



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 602 24 200 T2 2008.07.10

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 416 965 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 602 24 200.2

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US02/26321

(96) Europäisches Aktenzeichen: 02 766 022.4

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2003/015617

(86) PCT-Anmeldetag: 16.08.2002

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: 27.02.2003

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 12.05.2004

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 19.12.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 10.07.2008

(51) Int Cl.⁸: A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/567 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

313221 P 17.08.2001 US

313224 P 17.08.2001 US

334987 P 23.10.2001 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR

(73) Patentinhaber:

Eli Lilly and Co., Indianapolis, Ind., US;
Washington University, St. Louis, Mo., US

(74) Vertreter:

Westphal, Mussgnug & Partner, 80331 München

(72) Erfinder:

DEMATTOS, Ronald, St. Louis, MO 63108, US;

BALES, Kelly R., Cloverdale, IN 46120, US;

CUMMINS, David J., Indianapolis, IN 46256, US;

PAUL, Steven M., Carmel, IN 46032, US;

HOLTZMANN, David M., St. Louis, MO, US

(54) Bezeichnung: ASSAYVERFAHREN FÜR ALZHEIMER-KRANKHEIT

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingeleitet, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die Erfindung betrifft einen Test, der die Diagnose von präklinischer und klinischer Alzheimerscher Krankheit ermöglicht. Der Test beruht auf der Bewertung der Amyloid-beta(A β)-Peptid-Level im Plasma nach Verabreichung bestimmter anti-A β -Antikörper an ein Subjekt.

Technologischer Hintergrund

[0002] Eine Reihe von Symptomatiken, die zu kognitiven Defiziten, Schlaganfall, Gehirnblutung und allgemeinem Schwachsinn führen, scheinen mit neuritischen und zerebrovaskulären Plaques im Gehirn, die das Amyloid-beta-Peptid (A β) enthalten, verbunden zu sein. Zu diesen Krankheitszuständen gehören sowohl präklinische und klinische Alzheimersche Krankheit, Down-Syndrom, als auch präklinische und klinische zerebrale Amyloid-Angiopathie („cerebral amyloid angiopathy“, CAA). Die Amyloid-Plaques sind aus Amyloid-beta-Peptiden gebildet. Diese Peptide zirkulieren im Blut und in der Zerebrospinalflüssigkeit („cerebrospinal fluid“, CSF). Das A β -Peptid in zirkulierender Form ist aus 39–43 Aminosäuren (meistens 40 oder 42 Aminosäuren) zusammengesetzt, was sich aus der Spaltung eines allgemeinen Vorläufer-Proteins, des Amyloid-Vorläufer-Proteins, das häufig als APP bezeichnet wird, ergibt.

[0003] Es gibt Anzeichen dafür, die vermuten lassen, dass A β zwischen dem Gehirn und dem Blut hin und her transportiert werden kann (Ghersi-Egea, J.-F., et al., J. Neurochem. (1996) 67: 880–883; Zlokovic, B. V., et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. (1993) 67: 1034–1071; Shibata M., et al., J. Clin. Invest. (2000) 106: 1489–1499. Weiters befindet sich A β in den Plaques in einem Gleichgewicht mit löslichem A β in Gehirn und Blut (Kawarabayashi, T., et al., J. Neurosci. (2001) 21: 372–381), DeMattos et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci USA (2001) 98: 8850–8855.

[0004] Wie in der WO 01/4987 beschrieben, sind die gesamten zirkulierenden Level an A β -Peptid im CSF ähnlich bei normalen Individuen und bei Individuen mit einer Prädisposition für die Symptome der Alzheimer-schen Krankheit. Jedoch sind bei Individuen mit Alzheimerscher Krankheit die A β_{42} -Level im Durchschnitt geringer (Nitsch, R. M., et al., Ann. Neurol. (1995) 37: 512–518). Es ist bekannt, dass A β_{42} eher zur Aggregation neigt als A β_{40} , und wenn dies geschieht, bringt dies schädliche Folgen mit sich, wie die Ablagerung von A β in amyloid-Plaques, die Umwandlung von A β in toxische Formen, Nervenzellschädigung und eine Verhaltenschädigung, wie Demenz (Golde, T. E., et al., Biochem. Biophys. Acta. (2000) 1502: 172–187).

[0005] Die WO 01/62801 mit dem Titel „Humanized Antibodies that Sequester A β Peptide“, eingereicht am 26. Februar 2001, beschreibt Antikörper, welche die Blut-Hirn-Schranke nicht merkbar überqueren und welche A β -Peptide sequestrieren, die in biologischen Flüssigkeiten zirkulieren. Diese Antikörper sind als nützlich beschrieben für die präventive und therapeutische Behandlung von Krankheitszuständen, die mit der Bildung von A β -hältigen diffusen, neuritischen und zerebrovaskulären Plaques im Gehirn verbunden sind. Die Anmeldung beschreibt das Verabreichen der Antikörper und danach das Messen der zirkulierenden A β -Peptid-Levels im Blut, um den Fortschritt der Therapie zu bewerten. Es gibt jedoch keinen deutlichen Hinweis darauf, dass die A β -Peptid-Levels nach Verabreichung der Antikörper für den Krankheitszustand selbst diagnostisch sind. Die vorliegende Erfindung beruht auf dem überraschenden Ergebnis, dass erhöhte Level von sowohl A β_{40} als auch A β_{42} sowie das A β_{40} /A β_{42} -Verhältnis mit den Levels der A β -Peptid-Ablagerung im Gehirn korrelieren, wenn die Antikörper an ein Individuum verabreicht wurden. Somit sieht die Messung dieser Komponenten im Blut nach Verabreichung des Antikörpers einen einfachen, direkten diagnostischen Test für sowohl klinische als auch präklinische Alzheimersche Krankheit und damit verwandte neurologische Störungen vor.

[0006] Es gibt zusätzliche relevante Veröffentlichungen, die das Verhalten der A β -Peptid-Antikörper betreffen. Z. B. beschreibt die PCT-Veröffentlichung WO99/27944, die am 10. Juni 1999 veröffentlicht wurde, Methoden zur Induktion einer Immunantwort, um Amyloid-Ablagerungen zu verringern. Die Veröffentlichung Nr. WO99/60024, die am 25. November 1999 veröffentlicht wurde, beschreibt Verfahren zum Entfernen von Amyloid unter Verwendung von Anti-Amyloid-Antikörpern. Zusätzliche PCT-Veröffentlichungen, einschließlich der WO 00/72880, WO 00/72876 und WO 00/77178, beschreiben alle verschiedene Aktivitäten von Anti-A β -Peptid-Antikörpern. Es heißt, dass Antikörper, die gegen den N-Terminus dieses Peptids gerichtet sind, Plaques in einem transgenen murinen Modell verringern; die Immunisierung mit dem Amyloid selbst ist beschrieben, sowie auch Antikörper, die zum Katalysieren der Hydrolyse des Peptids entworfen wurden.

[0007] Es zeigte sich, dass ein Weg für den A β -Stoffwechsel über den Transport vom CNS zum Plasma ver-

läuft (Zlokovic, B. V., et al., Proc. Natl. Acad. Sci (USA) (1996) 93: 4229–4234; Ghersi-Egea, J-F., et al., J. Neuropathol. (1996) 67: 880–883). Außerdem zeigte es sich, dass A β im Plasma die Blut-Hirn-Schranke überqueren und ins Gehirn eindringen kann (Zlokovic, B. V., et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. (1993) 67: 1034–1040). Es zeigte sich auch, dass die Verabreichung bestimmter polyklonaler und monoklonaler A β -Antikörper die A β -Ablagerung in Amyloid-Plaques im APP^{V717F} transgenen Maus-Modell der Alzheimerschen Krankheit verringert (Bard, F., et al., Nature Med. (2000) 6: 916–919). Es hieß, dies sei auf bestimmte Anti-A β -Antikörper zurückzuführen, die die Blut-Hirn-Schranke überqueren und die Phagozytose von Amyloid-Plaques durch Mikroglia-Zellen stimulieren. Bei Bards Versuchen zeigten Tests von Gehirn-Schnitten ex vivo, dass das Vorhandensein von zugesetztem A β -Antikörper zusammen mit exogen zugesetzten Mikroglia die Phagozytose von A β induzierte, was zur Beseitigung von A β -Ablagerungen führte.

[0008] Die Level von sowohl löslichem A β ₄₀ als auch A β ₄₂ in CSF und Blut sind mit standardisierten Tests unter Verwendung von Antikörpern, die gegen Epitope entlang der A β gerichtet sind, leicht nachzuweisen. Solche Tests wurden z. B. in den U.S. Patenten 5,766,846; 5,837,672; und 5,593,846 berichtet. Diese Patente beschreiben die Herstellung muriner monoklonaler Antikörper gegen die zentrale Domäne des A β -Peptids, und es wurde berichtet, dass diese Epitope um die Positionen 16 und 17 herum und einschließlich derselben aufweisen. Antikörper, die gegen die N-terminale Region gerichtet sind, wurden ebenfalls beschrieben. Von mehreren monoklonalen Antikörpern wurde bestätigt, dass sie mit den Positionen 13–28 des A β -Peptids eine Immunreaktion bilden; diese banden nicht an ein Peptid, das die Positionen 17–28 darstellt, und bewiesen somit gemäß der zitierten Patente, dass es diese Region, einschließlich der Positionen 16–17 ist (die ◇-Sekretase-Stelle), die das Ziel dieser Antikörper war. Zu den Antikörpern, von welchen man weiß, dass sie zwischen den Aminosäuren 13 und 28 von A β binden, gehören die Maus-Antikörper 266 (m266), 4G8 und IC2.

Offenbarung der Erfindung

[0009] Es zeigte sich nun, dass Antikörper, die zum Durchführen von Tests auf A β -Peptid geeignet sind und die zur Behandlung von mit Amyloid-Plaques im Gehirn verbundenen Krankheitszuständen geeignet sind, eine Antwort hervorrufen können, die zu einer deutlichen Erhöhung des A β -Peptid-Levels im Blut führt, und dass dieser Level als diagnostischer Marker für klinische und präklinische Alzheimersche Krankheit verwendet werden kann. Diese Antikörper, die humanisiert sein können oder auch nicht, sequestrieren A β -Peptid aus seiner gebundenen, zirkulierenden Form im Blut und verändern die Clearance von löslichen und gebundenen Formen von A β in Zentralnervensystem und Plasma. Diese Antikörper und deren Fragmente binden spezifisch an ein Epitop zwischen den Aminosäuren 13 und 28 des A β -Moleküls. Die CDR dieser Antikörper kann vom monoklonalen Maus-Antikörper 266 (SEQ ID NO: 1 bis SEQ ID NO: 6) stammen. Zu den geeigneten Antikörpern zählen Antikörper und Fragmente davon, worin die variablen Regionen Sequenzen aufweisen, die die CDR vom Maus-Antikörper 266 und spezifische humane Gerüstsequenzen (SEQ ID NO: 7 bis SEQ ID NO: 10) umfassen, wobei die Antikörper annähernd die Bindungseigenschaften des Maus-Antikörpers beibehalten und in vitro und in vivo Eigenschaften haben, die funktionell dem Maus-Antikörper 266 äquivalent sind. Besonders geeignet sind humanisierte Antikörper und deren Fragmente, worin die leichte Kette SEQ ID NO: 11 und die schwere Kette SEQ ID NO: 12 ist.

[0010] So ist gemäß einem Aspekt die Erfindung auf ein Verfahren zur Diagnose von präklinischer oder klinischer Alzheimerscher Krankheit gerichtet, umfassend:

- (a) Messen von entweder
 - (i) dem Gehalt an A β ₄₀;
 - (ii) dem Gehalt an A β ₄₂; oder
 - (iii) dem Verhältnis von A β ₄₀/A β ₄₂

oder von mehreren davon;

in einer Blutprobe eines Subjekts, die in einem Zeitintervall nach Verabreichung einer Menge eines Antikörpers an dieses Subjekt erhalten wurde, wobei der Antikörper ein innerhalb der Positionen 13–28 von A β enthaltenes Epitop spezifisch bindet, oder eines Antikörpers, der ein A β -Peptid aus seiner gebundenen zirkulierenden Form im Blut sequestriert und die Clearance von löslichen und gebundenen Formen von A β im zentralen Nervensystem in Plasma verändert, wobei die Menge effektiv ist, die Gehalte/Level an zirkulierenden A β -Peptiden im Blut des Subjekts zu verändern, wenn das Subjekt sich in einem präklinischen oder klinischen Stadium der Alzheimerschen Krankheit befindet; und

(b) Vergleichen des Gehalts/Levels an A β ₄₀, A β ₄₂ oder des Verhältnisses von A β ₄₀/A β ₄₂ im Subjekt mit einem Kontrollwert der Gehalte/Level, wobei Gehalte/Level von A β ₄₀, A β ₄₂ oder das Verhältnis von A β ₄₀/A β ₄₂ im Subjekt, die im Vergleich zu den Kontrollgehalten/Kontrolllevel oder dem Kontrollverhältnis erhöht sind, das Subjekt als eines identifizieren, das sich in einem präklinischen oder klinischen Stadium der Alzheimerschen Krankheit befindet.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0011] **Fig. 1A, B und C** sind Diagramme, die die Level von $\text{A}\beta_{40}$ (**Fig. 1A**), $\text{A}\beta_{42}$ (**Fig. 1B**) und das $\text{A}\beta_{40}/\text{A}\beta_{42}$ -Verhältnis (**Fig. 1C**) im Plasma transgener Mäuse vor der Verabreichung des Antikörpers m266 und das Fehlen einer Korrelation mit $\text{A}\beta$ -Ablagerungen im Gehirn zeigen.

[0012] **Fig. 2A und B** sind Diagramme, die Plasma- $\text{A}\beta_{40}$ (**Fig. 2A**) und das Plasma- $\text{A}\beta_{40}/\text{A}\beta_{42}$ -Verhältnis (**Fig. 2B**) bei transgenen Mäusen eine Stunde nach Injektion des Antikörpers m266 und die signifikante Korrelation mit $\text{A}\beta$ -Ablagerungen im Gehirn zeigen.

[0013] **Fig. 3A, B und C** sind Diagramme, die die signifikanten Korrelationen der beiden $\text{A}\beta$ -Peptide (**Fig. 3A** und **3B**) und ihr Verhältnis (**Fig. 3C**) mit der $\text{A}\beta$ -Peptid-Ablagerung im Gehirn 24 Stunden nach Injektion des monoklonalen Antikörpers m266 zeigen.

[0014] **Fig. 4A, B und C** sind Diagramme, die die signifikanten Korrelationen der Eintrittsraten der beiden $\text{A}\beta$ -Peptide (**Fig. 4A** und **4B**) in die Zirkulation und ihr Verhältnis (**Fig. 4C**) und die $\text{A}\beta$ -Peptid-Ablagerung bei transgenen Mäusen zeigen.

[0015] **Fig. 5A und B** sind Diagramme, die eine alternative graphische Darstellung der $\text{A}\beta_{40}$ -Level im Plasma 24 Stunden (**Fig. 5A**) und 1 Stunde (**Fig. 5B**) nach m266-Injektion, korreliert mit den von $\text{A}\beta$ -Ablagerungen bedeckten Prozent des Hippocampus zeigen.

[0016] **Fig. 6** ist eine Tabelle, die Pearson-Korrelationskoeffizienten (Pearson r) und Signifikanz (P-Wert) zeigen, die zwischen Plasma $\text{A}\beta$ -Werten (vor und nach Injektion von m266) und der Hippocampus- $\text{A}\beta$ - oder Amyloid-Last bestimmt wurden.

Arten der Durchführung der Erfindung

[0017] Die $\text{A}\beta$ -Peptide, die in humanen biologischen Flüssigkeiten zirkulieren, stellen eine Carboxy-terminale Region eines Vorläufer-Proteins, das am Chromosom 21 codiert ist, dar. Aus den Ergebnissen von in vitro-Versuchen wurde berichtet, dass das $\text{A}\beta$ -Peptid in physiologischen Lösungen schlecht löslich ist, da es einen Abschnitt hydrophober Aminosäuren enthält, die Teil der Region sind, welche seinen längeren Vorläufer an den Lipid-Membranen von Zellen verankert. Es ist somit nicht überraschend, dass zirkulierendes $\text{A}\beta$ -Peptid normalerweise mit anderen Teilen („moieties“) komplexiert ist, die es an einer Aggregation hindern. Dies führte zu Schwierigkeiten beim Nachweis von zirkulierendem $\text{A}\beta$ -Peptid in biologischen Flüssigkeiten.

[0018] Die oben erwähnten Patent-Dokumente (U.S. Patente 5,766,846; 5,837,672 und 5,593,846) beschreiben die Herstellung von Antikörpern, einschließlich eines monoklonalen Antikörpers mit der Bezeichnung Klon 266 (m266), welcher gegen ein die Aminosäuren 13–28 des $\text{A}\beta$ -Peptids aufweisendes Peptid gezogen wurde und nachweislich spezifisch an dieses bindet. Die Anmelder stellten fest, dass sie nach Verabreichung von m266 an APP^{V717F}-Mäuse, ein Maus-Modell der Alzheimerschen Krankheit, $\text{A}\beta$ -Peptid-Level im Blutkreislauf messen können, die für die Amyloid-Plaque-Level im Gehirn diagnostisch sind. Somit sind diese Antikörper nicht nur zur Durchführung von Tests für zirkulierende $\text{A}\beta$ -Peptide per se nützlich, sondern auch für das Her vorrufen von zirkulierenden Blut-Level, die für die Menge der Amyloid-Plaque im Gehirn diagnostisch sind und somit nützlich sind für die Identifikation von Individuen in klinischen und präklinischen Stadien der Alzheimer-schen Krankheit. Ein solcher Antikörper, m266, bindet an die mittlere Region des $\text{A}\beta$ -Peptids.

[0019] Mit „monoklonaler Antikörper, der an die mittlere Region des $\text{A}\beta$ -Peptids bindet“ ist ein monoklonaler Antikörper (Mak oder Maks) gemeint, der eine Aminosäuresequenz bindet, welche ein Epitop darstellt, das zwischen den Positionen 13–28 von $\text{A}\beta$ enthalten ist. Es muss nicht auf die gesamte Region abgezielt werden. Solange der Antikörper mindestens ein Epitop innerhalb dieser Region bindet (insbesondere, z. B. einschließlich der α -Sekretase-Stelle 16–17 oder der Stelle, an welcher der Antikörper 266 bindet), sind solche Antikörper beim Verfahren der Erfindung wirksam.

[0020] Mit „Antikörper“ ist ein monoklonaler Antikörper per se, oder ein immunologisch wirksames Fragment davon, wie ein F_{ab}^- , F_{ab^-} , oder $\text{F}_{(\text{ab})_2^-}$ -Fragment davon, gemeint. In einigen Zusammenhängen werden hierin Fragmente spezifisch zur Betonung erwähnt; trotzdem sei verstanden, dass unabhängig davon, ob Fragmente spezifisch angegeben werden, der Ausdruck „Antikörper“ solche Fragmente sowie auch Einzelketten-Formen inkludiert. Solange das Protein die Fähigkeit beibehält, spezifisch an sein beabsichtigtes Ziel zu binden, und in diesem Fall α -Peptid von seinen Träger-Proteinen im Blut zu sequestrieren, ist es im Ausdruck „Antikörper“

mit eingeschlossen. Beispielsweise ebenso in der Definition „Antikörper“ mit eingeschlossen sind Einzelketten-Formen, allgemein als F_v -Regionen bezeichnet, von Antikörpern mit dieser Spezifität. Vorzugsweise – jedoch nicht unbedingt – werden die bei der Erfindung nützlichen Antikörper rekombinant erzeugt, da eine Manipulation der typischerweise murinen oder nicht-humanen Antikörper mit der passenden Spezifität nötig ist, um sie in die humanisierte Form überzuführen. Die Antikörper können glykosyliert sein oder auch nicht, obwohl glykosylierte Antikörper bevorzugt sind. Die Antikörper sind über Disulfidbrücken richtig vernetzt, was wohlbekannt ist.

[0021] Es ist bekannt, dass die grundlegende Antikörper-Struktur-einheit ein Tetramer umfasst. Jedes Tetramer ist aus zwei identischen Paaren Polypeptidketten zusammengesetzt, wobei jedes Paar eine „leichte“ (etwa 25 kDa) und eine „schwere“ Kette (etwa 50–70 kDa) aufweist. Der Amino-terminale Teil jeder Kette inkludiert eine variable Region von etwa 100 bis 110 oder mehr Aminosäuren, die vor allem für die Antigen-Erkennung verantwortlich ist. Der Carboxy-terminale Teil jeder Kette definiert eine konstante Region, die vor allem für die Effektor-Funktion verantwortlich ist.

[0022] Leichte Ketten sind als gamma, mu, alpha und lambda klassifiziert. Schwere Ketten sind als gamma, mu, alpha, delta oder epsilon klassifiziert und definieren den Isotyp des Antikörpers als IgG, IgM, IgA, IgD bzw. IgE. Innerhalb der leichten und schweren Ketten sind die variablen und konstanten Regionen durch eine „J“-Region von etwa 12 oder mehr Aminosäuren verbunden, wobei die schwere Kette auch eine „D“-Region von etwa 10 mehr Aminosäuren inkludiert.

[0023] Die variablen Regionen jedes Paares aus leichter/schwerer Kette bilden die Antikörperbindungsstelle. Somit hat ein intakter Antikörper zwei Bindungsstellen. Die Ketten weisen alle dieselbe allgemeine Struktur relativ konservierter Gerüstregionen („framework regions“, FR) auf, verbunden durch drei hypervariable Regionen, die auch Komplementaritäts-bestimmende Regionen („complementarity determining regions“) oder CDR genannt werden. Die CDR von den beiden Ketten jedes Paares sind durch die Gerüstregionen zum Fluchten gebracht, was die Bindung an ein spezifisches Epitop ermöglicht. Vom N-Terminus zum C-Terminus weisen beide, die leichte und die schwere Kette, die Domänen FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 und FR4 auf. Die Zuordnung von Aminosäuren zu jeder Domäne erfolgt in Übereinstimmung mit wohlbekannten Grundsätzen [Kabat „Sequences of Proteins of Immunological Interest“ National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 und 1991; Chothia, et al., J. Mol. Bio. (1987) 196: 901–917; Chothia, et al., Nature (1989) 342: 878–883].

[0024] Wie auf dem Gebiet wohlverstanden, können monoklonale Antikörper mit der richtigen Spezifität leicht erzeugt werden mittels Standard-Techniken der Immunisierung von Säugern, der Bildung von Hybridomen aus Antikörper-erzeugenden Zellen dieser Säuger oder Immortalisieren auf andere Weise und Züchten der Hybridome oder immortalisierten Zellen, um sie auf ihre passende Spezifität zu beurteilen. Im vorliegenden Fall könnten solche Antikörper durch Immunisieren von z. B. einem Menschen, einem Kaninchen, einer Ratte oder einer Maus mit einem Peptid erzeugt werden, das ein Epitop darstellt, welches die 13–28-Region des A β -Peptids oder eine geeignete Unterregion desselben umfasst. Materialien zur rekombinanten Manipulation können erhalten werden, indem man die Nukleotidsequenzen, die den gewünschten Antikörper codieren, aus dem Hybridom oder einer anderen Zelle, die ihn produziert, wiedergewinnt. Diese Nukleotidsequenzen können dann manipuliert werden, um sie gewünschtenfalls in humanisierter Form vorzusehen.

[0025] Es kann erwünscht sein, humanisierte Formen dieser Antikörper zu verwenden, um die gewünschten zirkulierenden Level der Peptide in Menschen auszulösen. Da die Verabreichung kurzfristig und nur für diagnostische Zwecke ist, kann dies unnötig sein, es ist jedoch eindeutig bevorzugt, um jegliche Möglichkeit einer Immunantwort zu vermeiden, und daher ist die Verwendung humanisierter Formen für diesen Zweck bevorzugt. Natürlich können für die Durchführung des Tests der A β -Level ex vivo (z. B. mittels ELISA) die murinen Formen selbst verwendet werden.

[0026] Mit „humanisierter Antikörper“ ist ein Antikörper gemeint, der teilweise oder vollständig aus Aminosäuresequenzen zusammengesetzt ist, die aus einer humanen Antikörper-Keimbahn stammen, durch Verändern der Sequenz eines Antikörpers mit nicht-humanen Komplementaritäts-bestimmenden Regionen (CDR). Die einfachste derartige Veränderung kann einfach darin bestehen, dass die konstante murine Region durch die konstante Region eines humanen Antikörpers ersetzt wird, was somit zu einer human/murinen Chimäre führt, welche eine ausreichend geringe Immunogenität haben kann, dass sie für eine pharmazeutische Verwendung akzeptabel ist. Vorzugsweise ist jedoch die variable Region des Antikörpers und selbst die CDR auch durch Techniken, die inzwischen auf dem Gebiet wohlbekannt sind, humanisiert. Die Gerüstregionen der variablen Regionen werden durch die entsprechenden humanen Gerüstregionen ersetzt, wobei die nicht-humane CDR im Wesentlichen intakt bleibt, oder indem sogar die CDR durch Sequenzen ersetzt wird, die aus einem huma-

nen Genom stammen. Vollständig humane Antikörper werden in genetisch modifizierten Mäusen erzeugt, deren Immunsysteme verändert wurden, so dass sie den humanen Immunsystemen entsprechen. Wie oben erwähnt, reicht es für die Verwendung bei den Methoden der Erfindung aus, ein immunologisch spezifisches Fragment des Antikörpers zu verwenden, einschließlich Fragmenten, die Einzelketten-Formen darstellen.

[0027] Ein humanisierter Antikörper bezieht sich somit auf einen Antikörper, der ein humanes Gerüst hat, mindestens eine CDR von einem nicht-humanen Antikörper hat, und bei welchem jegliche vorhandene konstante Region im Wesentlichen identisch ist mit einer humanen konstanten Immunglobulin-Region, d. h. zumindest zu etwa 85–90%, vorzugsweise zu 95% identisch ist. Folglich sind alle Teile eines humanisierten Antikörpers, außer gegebenenfalls die CDRs, im Wesentlichen identisch mit korrespondierenden Teilen einer oder mehrerer nativer humarer Immunglobulin-Sequenzen.

[0028] Beispielsweise würde ein humanisiertes Immunglobulin typischerweise nicht einen chimären Antikörper mit variabler Maus-Region/konstanter humarer Region umfassen.

[0029] Das Entwerfen humanisierter Immunglobuline kann wie folgt durchgeführt werden. Wenn eine Aminosäure in die folgende Kategorie fällt, wird die Gerüst-Aminosäure eines zu verwendenden humanen Immunglobulins (Akzeptor-Immunglobulin) durch eine Gerüst-Aminosäure von einem CDR-vorbehenden nicht-humanen Immunglobulin (Donor-Immunglobulin) ersetzt: (a) die Aminosäure in der humanen Gerüst-Region des Akzeptor-Immunglobulins ist für humanes Immunglobulin an dieser Position ungewöhnlich, wogegen die entsprechende Aminosäure im Donor-Immunglobulin für humanes Immunglobulin an dieser Position typisch ist; (b) die Position der Aminosäure ist unmittelbar angrenzend an eine der CDRs; oder (c) irgendein Seitenketten-Atom einer Gerüst-Aminosäure liegt innerhalb von etwa 5–6 Angstrom (von Mittelpunkt zu Mittelpunkt) von irgendeinem Atom einer CDR-Aminosäure in einem dreidimensionalen Immunglobulin-Modell [Queen, et al., op. cit., und Co, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88: 2869]. Wenn die Aminosäure in der humanen Gerüst-Region des Akzeptor-Immunglobulins und eine entsprechende Aminosäure im Donor-Immunglobulin jeweils ungewöhnlich für humanes Immunglobulin an dieser Position sind, wird eine solche Aminosäure durch eine Aminosäure ersetzt, die für humanes Immunglobulin an dieser Position typisch ist.

[0030] Ein bevorzugter humanisierter Antikörper ist eine humanisierte Form des Maus-Antikörpers 266. Die CDRs von humanisiertem 266 haben die folgenden Aminosäuresequenzen:
die leichte Kette CDR1:

1	5	10	15												
Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Ile	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asn	Ala	Tyr	Leu	His
(SEQ ID NO:1)															

die leichte Kette CDR2:

1	5										
Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Pha	Ser	(SEQ ID NO:2)				

die leichte Kette CDR3:

1	5												
Ser	Gln	Ser	Thr	His	Val	Pro	Trp	Thr	(SEQ ID NO:3)				

die schwere Kette CDR1:

1	5								
Arg	Tyr	Ser	Met	Ser	(SEQ ID NO:4)				

die schwere Kette CDR2:

1	5	10	15													
Gln	Ile	Asn	Ser	Val	Gly	Asn	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Val	Lys	Gly
(SEQ ID NO:5)																

und die schwere Kette CDR3:

1			
Gly Asp Tyr (SEQ ID NO:6).			

[0031] Eine bevorzugte variable Region der leichten Kette eines humanisierten Antikörpers der vorliegenden Erfindung hat die folgende Aminosäure-Sequenz, in welcher das Gerüst von humanen Keimbahn-Vk-Segmenten DPK18 und dem J-Segment Jkl herrührte, mit mehreren Aminosäure-Substitutionen an den Consensus-Aminosäuren in derselben humanen V-Untergruppe, um die potentielle Immunogenität zu verringern:

1	5	10	15											
Asp	Xaa	Val	Met	Thr	Gln	Xaa	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Xaa	Xaa
				20				25				30		
Gly	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Xaa
					35				40			45		
Tyr	Ser	Asp	Gly	Asn	Ala	Tyr	Leu	His	Trp	Phe	Leu	Gln	Lys	Pro
					50				55			60		
Gly	Gln	Ser	Pro	Xaa	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe
					65				70			75		
Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp
					80				85			90		
Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Xaa	Gly	Val
					95				100			105		
Tyr	Tyr	Cys	Ser	Gln	Ser	Thr	His	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Xaa
					110									
.														
Gly Thr Xaa Xaa Glu Ile Lys Arg (SEQ ID NO:7)														

worin:

- Xaa an Position 2 Val oder Ile ist;
- Xaa an Position 7 Ser oder Thr ist;
- Xaa an Position 14 Thr oder Ser ist;
- Xaa an Position 15 Leu oder Pro ist;
- Xaa an Position 30 Ile oder Val ist;
- Xaa an Position 50 Arg, Gln oder Lys ist;
- Xaa an Position 88 Val oder Leu ist;
- Xaa an Position 105 Gln oder Gly ist;
- Xaa an Position 108 Lys oder Arg ist; und
- Xaa an Position 109 Val oder Leu ist.

[0032] Eine bevorzugte variable Region der schweren Kette eines humanisierten Antikörpers hat die folgende Aminosäuresequenz, bei welcher das Gerüst von den humanen Keimbahn-VH-Segmenten DP53 und dem J-Segment JH4 herrührte, mit mehreren Aminosäure-Substitutionen an den Consensus-Aminosäuren in derselben humanen Untergruppe, um die potentielle Immunogenität zu verringern:

1	5	10	15
Xaa Val Gln Leu Val Glu Xaa Gly Gly		Leu Val Gln Pro Gly	
20	25	30	
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser	Gly Phe Thr Phe Ser		
35	40	45	
Arg Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
50	55	60	
Xaa Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr			
65	70	75	
Pro Asp Xaa Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Xaa			
80	85	90	
Xaa Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Xaa Asp			
95	100	105	
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
110			
Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO:8)			

worin:

Xaa an Position 1 Glu oder Gln ist;
 Xaa an Position 7 Ser oder Leu ist;
 Xaa an Position 46 Glu, Val, Asp oder Ser ist;
 Xaa an Position 63 Thr oder Ser ist;
 Xaa an Position 75 Ala, Ser, Val oder Thr ist;
 Xaa an Position 76 Lys oder Arg ist;
 Xaa an Position 89 Glu oder Asp ist; und
 Xaa an Position 107 Leu oder Thr ist.

[0033] Eine besonders bevorzugte variable Region der leichten Kette eines humanisierten Antikörpers hat die folgende Aminosäuresequenz, bei welcher das Gerüst von humanen Keimbahn-V_k-Segmenten DPK18 und dem J-Segment JKL herrührte, mit mehreren Aminosäure-Substitutionen an den Consensus-Aminosäuren in derselben humanen V-Untergruppe, um die potentielle Immunogenität zu verringern:

1	5	10	15
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu			
20	25	30	
Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro			
50	55	60	
Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe			
65	70	75	
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp			
80	85	90	
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val			
95	100	105	
Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln			
110			
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg (SEQ ID NO:9).			

[0034] Eine besonders bevorzugte variable Region der schweren Kette eines humanisierten Antikörpers hat die folgende Aminosäuresequenz, bei welcher das Gerüst von den humanen Keimbahn-V_H-Segmenten DP53 und dem J-Segment JH4 herrührte:

1 5 10 15
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 20 25 30
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 35 40 45
 Arg Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr
 65 70 75
 Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
 80 85 90
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 95 100 105
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO:10).

[0035] Eine bevorzugte leichte Kette für einen humanisierten Antikörper hat die Aminosäuresequenz:

1 5 10 15
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu
 20 25 30
 Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 80 85 90
 Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val
 95 100 105
 Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln
 110 115 120
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
 125 130 135
 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
 140 145 150
 Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 155 160 165
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 170 175 180
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 185 190 195
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 200 205 210
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 215
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys (SEQ ID NO:11).

[0036] Eine bevorzugte schwere Kette für einen humanisierten Antikörper hat die Aminosäuresequenz:

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

80	85	90
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp		
95	100	105
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
110	115	120
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
125	130	135
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
140	145	150
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
155	160	165
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe		
170	175	180
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val		
185	190	195
Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys		
200	205	210
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
215	220	225
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro		
230	235	240
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
245	250	255
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr		
260	265	270
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe		
275	280	285
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
290	295	300
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
305	310	315
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
320	325	330
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
335	340	345
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
350	355	360
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		

365	370	375
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
380	385	390
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
395	400	405
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
410	415	420
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
425	430	435
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
440		
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys (SEQ ID NO:12).		

[0037] Andere Sequenzen sind für die leichten und schweren Ketten für die humanisierten Antikörper und für den humanisierten 266 möglich. Die Immunglobuline können zwei Paare von Komplexen aus leichter Kette/schwerer Kette aufweisen, wobei mindestens eine Kette eine oder mehrere Maus-Komplementaritäts-bestimmende Regionen aufweist, die funktionell mit humanen Gerüstregionen-Segmenten verknüpft sind.

[0038] Ausgehend von der Position 56 der variablen Region der schweren Kette enthalten sowohl m266 als auch humanisierter 266 die Sequenz Asn-Ser-Thr. Diese Sequenz ist ein Beispiel für das Asn-X-Ser/Thr-Signal für die N-verbundene Glykosylierung, worin das Asn die Stelle der Befestigung von N-verbundenen Glykosyl-Ketten ist. Sowohl m266 als auch humanisierter 266 sind an dieser Stelle umfassend glykosyliert. Ganz unverhersagbar und vorteilhaft ist die Affinität von humanisiertem 266, der in der schweren Kette CDR2 deglykosyliert ist, für A β -Peptid deutlich höher als die von humanisiertem 266. Die schwere Kette CDR2 von deglykosyliertem humanisiertem 266 hat die folgenden Aminosäuresequenzen:
schwere Kette CDR2:

1	5	10	15
Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly			
(SEQ ID NO:13)			

worin:

Xaa an Position 7 irgendeine Aminosäure ist, mit der Maßgabe, dass wenn Xaa an Position 8 weder Asp noch Pro ist und Xaa an Position 9 Ser oder Thr ist, Xaa an Position 7 dann nicht Asn ist:

Xaa an Position 8 irgendeine Aminosäure ist, mit der Maßgabe, dass wenn Xaa an Position 7 Asn ist und Xaa an Position 9 Ser oder Thr ist, Xaa an Position 8 dann Asp oder Pro ist; und

Xaa an Position 9 irgendeine Aminosäure ist, mit der Maßgabe, dass wenn Xaa an Position 7 Asn ist und Xaa an Position 8 weder Asp noch Pro ist, Xaa an Position 9 dann weder Ser noch Thr ist.

[0039] Mit „irgendeine Aminosäure“ ist jede natürlich vorkommende Aminosäure gemeint. Bevorzugte natürlich vorkommende Aminosäuren sind Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp und Tyr.

[0040] Ein bevorzugter deglykosylierter humanisierter Antikörper ist eine humanisierte Form von m266, wobei die deglykosylierte schwere Kette CDR2 SEQ ID NO: 13 ist, worin:

Xaa an Position 7 der SEQ ID NO: 13 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp und Tyr, mit der Maßgabe, dass wenn Xaa an Position 8 weder Asp noch Pro ist und Xaa an Position 9 Ser oder Thr ist, Xaa an Position 7 dann nicht Asn ist;

Xaa an Position 8 der SEQ ID NO: 13 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp und Tyr, mit der Maßgabe, dass wenn Xaa an Position 7 Asn ist und Xaa an Position 9 Ser oder Thr ist, Xaa an Position 8 dann Asp oder Pro ist; und

Xaa an Position 9 der SEQ ID NO: 13 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp und Tyr, mit der Maßgabe, dass wenn Xaa an Position 7 Asn ist und Xaa an Position 8 weder Asp noch Pro ist, Xaa an Position 9 dann weder Ser noch Thr ist.

[0041] Eine bevorzugte variable Region der schweren Kette eines deglykosylierten humanisierten Antikörpers hat die folgende Aminosäuresequenz, worin das Gerüst vom humanen Keimbahn-VH-Segment DP53 und dem J-Segment JH4 hergeleitet ist, mit mehreren aminosäuresubstitutionen an den Consensus-Aminosäuren in derselben humanen Untergruppe, um die potentielle Immunogenität zu verringern, und wobei die N-Glykosylierungsstelle in der schweren Kette CDR2 modifiziert ist, so dass sie nicht N-glykosyliert werden kann:

1	5	10	15
Xaa Val Gln Leu Val Glu Xaa Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly			
20	25	30	
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser			
35	40	45	
Arg Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
50	55	60	
Xaa Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Tyr Tyr			
65	70	75	
Pro Asp Xaa Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Xaa			
80	85	90	
Xaa Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Ile Arg Ala Xaa Asp			
95	100	105	
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
110			
Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser		(SEQ ID NO:14)	

worin:

Xaa an Position 1 Glu oder Gln ist;

Xaa an Position 7 Ser oder Leu ist;

Xaa an Position 46 Glu, Val, Asp oder Ser ist;

Xaa an Position 56 irgendeine Aminosäure ist, mit der Maßgabe, dass wenn Xaa an Position 57 weder Asp noch Pro ist und Xaa an Position 59 Ser oder Thr ist, Xaa an Position 56 dann nicht Asn ist;

Xaa an Position 57 irgendeine Aminosäure ist, mit der Maßgabe, dass wenn Xaa an Position 56 Asn ist und Xaa an Position 58 Ser oder Thr ist, Xaa an Position 57 dann Asp oder Pro ist; und

Xaa an Position 58 irgendeine Aminosäure ist, mit der Maßgabe, dass wenn Xaa an Position 56 Asn ist und Xaa an Position 57 weder Asp noch Pro ist, Xaa an Position 58 dann weder Ser noch Thr ist;

Xaa an Position 63 Thr oder Ser ist;

Xaa an Position 75 Ala, Ser, Val oder Thr ist;

Xaa an Position 76 Lys oder Arg ist;

Xaa an Position 89 Glu oder Asp ist; und

Xaa an Position 107 Leu oder Thr ist.

[0042] Eine besonders bevorzugte variable Region der schweren Kette eines deglykosylierten humanisierten Antikörpers hat die folgende Aminosäuresequenz, wobei das Gerüst vom humanen Keimbahn-VH-Segment DP53 und dem J-Segment JH4 herrührte, und wobei die N-Glykosylierungsstelle in der schweren Kette CDR2 modifiziert ist, so dass sie nicht N-glykosyliert werden kann:

1	5	10	15
Glu Val Gln Leu Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly			
20	25	30	
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser			
35	40	45	
Arg Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
50	55	60	
Glu Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr			
65	70	75	
Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala			
80	85	90	
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp			
95	100	105	
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
110			
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		(SEQ ID NO:15).	

worin:

Xaa an Position 56 irgendeine Aminosäure ist, mit der Maßgabe, dass wenn Xaa an Position 57 weder Asp noch Pro ist und Xaa an Position 59 Ser oder Thr ist, Xaa an Position 56 dann nicht Asn ist;
 Xaa an Position 57 irgendeine Aminosäure ist, mit der Maßgabe, dass wenn Xaa an Position 56 Asn ist und Xaa an Position 58 Ser oder Thr ist, Xaa an Position 57 dann Asp oder Pro ist; und
 Xaa an Position 58 irgendeine Aminosäure ist, mit der Maßgabe, dass wenn Xaa an Position 56 Asn ist und Xaa an Position 57 weder Asp noch Pro ist, Xaa an Position 58 dann weder Ser noch Thr ist.

[0043] Eine bevorzugte schwere Kette für einen deglykosylierten humanisierten Antikörper, worin die N-Glykosylierungsstelle in der schweren Kette CDR2 modifiziert ist, so dass sie nicht N-glykosyliert werden kann, hat die Aminosäuresequenz:

1	5	10	15
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly			
20	25	30	
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser			
35	40	45	
Arg Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
50	55	60	
Glu Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr			
65	70	75	
Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala			
80	85	90	
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp			
95	100	105	
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
110	115	120	
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val			
125	130	135	
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Thr Ser Gly Gly Thr Ala			
140	145	150	
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr			
155	160	165	
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe			
170	175	180	
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val			
185	190	195	
Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys			
200	205	210	
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Val			
215	220	225	
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro			
230	235	240	
Ala Pro Gln Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
245	250	255	
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr			
260	265	270	
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe			
275	280	285	
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys			

290	295	300
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
305	310	315
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
320	325	330
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
335	340	345
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
350	355	360
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
365	370	375
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
380	385	390
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
395	400	405
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
410	415	420
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
425	430	435
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
440		
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		(SEQ ID NO:16)

worin:

Xaa an Position 56 irgendeine Aminosäure ist, mit der Maßgabe, dass wenn Xaa an Position 57 weder Asp noch Pro ist und Xaa an Position 59 Ser oder Thr ist, Xaa an Position 56 dann nicht Asn ist;
 Xaa an Position 57 irgendeine Aminosäure ist, mit der Maßgabe, dass wenn Xaa an Position 56 Asn ist und Xaa an Position 58 Ser oder Thr ist, Xaa an Position 57 dann Asp oder Pro ist; und
 Xaa an Position 58 irgendeine Aminosäure ist, mit der Maßgabe, dass wenn Xaa an Position 56 Asn ist und Xaa an Position 57 weder Asp noch Pro ist, Xaa an Position 58 dann weder Ser noch Thr ist.

[0044] Bevorzugte deglykosyierte 266-Antikörper mit der variablen schweren Region gemäß SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 und SEQ ID NO: 16 sind jene, worin:
 Xaa an Position 56 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Ala, Gly, His, Asn, Gln, Ser und Thr, mit der Maßgabe, dass wenn Xaa an Position 58 Ser oder Thr ist, Xaa an Position 56 dann nicht Asn ist;
 Xaa an Position 57 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Ala, Gly, His, Asn, Gln, Ser und Thr; und
 Xaa an Position 58 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Ala, Gly, His, Asn, Gln, Ser und Thr, mit der Maßgabe, dass wenn Xaa an Position 56 Asn ist, Xaa an Position 58 dann weder Ser noch Thr ist.

[0045] Bevorzugte Sequenzen für CDR2 (Positionen 56, 57 und 58) der schweren Kette SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 und SEQ ID NO: 16 inkludieren jene, bei welchen nur eine einzige Aminosäure verändert ist, jene, bei welchen nur zwei Aminosäuren verändert sind, oder alle drei verändert sind. Es ist bevorzugt, Asn an Position 56 zu ersetzen. Es ist bevorzugt, Thr an Position 58 mit einer anderen Aminosäure als Ser zu ersetzen. Es ist bevorzugt, die N-Glykosylierungsstelle in der CDR2 der 266-schweren Kette nicht zu zerstören durch Ersetzen von Ser an Position 57 mit Pro oder Asp. Konservative Substitutionen an einer, zwei oder allen drei Positionen sind bevorzugt. Die am meisten bevorzugten Spezies sind jene, in welchen Asn an Position 56 durch Ser oder Thr ersetzt ist. Besonders bevorzugte Antikörper sind jene, in welchen Ser oder Thr an Position 56 ist, Ser an Position 57 ist und Thr an Position 58 der SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 oder SEQ ID NO: 16 ist.

[0046] Besonders bevorzugte deglykosyierte Spezies sind Antikörper, die eine leichte Kette der SEQ ID NO: 11 und eine schwere Kette der SEQ ID NO: 16 aufweisen, wobei in SEQ ID NO: 16 Xaa an Position 56 Ser ist, Xaa an Position 57 Ser ist und Xaa an Position 58 Thr ist („N56S“), oder wobei in SEQ ID NO: 16 Xaa an Po-

sition 56 Thr ist, Xaa an Position 57 Ser ist und Xaa an Position 58 Thr ist („N56T“).

[0047] Die Herstellung der bei der Erfindung nützlichen Antikörper umfasst typischerweise rekombinante Techniken, wie in der oben zitierten WO 01/62801 beschrieben.

[0048] Die Antikörper (einschließlich immunologisch reaktiver Fragmente) werden einem Subjekt verabreicht, welches im Hinblick auf Krankheitszustände evaluiert werden soll, welche mit Ab-Ablagerungen verbunden sind, wie klinische oder präklinische Alzheimersche Krankheit oder klinische oder präklinische Amyloid-Angiopathie, unter Verwendung von Standard-Verabreichungstechniken, vorzugsweise peripher (d. h. nicht durch Verabreichung ins Zentralnervensystem) durch intravenöse, intraperitoneale, subkutane, pulmonale, transdermale, intramuskuläre, intranasale, bukkale, sublinguale Verabreichung oder Verabreichung in Zäpfchenform.

[0049] Die Zusammensetzungen zur Verabreichung sind so entworfen, dass sie für die ausgewählte Verabreichungsart geeignet sind, und pharmazeutisch akzeptable Exzipienten, wie Dispergierungsmittel, Puffer, grenzflächenaktive Mittel, Konservierungsmittel, Solubilisierungsmittel, Isotoniemittel, Stabilisatoren u. dgl. werden, soweit angemessen, verwendet. Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton PA, jüngste Ausgabe, liefert eine Übersicht über Formulierungstechniken, wie sie dem Fachmann allgemein bekannt sind. Es kann besonders nützlich sein, die Löslichkeitsmerkmale der Antikörper zu verändern und sie mehr lipophil zu machen, z. B. indem man sie in Liposome verkapselt oder durch Blockieren von polaren Gruppen.

[0050] Die periphere systemische Abgabe durch intravenöse oder intraperitoneale oder subkutane Injektion wird bevorzugt. Geeignete Vehikel für solche Injektionen sind bekannt („straight-forward“). Außerdem kann jedoch die Verabreichung auch durch die Schleimhäute bewirkt werden durch Nasenaerosole oder durch Zäpfchen. Geeignete Formulierungen für solche Verabreichungsarten sind wohlbekannt und inkludieren typischerweise grenzflächenaktive Mittel, die den Transfer über die Membran erleichtern. Solche grenzflächenaktive Mittel stammen oft von Steroiden oder sind kationische Lipide, wie N-[1-(2,3-Dioleoyl)-propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid (DOTMA) oder verschiedene Verbindungen, wie Cholesterinhemisuccinat, Phosphatidylglycerine u. dgl.

[0051] Die Konzentration des humanisierten Antikörpers in Formulierungen reicht von so wenig wie etwa 0,1 Gew.-% bis so viel wie 15 oder 20 Gew.-% und wird vor allem auf Basis von Fluid-Volumina, Viskositäten usw. gewählt, gemäß der bestimmten Verabreichungsart, die ausgewählt wurde. So könnte eine typische Zusammensetzung zur Injektion so zusammengesetzt sein, dass sie 1 ml steriles gepuffertes Wasser von mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung und 1–1000 mg, vorzugsweise 10–100 mg, des humanisierten Antikörpers enthält. Die Formulierung könnte steril-filtriert werden, nachdem die Formulierung hergestellt worden ist, oder auf andere Weise mikrobiologisch akzeptabel gemacht werden. Eine typische Zusammensetzung zur intravenösen Infusion könnte Volumina zwischen 1–250 ml Fluid, wie sterile Ringer-Lösung, und 1–100 mg pro ml oder mehr an Antikörper-Konzentration aufweisen. Therapeutische Mittel können zur Lagerung gefroren oder lyophilisiert werden und vor der Verwendung in einem geeigneten sterilen Träger rekonstituiert werden. Die Lyophilisierung und Rekonstituierung können zu unterschiedlichen Graden an Antikörper-Aktivitätsverlust führen (bei herkömmlichen Immunglobulinen z. B. neigen die IgM-Antikörper dazu, einen größeren Aktivitätsverlust zu haben als IgG-Antikörper). Es kann sein, dass die Dosierungen zwecks Kompensation angeglichen werden müssen. Der pH-Wert der Formulierung wird so gewählt, dass die (chemische und physikalische) Antikörper-Stabilität und die Annehmlichkeit für den Patienten bei der Verabreichung sich die Waage halten. Im Allgemeinen wird ein pH-Wert zwischen 4 und 8 toleriert.

[0052] Obwohl die voranstehenden Verfahren am praktischsten und am meisten geeignet zu sein scheinen, um Proteine, wie humanisierte Antikörper, durch geeignete Adaptierung zu verabreichen, können andere Verabreichungstechniken, wie transdermale Verabreichung und orale Verabreichung, verwendet werden, vorausgesetzt, es wird die richtige Formulierung entworfen.

[0053] Außerdem kann es wünschenswert sein, Formulierungen mit gesteuerter Freisetzung zu verwenden, wobei biologisch abbaubare Filme und Matrizen oder osmotische Minipumpen oder Abgabesysteme auf Basis von Dextran-Kügelchen, Alginat oder Kollagen verwendet werden.

[0054] Insgesamt stehen Formulierungen zur Verabreichung der Antikörper zur Verfügung und sind auf dem Gebiet wohlbekannt und können aus vielerlei Möglichkeiten ausgewählt werden.

[0055] Die typischen Dosis-Level können unter Verwendung von klinischen Standard-Techniken optimiert

werden und hängen von der Art der Verabreichung ab.

[0056] Nach der Verabreichung des Antikörpers an das Subjekt werden in periodischen Intervallen über die nachfolgenden Minuten, Stunden oder Tage Blutproben entnommen. Geeignete Zeitdauern können so kurz wie ein paar Minuten, 10 Minuten, 30 Minuten sein, oder man kann 1 Stunde, mehrere Stunden oder Tage vergehen lassen, bevor die Blutprobe entnommen wird. Eine Messung nach weniger als 3 Stunden ist bevorzugt. Gewünschtenfalls kann zwecks leichter Analyse die Plasmafraktion erhalten werden. Standard-Analysetechniken zur Analyse des $\text{A}\beta_{40}$, $\text{A}\beta_{42}$ und von deren Verhältnis werden verwendet. Diese Techniken sind beispielsweise im U.S. Patent 5,766,846 beschrieben. Es kann jedoch jede geeignete Technik zur Analyse verwendet werden, wie chromatographische Trennung, Western Blot, ELISA-Test, homogene Assays u. dgl.

[0057] Die Konzentration des $\text{A}\beta_{40}$, $\text{A}\beta_{42}$ oder ihres Verhältnisses wird dann mit diesen Werten in einer Kontrolle verglichen. Typische Kontrollen inkludieren Individuen, von welchen bekannt ist, dass sie frei von mit den Amyloid-Plaques verbundenen Krankheitszuständen sind, wie Teenager oder sehr junge Erwachsene und zusätzlich werden im Alter dazupassende kognitiv normale Kontrollen erhalten durch die Bildung von Mittelwerten der allgemeinen Bevölkerung. Während einige ältere, im Alter dazupassende, kognitiv normale Kontrollen prä-klinische AK haben, ist dies bei den meisten nicht der Fall. So ist der Erhalt der Durchschnittswerte aus einer solchen Population nützlich und entscheidend. Das Entwerfen von Standard-Kontrollen ist ein Verfahren, das dem Durchschnittsfachmann wohlbekannt ist. Individuen, die erhöhte Level der angeführten Peptide oder des Verhältnisses von $\text{A}\beta_{40}$ zu $\text{A}\beta_{42}$ im Vergleich zu den Kontrollwerten haben, werden dann als solche mit einer hohen Wahrscheinlichkeit klinischer oder präklinischer Krankheitszustände, die mit der Bildung von Amyloid-Plaques verbunden sind, identifiziert.

[0058] Die folgenden Beispiele sind zur Veranschaulichung, jedoch nicht zur Einschränkung der Erfindung bestimmt.

[0059] In den nachstehenden Beispielen wird unter anderem ein monoklonaler muriner Antikörper mit der Bezeichnung „266“ verwendet, welcher ursprünglich durch Immunisieren mit einem aus den Resten 13–28 des humanen $\text{A}\beta$ -Peptids bestehenden Peptid hergestellt wurde. Es wurde bestätigt, dass der Antikörper mit diesem Peptid eine Immunreaktion eingeht, jedoch war früher berichtet worden, dass er nicht mit dem Peptid reagiert, das nur die Reste 17–28 von humanem $\text{A}\beta$ -Peptid enthielt, oder an irgendwelchen anderen Epitopen innerhalb des $\text{A}\beta$ -Peptids. Die Herstellung dieses Antikörpers ist im U.S. Patent 5,766,846 beschrieben. Da die Beispiele hier Versuche beschreiben, die in murinen Systemen durchgeführt wurden, ist die Verwendung von monoklonalen murinen Antikörpern ausreichend. Humanisierte Formen der Antikörper mit der Immunspezifität entsprechend jener des Antikörpers 266 sind jedoch bevorzugt.

Beispiel 1

Korrelation zirkulierender Peptid-Level mit Plaques

[0060] Bei diesem Test wurde ein murines Modell für die Alzheimersche Krankheit, APP V717F transgene Mäuse, verwendet. Diese Mäuse sind von Games, D. et al., *Nature* (1995) 373: 523–527; Bales, K. R., et al., *Nature Genet.* (1997) 17: 263–264; und von Holtzman, D. M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2000) 97: 2892–2897, beschrieben. Bei diesem Modell wird eine mutierte Form des humanen APP-Gens exprimiert und führt zu einer Form der familiären Alzheimerschen Krankheit mit frühem Beginn. Obwohl die Gehirne dieser Mäuse anfangs normal zu sein scheinen, tritt zum Zeitpunkt 6–15 Monate eine $\text{A}\beta$ -Ablagerung in Form diffuser und neuritischer Plaques auf, obwohl Mäuse, die für das Transgen homozygot sind, eine Variabilität insofern aufweisen, als bei einigen Mäuse zum Zeitpunkt eines Alters von 9–14 Monaten $\text{A}\beta$ -Ablagerungen entstehen, während dies bei anderen nicht der Fall ist.

[0061] 53 homozygote Mäuse im Alter von 12 Monaten wurden bei dieser Studie verwendet.

[0062] Die Plasma-Level von $\text{A}\beta_{40}$, $\text{A}\beta_{42}$ und das Verhältnis $\text{A}\beta_{40}/\text{A}\beta_{42}$ wurden mittels ELISA im Plasma dieser Mäuse vor Verabreichung von 500 μg m266 und in verschiedenen Zeitintervallen bis zu 24 Stunden nach Verabreichung dieses Antikörpers gemessen. Nach 24 Stunden wurden die Mäuse getötet und die Menge der $\text{A}\beta$ -Ablagerung im Gehirn wurde im Hippocampus und im Cortex beurteilt, wie von DeMattos, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2001) 98: 8850–8855 beschrieben, und als Prozentsatz des Gehirns, der von $\text{A}\beta$ -Ablagerungen bedeckt war, evaluiert.

[0063] Wie in den **Fig. 1A, B und C** gezeigt, findet man, wenn der Prozentsatz an $\text{A}\beta$ -Ablagerung infolge einer

Ablagerung im Hippocampus auf der x-Achse gegen die Peptid-Level und ihr Verhältnis im Plasma auf der y-Achse vor Verabreichung des Antikörpers aufgetragen wird, keine Korrelation. Unabhängig davon, ob die Prozent A β -Ablagerung im Wesentlichen Null (0) oder über 75% waren, war der durchschnittliche Level von A β_{40} etwa 250 (pg/ml) und von A β_{42} etwa 400 (pg/ml). Das Verhältnis von A β_{40} zu A β_{42} war somit etwa 0,5–0,6.

[0064] Wie in den **Fig. 2A** und **B** gezeigt, korrelierte der Plasma-A β_{40} -Level jedoch stark mit dem Prozentsatz der A β -Ablagerung im Hippocampus eine Stunde nach m266-Injektion, wie es auch beim Verhältnis von A β_{40} /A β_{42} der Fall war.

[0065] Die **Fig. 3A**, **B** und **C** zeigen ähnliche Ergebnisse, die 24 Stunden nach der Injektion erhalten wurden. Die erhaltenen A β_{40} -Level und das Verhältnis von A β_{40} /A β_{42} korrelierte stark mit den % A β -Ablagerung im Hippocampus. Die A β_{42} -Level korrelierten auch mit den % A β -Ablagerung, jedoch nicht so gut wie die A β_{40} -Level.

[0066] Die **Fig. 4A**, **B** und **C** zeigen analoge Ergebnisse im Hinblick auf die Eintrittsgeschwindigkeit der beiden A β -Peptide in das Plasma und die berechneten Werte für die Eintrittsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom Verhältnis dieser Peptide. Die besten Korrelationen mit der A β -Ablagerung waren die Geschwindigkeit des A β_{40} -Eintritts und das Verhältnis von A β_{40} /A β_{42} .

[0067] Die **Fig. 5A** und **B** zeigen eine alternative Präsentation der Daten für die Plasma-Level von A β_{40} 24 Stunden und 1 Stunde nach m266-Injektion. Wenn die Mäuse in Gruppen nach geringer, mittlerer oder starker A β -Reichweite im Hippocampus eingeteilt wurden, konnten die Tiere mit geringer A β -Ablagerung von jenen mit hoher Ablagerung in Abhängigkeit des A β_{40} -Plasma-Levels vollständig unterschieden werden.

Beispiel 2

[0068] Bei einer Studie ähnlich der in Beispiel 1 angeführten wurde eine Gruppe von 49 homozygoten APP V717F-Mäusen verwendet. Vor und nach Injektion von 500 μ g IV m266 wurden Plasmaproben zum Zeitpunkt 5 Minuten, 1 Stunde, 3 Stunden, 6 Stunden und 24 Stunden entnommen und die A β_{40} - und A β_{42} -Level, wie in Beispiel 1 beschrieben, bewertet. Die Mäuse wurden nach 24 Stunden getötet, und 1 Hämisphere wurde hinsichtlich des Prozentsatzes der Fläche von Hippocampus oder gürtelförmigem Cortex, die von A β -Peptid eingenommen war (unter Verwendung von quantitativer A β -Immunfluoreszenzfärbung) und der Fläche, die von Amyloid eingenommen war (mittels Thioflavin-S(Amyloid)-Färbung) bewertet. Die Regionen aus der anderen Hämisphere wurden mittels ELISA im Hinblick auf A β -Peptid bewertet.

[0069] Der Pearson-Korrelations-Koeffizient (Pearson r) und Signifikanz (P-Wert) wurden zwischen Plasma-A β -Werten (vor und nach Injektion von m266) und Hippocampus-A β - oder Amyloid-Last unter Verwendung der GraphPad Prism-Software (Version 3.00 für Windows, San Diego, USA) bestimmt. Die A β -Last ist definiert als der Prozentsatz an Fläche des Hippocampus, die von A β -immunreaktiven Ablagerungen bedeckt ist. Die Amyloid-Last ist definiert als der Prozentsatz an Fläche des Hippocampus, die von Thioflavin-S-positiven Ablagerungen bedeckt ist. Korrelationen wurden auch zwischen der Plasma-A β -Ansammlung über 24 Stunden (Fläche unter der Kurve, „area under curve“, AUC) und der Hippocampus-A β -Last oder Amyloid-Last bestimmt.

[0070] **Fig. 6** zeigt die erhaltenen Ergebnisse. Kurz gesagt wurde festgestellt, dass die Grundlinien-Level („base line levels“) (vor Injektion) von A β_{40} , A β_{42} und dem berechneten A $\beta_{40/42}$ -Verhältnis vor Injektion mit m266 nicht mit dem Prozentsatz der A β - oder Amyloid-Ablagerung korrelierten. Nach Verabreichung von m266 gab es jedoch signifikante Korrelationen zwischen Plasma-A β_{40} , -A β_{42} und dem A $\beta_{40/42}$ -Verhältnis und sowohl mit der A β - als auch der Amyloid-Last im Hippocampus und im gürtelförmigen Cortex.

[0071] Die statistische Analyse der Ergebnisse ermöglicht eine genaue Vorhersage der Hippocampus-A β -Last bei diesen Mäusen auf Basis von Plasma-A β_{40} -Levels 24 Stunden nach m266-Injektion.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Diagnose von präklinischer oder klinischer Alzheimerscher Krankheit, umfassend:
 - (a) Messen von entweder
 - (i) dem Gehalt an A β_{40} ;
 - (ii) dem Gehalt an A β_{42} ; oder
 - (iii) dem Verhältnis von A β_{40} /A β_{42}
 - oder von mehreren davon;
- in einer Blutprobe eines Subjekts, die in einem Zeitintervall nach Verabreichung einer Menge eines Antikörpers

an dieses Subjekt erhalten wurde, wobei der Antikörper ein innerhalb der Positionen 13–28 von A β enthaltenes Epitop spezifisch bindet, oder eines Antikörpers, der ein A β -Peptid aus seiner gebundenen zirkulierenden Form im Blut sequestriert und die Clearance von löslichen und gebundenen Formen von A β im zentralen Nervensystem in Plasma verändert, wobei die Menge effektiv ist, die Gehalte an zirkulierenden A β -Peptiden im Blut des Subjekts zu verändern, wenn das Subjekt sich in einem präklinischen oder klinischen Stadium der Alzheimerschen Krankheit befindet; und

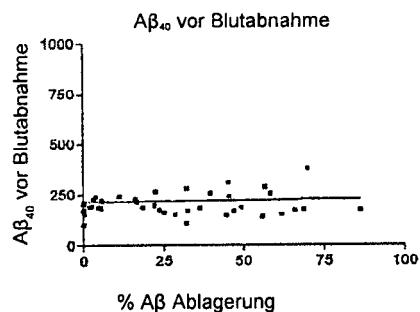
(b) Vergleichen des Gehalts an A β_{40} , A β_{42} oder des Verhältnisses von A β_{40} /A β_{42} im Subjekt mit einem Kontrollwert der Gehalte, wobei Gehalte von A β_{40} , A β_{42} oder das Verhältnis von A β_{40} /A β_{42} im Subjekt, die im Vergleich zu den Kontrollgehalten oder dem Kontrollverhältnis erhöht sind, das Subjekt als eines identifizieren, das sich in einem präklinischen oder klinischen Stadium der Alzheimerschen Krankheit befindet.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Zeitintervall weniger als 1 Woche beträgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Zeitintervall weniger als 24 Stunden oder gleich 24 Stunden beträgt.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das Zeitintervall weniger als 3 Stunden oder gleich 3 Stunden beträgt.
5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Verabreichung mittels Injektion der Antikörper erfolgte.
6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Subjekt menschlich ist und der Antikörper ein humanisierter Antikörper oder ein Fragment davon ist.
7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei der humanisierte Antikörper oder das Fragment davon eine leichte Kette von SEQ ID Nr. 11 und eine schwere Kette von SEQ ID Nr. 12 umfasst.
8. Verfahren nach Anspruch 6, wobei der humanisierte Antikörper oder das Fragment davon eine leichte Kette von SEQ ID Nr. 11 und eine schwere Kette von SEQ ID Nr. 16 umfasst.
9. Verfahren nach Anspruch 6, wobei der humanisierte Antikörper oder das Fragment davon eine leichte Kette, die eine variable Region von SEQ ID Nr. 7 aufweist, und eine schwere Kette umfasst, die eine variable Region von SEQ ID Nr. 14 aufweist.
10. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Antikörper ein Fragment ist.
11. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Antikörper ein Einzelketten-Antikörper ist.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

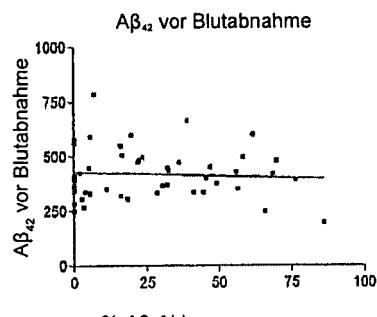
Anhängende Zeichnungen

A



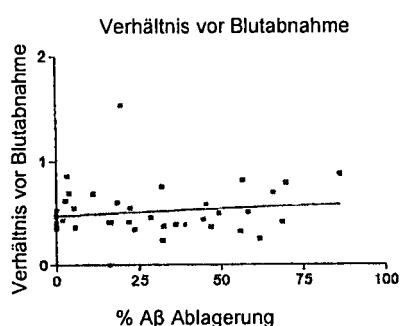
Parameter	PB 40
Anzahl der XY-Paare	42
Pearson r	0,02586
95 % Konfidenzintervall	- 0,2804 bis 0,3273
P-Wert (zweiseitig)	0,8709
P-Wert Zusammenfassung	ns
ist Korrelation signifikant?	nein
R Quadrat	0,0006685

B



Parameter	PB 42
Anzahl der XY-Paare	47
Pearson r	- 0,07387
95 % Konfidenzintervall	- 0,3536 bis 0,2180
P-Wert (zweiseitig)	0,6217
P-Wert Zusammenfassung	ns
ist Korrelation signifikant?	nein
R Quadrat	0,005456

C



Parameter	PB Verhältnis
Anzahl der XY-Paare	40
Pearson r	0,1213
95 % Konfidenzintervall	- 0,1978 bis 0,4171
P-Wert (zweiseitig)	0,4560
P-Wert Zusammenfassung	ns
ist Korrelation signifikant?	nein
R Quadrat	0,01471

Fig. 1

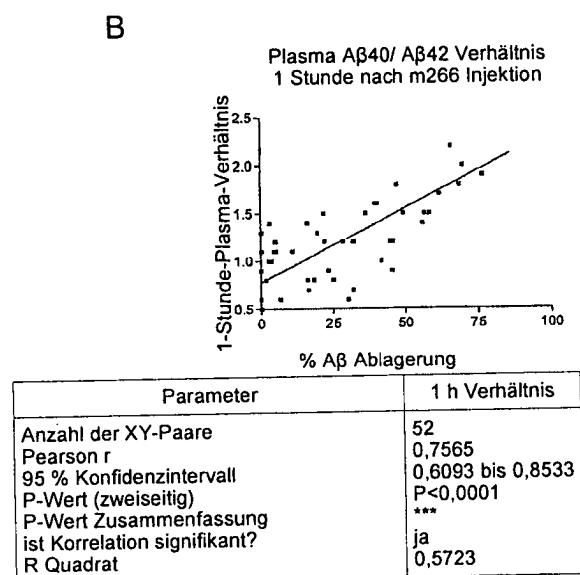
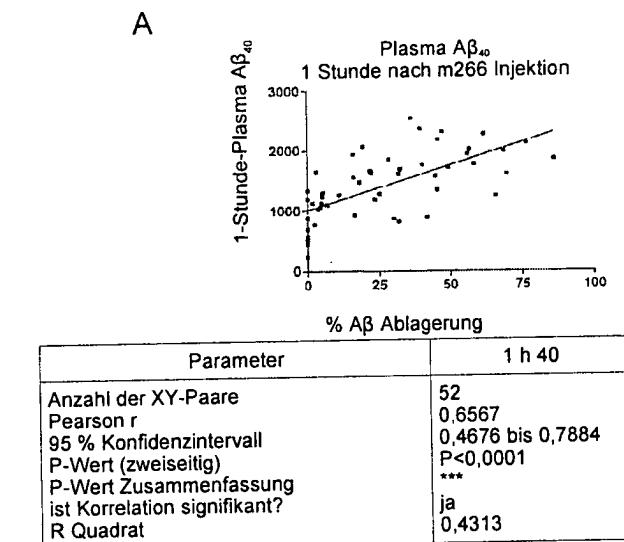
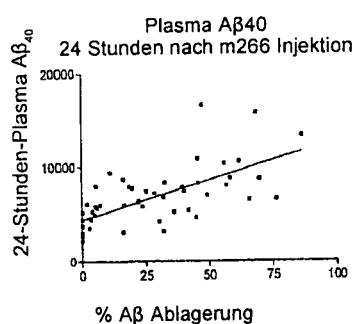


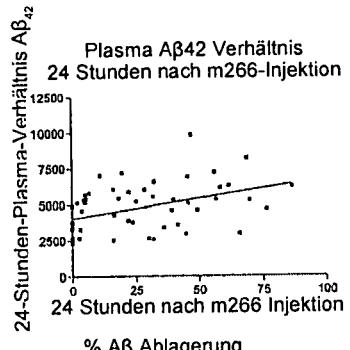
Fig. 2

A



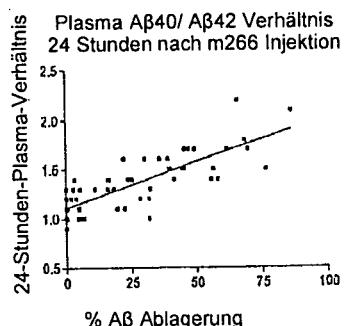
Parameter	24 h 40
Anzahl der XY-Paare	52
Pearson r	0,6628
95 % Konfidenzintervall	0,4759 bis 0,7924
P-Wert (zweiseitig)	P<0,0001
P-Wert Zusammenfassung	***
ist Korrelation signifikant?	ja
R Quadrat	0,4393

B



Parameter	24 h 42
Anzahl der XY-Paare	52
Pearson r	0,4039
95 % Konfidenzintervall	0,1471 bis 0,6096
P-Wert (zweiseitig)	0,0030
P-Wert Zusammenfassung	***
ist Korrelation signifikant?	ja
R Quadrat	0,1631

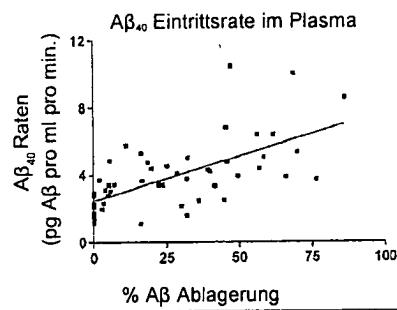
C



Parameter	24 h Verhältnis
Anzahl der XY-Paare	52
Pearson r	0,7987
95 % Konfidenzintervall	0,6724 bis 0,8799
P-Wert (zweiseitig)	P<0,0001
P-Wert Zusammenfassung	***
ist Korrelation signifikant?	ja
R Quadrat	0,6380

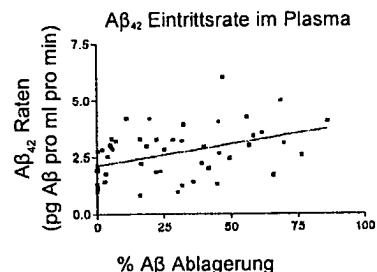
Fig. 3

A



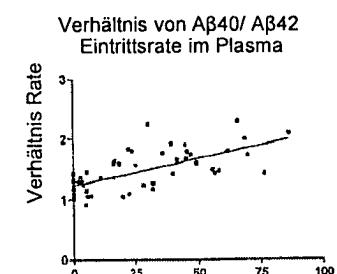
Parameter	40 Ratensteigung
Anzahl der XY-Paare	52
Pearson r	0,6360
95 % Konfidenzintervall	0,4394 bis 0,7745
P-Wert (zweiseitig)	P<0,0001
P-Wert Zusammenfassung ist Korrelation signifikant?	***
R Quadrat	0,4048

B



Parameter	42 Ratensteigung
Anzahl der XY-Paare	52
Pearson r	0,4062
95 % Konfidenzintervall	0,1499 bis 0,6114
P-Wert (zweiseitig)	0,0028
P-Wert Zusammenfassung ist Korrelation signifikant?	***
R Quadrat	0,1850

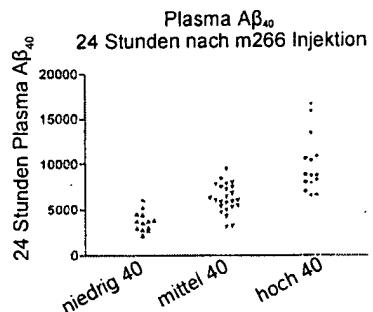
C



Parameter	Verhältnisrate
Anzahl der XY-Paare	52
Pearson r	0,6551
95 % Konfidenzintervall	0,4653 bis 0,7873
P-Wert (zweiseitig)	P<0,0001
P-Wert Zusammenfassung ist Korrelation signifikant?	***
R Quadrat	0,4291

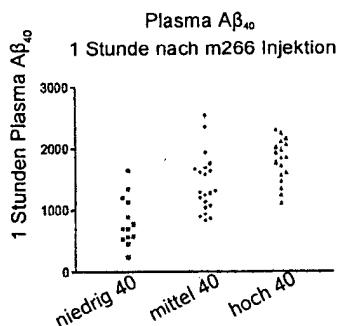
Fig. 4

A

**Hippocampus Aβ Bedeckung**

Einweganalyse der Varianz	P<0,0001
P-Wert	***
P-Wert Zusammenfassung	ja
sind Mittelwerte sign. verschieden? (P <0,05)	3
Anzahl der Gruppen	13,88
F	0,3616
R Quadrat	
Tukeys multipler Vergleichs-Test	
niedrig (42) vs. mittel (42)	P < 0,01
niedrig (42) vs. hoch (42)	P < 0,001
mittel (42) vs. hoch (42)	P < 0,05

B

**Hippocampus Aβ Bedeckung**

P-Wert	P<0,0001
P-Wert Zusammenfassung	***
sind Mittelwerte sign. verschieden? (P <0,05)	ja
Anzahl der Gruppen	3
F	20,81
R Quadrat	0,4593
Tukeys multipler Vergleichs-Test	
niedrig (40) vs. mittel (40)	P < 0,001
niedrig (40) vs. hoch (40)	P < 0,001
mittel (40) vs. hoch (40)	P < 0,05

Fig. 5

Korrelation mit Alzheimer-artiger Pathologie im Hippocampus

Plasma A β Korrelation mit A β -last und fibrillären Amyloid						
		vor	Blutabnahme	5 min	1 Stunde	3 Stunden
Plasma A β 40:						
A β Last:	Pearson r	-0.0158	0.5527	0.5904	0.4310	0.5533
P Wert		0.9209	< 0.0001	< 0.0001	0.0014	< 0.0001
Amyloid Last:	Pearson r	0.1535	0.7420	0.6257	0.7053	0.6684
P Wert		0.3378	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Plasma A β 42:						
A β Last:	Pearson r	-0.0614	0.2223	-0.0036	0.1309	0.4551
P Wert		0.6817	0.1207	0.9798	0.3549	0.0008
Amyloid Last:	Pearson r	0.0443	0.4790	0.2221	0.3996	0.4476
P Wert		0.7698	0.0005	0.1013	0.0037	0.0011
A β 40/A β 42 Verhältnis:						
A β Last:	Pearson r	0.0369	0.5223	0.6888	0.4215	0.1754
P Wert		0.8236	< 0.0001	< 0.0001	0.0019	0.2183
Amyloid Last:	Pearson r	0.1293	0.4825	0.5047	0.4364	0.2843
P Wert		0.4393	0.0004	0.0002	0.0014	0.0454

Fig. 6