng theo sáng chế còn có thể được sử dụng cả là kháng thể giữ và kháng thể dò, cùng nhau trong thử nghiệm đơn. Vì vậy, một phương án của sáng

chế sử dụng phương pháp kháng thể kẹp nhiều lớp để phát hiện kháng nguyên dạng tinh bột trong mẫu của dịch sinh học. Trong phương pháp này, chất phân tích (kháng nguyên dạng tinh bột) được kẹp giữa kháng thể dò và kháng thể giữ, kháng thể giữ được làm bất động không thể đảo ngược trên lớp nền rắn. Kháng thể dò sẽ chứa chất đồng vị có thể phát hiện được, để nhận dạng sự có mặt của lớp kháng thể-chất phân tích và vì vậy có mặt chất phân tích.

Các chất pha rắn ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các đĩa vi chuẩn độ, các ống thí nghiệm chứa các bản và các hạt polystyren, thủy tinh hoặc chất dẻo, từ tính đã biết rõ trong lĩnh vực thử nghiệm miễn dịch enzyme và thử nghiệm chất miễn dịch phóng xạ. Các phương pháp để kết hợp các kháng thể với các pha rắn cũng đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Mới đây hơn, số lượng chất xốp như nylon, nitroxenluloza, xenluloza axetat, các sợi thủy tinh và các polyme xốp khác được sử dụng làm các chất nền rắn.

Sáng chế cũng đề cập đến bộ dụng cụ chẩn đoán để phát hiện kháng nguyên dạng tinh bột trong mẫu sinh học bao gồm chế phẩm như được xác định ở trên. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến bộ dụng cụ chẩn đoán mới đây, ngoài chế phẩm như được xác định trên, còn bao gồm chất phản ứng dò như được xác định ở trên. Thuật ngữ "bộ dụng cụ chẩn đoán" nói chung đề cập đến bộ dụng cụ chẩn đoán bất kỳ đã biết nào trong lĩnh vực kỹ thuật. Cụ thể hơn, thuật ngữ sau đề cập đến bộ dụng cụ chẩn đoán như được mô tả trong tài liệu Zrein et al. (1998).

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất các mẫu lai thử miễn dịch mới và các bộ dụng cụ thử nghiệm để phát hiện và chẩn đoán các bệnh và các tình trạng có liên quan đến dạng tinh bột bao gồm các kháng thể theo sáng chế. Đối với các mẫu lai thử miễn dịch, các kháng thể được trực tiếp hoặc gián tiếp gắn với phân tử báo cáo thích hợp, ví dụ một enzyme hoặc chất đồng vị phóng xạ. Bộ dụng cụ thử nghiệm bao gồm bình chứa giữ một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế và các tài liệu chỉ dẫn sử dụng các kháng thể nhằm mục đích gắn kết kháng

nguyên dạng tinh bột để tạo ra phức hệ miễn dịch và phát hiện sự hình thành của phức hệ miễn dịch sao cho sự có mặt hoặc vắng mặt của phức hệ miễn dịch tương quang với sự có mặt hoặc vắng mặt của kháng nguyên dạng tinh bột.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các kháng nguyên được sử dụng để làm tăng các kháng thể đơn dòng của chuột.

Bảng 1. Các kháng thể và cấu trúc kháng nguyên được sử dụng để làm tăng các kháng thể này

mAb chuột	Kháng nguyên/trình tự	Liên kết	Neo	Chất phụ trợ
mACI-01-Ab7	$A\beta_{1-16}$	PEG	DSPE	Lipit A
mACI-02-Ab6	$A\beta_{1-16(D14)}$	PEG	DSPE	Lipit A
mACI-11-Ab9	$A\beta_{22-35}$	PEG	DSPE	Lipit A
mACI-12-Ab11	$A\beta_{29-40}$		DSPE	Lipit A
mACI-24-Ab4	$A\beta_{1-15}$		Palm	Lipit A

Ví dụ 1: Các phương pháp tạo ra các cấu trúc kháng nguyên siêu phân tử palmitoyl hoá $A\beta_{1-15}$

Tổng hợp kháng nguyên peptit tetra(palmitoyl lysin)- $A\beta_{1-15}$

Peptit dạng tinh bột palmitoyl hoá 1-15 được tổng hợp theo phương pháp báo cáo mới cải tiến mới đây (Nicolau et. al. 2002). Phương pháp mới này bao gồm ghép trên nhựa axit palmitic với các gốc tận cùng Lys của peptit được tạo ra trước đó thay vì tổng hợp pha rắn phân đoạn kết hợp axit amin 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Lys(Pal)-OH. Phương pháp mới này cải thiện hiệu quả kết hợp và tạo ra sản phẩm có độ tinh khiết cao mong muốn. Vì vậy, axit amin Fmoc-Lys(Mtt)-OH bảo vệ trực giao được gắn với nhựa Wang nhờ sử dụng hoá học kết hợp [2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyluroni hexafluorophosphat] (HBTU). Nhóm Fmoc được loại bỏ nhờ sử dụng 20% piperidin trong DMF và gốc thứ hai Fmoc-Lys(Mtt)-OH được kết hợp. Quá trình tổng hợp peptit tự động chuẩn nhờ sử dụng hoá học Fmoc/tBu và sau đó các nhóm bảo vệ

mạch bên chuẩn được sử dụng để kết hợp trên 15 axit amin tiếp theo để thu được trình tự peptit như nêu trong SEQ ID NO:1. Cuối cùng, hai axit amin kết hợp là Fmoc-Lys(Mtt)-OH. Sau đó nhóm Mtt được phân giải có chọn lọc nhờ sử dụng axit trifloaxetic 1% (TFA) trong diclometan để giải phóng phần peptit và sau đó kết hợp với axit palmitic nhờ sử dụng HBTU. Sau khi rửa nhựa, nhóm Fmoc được loại bỏ bằng piperidin 20% trong dimetylformamit (DMF) và cuối cùng phân giải nhựa đồng thời và các quá trình khử bảo vệ mạch bên được tiến hành nhờ sử dụng TFA trong các điều kiện chuẩn. Quá trình nghiền thành bột từ diethyl ete lạnh tạo ra sản phẩm là chất rắn màu trắng. Phép đo phổ khối điện phun xác nhận độ đồng nhất của sản phẩm (m/z mong đợi: 1097,9 ($[M]3+$); phát hiện: 1096,8 ($[M-3H]3+$), không có các peptit palmitoyl hoá ba, hai một lần được phát hiện.

Ví dụ 2: Các phương pháp tạo ra các cấu trúc kháng nguyên siêu phân tử

Tổng hợp kháng nguyên peptit dạng tinh bột pegyl hoá β -

Để tăng cường đáp ứng miễn dịch, đoạn neo/đệm khác được sử dụng để hồi phục peptit trong liposom, ví dụ polyetylen glycol (PEG). PEG được gắn kết cộng hoá trị với liên kết gốc lysin ở cả hai đầu của peptit. Ở đầu khác của chuỗi (PEG_n=70) phosphatidyl etanol amin (PEA) được gắn kết cộng hoá trị để hoạt động như thành phần neo trong lớp kép liposom. Vì vậy, liposom vẫn hoạt động như một chất phụ trợ và peptit đủ xa lớp kép có thể được xử lý riêng và vì vậy làm tăng tính sinh miễn dịch của nó so với kháng nguyên palmitoyl hoá.

Các cấu trúc siêu phân tử được mô tả ở đây có thể được tổng hợp duy nhất nhờ sử dụng các quá trình bảo mạch bên axit amin Fmoc/tBu chuẩn. Thông thường, quá trình pegyl hoá các peptit tạo ra các hỗn hợp của các chất đồng phân vùng. Ở đây phương pháp thuận tiện cho việc gắn kết điểm đặc hiệu của thể liên hợp PEG-lipit với cả đầu C- và N- của A β được thể hiện nhờ sử dụng các peptit bảo vệ một phần.

Đối với các trình tự peptit chứa các gốc Lys hoặc His bên trong (1-16, 1-16 Δ 14, 22-35), Lys(ivDde) bảo vệ trực giao được thêm vào mỗi đầu. Gly khác được gắn vào đầu C để tạo thuận lợi cho việc tổng hợp. Nhóm Fmoc được loại bỏ bằng 20% piperidin trong DMF và N-acetyl hoá nhờ sử dụng axetic anhydrit. Quá trình phân giải có chọn lọc các nhóm ivDde đạt được bằng 3% hydrazin hydrat trong DMF trong một giờ. Nhựa 2-clotrityl được ưu tiên hơn so với nhựa Wang đã được sử dụng rất rộng rãi do nhựa 2-clotrityl thể hiện khả năng chịu sự phân giải bằng hydrazino nhiều hơn. Ngoài ra, nhựa 2-clotrityl là axit cực kỳ nhạy và vì vậy, khác với nhựa Wang, làm cho quá trình tách các peptit bảo vệ có thể thực hiện được. Thật vậy, cần thiết để tiến hành phản ứng kết hợp trong pha dung dịch khi việc kết hợp peptit liên kết nhựa với chất phản ứng lipit pegyl hoá được hoạt hoá trước đó DSPE-PEG-SPA không làm tăng sản phẩm kết hợp bất kỳ. Vì vậy quá trình phân giải chọn lọc từ nhựa trong các điều kiện bình thường (axit axetic/trifloetanol/diclometan, 1:1:8, 1 giờ, nhiệt độ trong phòng) tạo ra các peptit bảo vệ bên trong. Các kết hợp pha dung dịch được thực hiện thành công với các peptit thu được từ trình tự A β ₁₋₁₆ (SEQ ID NO:2) đến DSPE-PEG-SPA trong DMSO và bazơ dư. Sau đó phản ứng được tôi bằng cách bổ sung etanolamin dư trong 2 giờ và dung dịch được làm đông khô nhanh.

Đối với trình tự 29-40, không cần thiết phải có phương pháp bảo vệ cụ thể.

Quá trình tinh chế bằng HPLC (cột đảo pha bán tuyển chọn C₄) tạo ra các thể liên hợp PEG-lipit đầu N- và C- có độ tinh khiết khoảng 50-70% mà độ đồng nhất của nó được khẳng định bằng MALDI (chất nền hỗ trợ quá trình khử ion hoá giải hấp bằng laze). Mỗi trình tự thể hiện sự biến đổi đáng kể về mức độ dễ dàng của phản ứng kết hợp và các điều kiện được điều chỉnh theo (nhiệt độ, số các đương lượng mol DSPE-PEG-SPA, thời gian). Đối với quá trình tách, lượng DSPE-PEG-SPA dư từ quá trình tinh chế HPLC sản phẩm mong muốn được sử dụng. Quá trình tách các sản phẩm kết hợp một và hai lần trước các bước bảo vệ mạch bên cuối cùng có thể đạt được nhờ sử dụng phép sắc ký trao đổi cation. Các quá trình bảo vệ mạch bên peptit tiếp theo và quá trình tách lượng dư tôi

DSPE-PEG-SPA tạo ra sự quá trình phân lập của các thể tiếp hợp mong muốn với độ tinh khiết có thể chấp nhận được.

Phương pháp này để tổng hợp các kháng nguyên dạng tinh bột lipit-PEG β - có đầu N- và C- nhờ sử dụng các peptit bảo vệ có thể áp dụng đối với nhiều loại trình tự peptit.

Ví dụ 3: Các kháng thể được tạo ra bằng các cấu trúc kháng nguyên siêu phân tử

3.1 Bào chế mAbs tăng cường chống lại cấu trúc kháng nguyên siêu phân tử palmitoyl hoá $A\beta_{1-15}$:

Kháng nguyên palmitoyl hoá (ACI-24, $A\beta_{1-15}$) được sử dụng để tạo miễn dịch cho chuột nhắt C57BL/6 trong các khoảng thời gian 2 tuần. 10-12 con vật được tạo miễn dịch bằng mỗi kháng nguyên (thể tích tiêm: 200 μ l chứa 8 nmol peptit). Liều tiêm cuối được tiến hành 4 ngày trước khi giết các con vật. Sau 5 liều tiêm chủng cho chuột nhắt bằng các độ chuẩn điều trị (khi nồng độ pha loãng 1:5.000 của huyết thanh là dương tính trong ELISA) được lựa chọn để kết hợp. Các tế bào lách được thu gom các con vật được tạo miễn dịch và các tế bào lai được tạo ra bằng cách kết hợp các tế bào lách nhạy cảm với dòng tế bào u tuỷ. Quá trình hợp nhất các tế bào lympho B của chuột nhắt từ lá lách được tiến hành với các tế bào của dòng tế bào u tuỷ SP2-0. (ATCC, Manassas, VA) nhờ sử dụng các phương pháp đã biết rõ của Kohler và Milstein (Nature 256: 495-497 (1975)) và Harlow và Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988)).

Các tế bào được kích thích để hợp nhất bằng cách bổ sung polyetylen glycol. Các tế bào lai thu được sau đó được nuôi cấy trong 10 ± 14 ngày theo cách thông thường để sinh trưởng vô tính. Quá trình lựa chọn vô tính ban đầu được tạo ra nhờ pha loãng giới hạn. Các dòng vô tính lai tạo ra IgG được chọn và thử nghiệm về tính gắn kết đặc hiệu của chúng với peptit $A\beta_{1-42}$ bằng ELISA

và các dòng vô tính thu được tạo ra các kháng thể đơn dòng mong muốn, được nuôi cấy.

Các tế bào lai thu được theo cách đó được chọn lọc hoá bằng cách dàn mỏng các tế bào trong môi trường chọn lọc chứa hypoxanthin, aminopterin và thymidin (HAT).

Sau đó, các tế bào lai được sàng lọc về khả năng tạo ra các kháng thể đơn dòng chống lại các bệnh hoặc các rối loạn liên quan đến dạng tinh bột đặc hiệu. Khi các dòng vô tính gốc được nhận dạng, nó được tách dòng phụ bốn lần để đảm bảo tính đơn dòng và cho phép thể lai ổn định

Các tế bào lai tạo ra các kháng thể quan tâm được tách dòng, mở rộng và giữ đông lạnh để sản xuất trong tương lai.

Kháng thể được isotyp hoá bằng bộ dụng cụ isotyp hoá dòng vô tính chuột có bán trên thị trường và dòng vô tính ổn định được làm thích ứng với môi trường không chứa huyết thanh và đặt trong bình phản ứng sinh học để tạo ra kháng thể.

Tế bào lai ưu tiên tạo ra kháng thể đơn dòng có isotyp IgG, tốt hơn nữa là isotyp IgG1.

3.2 Bào chế các mAb tăng cường kháng lại cấu trúc kháng nguyên siêu phân tử palmitoyl hoá PEG-A β_{1-16} A β_{4-11} A β_{22-35} và A β_{29-40} :

Các kháng nguyên liposom được điều chế như được mô tả (Nicolau et al., 2002, PNAS, 99, 2332-37). Các trình tự PEG-A β_{1-16} , A β_{4-11} , A β_{22-35} và A β_{29-40} (Fig. 1) được hồi phục trong cấu trúc gồm có các liposom được tạo ra từ dimyristoyl phosphatidyl cholin (DMPC), dimyristoyl phosphatidyl etanolamin (DMPEA), dimyristoyl phosphatidyl glyxerol (DMPG) và cholesterol (các tỷ lệ mol là 0,9:0,1:0,1:0,7) chứa monophosphoryl lipit A (40 mg/mM các phospholipit). Các kháng nguyên và A β_{1-16} pegyl hoá được sử dụng cho quá trình tạo miễn dịch ở chuột nhắt C57BL/6 trong các khoảng thời gian 2 tuần. 10-12 con vật được tạo miễn dịch bằng từng kháng nguyên. Sau 3 đến 6 liều, chuột

nhất với các độ chuẩn điều trị (khi nồng độ pha loãng của huyết thanh 1:5.000 là dương tính trong ELISA) được chọn lọc để kết hợp. Các tế bào lách được thu gom từ các con được tạo miễn dịch và các tế bào lai tạo ra bằng cách kết hợp các tế bào lách nhạy cảm với dòng tế bào u tủy. Quá trình hợp nhất các tế bào lympho B của chuột nhất từ lá lách được tiến hành với các tế bào của dòng tế bào u tủy SP2-0. (ATCC, Manassas, VA) nhờ sử dụng các phương pháp đã biết rõ của Kohler và Milstein (Nature 256: 495-497 (1975)) và Harlow và Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988))

Các tế bào được kích thích để hợp nhất bằng cách bổ sung polyetylen glycol. Các tế bào lai thu được sau đó được tách dòng theo cách thông thường, ví dụ nhờ sử dụng pha loãng giới hạn. Các dòng vô tính lai tạo ra IgG được chọn và thử nghiệm về tính gắn kết đặc hiệu của chúng với peptit A β ₁₋₄₂ bằng ELISA và các dòng vô tính thu được tạo ra các kháng thể đơn dòng mong muốn, được nuôi cấy.

Các tế bào lai thu được theo cách đó được chọn lọc hoá bằng cách dần mỏng các tế bào trong môi trường chọn lọc chứa hypoxanthin, aminopterin và thymidin (HAT).

Sau đó, các tế bào lai được sàng lọc về khả năng tạo ra các kháng thể đơn dòng chống lại các bệnh hoặc các rối loạn liên quan đến dạng tinh bột đặc hiệu. Các tế bào lai tạo ra các kháng thể quan tâm được tách dòng, mở rộng và giữ đông lạnh để sản xuất trong tương lai. Tế bào lai ưu tiên tạo ra kháng thể đơn dòng có isotyp IgG, tốt hơn nữa là isotyp IgG1

Ví dụ 4: Xác định tính đặc hiệu của kháng thể mAC1-24-Ab4

Để phân tích tính đặc hiệu của kháng thể mAC1-24-Ab4, các nồng độ khác nhau của sợi nhỏ dạng tinh bột 1-42, 1-40 và 1-38 tạo ra trước đó được thẩm tách trên màng nitrocellulose Hybond ECL (Amersham Biosciences). Sau khi phong bế bằng 10% sữa khô và 0,7% Tween 20, các màng được ủ bằng kháng

thể nguyên sinh với 20 $\mu\text{g/ml}$ trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa, các màng được ủ bằng kháng thể cừu kháng chuột IgG kết hợp với peroxidaza cây cải củ cay (Amersham Biosciences) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, rửa và ủ với dung dịch phát quang hoá học tiếp theo là cho màng tiếp với màng tia X.

Để xác định sự gắn kết của mAb mACI-24-Ab4 với các sợi dạng tinh bột β 1-42, các sợi $A\beta$ 1-42, 1-40 và 1-38 được tạo ra trước 7 ngày ở 37°C và thẩm tách trên màng. 20 $\mu\text{g/ml}$ kháng thể được sử dụng để xác định khả năng gắn kết và kháng thể liên kết được phát hiện bằng kháng thể cừu kháng chuột IgG kết hợp với peroxidaza cây cải củ cay trong 20 phút phơi nhiễm.

Như được chứng minh bằng cách phân tích Dot Blot, kháng thể mACI-24-Ab4 gắn kết với các sợi $A\beta$ khác nhau tạo ra trước đó có các độ nhạy khác nhau. Kháng thể thể hiện độ nhạy gắn kết cao nhất với các sợi $A\beta_{1-42}$ hơn $A\beta_{1-40}$ hoặc $A\beta_{1-38}$. Có thể phát hiện ở ít nhất là 0,001 μg các sợi $A\beta_{1-42}$ trong khi giới hạn phát hiện của kháng thể đối với các sợi $A\beta_{1-40}$ ít nhất là 0,1 μg và đối với các sợi $A\beta_{1-38}$ 1 μg , có nghĩa là độ nhạy ít hơn 100 lần đến 1000 lần so với các loại của các sợi dạng tinh bột. Thông số này chứng tỏ rằng kháng thể ACI-24-Ab4 ít nhất nhạy hơn gấp 100 lần so với dạng tinh bột (1-42) đã được biết là không tan do sự thay đổi cấu hình thứ cấp và là phần chính của các mảng dạng tinh trong não bệnh nhân AD.

Ví dụ 5: Gắn kết của kháng thể đơn dòng mACI-01-Ab7 C2 miễn dịch AC với loại tinh bột trong phép thẩm tách Western và Dot

Để xác định xem sự gắn kết của kháng thể chuột mACI-01-Ab7 C2 có phụ thuộc vào cấu hình tự nhiên của $A\beta$ không, so sánh gắn kết với dạng tinh bột tuyến tính bằng phép thẩm tách Western hoặc dạng tinh bột nguyên thể bằng phép thẩm tách Dot được tiến hành (các Fig.2a và 2b).

Các chất đơn phân dạng tinh bột được tạo ra bằng cách hoà tan peptit $A\beta_{1-42}$ trong HFIP và dung môi được làm bay hơi dưới khí argon. Màng peptit khô

được giữ ở -80°C cho tới khi sử dụng. Để tạo ra các chất đơn phân, màng peptit được tái tạo huyền phù trong DMSO tới nồng độ là $2,75\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ và pha loãng trong PBS đến $1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Để điều chế các oligome, màng peptit được tái tạo huyền phù trong DMSO thành 5mM , siêu âm và PBS được thêm vào để đạt được $400\ \mu\text{M}$ dạng tinh bột tiếp theo thêm SDS tới nồng độ cuối cùng là $0,2\%$. Sau 6 giờ ủ ở 37°C , tinh bột được pha loãng trong nước tới nồng độ cuối cùng là $100\ \mu\text{M}$ và ủ thêm 18 giờ ở 37°C . Các oligome tinh bột được kết tủa bằng 33% metanol làm lạnh bằng nước đá, dung dịch axit axetic 4% trong 1 giờ ở 4°C , quay giảm xuống 16200g trong 10 phút và các viên được tái tạo huyền phù trong $5\ \text{mM Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, $35\ \text{mM NaCl}$ pH 7,4 tới nồng độ cuối cùng là $1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Để điều chế các sợi, màng peptit được pha loãng trong chất đệm 50mM Tris-HCl để đạt được nồng độ là $1\ \text{mg}/\text{ml}$ tinh bột và ủ ở 37°C trong 5 ngày. Các ống thử nghiệm được quay ở 10000g trong 5 phút và các viên được tái tạo huyền phù trong $0,1\ \text{M}$ chất đệm cacbonat, độ pH 9,6 để đạt tới $1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

1 hoặc $5\ \mu\text{g}$ các chất đơn phân, các oligome hoặc các sợi được pha loãng trong PBS và trong chất đệm nạp vào và sử dụng cho 12% SDS-PAGE và gel được chuyển tới các màng nitroxenluloza. Theo cách khác, 3 hoặc $1\ \mu\text{g}$ hoặc 100 và 10ng loại tinh bột được pha loãng PBS và được chấm trực tiếp lên các màng nitroxenluloza và các màng được làm khô ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau khi phong bế trong 30 phút bằng dung dịch Casein (Vật truyền), các màng được ủ trong 30 phút bằng các kháng thể mACI-01-Ab7 C2 hoặc 6E10 (Chemicon) pha loãng đến $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ trong dung dịch Casein. Sau 3 lần rửa bằng dung dịch Casein, các màng được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút với IgG dê kháng chuột đánh dấu HRP (Dako Cytomation) pha loãng bằng dung dịch Casein, rửa 3 lần và mở rộng bằng chất nền DAB (Dako Cytomation).

Kháng thể chuột đơn dòng mACI-01-Ab7 C2 liên kết đặc hiệu với chất đơn phân, các oligome và các sợi trong thử nghiệm Dot Blot như tiến hành với kháng thể đối chứng dương tính 6E10. Trái lại, kháng thể mACI-01-Ab7C2 không phát hiện loại tinh bột tuyến tính bằng phép thấm tách Western ngược với

kháng thể 6E10 đã nhận dạng rõ tất cả các peptit tuyến tính. Kết quả này chứng tỏ rằng gắn kết của mACI-01-Ab7 C2 với tinh bột tùy thuộc vào cấu hình tự nhiên của tinh bột.

Ví dụ 6: các tương tác mACI-01Ab7 C2 – $A\beta_{1-42}$

Các tương tác giữa kháng thể dẫn đầu mACI-01-Ab7 C2 (mC2) của miễn dịch AC với peptit dạng tinh bột $A\beta_{1-42}$ được nghiên cứu nhờ sử dụng cộng hưởng plasmon bề mặt. Sự gắn kết của kháng thể chuột mACI-01-Ab7 C2 hoặc với các chất đơn phân của chúng hoặc các sợi $A\beta_{1-42}$ được xác định.

Tất cả các thử nghiệm SPR được tiến hành bằng dụng cụ Biacore X (Biacore AB). Các chất phản ứng để cố định (EDC, NHS và etanolamin), các chip cảm biến CM5 và SA cũng như chất đệm mẫu và chất đệm trung bình HBS-EP được mua của Biacore AB. Natri axetat (10 mM, pH 5,0) được sử dụng làm chất đệm kết hợp để tăng hiệu quả kết hợp. $A\beta_{1-42}$ sợi nhỏ (Bachem) được điều chế bằng cách bổ sung chất đệm PBS vào $A\beta_{1-42}$ đến nồng độ cuối cùng là 3 mg/ml và để các lọ thử nghiệm ở 37°C trong 7 ngày. $A\beta_{1-42}$ sợi nhỏ được kết hợp với chip cảm biến CM5 chứa chất nền carboxymethyl dextran liên kết bề mặt. $A\beta_{1-42}$ biotinyll hoá đơn phân (Bachem) được kết hợp với chip cảm biến SA gồm có chất nền carboxymethyl dextran gắn kết cộng hoá trị với streptavidin. Thông thường bốn hoặc năm nồng độ mAb được thử nghiệm bằng các nồng độ pha loãng nhiều bậc có sử dụng chất đệm trung bình. Việc tiêm truyền được tiến hành bắt đầu từ nồng độ thấp và được cho qua cả hai fc 1 và 2 với tốc độ chảy là 30 μ l/phút trong 3 phút. Tế bào dòng 2 không được dẫn xuất và lấy fc 1 trừ đi các đáp ứng để hiệu chỉnh âm tạp của dụng cụ và các thay đổi khúc xạ khối. Sau khi việc tiêm truyền kết thúc, các bề mặt được rửa ngay bằng chất đệm trung bình trong 5 phút. Để loại bỏ kháng thể gắn kết còn lại khỏi các sợi nhỏ $A\beta_{1-42}$, quá trình tái sinh bề mặt được tiến hành bằng cách truyền vào các mạch 10 mM NaOH. Phân tích động học được tiến hành nhờ sử dụng thuật toán tích hợp số và phân tích toàn bộ có sử dụng BIAevaluation 3.0. Các đường cong thu được đối với các quá trình tiêm truyền chất phân tích với các nồng độ khác nhau được che

và các vạch giới hạn được điều chỉnh đến 0. Để điều chỉnh đường cong, tất cả các thông số được điều chỉnh đồng thời tới phức hợp đồng nhất 1:1.

Gắn kết của kháng thể chuột mACI-01-Ab7 C2 với dạng tinh bột được xác định là tương đối mạnh. Như được chứng minh trong Bảng 2, kháng thể chuột mACI-01-Ab7 C2 gắn kết đặc hiệu với các sợi bất động A β ₁₋₄₂ với hằng số kết hợp trung bình (k_a) là $3,8 \times 10^{-4}$ M/s, hằng số phân ly (k_d) là $1,1 \times 10^{-3}$ s⁻¹ và cho nên với mức trung bình thu được KD là $3,5 \times 10^{-8}$ M. Mức kết hợp của mACI-01-Ab7 C2 với chất đơn phân A β tương tự nhanh hơn một chút với k_a trung bình là $1,6 \times 10^{-4}$ M/s nhưng mức phân ly nhanh hơn tạo ra KD là $2,5 \times 10^{-7}$ M.

Bảng 2. Dạng sợi

	Các chất đơn phân			Các sợi		
	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	KD (M)	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	KD (M)
mACI-01-Ab7 C2						
Ví dụ 1	1,8E+04	2,7E-03	1,5E-07	2,4E+04	9,9E-04	4,4E-08
mACI-01-Ab7 C2		5,3E-03				
Ví dụ 2	1,5E+04		3,5E-07	5,6E+04	9,66E-04	1,73E-08
mACI-01-Ab7 C2						
Ví dụ 3				3,26E+04	1,49E-03	4,58E-08
mACI-01-Ab7 C2 trung bình	1,6E+04 $\pm 0,21$	4,0E-03 1,84	2,5E-07 1,41	3,8E+0,4 1,41	1,1E-03 0,3	3,5E-08 1,51

Ví dụ 7: Gắn kết của kháng thể đơn dòng mACI-01-Ab7 C2 với các sợi dạng tinh bột

Để phân tích điểm gắn kết phân tử của kháng thể đối với các sợi đã tạo ra trước đó trái ngược âm, phương pháp hiển vi điện tử truyền qua (TEM) được tiến hành (các Fig.3a và 3b).

Kháng thể, mACI-01-Ab7 C2, được kết hợp với 8 nm vàng keo theo ^{4,5}. Đối với quá trình cùng ủ các sợi dạng tinh bột 1-42 (A β ₁₋₄₂), 6,65 μ M các sợi được ủ trong 24 giờ ở nhiệt độ trong phòng bởi kháng thể đánh dấu bằng vàng với tỷ lệ mol là 1:100. Sau đó 5 μ l mẫu được ủ trên lưới Cu phát sáng mới (mesh 200) được phủ màng parlodi/C trong 45 giây, rửa 3 lần với nước và 1 lần bằng

2% uranyl axetat mới pha loãng và lọc. Các mẫu được nhuộm bằng 2% uranyl axetat trong 15-20 giây. Lượng dư chất nhuộm trên các lưới được hút và nhô vậ được làm khô bằng không khí. Ba lưới chứa từng mẫu được chuẩn bị. Các lưới được phân tích bằng phương pháp hiển vi điện tử truyền qua Hitachi 7000.

Kháng thể đơn dòng, mACl-01-Ab7 C2, gắn kết trực tiếp với các sợi $A\beta_{1-42}$. Hấp dẫn là kháng thể thể hiện gắn kết không đối xứng với trục của các sợi đơn nhưng gắn kết với vùng cụ thể chứ không phải là tất cả các vùng của các nhánh bên của mạng sợi. Có vẻ dường như là kháng thể nhắm tới các vùng đặc hiệu trong các nhánh bên. Sự giải thích thuyết phục là cấu trúc phụ đặc hiệu chỉ xuất hiện ở các nhánh bên đặc hiệu. Giả thuyết này được xác nhận bằng thông số NMR chứng tỏ rằng kháng thể kích thích sự đồng hoán đối với cấu hình và vì vậy có khả năng sự gắn kết của nó tùy thuộc vào cấu hình của sợi dạng tinh bột bao gồm cấu trúc tám β -.

Ví dụ 8: Cát phân đoạn bằng cách siêu ly tâm tỷ trọng-gradien

Các đặc tính của các kháng thể đơn dòng để ức chế quá trình polyme hoá sợi $A\beta_{1-42}$ và chống kết tụ các sợi $A\beta_{1-42}$ được nghiên cứu bằng cách siêu ly tâm tỷ trọng-gradien (Rzepecki et al., 2004) dựa trên nguyên lý phân bố giữa các sợi peptit cỡ khác nhau thu được sau khi ủ với và hoặc không với các kháng thể tiếp theo bằng cách phân tích sa lắng SDS-PAGE trên gradien sơ bộ (OptiPrep™). Phân tích đồng thời các quần thể các sợi $A\beta$ - tạo ra trước đó, các đặc tính chống kết tụ và ức chế kết tụ của các kháng thể cùng ủ, và sự gắn kết của các kháng thể với các sợi rõ ràng là có ích của các phương pháp này.

Các kháng thể đơn dòng được làm tăng lên chống lại $A\beta_{1-16}$ (mACl-01-Ab7 C2), $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$ (mACl- 02-Ab6), $A\beta_{1-15}$ (mACl-24-Ab4), $A\beta_{22-35}$ (mACl-11-Ab9), và $A\beta_{29-40}$ (mACl-12-Ab11) được phân tích tất cả trong các thử nghiệm chống kết tụ trong khi các đặc tính ức chế kết tụ được nghiên cứu chỉ đối với kháng thể đơn dòng mACl-02-Ab6, mACl-24-Ab4, và mACl-01-Ab7 C2.

Để ức chế sự kết tụ $A\beta_{1-42}$, các chất đơn phân $A\beta_{1-42}$ được ủ với các mAb ở hai tỷ lệ mol khác nhau (tỷ lệ mol của chất đơn phân $A\beta_{1-42}$ cao hơn 30 hoặc 100 lần mAb) với nồng độ cuối cùng $A\beta$ là 50 μ M. Sau 24 h ở 37°C, các mẫu được phủ lên gradien không liên tục của Optiprep™ và các ống thử nghiệm được quay ở 259000 g trong 3 giờ ở 4°C. 15 phần được thu hoạch (mỗi phần 140 μ l), phần 1 là phần ít đặc nhất từ đỉnh của gradien và phần 15 là phần đặc nhất từ đáy của gradien. Các viên cũng được thu gom. Các phần thu gom được phân tích bằng SDS-PAGE có nhuộm bạc. Nồng độ $A\beta_{1-42}$ trong các thử nghiệm ức chế ít hơn 5 lần trong các thử nghiệm chống kết tụ làm giảm động lực kết tụ tinh bột và đảm bảo kích thước nằm trong pha tuyến tính.

Để chống kết tụ các sợi nhỏ $A\beta_{1-42}$ tạo ra trước đó bằng cách cùng ủ với các mAb (với hai tỷ lệ mol khác nhau là 1:30 và 1:100, mAb+ Chất đơn phân $A\beta_{1-42}$ với nồng độ $A\beta$ cuối cùng là 246 μ M), các mẫu được ủ trong 24 giờ ở 37°C. Sau 24 giờ, các mẫu được chưng cất bằng cách siêu ly tâm và tách bằng SDS-PAGE như được mô tả ở trên và trước đó (Rzepecki et al., 2004).

8.1. Thử nghiệm ức chế kết tụ $A\beta_{1-42}$

Có thể chứng minh rằng nếu không bổ sung mAb, peptit $A\beta$ kết tụ sau 24 giờ ủ và hầu hết protein được thấy trong các phần 13-15, thể hiện quá trình polyme hoá hoàn toàn chất đơn phân peptit $A\beta$. Việc ức chế thành công và đáng kể sự kết tụ sẽ làm các sợi hoặc protein ($A\beta$) polyme dạng tinh bột tan β nhỏ hơn, sẽ được thấy ở các phần với tỷ trọng thấp hơn (10-13). Đúng vậy sự thay đổi này trong các dải có thể được chứng minh bằng thử nghiệm chống kết tụ chứa mACI-01-Ab7 C2 có sự phân bố của peptit $A\beta$ trên các phần 11, 12 và 13.

Điều này được khẳng định trong thử nghiệm thứ hai trong đó mACI-01-Ab7 C2 lần nữa gây ra sự thay đổi ở các dải và phần lớn (dải mạnh nhất) từ 14 đến 13 và quá trình làm tan đáng kể của các dải tiến hành ở phần 14 để tạo viên. Có nghĩa là mACI-01-Ab7 C2 thể hiện khả năng mạnh để ức chế quá trình polyme hoá chất đơn phân peptit $A\beta$ thành các sợi và thể hiện tính gắn kết đặc hiệu với các sợi $A\beta$ (ở phần 13).

Các quan sát tương tự được tiến hành khi sử dụng kháng thể mACI-24-Ab4 và mACI-02-Ab6. Không bổ sung mAb, peptit A β tích tụ sau 24 giờ ủ và phần lớn protein được thấy ở các phần 13 chuyển thành viên, (viên, rất ít ở phần 12), thể hiện quá trình polyme hoá hoàn toàn chất đơn phân peptit A β . Việc ức chế thành công và đáng kể sự kết tụ sẽ làm các sợi hoặc protein (A β) polyme dạng tinh bột tan β nhỏ hơn, sẽ được thấy ở các phần với tỷ trọng thấp hơn. Trong thử nghiệm ức chế kết tụ, mACI-24-Ab4 tạo ra sự thay đổi ở các dải ở phần lớn (dải mạnh nhất) từ 13 đến 11 và 12 và quá trình làm tan đáng kể tiến hành ở phần 13 để tạo viên trong khi mACI-02-Ab6 tạo ra sự thay đổi ở các dải từ 13 đến 10 nhưng ngoài ra sự ức chế hoàn toàn sự hình thành các sợi lớn hơn (chúng cắt ở phần 13 thành viên). Thông số đó biểu thị rằng cả mACI-24-Ab4 và mACI-02-Ab6 đều thể hiện khả năng mạnh để ức chế quá trình polyme hoá của các chất đơn phân peptit A β thành các sợi và thể hiện tính gắn kết đặc hiệu với các sợi A β (ở phần 11 và 12).

Ngược lại, thử nghiệm kết tụ có mACI-11-Ab9, với tỷ lệ mol 1:30, thể hiện các khối kết tụ lớn hơn trải giữa các phần 12-15 và viên. Với sự có mặt của mACI-12-Ab11, ở tỷ lệ mol 1:30, các khối kết tụ được kết tụ các phần 11-15 và viên, nhưng với tín hiệu mạnh nhất ở các phần 11 và 12. Có nghĩa là mACI-01-Ab7 C2 và mACI-24-Ab4 thể hiện khả năng ức chế mạnh nhất quá trình polyme hoá chất đơn phân peptit A β thành các sợi. mACI-12-Ab11 có các đặc tính ức chế ít hơn đáng kể so với mACI-01-Ab7 C2, để thu được hoạt tính ức chế yếu này, cần có tỷ lệ cao hơn ba lần. Ngoài ra, mức ức chế nhỏ có thể được quan sát thấy nếu so với mACI-11-Ab9 không thể ức chế sự kết tụ sợi peptit A β . Tất cả mAb thể hiện tính gắn kết đặc hiệu với các sợi A β - (đối với mACI-01-Ab7 C2 ở phần 11 + 12; đối với mACI-11-Ab9 ở phần 12 và yếu ở phần 13; đối với mACI-12-Ab11 ở phần 11 và 12).

Trong tất cả các thử nghiệm ức chế, peptit được phát hiện ở các phần đáy. mAb không liên kết (37 kDa, 95 kDa và lớn hơn 120 kDa) xuất hiện ở nửa phần trên cùng của gradien (các phần 3-9 và 4-8 tương ứng).

8.2 Thử nghiệm chống kết tụ các sợi $A\beta_{1-42}$

Do quá trình polyme sợi không hoàn toàn sự phân bố của các sợi nhỏ $A\beta_{1-42}$ riêng thể hiện giới hạn rộng hơn của các phần (11-15). Vì vậy, việc thể hiện sự thành công và các đặc tính chống kết tụ đáng kể của các kháng thể khi cùng ủ với các sợi tạo ra trước đó khó hơn nhiều bằng phân tích kết tụ. Chỉ thay đổi phần lớn các sợi tới gần các phần có tỷ trọng thấp hơn nhưng vẫn nằm trong giới hạn phân tinh bột riêng rẽ sẽ biểu thị hoạt tính chống kết tụ; đối với dạng tinh bột riêng rẽ, dải chính là phần 12. Việc bổ sung mACI-01-Ab7 C2 với tỷ lệ mol 1:100 chứng tỏ không có sự dịch chuyển các sợi tinh bột tới gần các phần có tỷ trọng thấp (vẫn giữa các phần 11-15), nhưng với sự dịch chuyển tín hiệu mạnh hơn trong giới hạn từ 12 đến 11, nếu so với chỉ riêng tinh bột. Dù các tình huống hình thành sợi không đầy đủ không tối ưu, thì mACI-01-Ab7 C2 biểu thị hoạt tính chống kết tụ thấp nhưng vẫn có thể phát hiện được.

Ngược lại, quá trình cùng ủ của các sợi nhỏ $A\beta_{1-42}$ tạo ra trước đó với mACI-02-Ab6 chứng tỏ không có sự dịch chuyển của các dải tới phần tỷ trọng thấp hơn khi ủ với tỷ lệ mol peptit dạng tinh bột:kháng thể tương tự như mACI-01-Ab7 C2. Chỉ khi tỷ lệ mol cao hơn 3 lần là 1:30 được sử dụng thì các sợi tinh bột dịch từ 12-15 (chỉ riêng tinh bột không có cùng ủ với kháng thể) tới các phần 11-15. Vì vậy dường như là mACI-01- Ab7 C2 có đặc tính chống kết tụ cao hơn một chút so với mACI-02-Ab6.

Việc phát hiện các dải tương ứng với mAb ở một nửa thấp hơn của gradient thể hiện sự gắn kết của mACI-02-Ab6 và mACI-01-Ab7 C2 với các sợi nhỏ $A\beta_{1-42}$ (các phần 11 đến 15 hoặc cả hai mAb).

Đặc tính chống kết tụ của mACI-01-Ab7 C2 có thể được khẳng định trong một thử nghiệm khác, trong đó quá trình polyme hoá sợi có thể được chứng minh bằng sự phân bố của các sợi nhỏ $A\beta_{1-42}$ mà không có mặt kháng thể ở các phần 13 đến P (viên). Ở đây các mức dịch chuyển của các sợi tới gần các phần có tỷ trọng thấp hơn biểu thị hoạt tính chống kết tụ của kháng thể, khi cùng ủ với các sợi tạo ra trước. Việc bổ sung mACI-01-Ab7 C2 với tỷ lệ mol 1:100

chúng tỏ có sự dịch chuyển phần lớn các sợi tinh bột từ 13 đến 12 và còn có sự dịch chuyển của dải có tỷ trọng thấp nhất từ 13 tới gần 11. Vì vậy, mACI-01-Ab7 C2 cũng biểu thị hoạt tính chống kết tụ mạnh.

Việc phát hiện các dải tương ứng với mAb ở một nửa thấp hơn của gradient thể hiện sự gắn kết của mACI-01-Ab7 C2 với các sợi nhỏ $A\beta_{1-42}$ (phần 11 đến P) trong khi các dải tương ứng với mAb ở các phần 4 đến 7 thể hiện kháng thể không gắn kết.

Để tóm tắt các kết quả, nó có thể được chứng minh một cách thành công rằng kháng thể đơn dòng mACI-01-Ab7 C2 đích peptit dạng tinh bột $A\beta$ - gắn kết với các sợi tạo ra trước đó và có thể ức chế *in vitro* sự kết tụ của các peptit đơn phân $A\beta$ - với các sợi và các sợi không kết tụ tạo ra trước đó.

Các quan sát tương tự cũng được tạo ra khi sử dụng mACI-24-Ab4. Tương tự với thử nghiệm kết tụ, quá trình polyme hoá sợi hoàn toàn có thể được thể hiện bởi sự phân bố của chỉ các sợi nhỏ $A\beta_{1-42}$ ở các phần 12 đến P (viên). Ở đây các mức dịch chuyển của các sợi tới gần các phần có tỷ trọng thấp hơn biểu thị hoạt tính chống kết tụ của kháng thể, khi cùng ủ với các sợi tạo ra trước. Việc bổ sung mACI-24-Ab4 với tỷ lệ mol 1:100 chứng tỏ có sự dịch chuyển phần lớn các sợi tinh bột từ 12 đến 11. Vì vậy, mACI-24-Ab4 cũng biểu thị hoạt tính chống kết tụ mạnh.

Ví dụ 9: Thử nghiệm huỳnh quang để đánh giá khả năng ức chế sự kết tụ sợi $A\beta_{1-42}$ và chống kết tụ các sợi $A\beta_{1-42}$ tạo ra trước đó bằng cách cùng ủ với mAb

Thử nghiệm huỳnh quang BIS-ANS

Để đánh giá các đặc tính ức chế mAb, thử nghiệm huỳnh quang BIS-ANS (LeVine, 2002) được sử dụng để phát hiện đặc hiệu chất đơn phân hoặc chủng loại không phải dạng sợi của các sợi $A\beta_{1-42}$. Trước khi đo huỳnh quang, các chất đơn phân $A\beta_{1-42}$ được ủ trước với hoặc chất đệm, sử dụng làm đối chứng, hoặc mAb (tỷ lệ mol 1:100, mAb so với peptit $A\beta_{1-42}$) trong 14 giờ ở 37°C. Các đơn

vị huỳnh quang tương đối được tự động ghi lại và các kết quả được thể hiện là mức thay đổi so với đối chứng theo tỷ lệ phần trăm.

mACI-02-Ab6 có khả năng ức chế nhẹ nếu so với đối chứng ($125,8 \pm 28,5\%$ so với $100 \pm 29,5\%$). mACI-01-Ab7 C2 dường như có hoạt tính yếu ($108,0 \pm 30,0\%$) và không có sự cải thiện so với đối chứng có thể được quan sát thấy với mAb mACI-11-Ab9 và mACI-12-Ab11 ($93,5 \pm 21,9\%$ và $73,2 \pm 47,7\%$). Kết quả này khẳng định thông số siêu ly tâm, trong đó mACI-01-Ab7 C2 thể hiện khả năng ức chế lớn hơn so với mACI-11-Ab9 và mACI-12-Ab11.

Ví dụ 10: thử nghiệm huỳnh quang thioflavin T (Th-T)

Để xác định cả hai đặc tính ức chế sự kết tụ cũng như chống kết tụ của mAb, thử nghiệm phát huỳnh quang Thioflavin T (Th-T) được sử dụng để gắn kết đặc hiệu với các phân tử $A\beta_{1-42}$ dạng sợi nhỏ và sau đó cường độ phát xạ huỳnh quang tương quan với lượng các sợi $A\beta_{1-42}$ có trong dung dịch.

Trước khi đo huỳnh quang, chất đơn phân $A\beta_{1-42}$ được ủ trước với hoặc chất đệm (đối chứng), hoặc mAb (tỷ lệ mol 1:100, mAb so với peptit $A\beta_{1-42}$) trong 48 giờ ở 37°C . Các đơn vị huỳnh quang tương đối được tự động ghi lại và các kết quả được thể hiện là mức thay đổi so với đối chứng theo tỷ lệ phần trăm.

mACI-01-Ab7 C2 thể hiện khả năng ức chế đáng kể nếu so với đối chứng ($11,03 \pm 20,7\%$ so với $100 \pm 40,5\%$). Kết quả này khẳng định thông số siêu ly tâm, trong đó mACI-01-Ab7 C2 thể hiện khả năng ức chế.

Để xác định các đặc tính chống kết tụ của mAb, thử nghiệm phát huỳnh quang Thioflavin T (Th-T) được sử dụng để gắn kết đặc hiệu với các phân tử $A\beta_{1-42}$ dạng sợi nhỏ và sau đó cường độ phát xạ huỳnh quang tương quan với lượng các sợi $A\beta_{1-42}$ có trong dung dịch. Trước khi đo huỳnh quang, sợi $A\beta$ được tạo ra trước trong 7 ngày (ở 37°C trong PBS, độ pH 7,1) và sau đó được ủ trước với mAb hoặc chất đệm (đối chứng âm) trong 24 giờ ở 37°C với tỷ lệ mol 1:100 (mAb so với peptit $A\beta_{1-42}$). Các đơn vị huỳnh quang tương đối được tự

động ghi lại bằng đầu đọc đĩa vi chuẩn độ và các kết quả được thể hiện là mức thay đổi so với đối chứng theo tỷ lệ phần trăm.

Phù hợp với thông số siêu ly tâm mACI-01-Ab7 C2 cũng thể hiện trong thử nghiệm chống kết tụ Th-T ở hai thử nghiệm độc lập các khả năng tốt nhất là $35 \pm 11\%$ và $64,57 \pm 13,58\%$ (so với $100,0 \pm 15,37\%$) tương ứng, khả năng chống kết tụ so với đối chứng.

mACI-24-Ab4 cũng thể hiện các đặc tính chống kết tụ ($62,99 \pm 10,34\%$ so với $100,0 \pm 10,03\%$; $p < 0,0001$) trong thử nghiệm Th-T.

mACI-11-Ab9 có hoạt tính ít hơn một chút bằng $28 \pm 14\%$, trong khi ACI-02-Ab6 và ACI-12-Ab11 không thể hiện các đặc tính chống kết tụ đáng kể ($17 \pm 12\%$ và $13 \pm 11\%$ tương ứng).

Khi tóm tắt các thử nghiệm phát huỳnh quang mACI-01-Ab7 C2, mACI-01-Ab6 và mACI-24-Ab4 thể hiện các khả năng hai chức có thể ức chế sự hình thành sợi và làm ngăn các sợi $A\beta_{1-42}$ đã tạo ra trước đó trong thử nghiệm ly tâm mà có thể được khẳng định bằng thử nghiệm phát huỳnh quang. Ngoài ra, thử nghiệm ly tâm chứng tỏ sự gắn kết đặc hiệu của mAb với các sợi tinh bột.

mACI-11-Ab9 thể hiện khả năng ức chế thấp hơn đáng kể trong quá trình siêu ly tâm, nếu so với mACI-01-Ab7 C2 thậm chí nồng độ còn cao hơn ba lần, điều này có thể được khẳng định bằng thử nghiệm BIS-ANS. Đối với phân tích chống kết tụ mACI-01-Ab7 C2 thể hiện trong cả phân tích ly tâm và thử nghiệm các đặc tính làm rút ngắn các sợi $A\beta_{1-42}$. mACI-02-Ab6, có nồng độ gấp ba lần trong thử nghiệm ly tâm, cũng dương tính trong cả hai thử nghiệm nhưng mạnh hơn nhiều trong thử nghiệm ly tâm.

Từ các kết quả nêu trên rõ ràng là mACI-01-Ab7 C2 và mACI-02-Ab6 chỉ là các kháng thể thể hiện hoạt tính dưới dạng hai chức để tương tác với các sợi $A\beta_{1-42}$, ức chế sự kết tụ và chống kết tụ các sợi đã tạo ra trước đó.

Ví dụ 11: NMR và đặc trưng huỳnh quang của tương tác của kháng thể đơn dòng mACI-01-Ab7 C2 với peptit dạng tinh bột β 1-42 đánh dấu ^{13}C

Để đánh giá cơ chế hiệu nghiệm nhờ đó mAb làm tan các sợi đã tạo ra trước đó hoặc ức chế sự hình thành sợi, so sánh đầu đối đầu của thử nghiệm huỳnh quang Thioflavin-T (Th-T) và NMR trạng thái rắn của peptit dạng tinh bột A β 1-42 đánh dấu U- ^{13}C Tyr10 và Val12 được tiến hành (Fig.4). Vì vậy mục đích của việc nghiên cứu này theo sự đồng hoán tằm β bằng phép nghiên cứu phổ trạng thái rắn NMR trong peptit dạng tinh bột β - và với sự có mặt của kháng thể đơn dòng và so sánh trực tiếp khả năng này với khả năng chống kết tụ được xác định bằng thử nghiệm huỳnh quang Th-T.

Phép nghiên cứu phổ NMR trạng thái rắn không chỉ phát hiện sự đồng hoán ở cấu trúc thứ cấp, mà còn cho phép định vị các vùng của peptit A β ₁₋₄₂ mà có thể không chế sự đồng hoán cấu trúc. NMR trạng thái rắn đã được chứng minh về tính có ứng dụng của nó đối với các vấn đề khi nó giúp xác định cấu trúc của các sợi A β ₁₋₄₂ (Petkova et al., 2004, Petkova et al., 2002). Cụ thể là sự tương quan giữa mức dịch chuyển hoá học $^{13}\text{C}_\alpha$ và $^{13}\text{C}_\beta$ với cấu trúc thứ cấp (Cornilescu et al., 1999, Luca et al., 2001, Iwadata et al., 1999) là công cụ có ích đối với các biến đổi thử nghiệm của cấu trúc thứ cấp trong peptit.

Việc tổng hợp peptit đánh dấu bao gồm valine đánh dấu trước ^{13}C ở vị trí 12 (^{12}Val) và tyrosin đánh dấu trước ^{13}C ở vị trí 10 (^{10}Tyr) được tiến hành bằng phương pháp tổng hợp Fmoc. Tính đồng nhất và tinh khiết của peptit được khẳng định bằng phép phổ nghiệm khối lượng MALDI. Peptit dạng tinh bột đánh dấu β - (1-42) được sử dụng để tạo ra các sợi bằng cách ủ dung dịch peptit trong chất đệm PBS trong 1 tuần ở 37°C. Vấn đề chính, độ tan kém của peptit dạng tinh bột β - trong chất đệm PBS, có thể được giải quyết theo cách dưới đây: giá trị pH của chất đệm PBS được tăng tạm thời bằng các lượng rất nhỏ amoniac để hoà tan peptit dạng tinh bột β . Giá trị pH gốc của chất đệm PBS được quay lại bằng cách ủ mẫu với sự có mặt của bể PBS lớn hơn có sử dụng đặc tính dễ bay hơi của amoniac.

Để xác định hiệu quả của các kháng thể làm gãy tằm β , dung dịch chứa các sợi được ủ với kháng thể trong 24 giờ ở 37°C trong cả hai thử nghiệm NMR và

Th-T. Để so sánh thời gian thực, phần dung dịch mẫu tương tự được sử dụng cho thử nghiệm huỳnh quang Th-T và dung dịch còn lại được làm đông khô nhanh cho các phép đo NMR.

Sau khi phân tích các khả năng chống kết tụ thứ nhất của mACI-01-Ab7 C2 bằng cách cùng ủ với các sợi dạng tinh bột β - đánh dấu ^{13}C đã tạo ra trước đó nhờ sử dụng thử nghiệm huỳnh quang Th-T, có thể chứng tỏ rằng mAb chống kết tụ các sợi tới 38%. Sau đó, phân tích quang phổ NMR được tiến hành.

Để kiểm tra các khác biệt giữa PBS (đối chứng) và mAb quang phổ của từng quá trình ủ được khử vòng xoắn nhờ sử dụng PeakFit (<http://www.systat.com/-products/PeakFit>). Các đường được làm thích ứng bằng cách sử dụng phương pháp điều chỉnh kết hợp Lorentzian/Gaussian, các kết quả của chúng được thể hiện trên Fig.4. Các kết quả đó được tóm tắt trong Bảng 3 nhưng phần lớn khác biệt rõ ràng là các cường độ tích phân của hai chủng loại cần được điều chỉnh quanh đỉnh kép 30-33 ppm. Đỉnh ở 33 ppm tương ứng với cấu hình tấm β của các sợi trong khi đỉnh ở 30 ppm là kết quả của cấu hình xoắn ngẫu nhiên. Mẫu được ủ trong PBS thể hiện phần lớn chất đồng vị đánh dấu trong cấu hình tấm β (81,7%) (đỉnh Fig.2) được giảm khi mẫu được ủ với mACI-01-Ab7 C2 (53,5%) (đáy Fig.4). Mức giảm ở chủng loại cấu hình tấm β theo hướng cấu hình xoắn ngẫu nhiên như được xác định bằng nghiên cứu Val 12 C β là tới 35% và nhờ đó gần với cấu hình được xác định nhờ sử dụng sự phát huỳnh quang.

Cộng hưởng	PBS			mACI-01-Ab7-C2		
	δ ISO (ppm)	FWHH (Hz)	Cường độ tích phân %	δ ISO (ppm)	FWHH (Hz)	Cường độ tích phân %
Val C β – tấm	32,60	479	81,7	33,09	366	53,5
Val C β – ngẫu nhiên	30,27	200	18,3	30,27	340	46,5

Bảng 3. So sánh các thông số thích hợp cho hai cấu hình của Val 12 C β . Các mức chuyển dời hoá học thích hợp đối với hai cấu hình là hoàn toàn tương tự nhưng các cường độ tích phân là rất khác nhau, cho thấy mức giảm ở cấu hình

tám beta gốc tới khoảng 35% ($1-(53,5/81,7)$). Điều này rất gần với giá trị thu được từ phép đo phát huỳnh quang.

Để tóm tắt các kết quả, có thể được chứng minh một cách thành công rằng kháng thể đơn dòng mAC1-01-Ab7 C2 đích vùng tận cùng N 1-16 của peptit dạng tinh bột A β - gắn kết với các sợi tạo ra trước đó và có thể ức chế *in vitro* sự kết tụ của các peptit đơn phân A β - với các sợi và các sợi không kết tụ tạo ra trước đó, như được minh họa bằng thử nghiệm siêu ly tâm gradien tỷ trọng cũng như bằng thử nghiệm phát huỳnh quang Th-T. Ngoài cách gắn kết kháng thể này với các sợi đã tạo ra trước đó, sự đồng hoán từ phần lớn tám β thành môi trường cấu hình thứ cấp cuộn ngẫu nhiên của Val12 có thể được kích thích. Đó có thể là cơ chế hiệu nghiệm mà nhờ đó các sợi có thể được làm tan nhờ gắn kết của kháng thể đơn dòng mAC1-01-Ab7 C2 còn do phân tích chi tiết đỉnh Val 12 C β thể hiện mức giảm thành phần tám β tới 35% là gần với thông số huỳnh quang.

Ví dụ 12: Tính chức của mAC1-01-Ab7 C2 đối với các sợi tinh bột

12.1 Quá trình cải biến cấu hình của các sợi A β_{1-42} và quá trình bắt đầu chống kết tụ sau gắn kết của kháng thể mAC1-01-Ab7 C2

Để đánh giá cơ chế nhờ đó kháng thể có thể chống lại sự kết tụ của các sợi tinh bột β đã tạo ra trước đó (A β_{1-42}), so sánh đầu đối đầu của thử nghiệm huỳnh quang Thioflavin-T (Th-T) được tiến hành xác định mức chống kết tụ và cộng hưởng từ hạt nhân trạng thái rắn (NMR) của cấu hình thứ cấp phân tích peptit A β_{1-42} đánh dấu bằng U- ^{13}C Tyrosin 10 và Valin12. Kháng thể làm tan 35,4% các sợi A β_{1-42} tạo ra trước đó và đồng thời kích thích sự thay đổi cấu hình thứ cấp từ tám β thành cuộn ngẫu nhiên. Việc làm giảm chủng loại của cấu hình tám β về cuộn ngẫu nhiên tới 35% và vì vậy gần với cấu hình được xác định nhờ sử dụng thử nghiệm phát huỳnh quang Th-T. Thông số này chứng tỏ rằng việc gắn kết của kháng thể khởi đầu sự đồng hoán của cấu trúc thứ cấp mà có khả năng tạo ra sự mất ổn định của việc sắp xếp giữa các phân tử tương đương của các tám β dẫn đến làm gãy các sợi kéo dài thành các phần ngắn hơn.

12.2 Ái lực gắn kết phụ thuộc cấu hình của kháng thể mACI-01-Ab7 C2

Do đã biết rõ trong tài liệu khoa học chuyên ngành rằng phần năng lượng gắn kết kháng thể-kháng nguyên có thể được sử dụng tạo ra cải biến phụ thuộc năng lượng của kháng nguyên ⁶, thử nghiệm so sánh ái lực gắn kết của kháng thể mACI-01-Ab7 C2 với toàn bộ protein $A\beta_{1-42}$ và với axit amin thứ chín, nhỏ hơn, kéo dài, peptit bao gồm epitop của kháng thể được tiến hành. Đối với so sánh này, các ái lực của kháng thể mACI-01-Ab7 C2 được phân tích bằng ELISA nhờ sử dụng các peptit biotinyl hoá bao trùm trình tự axit amin của epitop của mACI-01-Ab7 C2 (các axit amin 13-21 của trình tự $A\beta_{1-42}$, được tạo ra bởi Mimotopes và được mua của ANAWA Trading SA) và peptit biotinyl hoá hoàn toàn $A\beta_{1-42}$ (Bachem). Phân tích được thực hiện theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất (Mimotopes). Kháng thể gắn kết với peptit bao gồm epitop đặc hiệu của nó (các axit amin 13-21 của trình tự $A\beta_{1-42}$) có ái lực cao hơn 38,40% so với protein $A\beta_{1-42}$. Vì vậy có gợi ý rằng sự khác biệt về năng lượng ái lực gắn kết được sử dụng cho sự đồng hoán năng lượng-sử dụng của cấu hình thứ cấp của protein dạng tinh bột thể hiện kháng nguyên ở vị trí thích hợp hơn đối với tương tác kháng thể. Điều này giải thích tại sao ái lực của kháng thể đối với loại tự nhiên (toàn bộ protein dạng tinh bột) thấp hơn đối với cấu trúc siêu phân tử phân lập.

Ví dụ 13: Cấu hình-gắn kết đặc hiệu của mACI-01-Ab7 C2 với các loại protein dạng tinh bột khác nhau

Để đánh giá tính đặc hiệu của mACI-01-Ab7 C2 tới các tầng khác nhau của protein dạng tinh bột polyme hoá, tinh bột đơn phân và polyme tan, cụ thể, là protein tinh bột β ($A\beta$), và tinh bột sợi nhỏ, ELISA được bao bằng các tầng khác nhau của dạng tinh bột polyme β - được tiến hành. Các chất đơn phân được điều chế theo phương pháp cải biến được công bố bởi ⁷, tinh bột polyme tan, cụ thể, tinh bột β ($A\beta$) theo ⁸, trong khi các sợi được tiến hành bằng cách ủ tinh bột (Bachem, Switzerland) với nồng độ cuối cùng là 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ trong Tris/HCl pH 7,4 ở 37°C trong 5 ngày tiếp theo là bước làm ly tâm (10.000 vòng phút trong 5 phút). Sau đó polyme tinh bột được phủ lên các đĩa ELISA với nồng độ cuối

cùng là 55 $\mu\text{g/ml}$ và ái lực gắn kết ELISA nhờ sử dụng kháng thể đơn dòng IgG kháng chuột (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) đánh dấu bằng phosphat kiềm được tiến hành. Kháng thể gắn kết với protein tinh bột polyme tan β ($A\beta$) ($IC_{50} = 2,53\text{nM}$) với ái lực cao hơn các sợi ($IC_{50} = 5,27\text{nM}$) và thấp nhất với các chất đơn phân ($IC_{50} = 8,3\text{nM}$). Thông số đó chứng tỏ rằng gắn kết của kháng thể bị tác động so với epitop của nó bởi cấu hình của các chất kết tụ dạng tinh bột khác nhau.

Ví dụ 14: vẽ bản đồ epitop của kháng thể đơn dòng mACI-01-Ab7 C2

Vẽ bản đồ epitop của kháng thể đơn dòng mACI-01-Ab7 C2 được tiến hành bằng ELISA nhờ sử dụng ba thư viện peptit khác nhau. Một thư viện bao gồm tất cả 33 peptit biotinyl hoá bao cả trình tự axit amin hoàn toàn (aa) của $A\beta_{1-42}$ (được tạo ra bởi Mimotopes và mua của ANAWA Trading SA), thư viện thứ hai có các peptit biotinyl hoá nhờ sử dụng peptit 12 (aa12-20 của $A\beta$) từ thư viện peptit thứ nhất và thay thế mỗi axit amin trong trình tự bằng alanin (xem bảng 41 dưới đây), và thư viện thứ ba có các peptit biotinyl hoá 13, 14, hoặc 15 (aa 13-21, 14-22 hoặc 15-23 của $A\beta$) và thay thế trong mỗi trường hợp các axit amin cuối cùng đến alanin hoặc đến glyxin bằng aa 21 đã là alanin (xem bảng 5 dưới đây). Peptit biotinyl hoá $A\beta_{1-42}$ được sử dụng làm đối chứng dương tính (Bachem). Vẽ bản đồ epitop được tiến hành theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất (Mimotopes). Tóm lại, các đĩa phủ streptavidin (NUNC) được phong bế bằng 0,1% BSA trong PBS qua đêm ở 4°C . Sau khi rửa bằng PBS-0,05% Tween 20, các đĩa được phủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng bằng các peptit khác nhau từ thư viện, pha loãng trong 0,1% BSA, 0,1% natri azit trong PBS tới nồng độ cuối cùng là 10 μM . Sau khi rửa, các đĩa được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ môi trường bằng kháng thể mACI-01-Ab7 C2 hoặc kháng thể chuột isotyp đối chứng IgG2b, pha loãng tới 10 $\mu\text{g/ml}$ trong 2% BSA, 0,1% natri azit trong PBS. Các đĩa được rửa lại và ủ bằng IgG dê kháng chuột kết hợp với phosphatase kiềm trong 1 giờ ở nhiệt độ môi trường. Sau lần rửa cuối cùng, các đĩa được ủ với chất nền phosphatase (pNPP) và đọc ở 405 nm nhờ sử dụng đầu đọc đĩa ELISA.

Điều đó chứng tỏ rằng kháng thể đơn dòng mACI-01-Ab7 C2 gắn kết đặc hiệu với các peptit 12, 13, 14 và 15 của thư viện peptit thứ nhất. 4 peptit đó bao gồm aa 12- 20 (VHHQKLVFF), 13-21 (HHQKLVFFA), 14-22 (HQKLVFFAE) và 15-23 (QKLVFFAED) của A β 1-42 gợi ý rằng epitop nằm trong vùng 12-23 của A β . Thư viện thứ hai với các thay thế alanin được sử dụng để xác định aa giới hạn đối với gắn kết với peptit 12-20 (VHHQKLVFF). Gắn kết của kháng thể mACI-01-Ab7 C2 mất hoàn toàn khi aa 16, 17, 19 hoặc 20 được thay thế bằng alanin, chứng tỏ rằng aa là giới hạn tuyệt đối cho gắn kết của kháng thể với A β . Gắn kết của kháng thể mACI-01-Ab7 C2 mất một phần khi aa 15 và 18 được thay thế.

Gắn kết hầu như mất hoàn toàn khi aa 14 được thay thế bằng alanin, chứng tỏ rằng aa 14 cũng rất quan trọng đối với gắn kết.

Cuối cùng, thư viện thứ ba được sử dụng để xác định có hay không aa 21, 22 hoặc 23 là giới hạn đối với gắn kết với epitop. Gắn kết của kháng thể với aa 15-23 được giảm khi aa 23 được thay thế bằng alanin, chứng tỏ rằng aa 23 cũng quan trọng đối với gắn kết. Gắn kết mất một phần khi aa 21 được thay thế bằng glyxin và mất một chút khi aa 22 được thay thế bằng alanin.

Bảng 4. Bảng tóm tắt các peptit sử dụng trong thư viện thứ hai.

aa quan trọng đối gắn kết được đánh dấu bằng các chữ in nghiêng và đường gạch dưới và aa giới hạn tuyệt đối đối với gắn kết được đánh dấu bằng các chữ in nghiêng và đậm nét và được gạch dưới.

p12-20	V H H Q K L V F F
A12	A H H Q K L V F F
A13	V A H Q K L V F F
A14	V H A Q K L V F F
A15	V H H A K L V F F
A16	V H H Q A L V F F
A17	V H H Q K A V F F
A18	V H H Q K L A F F

A19	V H H Q K L V A F
A20	V H H Q K L V F A
aa no.	12 13 14 <u>15</u> 16 17 <u>18</u> 19 20

Bảng 5. Bảng tóm tắt các peptit sử dụng trong thư viện thứ ba.

aa quan trọng đối gắn kết được đánh dấu bằng các chữ in nghiêng và đường gạch dưới và aa giới hạn tuyệt đối đối với gắn kết được đánh dấu bằng các chữ in nghiêng và đậm nét và được gạch dưới

p13-21	H H Q K L V F F A
p13-21	G21 H H Q K L V F F G
p 14-22	H Q K L V F F A E
p 14-22	A22 H Q K L V F F A A
p 15-23	Q K L V F F A E D
p15-23	A23 Q K L V F F A E A
aa no.	13 14 <u>15</u> 16 17 <u>18</u> 19 <u>20</u> 21 22 <u>23</u>

Ví dụ 15: tác động của việc tiêm chủng thụ động bằng mAC1-01-Ab7 C2 đối với lượng tinh bột tích tụ trong não ở chuột nhắt riêng rẽ chuyển gen hAPP

Để đánh giá khả năng *in vivo* của kháng thể đơn dòng mAC1-01-Ab7 C2 về khả năng gắn kết và làm sạch tinh bột tan trong não, chuột nhắt riêng rẽ 6 tháng tuổi⁹, giống và tuổi phù hợp, được sử dụng để nghiên cứu tạo miễn dịch thụ động bằng liều khác nhau. Lượng tinh bột tích tụ tan được phân tích khi kết thúc nghiên cứu bằng cách thu gom não các con vật và bằng cách tiến hành ELISA đặc hiệu A β ₁₋₄₀ và A β ₁₋₄₂ (TGC, Germany).

8-13 con vật trên mỗi nhóm được tiêm hai lần với khoảng thời gian một tuần 100, 300 và 1000 μ g kháng thể đơn dòng trong 200 μ l PBS trong khi chỉ tiêm riêng PBS được sử dụng làm đối chứng. Một ngày sau khi tiêm lần thứ hai, các con vật được giết để phân tích hoá sinh phần tinh bột tan. Để xác định số lượng A β ₁₋₄₀ người và A β ₁₋₄₂ người ở phần tan của các chất đồng nhất não và/hoặc trong dịch não-tủy sống (CSF), bộ dụng cụ Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay có bán trên thị trường được sử dụng (ELISA) (h β 40

dạng tinh bột hoặc β 42 ELISA nhạy cao TGC, Switzerland). ELISA được tiến hành theo phương pháp của nhà sản xuất. Tóm lại, các tiêu chuẩn (mức pha loãng $A\beta_{1-40}$ hoặc $A\beta_{1-42}$ tổng hợp) và các mẫu được chuẩn bị trong đĩa polypropylen 96 giếng không có khả năng gắn kết protein (Greiner, Germany). Các mức pha loãng chuẩn với các nồng độ cuối cùng là 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3 và 15,6 pg/ml và các mẫu được chuẩn bị trong chất pha loãng mẫu, có trang bị bộ dụng cụ ELISA, tới thể tích cuối cùng là 60 μ l. Do các mức tinh bột tăng theo tuổi của chuột và do việc đánh giá thực tế đòi hỏi rằng các chỉ số của các mẫu nằm trong phần tuyến tính của đường cong chuẩn, nên các mẫu của phân tích $A\beta$ 40 được pha loãng 2:3, các mẫu của phân tích $A\beta$ 42 không được pha loãng.

Các mẫu, các tiêu chuẩn và các trị trống (50 μ l) được thêm vào đĩa polystyrol phủ kháng $A\beta$ (giữ kháng thể nhận dạng chọn lọc đầu C-của kháng nguyên) cùng với thể tiếp hợp kháng kháng thể $A\beta$ (kháng thể phát hiện biotinyl hoá) và ủ qua đêm ở 4°C để cho phép hình thành phức hợp kháng thể-dạng tinh bột-kháng thể. Ngày tiếp theo, thể tiếp hợp streptavidin-Peroxidaza-được thêm vào, tiếp 30 phút sau bằng cách bổ sung hỗn hợp TMB/peroxit, tạo ra sự chuyển hoá của chất nền thành sản phẩm có màu và cường độ màu được xác định bằng phép trắc quang với đầu đọc ELISA có màng lọc 450 nm. Việc xác định số lượng của hàm lượng $A\beta$ của các mẫu thu được bằng cách so sánh mức hấp thụ với đường cong chuẩn được tạo ra bằng $A\beta_{1-40}$ hoặc $A\beta_{1-42}$ tổng hợp. Thông số biểu hiện như các mức thay đổi riêng rẽ có nghĩa là giá trị đối chứng (theo phần trăm với đối chứng).

Lượng tổng $A\beta$ 40 trong các chất đồng nhất não có thể được giảm đáng kể và không đáng kể lắm đối với $A\beta$ 42 khi chuột nhất riêng lẻ hAPP được tạo miễn dịch thụ động bằng hai lần tiêm truyền i.p. kháng thể đơn dòng AC1-01-Ab7 C2 với liều 300 μ g ($A\beta$ 40: $-27,3 \pm 13,9\%$ với $p < 0,05$; $A\beta$ 42: $-8,6 \pm 22,4$ với $p = 0,56$; thử nghiệm nghiên cứu không cặp đôi), trong khi 100 và 1.000 μ g không đạt tới mức đáng kể. Quá trình tạo miễn dịch bằng 100 μ g làm tăng $A\beta$

40 và A β 42 ở các chất đồng nhất não (A β 40: $32,3 \pm 36,8\%$; A β 42: $38,3 \pm 51,4\%$) trong khi điều trị bằng 1.000 μg tạo ra xu hướng lượng tinh bột tích tụ giảm hợp lý và có thể hữu hiệu mạnh với số động vật tăng trên mỗi nhóm (A β 40: $-2,2 \pm 26,0\%$; A β 42: $-9,3 \pm 15,9\%$). Thông số này chứng tỏ rằng trong phương pháp tạo miễn dịch cấp kháng thể mAC1-01-Ab7 C2 có thể làm giảm tổng lượng A β tan trong não của loại murine AD này. Thú vị rằng dường như mối liên quan với liều lượng là tạm thời nhưng nhiều nghiên cứu hơn với các nhóm lớn hơn phải được tiến hành để thu được thông số có ý nghĩa.

Ví dụ 16: Tác động của việc sử dụng thụ động thường xuyên mAC1-01-Ab7 C2 đối với lượng mảng tích tụ ở chuột nhắt chuyển gen kép hAPPxPSI

Để đánh giá khả năng *in vivo* của kháng thể đơn dòng mAC1-01-Ab7 C2 về khả năng gắn kết và làm giảm các mảng dạng tinh bột trong não, chuột nhắt kép chuyển gen 3,5 tháng tuổi hAPPxPSI¹⁰, giống và tuổi phù hợp, được sử dụng để nghiên cứu tạo miễn dịch thụ động trong 4 tháng. Các mảng dạng tinh bột được phân tích khi kết thúc nghiên cứu bằng mô hoá học não của các con vật nhờ gắn kết của Thioflavin S.

15 con vật chuyển gen được tiêm truyền 16 lần hàng tuần với 500 μg kháng thể đơn dòng trong PBS. 15 con vật được tiêm chỉ riêng PBS, được sử dụng làm các đối chứng. Tất cả các lần đều được tiêm trong màng bụng. Khi giết, chuột nhắt được gây mê và xịt rửa qua tâm vị bằng huyết thanh sinh lý ở 4°C để loại bỏ máu khỏi các mạch não. Sau đó, não được lấy khỏi sọ và não sau và não trước được tách ra bằng cách cắt ở mặt phẳng trán đỉnh/trán. Não trước được chia thành bán cầu trái và phải bằng nhau nhờ lát cắt đối xứng dọc theo đường phân giác. Một bán cầu não được cố định sau qua đêm bằng 4% paraformaldehyt để nghiên cứu mô. Các phần đối xứng dọc vibratome (40 μm) được cắt để ủ lơ lửng tự do và giữ ở 4°C cho tới khi nhuộm trong PBS bằng 0,1% natri azit. Năm phần với các mức khác nhau được nhuộm cho các mảng đặc bằng Thioflavin S. Các phần của các con vật được sử dụng ngẫu nhiên để nhuộm và xác định số lượng không rõ ràng. Các hình ảnh thu được bằng kính

hiển vi Leica DMR có gắn máy ảnh Sony DXC-9100P và phân tích bằng máy tính nhờ sử dụng phần mềm Leica Q-Win. Việc đặt cường độ ánh sáng và tụ sáng cho kính hiển vi được giữ không đổi trong suốt quy trình thu nhận hình ảnh. Tất cả các hình ảnh thu được theo thủ tục con máy tính tương tự để giảm đến mức tối thiểu độ lệch nghiên cứu. Ngưỡng phần dày đặc được sử dụng giống nhau trong toàn bộ phân tích. Vùng lớp nền sợi được chọn lựa để xác định số lượng tự động lượng tinh bột tích tụ bằng cách nhuộm màu Thioflavin S.

Tổng lượng mảng tích tụ và số lượng các mảng ở vùng lớp nền sợi có thể được giảm đáng kể khi chuột nhắt đôi hAPP/PS1 được tạo miễn dịch thụ động trong 4 tháng như được mô tả ở trên. Trong lượng mảng tích tụ thì mức giảm đáng kể là 31% (mACI-01- Ab7 C2: $1,11 \pm 0,21$ % và đối chứng: $1,61 \pm 0,35$ %; $p=0,003$, Mann-Whitney U-Test) có thể đạt được trong khi việc tạo miễn dịch thụ động thường xuyên làm giảm đáng kể lượng của các mảng là 19% (mACI-01-Ab7 C2: $8,73 \pm 1,36$ và đối chứng: $10,78 \pm 1,36$; $p=0,006$, Mann-Whitney U-Test), chứng tỏ rằng việc làm tan mảng xuất hiện tạo ra mức ít hơn một chút so với việc làm gãy mảng.

Ví dụ 17: Tác động của việc tiêm chủng thụ động với mACI-01-Ab7 C2 đối với khả năng nhớ ở chuột nhắt chuyển gen riêng lẻ hAPP

Để phân tích khả năng *in vivo* của kháng thể mACI-01-Ab7 C2 để cải biến hoặc làm tăng tính chức liên quan đến khả năng nhận thức, chuột nhắt hAPP riêng lẻ 9 tháng tuổi, giống và tuổi phù hợp, được sử dụng để nghiên cứu tạo miễn dịch thụ động. Nhận thức không liên quan đến không gian được đánh giá khi kết thúc thời gian tạo miễn dịch bằng Object Recognition Task mới (ORT).

12 con vật mỗi nhóm được nhận hai liều tiêm trong màng bụng là 400 μ g kháng thể đơn dòng 200 μ l PBS trong việc tiêm PBS riêng rẽ được sử dụng làm đối chứng. Một ngày sau khi tiêm liều thứ hai khả năng liên quan đến nhận thức được nghiên cứu bằng Object Recognition Task (ORT)^{12,13}. Đối với chuột nhắt thử nghiệm ORT được đặt trong 10 phút đầu trường để nghiên cứu tập tính và đương đầu với đối tượng không quen mới. Thời gian khảo sát được ghi lại. Ba

giờ sau các con vật tương tự được đặt lại vào đầu trường đó trong phiên thứ hai nhưng đối mặt với một đối tượng già hơn, đã nghiên cứu trước, và cùng với một đối tượng mới. Một lần nữa, các thời gian khảo sát với cả hai đối tượng được ghi lại và chỉ số liên quan đến nhận thức thu được được xác định là tỷ lệ của thời gian khảo sát đối với đối tượng mới liên quan đến thời gian khảo sát tổng và biểu hiện là các thay đổi tỷ lệ với đối chứng.

Việc tiêm chủng thụ động bằng mACI-01-Ab7 C2 tạo ra mức gia tăng đáng kể khả năng trí nhớ liên quan đến nhận thức ở chuột nhắt chuyển gen đơn AD (mACI-01-Ab7 C2: $131,6 \pm 9,1\%$ và đối chứng: $100,0 \pm 9,2\%$ với $p < 0,05$; thử nghiệm T của nhà nghiên cứu riêng và $n=12$ cho mỗi nhóm).

Thông tin nộp lưu

Các dòng tế bào lai dưới đây được lưu giữ bởi "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)" ở Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, theo điều khoản của Hiệp ước Budapest:

Tên dòng tế bào lai	Tên kháng thể	Ngày nộp lưu	Số hiệu lưu giữ
FP 12H3	mACI-01-Ab7	01/12/2005	DSM ACC2752
FP 12H3-C2	mACI-01-Ab7C2	01/12/2005	DSM ACC2750
FP 12H3-G2	mACI-01-Ab7G2	01/12/2005	DSM ACC2751
ET 7E3	mACI 02-Ab6	01/12/2005	DSM ACC2755
EJ 7H3	mACI-24-Ab4	01/12/2005	DSM ACC2756

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Lieberburg I, Motter R, Nguyen M, Soriano F, Vasquez N, Weiss K, Welch B, Seubert P, Schenk D, Yednock T. (2000). *Nature Med.* 6, 916-919.
- Barghorn S, Nimmrich V, Striebinger A, Krantz C, Keller P, Janson B, Bahr M, Schmidt M, Bitner RS, Harlan J, Barlow E, Ebert U, Hillen H (2005) Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer Disease. *J Neurochem* 95:834-847.
- Baschong W, Wrigley NG (1990) Small colloidal gold conjugated to Fab fragments or to immunoglobulin G as high-resolution labels for electron microscopy: a technical overview. *J Electron Microscop Tech* 14:313-323.
- Blond and Goldberg, 1987, *PNAS* March 1, 1987 Vol. 84 no. 5 11147-1151
- Cornilescu G, Delaglio F, Bax A. (1999) *J. Biomol. NMR*; 13: 289-302.
- Burdick D. et al. Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/ beta amyloid peptide analogs. *J. Biol. Chem.* 267, 546-554 (1992).
- DeMattos, Bales, KR, Cummins, DJ, Dodart, JC, Paul, SM, Holtzman, D.M (2001).
- Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8850-8855.
- Dewachter I, Van DJ, Smeijers L, GiNs M, Kuiperi C, Laenen I, Caluwaerts N, Moechars D, Checler F, Vanderstichele H, Van LF (2000) Aging increased amyloid peptide and caused amyloid plaques in brain of old APP [V717] transgenic mice by a different mechanism than mutant presenilini. *J Neurosci* 20:6452-6458.
- Dewachter I, Reverse D, Caluwaerts N, Ris L, Kuiperi C, Van den HC, Spittaels K, Umans L, Serneels L, Thiry E, Moechars D, Mercken M, Godaux E, Van Leuven F (2002) Neuronal deficiency of presenilin 1 inhibits amyloid plaque

formation corrects hippocampal long-term potentiation but not a cognitive defect of amyloid precursor protein [V717] transgenic mice. *J Neurosci* 22:3445-3453.

Glenner and Wong, *Biochem Biophys Res Comm* 129, 885-890 (1984)
Harlow and Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988)).

Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Dewachter I, Walter J, Klockgether T, Van LF (2005) Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice. *J Neuroinflammation* 2:22.

Hodgson et al., *Bio/Technology*, 9:421 (1991) Iwadata M, Asakura T, Williamson MP. (1999) *J. Biomol. NMR*; 13: 199-211.

Kirschner DA, Abraham C, & Selkoe DJ. X-ray diffraction from intraneuronal paired helical filaments and extraneuronal amyloid fibers in Alzheimer disease indicates cross-beta conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83, 503-507 (1986).

Khaw, B. A. et al. *J. Nucl. Med.* 23:1011-1019 (1982) Kennedy, J. H., et al., 1976 (*Clin. Chim. Acta* 70:1-31) Klein WL (2002) A β toxicity in Alzheimer Disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int* 41(5):345-352.

Kohler and Milstein (*Nature* 256: 495-497 (1975)).

LeVine, H. III, (2002). *Arch Biochem Biophys* 404, 106-115.

Luca et al., 2001.

McGeer et al., 1994.

Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reverse D, Baekelandt V, Naidu A, Tesseur I, Spittaels K, Haute CV, Checler F, Godaux E, Cordell B, Van LF

- (1999) Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of protein amyloid precursor in brain. *J Biol Chem* 274:6483-6492.
- Nelson, R. & Eisenberg, D. Recent atomic models of amyloid fibril structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* (2006).
- Nicolau, C, Grefechuôth, R., Balaban, T. S., Lazarte, J. E., and Hopkins, R. J. (2002). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2332-2337.
- Queen et al., *Proc. Natl Acad Sci USA*, 86:10029-10032 (1989).
- Pearson W.R. (1990), *Methods in Enzymology* 183, 63-98.
- Petkova AT, Buntkowsky G, Dyda F, Leapman RD, Yau WM, Tycko R. *J. Mol. Biol.* 2004; 335: 247-260.
- Petkova AT, Ishii Y, Balbach JJ, Antzutkin ON, Leapman RD, Delaglio F, Tycko R. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 99: 16742-16747.
- Rousseaux et al. *Methods Enzymology*, 121 :663-69, Academic Press, 1986
- Rzepecki, P., Nagel-Steger, L., Feuerstein, S., Linne, U., Molt, O., Zadnavor, R., Aschermann, K., Wehner, M., Schrader, T. and Riesner, D. (2004). *J Biol Chem* 279, 47497-47505.
- Sambrook et al. loc. cit. Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Smith, S. O., and Bormann, B. J. (1995). *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 488-491.
- Schenk et al., 1999.
- Schurs, A. H. W. M., et al. 1977 (*Clin. Chim Acta* 81 :1-40 Slot JW, Geuze HJ (1985) A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. *Eur J Cell Biol* 38:87-93.
- Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489.

Van dA, Il Wera S, Van LF, Henderson ST (2005) A ketogenic diet reduces amyloid beta 40 and 42 in mouse model of Alzheimer Disease. *Nutr Metab (Lond)* 2:28.

Wagner et al (2002) *Journal of Liposome Research* Vol 12(3), pp 259 – 270.

Ye, J., Dave, U. P., Grishin, N. V., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2000). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5123-5128.

Zrein et al. (1998), *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5(1): 45-49. *Experimental Eye Research* 78 (2004) 243-256.

WO 2004/058258.

WO96/1359.

WO96/29605.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể hoặc phần chức năng của chúng, trong đó kháng thể hoặc phần chức năng này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 8 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7, trong đó kháng thể hoặc phần chức năng này nhận diện và gắn với dạng tinh bột β .
2. Kháng thể hoặc phần chức năng của chúng, trong đó kháng thể hoặc phần chức năng này được tạo ra bởi dòng tế bào lai FP 12H3-C2, được nộp lưu ngày 01/12/2005 với số nộp lưu DSM ACC2750.
3. Kháng thể hoặc phần chức năng của chúng, trong đó kháng thể hoặc phần chức năng này bao gồm các vùng xác định bổ trợ (CDR) của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7 và vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 8.
4. Kháng thể hoặc phần chức năng của chúng, trong đó kháng thể hoặc phần chức năng này bao gồm các đoạn gắn kết với epitop của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7 và vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 8.
5. Kháng thể hoặc phần chức năng của chúng, trong đó kháng thể hoặc phần chức năng này nhận diện và gắn với epitop của dạng tinh bột β ($A\beta$) và trong đó kháng thể hoặc phần chức năng này bao gồm các vùng xác định bổ trợ (CDR) hoặc các đoạn gắn kết epitop của kháng thể được tạo ra bởi dòng tế bào lai FP 12H3-C2, được nộp lưu ngày 01/12/2005 với số nộp lưu là DSM ACC2750.
6. Kháng thể hoặc phần chức năng của chúng, trong đó kháng thể hoặc phần chức năng này nhận diện và gắn kết với epitop của $A\beta$ và trong đó kháng thể hoặc phần chức năng này bao gồm các vùng xác định bổ trợ (CDR) của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7 và vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 8.

7. Kháng thể hoặc phần chức năng của chúng, trong đó kháng thể hoặc phần chức năng này nhận diện và gắn với epitop của A β và trong đó kháng thể hoặc phần chức năng này bao gồm các đoạn gắn kết epitop của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7 và vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 8.
8. Kháng thể hoặc phần chức năng của chúng, trong đó kháng thể hoặc phần chức năng này nhận diện và gắn với epitop của A β , trong đó kháng thể hoặc phần chức năng này bao gồm (i) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) bao gồm CDR1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 23; CDR2 có trình tự axit amin nêu trong ID NO: 24, và CDR3 có trình tự axit amin nêu trong ID NO: 25; và (ii) vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) bao gồm CDR1 có trình tự axit amin nêu trong ID NO: 26; CDR2 có trình tự axit amin nêu trong ID NO: 27, và CDR3 có trình tự axit amin nêu trong ID NO: 28.
9. Kháng thể hoặc phần chức năng của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó kháng thể là kháng thể đơn dòng.
10. Kháng thể hoặc phần chức năng của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó kháng thể hoặc phần chức năng của chúng là kháng thể được làm tương thích với người.
11. Kháng thể hoặc phần chức năng của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó kháng thể hoặc phần chức năng của chúng là kháng thể khảm.
12. Polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa kháng thể hoặc phần chức năng của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11.
13. Phương pháp sản xuất chế phẩm, trong đó phương pháp này bao gồm bước phối trộn kháng thể hoặc phần chức năng của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11 dưới dạng dược dụng.
14. Chế phẩm được sản xuất bằng phương pháp theo điểm 13.

15. Dòng tế bào lai, trong đó dòng tế bào lai này tạo ra kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9.
16. Dòng tế bào lai FP 12H3-C2, trong đó dòng tế bào này được nộp lưu ngày 01/12/2005 với số nộp lưu là DSM ACC2750.
17. Kit để phát hiện và chẩn đoán các bệnh và tình trạng liên quan đến dạng tinh bột, trong đó kit này bao gồm kháng thể hoặc phân chức năng của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11.
18. Dòng tế bào, trong đó dòng tế bào này tạo ra kháng thể hoặc phân chức năng của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11.
19. Dòng tế bào, trong đó dòng tế bào này chứa polynucleotit theo điểm 12.
20. Phương pháp sản xuất kháng thể hoặc phân chức năng của chúng, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy dòng tế bào theo điểm 18.
21. Phương pháp sản xuất kháng thể hoặc phân chức năng của chúng, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy dòng tế bào theo điểm 19.
22. Phương pháp sản xuất kháng thể hoặc phân chức năng của chúng, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy dòng tế bào theo điểm 16.
23. Phương pháp sản xuất kháng thể hoặc phân chức năng của chúng, trong đó phương pháp này bao gồm bước biểu hiện polynucleotit theo điểm 12.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> GREFERATH, RUTH
 HICKMAN, DAVID
 MUHS, ANDREAS
 PFEIFER, ANDREA
 NICOLAU, CLAUDE

<120> KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG, DÒNG TẾ BÀO LAI VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY

<130> 12593-001-187

<140> 2008/04916

<141> 2006-12-08

<150> EP 05027092.5

<151> 2005-12-12

<150> EP 06014729.5

<151> 2006-07-14

<150> EP 06020766.9

<151> 2006-10-02

<160> 45

<170> PatentIn phiên bản 3.3

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln
1				5					10					15

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln	Lys
1				5					10					15	

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	Gln	Lys
1				5					10					15

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met
1 5 10

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
1 5 10

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu

<210> 7

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

<210> 8
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 9
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 9
 gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta ttacattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcct 300
 tggacgttcg gtggaggcac caagctagaa atcaaa 336

<210> 10
 <211> 417
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 10
 atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttcttgcttc cagcagtgat 60
 gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120

tcttgcagat ctagtcagag ccttgtatat agtaatggag acacctatth acattggtac 180
 ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct 240
 ggggtcccag acagggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc 300
 agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttccttgg 360
 acgttcggtg gaggcaccaa gctagaaatc aaacgggctg atgctgcacc aactgta 417

<210> 11
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 11
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tctgtgagc cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120
 ccagacaaga ggctggaatt ggtcgcaagc atcaatagta atgggtgtag cacctattat 180
 ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
 ctgcaaata gaagctctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagtgggtgac 300
 tactggggcc aaggctccac tctcacagtc tctca 336

<210> 12
 <211> 408
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 12
 atgrasttsg ggytcagmtt grttttcctt gcccttatth taaaagggtg ccaatgtgag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtcctt gaaactctcc 120
 tgtgcagcct ctggattcac tttcagtagc tatggcatgt cttgggttcg ccagactcca 180
 gacaagaggc tggaattggt cgcaagcatc aatagtaatg gtggtagcac ctattatcca 240
 gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300
 caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag tgggtgactac 360
 tggggccaag gctccactct cacagtctcc tcagccaaaa caacaccc 408

<210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Asn hoặc Gln

<220>
 <221> MOD_RES

```

<222> (5)..(5)
<223> Ala, Val, Leu, norleucin, Met, Phe hoặc Ile

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Ala, Val, Leu, norleucin, Met, Phe hoặc Ile

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Ala, Val, Leu, norleucin, Met, Phe hoặc Ile

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Ala, Val, Leu, Ser hoặc Ile

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Glu hoặc Asp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Glu hoặc Asp

<400> 13
His Xaa Lys Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1          5          10

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> His, Asn, Gln, Lys hoặc Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Asn hoặc Gln

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> His, Asn, Gln, Lys hoặc Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Ala, Val, Leu, Ser hoặc Ile

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Ala, Val, Leu, Ser hoặc Ile

```

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Ala, Val, Leu, Ser hoặc Ile

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Glu hoặc Asp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Glu hoặc Asp

<400> 14
 Xaa His Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> His, Asn, Gln, Lys hoặc Arg

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Asn hoặc Gln

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Ala, Val, Leu, norleucin, Met, Phe hoặc Ile

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Ala, Val, Leu, Ser hoặc Ile

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Glu hoặc Asp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Glu hoặc Asp

<400> 15
 Xaa Xaa Lys Leu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 16
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Asn hoặc Gln

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Ala, Val, Leu, norleucin, Met, Phe hoặc Ile

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Ala, Val, Leu, Ser hoặc Ile

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Glu hoặc Asp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Glu hoặc Asp

<400> 16

His	Xaa	Lys	Leu	Xaa	Phe	Phe	Xaa	Xaa	Xaa
1			5						10

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> His, Asn, Gln, Lys hoặc Arg

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Asn hoặc Gln

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Ala, Val, Leu, norleucin, Met, Phe hoặc Ile

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Ala, Val, Leu, Ser hoặc Ile

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Glu hoặc Asp

<400> 17
 Xaa Xaa Lys Leu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Asp
 1 5 10

<210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Asn hoặc Gln

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Ala, Val, Leu, norleucin, Met, Phe hoặc Ile

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Ala, Val, Leu, Ser hoặc Ile

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Glu hoặc Asp

<400> 18
 His Xaa Lys Leu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Asp
 1 5 10

<210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> His, Asn, Gln, Lys hoặc Arg

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Asn hoặc Gln

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Lys, His, Asn, Gln hoặc Arg

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Ala, Val, Leu, norleucin, Met, Phe hoặc Ile

<220>
 <221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Ala, Val, Leu, Ser hoặc Ile

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Glu hoặc Asp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Glu hoặc Asp

<400> 19

Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Val His His Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
1 5 10

<210> 21

<211> 219

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 22

<211> 448

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

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

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110

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

Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
 130 135 140

Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
 145 150 155 160

Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Met
 165 170 175

Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val
 180 185 190

Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Thr Val Asp Lys Lys
 195 200 205

Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Pro Cys Pro Pro Cys
 210 215 220

Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu
 245 250 255

Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro
 260 265 270

Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala
 275 280 285

Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val
 290 295 300

Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Ile Leu
 340 345 350

Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser
 370 375 380

Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser
 405 410 415

Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg His Glu Gly
 420 425 430

Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 23
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 23
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15

<210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 24
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 25
 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
 1 5

<210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 26
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser
 1 5 10

<210> 27
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 27
 Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 28
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 28
 Gly Asp Tyr
 1

<210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> peptit được sử dụng trong thư viện thứ hai

<400> 29
 Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe
 1 5

<210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> peptit được sử dụng trong thư viện thứ hai

<400> 30
 Ala His His Gln Lys Leu Val Phe Phe
 1 5

<210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> peptit được sử dụng trong thư viện thứ hai

<400> 31
 Val Ala His Gln Lys Leu Val Phe Phe
 1 5

<210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> peptit được sử dụng trong thư viện thứ hai

<400> 32
 Val His Ala Gln Lys Leu Val Phe Phe
 1 5

<210> 33
 <211> 9
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>peptit được sử dụng trong thư viện thứ hai

<400> 33
 Val His His Ala Lys Leu Val Phe Phe
 1 5

<210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>peptit được sử dụng trong thư viện thứ hai

<400> 34
 Val His His Gln Ala Leu Val Phe Phe
 1 5

<210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>peptit được sử dụng trong thư viện thứ hai

<400> 35
 Val His His Gln Lys Ala Val Phe Phe
 1 5

<210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>peptit được sử dụng trong thư viện thứ hai

<400> 36
 Val His His Gln Lys Leu Ala Phe Phe
 1 5

<210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>peptit được sử dụng trong thư viện thứ hai

<400> 37
 Val His His Gln Lys Leu Val Ala Phe
 1 5

<210> 38
 <211> 9
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>peptit được sử dụng trong thư viện thứ hai

<400> 38
 Val His His Gln Lys Leu Val Phe Ala
 1 5

<210> 39
 <211> 9
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>peptit được sử dụng trong thư viện thứ ba

<400> 39
 His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala
 1 5

<210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>peptit được sử dụng trong thư viện thứ ba

<400> 40
 His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Gly
 1 5

<210> 41
 <211> 9
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>peptit được sử dụng trong thư viện thứ ba

<400> 41
 His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu
 1 5

<210> 42
 <211> 9
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>peptit được sử dụng trong thư viện thứ ba

<400> 42
 His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Ala
 1 5

<210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>peptit được sử dụng trong thư viện thứ ba

<400> 43
 Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
 1 5

<210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>peptit được sử dụng trong thư viện thứ ba

<400> 44
 Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Ala
 1 5

<210> 45
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 45
 Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
 1 5 10

A β 1-15 (ACI-24)

H₂N-Lys-Lys-Asp(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-His(Trt)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Gly-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Val-His(Trt)-His(Trt)-Gln(Trt)-Lys-Lys-OH

A β 1-16 (ACI-01)

Ac-Lys-Asp(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-His(Trt)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Gly-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Val-His(Trt)-His(Trt)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Lys-Gly-OH

A β 1-16(Δ 14) (ACI-02)

Ac-Lys-Asp(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-His(Trt)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Gly-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Val-His(Trt)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Lys-Gly-OH

A β 22-35 (ACI-11)

Ac-Lys-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Val-Gly-Ser(tBu)-Asn(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Lys-Gly-OH

A β 29-40 (ACI-12)

Ac-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Lys-Gly-OH

FIG 1

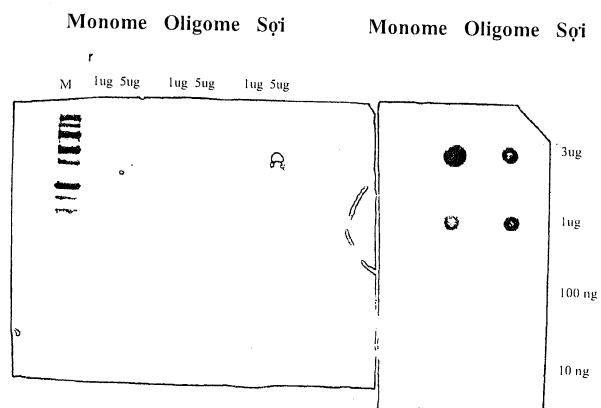


Fig 2a

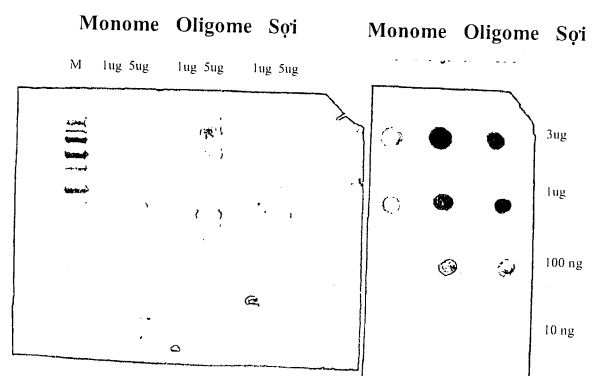


Fig 2b

FIG. 2

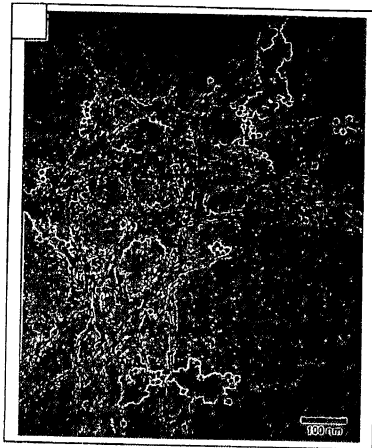


Fig 3a

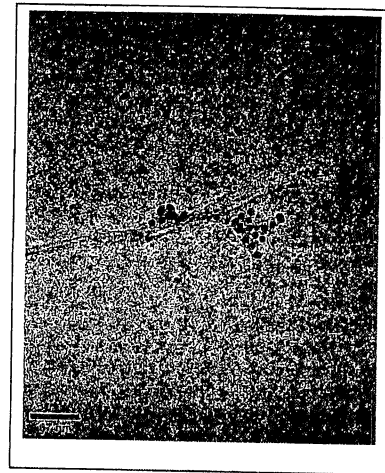
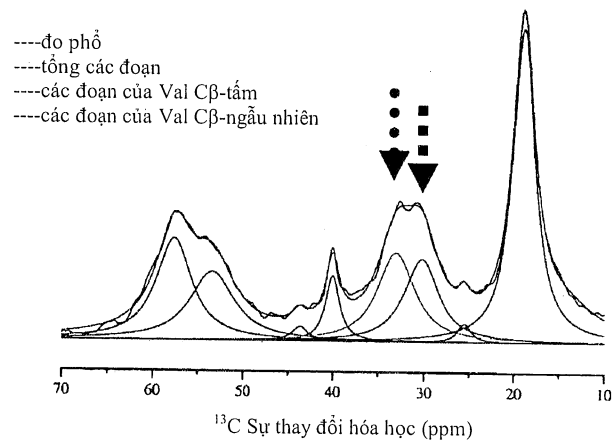
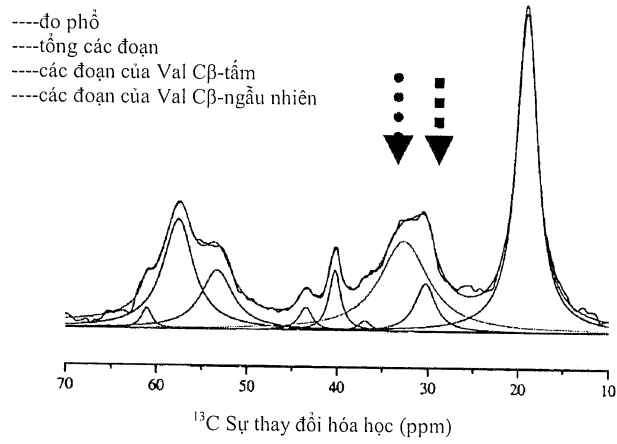


Fig 3b



Đối chứng



ACI-01-Ab7

-➤ Đoạn đối với β -tắm của ^{13}C -đánh dấu Val12
➤ Đoạn đối với ngẫu hứng được cuộn của ^{13}C -đánh dấu Val12

FIG: 4