



(12) Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift

(97) EP 1 257 584 B2

(21) Deutsches Aktenzeichen: 601 06 394.5

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US01/06191

(96) Europäisches Aktenzeichen: 01 91 3081.4

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2001/062801

(86) PCT-Anmeldetag: 26.02.2001

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: 30.08.2001

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 20.11.2002

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 13.10.2004

(97) Veröffentlichungstag
des geänderten Patents beim EPA: 06.03.2013

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 25.07.2013

(51) Int Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

(30) Unionspriorität:

184601 P 24.02.2000 US

254465 P 08.12.2000 US

254498 P 08.12.2000 US

(73) Patentinhaber:

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

(74) Vertreter:

Dr. Schön & Partner, 80336, München, DE

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

HOLTZMAN, David, M., St. Louis, US; DEMATTOS,
Ronald, St. Louis, US; BALES, Kelly, R.,
Cloverdale, US; PAUL, Steven, M., Carmel, US;
TSURUSHITA, Naoya, Palo Alto, US; VASQUEZ,
Maximiliano, Palo Alto, US

(54) Bezeichnung: HUMANISIERTE ANTIKÖRPER, DIE AMYLOID BETA PEPTID SEQUESTRIEREN

Beschreibung**Technisches Gebiet**

[0001] Die Erfindung betrifft humanisierte Antikörper, die an ein Epitop zwischen den Aminosäuren 13 und 28 des A β -Peptids binden, und die präventive und therapeutische Behandlung von Zuständen, die mit beta-Amyloid in Verbindung stehen, wie Alzheimer-Erkrankung, Down-Syndrom und zerebraler Amyloidangiopathie. Spezieller betrifft die Erfindung die Verwendung von humanisierten monoklonalen Antikörpern zur Sequestrierung von Amyloid-beta-Peptid (A β) in Plasma, Gehirn und Zerebrospinalflüssigkeit zum Verhindern der Anreicherung oder zum Rückgängigmachen der Ablagerung von A β -Peptid im Gehirn und in der zerebralen Vaskulatur und zur Verbesserung der Kognition.

Stand der Technik

[0002] Eine Reihe von Symptomatiken, die zu kognitiven Defiziten, Schlaganfall, Hirnblutung und allgemeiner mentaler Schwächung führen, scheinen mit neuritischen und zerebrovaskulären Plaques im Gehirn, die das Amyloid-beta-Peptid (A β) enthalten, in Verbindung zu stehen. Zu diesen Zuständen zählen sowohl präklinische als auch klinische Alzheimer-Erkrankung, Down-Syndrom und präklinische und klinische zerebrale Amyloidangiopathie (CAA). Die Amyloidplaques werden aus Amyloid-beta-Peptiden gebildet. Diese Peptide zirkulieren im Blut und in der Zerebrospinalflüssigkeit (Liquor cerebrospinalis, CSF), typischerweise in komplexierter Form mit Lipoproteinen. Das A β -Peptid in zirkulierender Form besteht aus 39 bis 43 Aminosäuren (meistens 40 oder 42 Aminosäuren), das aus der Spaltung eines gemeinsamen Vorläuferproteins, des Amyloid-Vorläuferproteins, das häufig als APP bezeichnet wird, herrührt. Einige Formen von löslichem A β sind selbst neurotoxisch und können die Schwere der Neurodegeneration und/oder des kognitiven Verfalls bestimmen (CA. McLean et al., Ann. Neurol. (1999) 46: 860–866; M. P. Lambert et al. (1998) 95: 6448–6453; J. J. Naslund, Am. Med. Assoc. (2000) 283: 1571).

[0003] Hinweise legen nahe, dass A β zwischen Gehirn und Blut hin- und hertransportiert werden kann (J-F. Ghersi-Egea et al., J. Neurochem. (1996) 67: 880–883; B. V. Zlokovic et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. (1993) 67: 1034–1040; M. Shibata et al., J. Clin. Invest. (2000) 106: 1489–1499). Des Weiteren befindet sich das A β in Plaques im Gleichgewicht mit löslichem A β im Gehirn und im Blut (T. Kawarabayashi et al., J. Neurosci. (2001) 21: 372–381).

[0004] Wie in der PCT-Anmeldung US 00/35681 und in der US-Patentanmeldung Nr. 09/153.130 beschrieben ist, die beide hier durch Bezugnahme aufgenommen werden, sind die Gesamtspiegel von zirkulierendem A β -Peptid in CSF bei normalen Individuen und bei Individuen, die prädisponiert sind, die Symptome einer Alzheimer-Erkrankung zu zeigen, ähnlich. Die A β_{42} -Spiegel sind jedoch im Mittel bei Individuen mit Alzheimer-Erkrankung niedriger (R. M. Nitsch et al., Ann. Neurol. (1995) 37: 512–518). Es ist bekannt, dass A β_{42} stärker zu einer Aggregation neigt als A β_{40} , und wenn diese auftritt, ergeben sich ungünstige Folgen, wie eine A β -Ablagerung in Amyloidplaques, die Umwandlung von A β in toxische lösliche Formen, eine Schädigung von Nervenzellen und Verhaltensbeeinträchtigungen wie Demenz (T. E. Golde et al., Biochem. Biophys. Acta. (2000) 1502: 172–187).

[0005] Verfahren zum induzieren einer Immunantwort zur Verringerung der Amyloidablagerungen zu verringern, sind in der PCT-Veröffentlichung WO 99/27944, veröffentlicht am 10. Juni 1999, beschrieben. Die Patentbeschreibung postuliert, dass ein eine volle Länge aufweisendes aggregiertes A β -Peptid ein verwendbares Immunogen wäre. Die Verabreichung eines A β -Fragments (Aminosäuren 13 bis 28), das an Schaf-anti-Maus-IgG konjugiert ist, verursachte keine Veränderung der Amyloidlast im Cortex und lediglich eines von neun Tieren, die Injektionen des A β -13–28-Fragmentkonjugats erhalten hatten, zeigten irgendeine Lymphoproliferation als Reaktion auf A β_{40} . Die Anmeldung weist ferner darauf hin, dass Antikörper, die spezifisch an A β -Peptid binden, als therapeutische Mittel verwendet werden könnten. Dies scheint jedoch eine Mutmaßung zu sein, da die stützenden Daten Protokolle wiedergeben, die eine aktive Immunisierung unter Verwendung von beispielsweise A β_{42} beinhalten. Die Peptide werden unter Verwendung von Adjuvantien zugeführt und die aus der Immunisierung gebildeten Antikörpertiter sowie die Spiegel von A β -Peptid und des Vorläuferpeptids werden bestimmt. Die Veröffentlichung weist deutlich darauf hin, dass die A β -Plaques für eine Linderung der Alzheimer-Symptome verringert werden müssen und dass zellvermittelte Prozesse für eine erfolgreiche Verringerung von A β -Plaques erforderlich sind.

[0006] WO 99/60024, veröffentlicht am 25. November 1999, ist auf Verfahren zum Entfernen von Amyloid unter Verwendung von Anti-Amyloid-Antikörpern gerichtet. Es wird jedoch angegeben, dass der Mechanismus

die Fähigkeit von Anti-A β -Antikörpern verwendet, vorgeformte Amyloidablagerungen (d. h. Plaques) zu binden, was nachfolgend zu einer lokalen mikroglären Clearance von lokalisierten Plaques führt. Dieser Mechanismus wurde *in vivo* nicht belegt. Diese Veröffentlichung konstatiert ferner, dass Anti-A β -Antikörper, um gegen A β -Plaques wirksam zu sein, Zugang zum Hirnparenchym erlangen und die Blut-Hirn-Schranke durchqueren müssen.

[0007] Verschiedene PCT-Anmeldungen, die die Versuche zur Kontrolle von Amyloidplaques betreffen, wurden am 7. Dezember 2000 veröffentlicht. WO 00/72880 beschreibt eine signifikante Verringerung der Plaques im Cortex und im Hippocampus in einem transgenen Mausmodell der Alzheimer-Erkrankung, wenn eine Behandlung unter Verwendung von N-terminalen Fragmenten von A β -Peptiden und Antikörpern, die an diese binden, erfolgte, jedoch nicht bei Behandlung mit dem an Schaf-anti-Maus-IgG konjugierten A β -13–28-Fragment oder mit einem Antikörper gegen das 13–28-Fragment, dem Antikörper 266. In *in vitro*-Studien wurde bestätigt, dass die N-terminal gerichteten Antikörper die Blut-Hirn-Schranke durchdringen und eine Phagozytose der Amyloidplaques auslösen.

[0008] WO 00/72876 umfasst nahezu die gleiche Offenbarung wie WO 00/72880 und ist auf eine Immunisierung mit den Komponenten der Amyloidfibrillen selbst gerichtet.

[0009] WO 00/77178 beschreibt Antikörper, die zum Katalysieren der Hydrolyse von β -Amyloid konzipiert wurden, unter Einschluss von Antikörpern, die gegen ein Gemisch der Phenylalanin-Statin-Übergangzustandsverbindungen Cys-A β _{10–25}-Statin-Phe₁₉-Phe₂₀ und Cys-A β _{10–25}-Statin-Phe₂₀-Ala₂₁ erzeugt wurden, und Antikörpern, die gegen A β _{10–25}, das eine reduzierte Amidbindung zwischen Phe₁₉ und Phe₂₀ besitzt, erzeugt wurden. Dieses Dokument erwähnt die Sequestrierung von A β , dies ist jedoch eine Mutmaßung, da kein Nachweis einer derartigen Sequestrierung geliefert wird. Des Weiteren liefert das Dokument keinen *in vivo*-Nachweis, dass die Verabreichung von Antikörpern einen Efflux von A β aus dem zentralen Nervensystem verursacht, die Plaquebildung beeinträchtigt, die Plaquelast verringert, Komplexe zwischen den Antikörpern und A β in Gewebeproben bildet oder die Kognition beeinflusst.

[0010] Es wurde gezeigt, dass ein Weg für den A β -Metabolismus über den Transport aus dem ZNS in das Plasma erfolgt (B. V. Zlokovic et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1996) 93: 4229–4234; J-F. Ghersi-Egea et al., J. Neurochem. (1996) 67: 880–883). Zusätzlich wurde gezeigt, dass A β in Plasma die Blut-Hirn-Schranke durchqueren und in das Gehirn eindringen kann (B. V. Zlokovic et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. (1993) 67: 1034–1040). Es wurde ferner gezeigt, dass die Verabreichung von bestimmten polyklonalen und monoklonalen A β -Antikörpern die A β -Ablagerung in Amyloidplaques im transgenen Mausmodell APP^{V717F} der Alzheimer-Erkrankung verringert (F. Bard et al., Nature Med. (2000) 6: 916–919); jedoch wurde angegeben, dass dies auf bestimmte, die Blut-Hirn-Schranke durchquerende Anti-A β -Antikörper zurückzuführen ist, die die Phagozytose von Amyloidplaques durch Mikroglia-Zellen stimulieren. In den Experimenten von Bard zeigten Assays von Hirnschnitten *ex vivo*, dass die Anwesenheit von zugegebenem A β -Antikörper zusammen mit exogen zugegebener Mikroglia eine Phagozytose von A β auslöste, was die Entfernung von A β -Ablagerungen zur Folge hatte.

[0011] Die Spiegel von sowohl löslichem A β ₄₀ als auch von A β ₄₂ in der CSF und im Blut können auf einfache Weise unter Verwendung standardisierter Assays unter Verwendung von Antikörpern, die gegen Epitope entlang der A β -Kette gerichtet sind, nachgewiesen werden. Von derartigen Assays wurde beispielsweise in den US-Patenten 5 766 846, 5 837 672 und 5 593 846 berichtet. Diese Patente beschreiben die Herstellung von murinen monoklonalen Antikörpern gegen die zentrale Domäne des A β -Peptids, und von diesen wurde berichtet, dass sie Epitope in der Nähe von und einschließlich der Positionen 16 und 17 besitzen. Es wurden ebenfalls Antikörper, die gegen die N-terminale Region gerichtet sind, beschrieben. Es wurde bestätigt, dass verschiedene monoklonale Antikörper mit den Positionen 13 bis 28 des A β -Peptids immunoreagieren; diese (Antikörper) banden nicht an ein Peptid, das die Positionen 17 bis 28 darstellt, wodurch gemäß den zitierten Patenten nachgewiesen wurde, dass diese Region, einschließlich der Positionen 16 bis 17 (der α -Sekretasestelle) das Ziel dieser Antikörper war. Zu den Antikörpern, von denen bekannt ist, dass sie zwischen den Aminosäuren 13 und 28 von A β binden, zählen die Maus-Antikörper 266, 4G8 und 1C2.

[0012] Wir stellten nun unerwarteterweise fest, dass die Verabreichung des Antikörpers 266 die Kognition (Objektgedächtnis) sehr schnell und nahezu vollständig bei 24 Monate alten hemizygoten transgenen Mäusen (APP^{V717F}) wiederherstellt. Dennoch besitzt der Antikörper nicht die Eigenschaften, die gemäß Lehre auf dem einschlägigen Fachgebiet für einen Antikörper erforderlich sind, um bei einer Behandlung von Alzheimer-Erkrankung, Down-Syndrom und anderen mit dem A β -Peptid in Verbindung stehenden Zuständen wirksam zu sein. Zu unserer weiteren Überraschung beobachteten wir, dass Antikörper, die an A β zwischen den Po-

sitionen 13 und 28 binden (266 und 4G8), in der Lage sind, lösliche Formen von A β aus ihren gebundenen, zirkulierenden Formen im Blut zu sequestrieren, und dass die periphere Verabreichung von Antikörper 266 zu einem raschen Efflux relativ hoher Mengen an A β -Peptid aus dem ZNS in das Plasma führt. Dies führt zu einer veränderten Clearance von löslichem A β , zur Verhinderung der Plaquebildung und in höchst überraschender Weise zu einer Verbesserung der Kognition, sogar ohne notwendigerweise die Last an A β -Amyloidplaques zu verringern, die Blut-Hirn-Schranke in einem signifikanten Ausmaß zu durchqueren, Plaques abzubauen, zelluläre Mechanismen zu aktivieren oder mit hoher Affinität an aggregiertes A β zu binden.

Offenbarung der Erfindung

[0013] Die Erfindung liefert einen humanisierten Antikörper oder ein Fragment hiervon, umfassend:

a) eine leichte Kette, umfassend drei komplementaritätsbestimmende Regionen (CDRs) der leichten Kette, die die folgenden Aminosäuresequenzen aufweisen:

CDR1 der leichten Kette:

1	5	10	15												
Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Ile	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asn	Ala	Tyr	Leu	Ris

(SEQ ID-Nr. 1)

oder

1	5	10	15												
Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asn	Ala	Tyr	Leu	Ris

(SEQ ID-Nr. 15)

CDR2 der leichten Kette:

1	5			15											
Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser									

(SEQ ID-Nr. 2)

und CDR3 der leichten Kette:

1	5			15											
Ser	Gln	Ser	Thr	Ris	Val	Pro	Trp	Thr							

(SEQ ID-Nr. 3)

und eine Frameworksequenz der leichten Kette aus einer humanen leichten Kette eines Immunglobulins und

b) eine schwere Kette, umfassend drei CDRs einer schweren Kette mit den folgenden Aminosäuresequenzen:

CDR1 der schweren Kette:

1	5			15										
Arg	Tyr	Ser	Met	Ser										

(SEQ ID-Nr. 4)

CDR2 der schweren Kette:

1	5	10	15													
Gln	Ile	Asn	Ser	Val	Gly	Asn	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Val	Lys	Gly

(SEQ ID-Nr. 5)

oder

1	5	10	15													
Gln	Ile	Asn	Ser	Val	Gly	Asn	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys	Gly

(SEQ ID-Nr. 16)

und CDR3 der schweren Kette:

**1
Gly Asp Tyr**

(SEQ ID-Nr. 6)

und eine Frameworksequenz einer schweren Kette aus einer humanen schweren Kette eines Immunglobulins, wobei der Antikörper oder das Fragment spezifisch an ein innerhalb der Positionen 13 bis 28 von A β enthaltenes Epitop bindet.

[0014] Die Erfindung liefert humanisierte Antikörper oder Fragmente hiervon, die in positiver Weise die Kognition bei Erkrankungen und Zuständen beeinflusst, bei denen A β beteiligt sein kann, wie klinische oder präklinische Alzheimer-Erkrankung, Down-Syndrom und klinische oder präklinische zerebrale Amyloidangiopathie. Die Antikörper oder Fragmente hiervon müssen nicht notwendigerweise die Blut-Hirn-Schranke durchqueren, Amyloidplaques abbauen, zelluläre Reaktionen aktivieren oder nicht einmal notwendigerweise die Amyloidplaquelast verringern. In einem weiteren Aspekt liefert diese Erfindung humanisierte Antikörper und Fragmente hiervon, wobei die variablen Regionen Sequenzen besitzen, die die CDR von Maus-Antikörper 266 und spezifische humane Frameworksequenzen (Sequenzen SEQ ID Nr.: 7 bis SEQ ID Nr.: 10) umfassen, wobei der Antikörper oder das Fragment spezifisch an ein innerhalb der Positionen 13 bis 28 von A β enthaltenes Epitop bindet. In einem weiteren Aspekt liefert diese Erfindung humanisierte Antikörper und Fragmente hiervon, worin die leichte Kette die SEQ ID Nr.: 11 und die schwere Kette die SEQ ID Nr.: 12 aufweist.

[0015] Ebenfalls Teil der Erfindung sind Polynucleotidsequenzen mit Codierung für die oben offenbarten humanisierten Antikörper oder Fragmente hiervon, Vektoren, die die Polynucleotidsequenzen mit Codierung für die humanisierten Antikörper oder Fragmente hiervon umfassen, Wirtszellen, die mit den Vektoren transformiert sind oder in die die Polynucleotide eingebaut sind, die die humanisierten Antikörper oder Fragmente hiervon exprimieren, pharmazeutische Formulierungen der hier offenbarten humanisierten Antikörper und der Fragmente hiervon und Verfahren zur Herstellung und Verwendung derselben.

[0016] Derartige pharmazeutische Formulierungen sind verwendbar zur Sequestrierung von A β bei Menschen, zum Behandeln und Verhüten von Erkrankungen und Zuständen, die durch A β -Plaques oder A β -Toxizität im Gehirn gekennzeichnet sind, wie Alzheimer-Erkrankung, Down-Syndrom und zerebraler Amyloidangiopathie beim Menschen, zum Diagnostizieren dieser Erkrankungen beim Menschen und zum Bestimmen, ob ein menschliches Individuum auf eine Behandlung unter Verwendung humarer Antikörper gegen A β ansprechen wird.

[0017] Die Verwendung eines geeigneten humanisierten Antikörpers zur Herstellung eines Medikaments zur Sequestrierung von in biologischen Flüssigkeiten zirkulierendem A β -Peptid ist zur präventiven und therapeutischen Behandlung von Zuständen geeignet, die mit der Bildung von A β enthaltenden diffusen, neuritischen und zerebrovaskulären Plaques im Gehirn verbunden sind. Der humanisierte Antikörper einschließlich eines immunologisch reaktiven Fragments hiervon führt zur Entfernung des A β -Peptids aus makromolekularen Komplexen, die normalerweise beim Transportieren des A β -Peptids in Körperflüssigkeiten zu und von Orten, an denen sich Plaques bilden können oder an denen es toxisch sein kann, relevant wären. Zusätzlich verhält sich eine Sequestrierung von Plasma-A β -Peptid mit dem Antikörper oder Fragment hiervon als eine "Senke", wobei in wirksamer Weise lösliches A β -Peptid im Plasmakompartiment sequestriert wird und A β zum Übertritt in das Plasma aus Gebieten des zentralen Nervensystems (ZNS) veranlasst wird. Durch die Sequestrierung von A β im Blut wird der Nettoefflux aus dem Gehirn gesteigert und es wird verhindert, dass sich lösliches A β in unlöslichen Plaques ablagert und toxische lösliche Spezies im Gehirn bildet. Zusätzlich wird in Plaques befindliches unlösliches A β , das sich mit dem löslichen A β im Gleichgewicht befindet, aus dem Gehirn durch einen sequestrierenden Effekt im Blut entfernt werden. Die Sequestrierung des A β -Peptids mit dem Antikörper steigert ferner dessen Entfernung aus dem Körper und hemmt toxische Wirkungen von löslichem A β im Gehirn und die Entwicklung und weitere Anreicherung von unlöslichem A β in Form von Amyloid in Plaques. Die in der Erfindung verwendbaren Antikörper durchqueren die Blut-Hirn-Schranke nicht in hohen Mengen ($\leq 0,1\%$ der Plasmaspiegel). Zusätzlich müssen die erfindungsgemäß verwendeten humanisierten Antikörper bei peripherer Verabreichung nicht notwendigerweise eine zelluläre Immunreaktion im Gehirn hervorrufen, wenn sie an A β -Peptid gebunden sind oder wenn sie frei zirkulieren, um ihren vorteilhaften Wirkungen aufzuweisen.

[0018] In einem Aspekt ist die Erfindung somit auf eine Verwendung einer therapeutisch oder prophylaktisch wirksamen Menge eines humanisierten monoklonalen Antikörpers oder eines immunologisch reaktiven Fragments hiervon, wobei der Antikörper spezifisch an die Mittelregion des A β -Peptids bindet, zur Herstellung eines Medikaments zum Behandeln und Verhindern von Zuständen, die durch Bildung von beta-Amyloidprotein enthaltenden Plaques bei Menschen gerichtet. In einem weiteren Aspekt ist die Erfindung auf eine Verwendung

einer wirksamen Menge eines humanisierten Antikörpers, der A β -Peptid aus seiner zirkulierenden Form im Blut sequestriert und den Efflux aus dem Gehirn sowie eine veränderte A β -Clearance im Plasma und dem Gehirn bewirkt, zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Bildung von Amyloidplaques und zur Beseitigung von Amyloidplaques bei Menschen gerichtet. In zusätzlichen Aspekten ist die Erfindung auf derartige humanisierte Antikörper, einschließlich immunologisch wirksamer Teile hiervon und auf Verfahren zu deren Herstellung gerichtet.

[0019] Die Erfindung umfasst ferner die Verwendungen einer wirksamen Menge eines humanisierten Antikörpers der Erfindung zur Herstellung eines Medikaments zum Umkehren eines kognitiven Abbaus, zum Verbessern der Kognition, Behandeln des kognitiven Abbaus und Verhindern des kognitiven Abbaus bei einem Individuum, bei dem eine klinische oder präklinische Alzheimer-Erkrankung, das Down-Syndrom oder eine klinische oder präklinische zerebrale Amyloidangiopathie diagnostiziert wurde.

[0020] Die Erfindung umfasst ferner die Verwendung eines humanisierten Antikörpers der Erfindung zur Herstellung eines Medikaments zum Behandeln, Verhindern oder Umkehren von Alzheimer-Erkrankung, Down-Syndrom oder zerebraler Amyloidangiopathie, zum Behandeln, Verhindern oder Umkehren des kognitiven Abbaus bei klinischer oder präklinischer Alzheimer-Erkrankung, Down-Syndrom oder klinischer oder präklinischer zerebraler Amyloidangiopathie oder zum Hemmen der Bildung von Amyloidplaques oder der Wirkungen von toxischen löslichen A β -Spezies bei Menschen.

[0021] Die Erfindung betrifft die überraschende Beobachtung, dass innerhalb eines kurzen Zeitraums nach Verabreichung eines Antikörpers der vorliegenden Erfindung relativ große Mengen von A β aus dem zentralen Nervensystem in das Blut aubfließen. Daher offenbart diese Erfindung Verfahren zum Beurteilen des Ansprechens eines menschlichen Individuums auf eine Behandlung mit einem A β bindenden Antikörper oder einem Fragment hiervon, die a) ein Verabreichen des Antikörpers oder eines Fragments hiervon an das Individuum und b) Messen der Konzentration von A β im Blut des Individuums umfassen.

[0022] Die Erfindung offenbart ferner ein Verfahren zum Behandeln eines humanen Individuums mit einem A β -bindenden Antikörper oder einem Fragment hiervon, das a) ein Verabreichen einer ersten Menge des Antikörpers oder Fragments hiervon an das Individuum, b) ein innerhalb von 3 Stunden bis 2 Wochen nach Verabreichung der ersten Dosis erfolgendes Messen der Konzentration von A β im Blut des Individuums, c) falls erforderlich, Berechnen einer zweiten Menge eines Antikörpers oder Fragments hiervon auf Basis des Ergebnisses von Stufe b), wobei die zweite Menge die gleiche ist wie die erste Menge oder davon verschieden ist, und d) das Verabreichen der zweiten Menge des Antikörpers oder Fragments umfasst.

[0023] Die Erfindung offenbart ferner ein Verfahren zum Beurteilen der Wirksamkeit eines Antikörpers, der an A β bindet, oder eines Fragments hiervon bei einem menschlichen Individuum zur Hemmen oder Verhinderung der Bildung von A β -Amyloidplaques, zum Verringern von A β -Amyloidplaques, zum Verringern der Wirkungen von toxischen löslichen A β -Spezies, oder zum Behandeln eines Zustands oder einer Erkrankung, die mit A β -Plaques in Verbindung steht, umfassend: a) Erhalten einer ersten Probe von Plasma oder CSF des Individuums, b) Messen einer Basislinienkonzentration von A β in der ersten Probe, c) Verabreichen des Antikörpers oder Fragments hiervon an das Individuum, d) Erhalten innerhalb von 3 Stunden bis 2 Wochen nach Verabreichung des Antikörpers oder Fragments hiervon einer zweiten Probe des Plasmas oder der CSF des Individuums und e) Messen der Konzentration von A β in der zweiten Probe, wobei die Wirksamkeit mit der Menge von A β , die an den Antikörper im Blut gebunden ist, und mit der Konzentration von A β in der CSF verbunden ist.

Kurze Beschreibung der Abbildungen

[0024] [Fig. 1](#) zeigt den prozentualen Anteil von A β -Peptid, das aus der humanen Zerebrospinalflüssigkeit durch eine Dialysemembran mittels mAb 266 entzogen wird, als Funktion des Molekulargewichts-Cutoffs der Dialysemembran.

[0025] [Fig. 2](#) zeigt die Konzentration von A β _{Gesamt}, die im Plasma einer APP^{V717F}-transgenen Maus nach Injektion von entweder 200 μ g oder 600 μ g von Mab 266 gefunden wurde, als Funktion der Zeit.

[0026] [Fig. 3A](#) zeigt die Menge der Ablagerung von A β -Peptid im Cortex von APP^{V717F}-transgenen Mäusen, die mit Kochsalzlösung, Maus-IgG oder mAb 266 behandelt wurden. [Fig. 3B](#) zeigt die Korrelation dieser Ergebnisse mit dem parentalen Ursprung.

[0027] [Fig. 4](#) zeigt die Polynukleotidsequenzen zum Exprimieren der leichten Kette von humanisiertem 266 aus Plasmid pVk-Hu266 und die einzelnen Aminosäurecodes für die exprimierte leichte Kette von humanisiertem 266 (entsprechend SEQ ID Nr.: 11, wenn reif).

[0028] [Fig. 5](#) zeigt die Polynukleotidsequenzen zum Exprimieren der schweren Kette von humanisiertem 266 aus Plasmid pVg1-Hu266 und die einzelnen Aminosäurecodes für die exprimierte schwere Kette von humanisiertem 266 (entsprechend SEQ ID Nr.: 12, wenn reif).

[0029] [Fig. 6](#) ist eine Plasmidkarte von pVk-Hu266.

[0030] [Fig. 7](#) ist eine Plasmidkarte von pVg1-Hu266.

Ausführungsmodi der Erfindung

[0031] Die A β -Peptide, die in humanen biologischen Flüssigkeiten zirkulieren, stellen die carboxyterminale Region eines auf Chromosom 21 codierten Precursorproteins dar. Es wurde aus den Ergebnissen von in vitro-Experimenten berichtet, dass das A β -Peptid eine geringe Löslichkeit in physiologischen Lösungen besitzt, da es eine Strecke von hydrophoben Aminosäuren enthält, die Teil einer Region sind, die ihren längeren Precursor an den Lipidmembranen von Zellen verankert. Es ist daher nicht überraschend, dass zirkulierendes A β -Peptid normalerweise mit anderen Einheiten komplexiert ist, die es von einem Aggregieren abhalten. Dies führte zu Schwierigkeiten beim Nachweisen von zirkulierendem A β -Peptid in biologischen Flüssigkeiten.

[0032] Die oben genannten Patentdokumente (US-Patente 5 766 846, 5 837 672 und 5 593 846) beschreiben die Herstellung von Antikörpern, einschließlich eines als Klon 266 bezeichneten monoklonalen Antikörpers, der gegen ein Peptid, das die Aminosäuren 13 bis 28 des A β -Peptids umfasst, erzeugt wurde und von dem nachgewiesen wurde, dass er spezifisch an dieses Peptid bindet. Die vorliegenden Anmelder stellten fest, dass Antikörper, die innerhalb dieser Region binden, im Gegensatz zu Antikörpern, die andernorts in der Aminosäuresequenz von A β binden, in der Lage sind, das lösliche A β -Peptid in sehr effektiver Weise aus makromolekularen Komplexen zu sequestrieren. Diese Sequestrierung wird den Nettoefflux von A β -Peptid aus dem ZNS bewirken, dessen Clearance im ZNS und Plasma verändern und dessen Verfügbarkeit für eine Plaquebildung verringern. Somit bietet die Verwendung von Antikörpern mit dieser Spezifität, die zum Verringern ihrer Immunogenität durch Umwandlung in eine humanisierte Form modifiziert wurden, um Medikamente herzustellen, die Möglichkeit, sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch Zustände zu behandeln, die mit einer Bildung von beta-Amyloidplaques in Verbindung stehen. Diese Zustände umfassen, wie oben angemerkt, präklinische und klinische Alzheimer-Erkrankung, Down-Syndrom und präklinische und klinische zerebrale Amyloidangiopathie.

[0033] Wie hier verwendet, umfasst das Wort "Behandeln" die therapeutische Behandlung, wobei hier ein zu behandelnder Zustand bereits als vorliegend bekannt ist, und die Prophylaxe – d. h. die Prävention oder Verbesserung des möglichen zukünftigen Beginns eines Zustands.

[0034] Unter "monoklonale Antikörper, die an die Mittelregion von A β -Peptid binden" sind monoklonale Antikörper (mAb oder mAbs) gemeint, die an eine Aminosäuresequenz binden, die zwischen den Positionen 13 bis 28 von A β enthaltene Epitop darstellen. Es muss nicht auf die gesamte Region abgezielt werden. Solange der Antikörper an mindestens ein Epitop innerhalb dieser Region bindet (insbesondere z. B. einschließlich der α -Sekretasestelle 16 bis 17 oder der Stelle, an die Antikörper 266 bindet), sind solche Antikörper in dem Verfahren der Erfindung wirksam.

[0035] Unter "Antikörper" ist ein monoklonaler Antikörper per se oder ein immunologisch wirksames Fragment hiervon, wie ein F_{ab}-, F_{ab'}- oder F_(ab')₂-Fragment hiervon, zu verstehen. In einigen Zusammenhängen hierin werden Fragmente speziell aus Gründen der Hervorhebung genannt, nichtsdestotrotz versteht sich, dass ungestrichen dessen, ob Fragmente speziell genannt sind, der Begriff "Antikörper" derartige Fragmente sowie einzelnkettige Formen umfasst. Solange das Protein die Fähigkeit beibehält, spezifisch an sein beabsichtigtes Ziel zu binden, und im vorliegenden Fall A β -Peptid von seinen Trägerproteinen im Blut zu sequestrieren, ist es in den Begriff "Antikörper" eingeschlossen. Ebenfalls in die Definition von "Antikörper" eingeschlossen sind beispielsweise einzelnkettige Formen, allgemein als F_v-Regionen bezeichnet, von Antikörpern mit dieser Spezifität. Vorzugsweise, jedoch nicht notwendigerweise, werden die in der Erfindung verwendbaren Antikörper rekombinant hergestellt, da eine Manipulation der typischerweise murinen oder anderer, nicht humaner Antikörper mit der geeigneten Spezifität erforderlich ist, um sie in eine humanisierte Form umzuwandeln. Antikörper können glykosyliert sein oder nicht, obwohl glykosylierte Antikörper bevorzugt sind. Antikörper sind, wie es allgemein bekannt ist, in geeigneter Weise über Disulfidbindungen querverknüpft.

[0036] Es ist bekannt, dass die strukturelle Einheit des zugrundeliegenden Antikörpers ein Tetramer umfasst. Jedes Tetramer besteht aus zwei identischen Paaren von Polypeptidketten, wobei jedes Paar eine "leichte" (etwa 25 kDa) und eine "schwere" Kette (etwa 50 bis 70 kDa) besitzt. Der aminotermrale Teil jeder Kette umfasst eine variable Region mit etwa 100 bis 110 oder mehr Aminosäuren, die in erster Linie für die Erkennung von Antigenen verantwortlich ist. Der carboxyterminale Teil jeder Kette definiert eine konstante Region, die in erster Linie für die Effektorfunktion verantwortlich ist.

[0037] Leichte Ketten werden als Gamma, My, Alpha und Lambda klassifiziert. Schwere Ketten werden als Gamma, My, 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 über eine "J"-Region von etwa 12 oder mehr Aminosäuren miteinander verbunden, wobei die schwere Kette ferner eine "D"-Region von etwa 10 weiteren Aminosäuren einschließt.

[0038] Die variablen Regionen eines jeden Paares aus leichter/schwerer Kette bilden die Antikörper-Bindungsstelle. Somit besitzt ein intakter Antikörper zwei Bindungsstellen. Die Ketten weisen alle die gleiche allgemeine Struktur aus relativ konservierten Frameworkregionen (FR), verbunden durch drei hypervariable Regionen, die auch Komplementaritätsbestimmende Regionen oder CDRs genannt werden, auf. Die CDRs aus den zwei Ketten eines jeden Paares werden durch die Frameworkregionen aligniert, was sie zum Binden an ein spezifisches Epitop befähigt. Ausgehend von N-terminal zu C-terminal umfassen sowohl die leichten als auch schweren Ketten die Domänen FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 und FR4. Die Zuordnung von Aminosäuren zu jeder Domäne steht in Übereinstimmung mit wohlbekannten Konventionen [Kabat "Sequences of Proteins of Immunological Interest" National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 und 1991; Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901–917 (1987); Chothia et al., Nature 342: 878–883 (1989)].

[0039] Wie auf dem einschlägigen Fachgebiet wohlbekannt ist, können monoklonale Antikörper mit einer geeigneten Spezifität leicht durch Standardtechniken der Immunisierung von Säugern unter Bildung von Hybridomen aus den Antikörper-produzierenden Zellen der Säuger oder andernfalls Immortalisieren von diesen und Kultivieren der Hybridome oder der immortalisierten Zellen zur Beurteilung dieser hinsichtlich der geeigneten Spezifität erzeugt werden. Im vorliegenden Fall könnten derartige Antikörper durch Immunisieren eines Menschen, Kaninchens, einer Ratte oder einer Maus, beispielsweise mit einem Peptid, das ein Epitop darstellt, das die 13–28-Region des A β -Peptids oder eine geeignete Unterregion hiervon umfasst, erzeugt werden. Die Materialien für eine rekombinante Manipulation können durch Gewinnen der für den gewünschten Antikörper codierenden Nucleotidsequenzen aus dem Hybridom oder anderen Zellen, die es produzieren, erhalten werden. Diese Nucleotidsequenzen können anschließend manipuliert werden, um sie in humanisierter Form bereitzustellen.

[0040] Mit "humanisierter Antikörper" ist ein Antikörper gemeint, der partiell oder vollständig aus Aminosäuresequenzen besteht, die aus einer humanen Antikörperkeimbahn stammen, durch Verändern der Sequenz eines Antikörpers, der nicht humane Komplementaritäts-bestimmende Regionen (CDR) besitzt. Vorzugsweise ist jedoch die variable Region des Antikörpers oder sogar die CDR ebenfalls mittels der Techniken, die heutzutage auf dem einschlägigen Fachgebiet wohlbekannt sind, humanisiert. Die Frameworkregionen der variablen Regionen werden durch die entsprechenden humanen Frameworkregionen ersetzt, wobei die nicht humane CDR im Wesentlichen intakt gelassen wird oder sogar die CDR durch Sequenzen ersetzt wird, die aus einem humanen Genom stammen. Vollständig humano Antikörper werden in gentechnisch modifizierten Mäusen hergestellt, deren Immunsysteme so verändert wurden, dass sie humanen Immunsystemen entsprechen. Wie oben erwähnt, ist es zur Verwendung in den erfundungsgemäßen Verfahren ausreichend, ein immunologisch spezifisches Fragment des Antikörpers einschließlich Fragmenten, die einzelkettige Formen darstellen, zu verwenden.

[0041] Ein humanisierter Antikörper bezieht sich wiederum auf einen Antikörper, der ein humanes Framework und mindestens eine CDR aus einem nicht humanen Antikörper umfasst und bei dem eine beliebige vorhandene konstante Region zu einer konstanten Region von humanem Immunoglobulin im Wesentlichen identisch ist, d. h. mindestens zu etwa 85 bis 90%, vorzugsweise mindestens zu 95% identisch ist. Somit sind alle Teile eines humanisierten Antikörpers, mit Ausnahme möglicherweise der CDRs, im Wesentlichen zu entsprechenden Teilen einer oder mehrerer nativer humaner Immunoglobulinsequenzen identisch. Beispielsweise würde ein humanisiertes Immunoglobulin typischerweise nicht einen chimären Antikörper mit muriner variabler Region/humaner konstanter Region umfassen.

[0042] Humanisierte Antikörper besitzen mindestens drei mögliche Vorteile gegenüber nicht humanen und chimären Antikörpern bei der Verwendung in der Humantherapie:

- 1) da der Effektor teil human ist, kann er besser mit den anderen Teilen des humanen Immunsystems wechselwirken (z. B. die Zielzellen in effizienterer Weise durch komplementabhängige Cytotoxizität (CDC) oder antikörperabhängige zelluläre Cytotoxizität (ADCC) zerstören).
- 2) Das humane Immunsystem sollte Framework oder C-Region des humanisierten Antikörpers nicht als fremd erkennen, und daher sollte die Antikörperreaktion gegenüber einem injizierten Antikörper geringer sein als gegen einen vollständig fremden nicht humanen Antikörper oder einen partiell fremden chimären Antikörper.
- 3) Es wurde berichtet, dass injizierte nicht humane Antikörper eine Halbwertszeit im humanen Blutkreislauf besitzen, die wesentlich kürzer ist als die Halbwertszeit von humanen Antikörpern. Injizierte humanisierte Antikörper werden eine Halbwertszeit besitzen, die im Wesentlichen identisch ist zu derjenigen natürlich vorkommender humarer Antikörper, wodurch es möglich wird, geringere und weniger häufige Dosen zu verabreichen.

[0043] Die Konzipierung humanisierter Immunoglobuline kann wie folgt durchgeführt werden. Falls eine Aminosäure unter die folgende Kategorie fällt, wird die Framework-Aminosäure eines humanen Immunoglobulins, das verwendet werden soll (Akzeptor-Immunoglobulin), durch eine Framework-Aminosäure aus einem CDR-liefernden nicht humanen Immunoglobulin (Donor-Immunoglobulin) ersetzt:

- (a) die Aminosäure in der humanen Frameworkregion des Akzeptor-Immunoglobulins ist an dieser Position für humanes Immunoglobulin unüblich, wohingegen die entsprechende Aminosäure in dem Donor-Immunoglobulin an dieser Position für humanes Immunoglobulin typisch ist;
- (b) die Position der Aminosäure ist unmittelbar benachbart zu einer der CDRs, oder
- (c) ein beliebiges Seitenkettenatom einer Framework-Aminosäure befindet sich innerhalb von etwa 5 bis 6 Å (Zentrum zu Zentrum) eines beliebigen Atoms einer CDR-Aminosäure in einem dreidimensionalen Immunoglobulinmodell [Queen et al., op. cit., und Co et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2869 (1991)]. Wenn jede der Aminosäuren in der humanen Frameworkregion des Akzeptor-Immunoglobulins und einer entsprechenden Aminosäure in dem Donor-Immunoglobulin für humanes Immunoglobulin an dieser Position unüblich ist, wird eine derartige Aminosäure durch eine Aminosäure ersetzt, die für humanes Immunoglobulin an dieser Position typisch ist.

[0044] Der humanisierte Antikörper ist eine humanisierte Form des murinen monoklonalen Antikörpers 266 oder ist vom murinen monoklonalen Antikörper 266 abgeleitet. Die CDRs von humanisiertem 266 besitzen die Aminosäuresequenz der SEQ ID Nrn.: 1 bis 6.

[0045] Eine variable Region der leichten Kette eines humanisierten Antikörpers eines Aspekts der vorliegenden Erfindung besitzt die folgende Aminosäuresequenz, bei der das Framework aus humanen Keimbahn-Vk-Segmenten DPK18 und dem J-Segment Jk1 stammten, mit mehreren Aminosäuresubstitutionen an den Konsensus-Aminosäuren in der gleichen humanen V-Untergruppe, um eine mögliche 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 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 Nr.: 7)

worin:

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

[0046] Eine variable Region der schweren Kette eines humanisierten Antikörpers eines Aspekts der vorliegenden Erfindung besitzt die folgende Aminosäuresequenz, in der das Framework aus humanen Keimbahn-VH-Segmenten DP538 und dem J-Segment JH4 stammten, mit mehreren Aminosäuresubstitutionen an den Kon sensus-Aminosäuren in der gleichen humanen Untergruppe, um eine mögliche 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 Nr.: 8)

worin:

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

[0047] Eine besonders bevorzugte variable Region der leichten Kette eines humanisierten Antikörpers eines Aspekts der vorliegenden Erfindung besitzt die folgende Aminosäuresequenz, in der das Framework aus humanen Keimbahn-Vk-Segmenten DPK18 und dem J-Segment Jk1 stammten, mit mehreren Aminosäuresubstitutionen an den Konsensus-Aminosäuren in der gleichen humanen V-Untergruppe, um eine mögliche 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 Nr.: 9)

[0048] Eine besonders bevorzugte variable Region der schweren Kette eines humanisierten Antikörpers der vorliegenden Erfindung besitzt die folgende Aminosäuresequenz, in der das Framework aus den humanen Keimbahn-VH-Segmenten DP53 und dem J-Segment JH4 stammten:

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 Nr.: 10)

[0049] Eine bevorzugte leichte Kette für einen humanisierten Antikörper der vorliegenden Erfindung besitzt die folgende 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	Phe	
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	115	120	
Gly	Thr	Lys	Val
Glu	Ile	Lys	Arg
Thr	Val	Ala	Ala
Ala	Pro	Ser	Val
125	130	135	
Phe	Ile	Phe	Pro
Pro	Pro	Ser	Asp
Glu	Gln	Leu	Lys
Ser	Gly	Ser	Gly
Thr	Asp	Val	Ala
140	145	150	
Ser	Val	Val	Cys
Cys	Leu	Leu	Asn
Asn	Asn	Phe	Tyr
Tyr	Pro	Arg	Glu
Pro	Glu	Ala	Lys
155	160	165	
Val	Gln	Trp	Lys
Lys	Val	Asp	Asn
Asn	Ala	Leu	Gln
Gln	Ser	Gly	Asn
Ser	Asn	Ser	Gln
170	175	180	
Glu	Ser	Val	Thr
Glu	Gln	Asp	Ser
Lys	Asp	Ser	Thr
Asp	Tyr	Ser	Leu
185	190	195	
Ser	Ser	Thr	Leu
Thr	Leu	Ser	Lys
Ala	Asp	Tyr	Glu
Tyr	Glu	Lys	His
200	205	210	
Val	Tyr	Ala	Cys
Glu	Val	Thr	His
Gln	Gly	Leu	Ser
Ser	Pro	Ser	Val
215			
Thr	Lys	Ser	Phe
Phe	Asn	Arg	Gly
Glu	Cys		

SEQ ID Nr.: 11

[0050] Eine bevorzugte schwere Kette für einen humanisierten Antikörper der vorliegenden Erfindung besitzt die folgende Aminosäuresequenz:

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

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 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 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 Nr.: 12)

[0051] Andere Sequenzen sind für die leichten und schweren Ketten für die humanisierten Antikörper der vorliegenden Erfindung und für humanisierte 266 möglich. Die Immunoglobuline können zwei Paare von leichte Kette/schwere Kette-Komplexen umfassen, wobei mindestens eine Kette murine Komplementaritäts-bestimmende Regionen umfasst, die funktionell an humane Frameworkregionsegmente gebunden sind.

[0052] In einem weiteren Aspekt ist die vorliegende Erfindung auf rekombinante Polynucleotide mit Codierung für Antikörper, die, wenn sie exprimiert sind, CDRs der schweren und leichten Kette aus einem Antikörper der vorliegenden Erfindung umfassen, gerichtet. In Bezug auf die humane Frameworkregion wird eine Framework- oder variable Region-Aminosäuresequenz eines CDR-liefernden nicht humanen Immunoglobulins mit entsprechenden Sequenzen in einer Sequenzsammlung der variablen Region von humanem Immunoglobulin verglichen und eine Sequenz mit einem hohen Prozentanteil an identischen Aminosäuren wird ausgewählt. Als Beispiel dienende Polynucleotide, die bei der Expression für die Polypeptidketten codieren, die die CDRs der schweren und leichten Kette des monoklonalen Antikörpers 266 umfassen, werden in den [Fig. 4](#) und [Fig. 5](#) geliefert. Aufgrund einer Codon-Degeneration und nicht-kritischer Aminosäuresubstitutionen können andere Polynucleotidsequenzen leicht an die Stelle dieser Sequenzen gesetzt werden. Speziell bevorzugte Polynucleotide der vorliegenden Erfindung codieren für Antikörper, die, wenn sie exprimiert werden, die CDRs der SEQ ID Nr.: 1 bis SEQ ID Nr.: 6, oder eine beliebige der variablen Regionen der SEQ ID Nr.: 7 bis SEQ ID Nr.: 10, oder die leichten und schweren Ketten der SEQ ID Nr.: 11 und SEQ ID Nr.: 12 umfassen.

[0053] Die Polynucleotide werden typischerweise weiter eine Polynucleotidsequenz zur Expressionssteuerung, funktionell gebunden an die für humanisiertes Immunoglobulin codierenden Sequenzen einschließlich natürlich assoziierten oder heterologen Promotorregionen, umfassen. Vorzugsweise wird es sich bei den Expressionssteuerungssequenzen um eukaryotische Promotersysteme in Vektoren mit der Fähigkeit zur Transformation oder Transfektion eukaryotischer Wirtszellen handeln, jedoch können ebenfalls Steuerungssequenzen für prokaryotische Wirte verwendet werden. Nachdem der Vektor in die geeignete Wirtszelllinie eingebaut wurde, wird die Wirtszelle unter Bedingungen vermehrt, die für eine hochgradige Expression der Nucleotidsequenzen geeignet sind, und, falls gewünscht, kann die Sammlung und Reinigung der leichten Ketten, schweren Ketten, von Dimeren der leichten/schweren Ketten oder der intakten Antikörper, der bindenden Fragmente oder anderer Immunoglobulinformen folgen.

[0054] Die Nucleotidsequenzen der vorliegenden Erfindung mit der Fähigkeit, letztendlich die gewünschten humanisierten Antikörper zu exprimieren, können aus einer Vielzahl von verschiedenen Polynucleotiden (genomischer oder cDNA, RNA, synthetischen Oligonucleotiden und dgl.) und Komponenten (z. B. V-, J-, D- und C-Regionen) sowie mittels einer Vielzahl verschiedener Techniken gebildet werden. Das Zusammenfügen ge-

eigneter genomischer und synthetischer Sequenzen ist ein übliches Herstellungsverfahren, es können jedoch auch cDNA-Sequenzen verwendet werden.

[0055] DNA-Sequenzen der humanen konstanten Region können gemäß wohlbekannter Verfahren aus einer Vielzahl von humanen Zellen, jedoch vorzugsweise aus immortalisierten B-Zellen, isoliert werden. Die CDRs zum Herstellen der Immunoglobuline der vorliegenden Erfindung werden in ähnlicher Weise aus nicht humanen monoklonalen Antikörpern mit der Fähigkeit, an ein Epitop zwischen den Aminosäuren 13 und 28 des A β -Peptids zu binden, abgeleitet, wobei die monoklonalen Antikörper in einem beliebigen zweckdienlichen Säuger als Quelle hergestellt werden, einschließlich in Mäusen, Ratten, Kaninchen oder anderen Wirbeltieren, die in der Lage sind, Antikörper mittels wohlbekannter Verfahren, wie sie oben beschrieben sind, zu produzieren. Geeignete Zellen als Quelle für die Polynukleotidsequenzen und Wirtszellen zur Expression und Sekretion von Immunoglobulin können aus einer Reihe von auf dem einschlägigen Fachgebiet wohlbekannten Quellen erhalten werden.

[0056] Zusätzlich zu den hier speziell beschriebenen humanisierten Immunoglobulinen können weitere "im Wesentlichen homologe" modifizierte Immunoglobuline unter Verwendung verschiedener rekombinanter DNA-Techniken, die Fachleuten auf dem einschlägigen Fachgebiet wohlbekannt sind, leicht konzipiert und hergestellt werden. Beispielsweise können Frameworkregionen sich von den nativen Sequenzen auf der Stufe der Primärstruktur durch mehrere Aminosäuresubstitutionen, terminale und intermediäre Additionen und Deletions und dgl. unterscheiden. Darüber hinaus kann eine Vielzahl von verschiedenen humanen Frameworkregionen einzeln oder in Kombination als Basis für die humanisierten Immunoglobuline der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Im Allgemeinen können Modifikationen dieser Gene leicht durch eine Vielzahl wohlbekannter Techniken, wie stellengerichtete Mutagenese, bewerkstelligt werden.

[0057] Alternativ können Polypeptidfragmente, die lediglich einen Teil der primären Antikörperstruktur umfassen, hergestellt werden, wobei diese Fragmente eine oder mehrere Immunoglobulinaktivitäten (z. B. die Komplementfixierungsaktivität) besitzen. Diese Polypeptidfragmente können durch proteolytische Spaltung intakter Antikörper durch auf dem einschlägigen Fachgebiet bekannte Verfahren oder durch Insertieren von Stopcodons an den gewünschten Stellen in Vektoren unter Verwendung stellengerichteter Mutagenese, wie beispielsweise nach CH1 zur Herstellung von Fab-Fragmenten oder nach der Gelenkregion zur Herstellung von F(ab')₂-Fragmenten hergestellt werden. Einzelketige Antikörper können durch Verbinden von VL und VH mit einem DNA-Linker hergestellt werden.

[0058] Wie zuvor dargelegt, wird die codierende Nucleotidsequenz in den Wirten exprimiert, nachdem die Sequenzen funktionell an eine Expressionssteuerungssequenz gebunden wurden (d. h. positioniert wurden, um das Funktionieren von dieser sicherzustellen). Diese Expressionsvektoren sind typischerweise in den Wirtsorganismen entweder als Episome oder als ein integraler Teil der chromosomalen DNA des Wirts replizierbar. Üblicherweise werden Expressionsvektoren Selektionsmarker, z. B. Tetracyclin oder Neomycin, enthalten, um die Erkennung derjenigen Zellen zu ermöglichen, die mit den gewünschten DNA-Sequenzen transformiert wurden.

[0059] *E. coli* ist ein prokaryotischer Wirt, der sich speziell zum Klonieren der Nucleotide der vorliegenden Erfindung eignet. Andere, zur Verwendung geeignete mikrobielle Wirtse umfassen Bacilli wie *Bacillus subtilis* oder andere Enterobacteriaceae wie *Salmonella*, *Serratia* und verschiedene *Pseudomonas*-Spezies. In diesen prokaryotischen Wirten kann man ferner Expressionsvektoren herstellen, die typischerweise Expressionssteuerungssequenzen enthalten, die mit der Wirtszelle (z. B. einem Replikationsursprung) kompatibel sind. Zusätzlich kann ein beliebiger einer Reihe von wohlbekannten Promotoren vorhanden sein, wie das Lactose-Promotorsystem, ein Tryptophan(Trp)-Promotorsystem, ein beta-Lactamase-Promotorsystem oder ein Promotorsystem aus Phage lambda. Die Promotoren werden typischerweise die Expression steuern, optional mit einer Operatorsequenz, und Ribosom-Bindungsstellensequenzen und dgl. zum Initiieren und Vervollständigen von Transkription und Translation besitzen.

[0060] Ferner können andere Mikroben wie Hefe zur Expression verwendet werden. *Saccharomyces* ist ein bevorzugter Wirt, wobei geeignete Vektoren Expressionssteuerungssequenzen, wie Promotoren, einschließlich 3-Phosphoglycerat-Kinase oder andere glykolytische Enzyme und einen Replikationsursprung, Terminationssequenzen und dgl., wie gewünscht, besitzen.

[0061] Zusätzlich zu Mikroorganismen kann eine Zellkultur aus Säugergewebe ebenfalls zum Exprimieren und Herstellen der Polypeptide der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Eukaryotische Zellen sind tatsächlich bevorzugt, da eine Reihe von geeigneten Wirtszelllinien mit der Fähigkeit, intakte Immunoglobuline

zu sezernieren, auf dem einschlägigen Fachgebiet entwickelt wurden, und diese umfassen die CHO-Zelllinien, verschiedene COS-Zelllinien, Syrische Hamsterovar-Zelllinien, HeLa-Zellen, vorzugsweise Myelomzelllinien, transformierte B-Zellen, humane embryonale Nierenzelllinien oder Hybridome. Expressionsvektoren für diese Zellen können Expressionssteuerungssequenzen wie einen Replikationsursprung, einen Promotor, einen Enhancer und notwendige Prozessierungsinformationsstellen, wie Ribosom-Bindungsstellen, RNA-Splicestellen, Polyadenylierungsstellen und transkriptionelle Terminatorsequenzen, umfassen. Bevorzugte Expressionssteuerungssequenzen sind Promotoren, die aus Immunoglobulinen, SV40, Adenovirus, Rinderpapillomvirus, Cytomegalovirus und dgl. stammen.

[0062] Die Vektoren, die interessierenden Nucleotidsequenzen, (beispielsweise die für die schwere und leichte Kette codierenden Sequenzen und die Expressionssteuerungssequenzen) enthalten, können in die Wirtszelle mittels wohlbekannter Verfahren überführt werden, die von dem Typ des zellulären Wirts abhängen. Beispielsweise wird für prokaryotische Zellen üblicherweise eine Calciumchloridtransfektion verwendet, wohingegen eine Calciumphosphatbehandlung oder Elektroporation für andere zelluläre Wirte verwendet werden können.

[0063] Nach der Expression können die ganzen Antikörper, deren Dimere, individuelle leichte und schwere Ketten oder andere Immunoglobulinformen der vorliegenden Erfindung gemäß Standardverfahren des einschlägigen Fachgebiets gereinigt werden, einschließlich Ammoniumsulfatpräzipitation, Ionenaustausch-, Affinitäts-, Umkehrphasen-, hydrophobe Wechselwirkungs-Säulenchromatographie, Gelelektrophorese und dgl. Im Wesentlichen reine Immunoglobuline mit einer mindestens etwa 90- bis 95%igen Homogenität sind bevorzugt und eine Homogenität von 98 bis 99% oder mehr ist am stärksten bevorzugt für pharmazeutische Verwendungen. Nachdem die Polypeptide je nach Wunsch partiell oder zur Homogenität gereinigt wurden, können sie anschließend, wie hier gezeigt, therapeutisch oder prophylaktisch verwendet werden.

[0064] Die Antikörper (einschließlich immunologisch reaktiver Fragmente) werden an ein Individuum verabreicht, das gefährdet ist, mit A β in Verbindung stehende Symptome oder Pathologien, wie klinische oder präklinische Alzheimer-Erkrankung, Down-Syndrom oder klinische oder präklinische Amyloidangiopathie, zu entwickeln oder diese aufweist, wobei Standardverabreichungstechniken verwendet werden, vorzugsweise auf peripherem Weg (d. h. nicht durch Verabreichung in das zentrale Nervensystem) mittels intravenöser, intraperitonealer, subkutaner, pulmonaler, transdermaler, intramuskulärer, intranasaler, bukkaler, lingualer Verabreichung oder mittels Verabreichung von Zäpfchen. Obwohl die Antikörper direkt in das ventrikuläre System, die Rückenmarksflüssigkeit oder das Gehirnparenchym verabreicht werden können und Techniken zur Applikation an diesen Orten auf dem einschlägigen Fachgebiet wohlbekannt sind, ist es nicht notwendig, diese eher schwierigen Vorgehensweisen zu verwenden. Die Antikörper der Erfindung sind wirksam, wenn sie durch einfachere Techniken, die sich auf das periphere Blutkreislaufsystem stützen, verabreicht werden. Die Vorteile der vorliegenden Erfindung umfassen die Fähigkeit des Antikörpers, seine vorteilhaften Wirkungen auszuüben, selbst wenn er nicht direkt an das zentrale Nervensystem selbst geliefert wird. In der Tat wurde hierin gezeigt, dass die Menge an Antikörper, die die Blut-Hirn-Schranke durchquert, < 0,1% der Plasmaspiegel beträgt und dass die erfindungsgemäßen Antikörper ihre Fähigkeit ausüben, A β im peripheren Kreislauf zu sequestrieren und die Clearance von löslichem A β im ZNS und Plasma zu verändern.

[0065] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen zur Verabreichung sind dahingehend gestaltet, dass sie für die gewählte Verabreichungsweise geeignet sind und pharmazeutisch akzeptable Hilfsstoffe, wie Dispergiermittel, Puffer, grenzflächenaktive Mittel, Konservierungsstoffe, Solubilisierungsmittel, für Isotonizität sorgende Mittel, Stabilisierungsmittel und dgl. werden je nach Eignung verwendet. Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton PA, jüngste Ausgabe, das hier durch Bezugnahme aufgenommen ist, liefert ein Handbuch für Formulierungstechniken, wie sie Praktikern allgemein bekannt sind. Es kann insbesondere sinnvoll sein, die Löslichkeitseigenschaften der erfindungsgemäßen Antikörper zu verändern, indem sie stärker lipophil gemacht werden, beispielsweise durch ihre Einkapselung in Liposomen oder durch Blockieren von polaren Gruppen.

[0066] Eine periphere systemische Abgabe durch intravenöse oder intraperitoneale oder subkutane Injektion ist bevorzugt. Geeignete Vehikel für derartige Injektionen sind unkompliziert. Zusätzlich jedoch kann eine Verabreichung auch durch die mukosalen Membranen mittels nasalen Aerosolen oder Suppositorien bewirkt werden. Geeignete Formulierungen für derartige Verabreichungsarten sind wohlbekannt und umfassen typischerweise grenzflächenaktive Mittel, die den Transport durch die Membran erleichtern. Derartige grenzflächenaktive Mittel sind häufig von Steroiden abgeleitet oder sind kationische Lipide, wie N-[1-(2,3-Dioleoyl)propyl-N,N,N-trimethylammoniumchlorid (DOTMA) oder verschiedene Verbindungen wie Cholesteryl-hemisuccinat, Phosphatidylglycerin und dgl.

[0067] Die Konzentration des humanisierten Antikörpers in Formulierungen von lediglich 0,1 Gew.-% bis zu 15 oder 20 Gew.-% wird in erster Linie auf Basis der Flüssigkeitsvolumina, Viskositäten usw. in Übereinstimmung mit der speziellen gewählten Verabreichungsart ausgewählt. Somit könnte eine typische pharmazeutische Zusammensetzung zur Injektion erstellt werden, die 1 mL steriles gepuffertes Wasser oder phosphatgepufferte Kochsalzlösung und 1 bis 100 mg des humanisierten Antikörpers der vorliegenden Erfindung enthält. Die Formulierung könnte nach der Herstellung der Formulierung sterilfiltriert oder anderweitig mikrobiologisch akzeptabel gemacht werden. Eine typischer Zusammensetzung zur intravenösen Infusion könnte ein Volumen von (bis zu) 250 mL einer Flüssigkeit, wie steriler Ringer-Lösung, und eine Antikörperkonzentration von 1 bis 100 mg pro mL oder mehr aufweisen. Die therapeutischen Mittel der Erfindung können zur Lagerung eingefroren oder lyophilisiert und in einem geeigneten sterilen Träger vor der Verwendung rekonstituiert werden. Die Lyophilisierung und Rekonstituierung können zu variierenden Graden eines Verlustes der Antikörperaktivität führen (z. B. neigen bei herkömmlichen Immunglobulinen IgM-Antikörper dazu, einen höheren Aktivitätsverlust aufzuweisen als IgG-Antikörper). Die Dosierungen können angepasst werden, um dies zu kompensieren. Der pH-Wert der Formulierung wird so ausgewählt werden, dass ein Ausgleich zwischen Antikörperstabilität (chemisch und physikalisch) und der Annehmlichkeit für den Patienten bei Verabreichung stattfindet. Im Allgemeinen wird ein pH-Wert zwischen 4 und 8 toleriert.

[0068] Obwohl die vorhergehenden Verfahren die zweckdienlichsten und geeignetsten für eine Verabreichung von Proteinen wie humanisierten Antikörpern zu sein scheinen, können durch geeignete Adaption andere Techniken zur Verabreichung, wie eine transdermale Verabreichung und eine orale Verabreichung verwendet werden, mit der Maßgabe, dass eine passende Formulierung konzipiert wird.

[0069] Zusätzlich kann es erwünscht sein, Formulierungen mit gesteuerter Freisetzung unter Verwendung biologisch abbaubarer Überzüge und Matrices oder osmotische Minipumpen oder Abgabesysteme auf Basis von Dextranperlen, Alginat oder Collagen zu verwenden.

[0070] Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Formulierungen zur Verabreichung der Antikörper der Erfindung verfügbar und auf dem einschlägigen Fachgebiet wohlbekannt sind und aus einer Vielzahl von Optionen ausgewählt werden können.

[0071] Die typischen Dosierungsniveaus können unter Verwendung von klinischen Standardtechniken optimiert werden und werden von der Verabreichungsweise und dem Zustand des Patienten abhängen.

[0072] Die folgenden Beispiele sollen der Veranschaulichung der Erfindung dienen, jedoch die Erfindung nicht einschränken.

[0073] Die hier nachfolgend genannten Beispiele verwenden unter anderem einen als "266" bezeichneten murinen monoklonalen Antikörper, der ursprünglich durch Immunisierung mit einem Peptid, das aus den Resten 13 bis 28 von humanem A β -Peptid besteht, hergestellt wurde. Die Immunoreaktion des Antikörpers mit diesem Peptid wurde bestätigt, es war jedoch vorausgehend berichtet worden, dass der Antikörper nicht mit dem Peptid, das lediglich die Reste 17 bis 28 von humanem A β -Peptid enthält, oder mit beliebigen anderen Epitopen innerhalb des A β -Peptids reagiert. Die Herstellung dieses Antikörpers ist im US-Patent 5.766.846 beschrieben, das hier durch Bezugnahme aufgenommen wird. Da die Beispiele hierin Experimente beschreiben, die in murinen Systemen durchgeführt werden, ist die Verwendung von murinen monoklonalen Antikörpern zufriedenstellend. Jedoch sind bei den erfindungsgemäßen Behandlungsverfahren, die für eine Verwendung am Menschen vorgesehen sind, humanisierte Formen der Antikörper mit einer Immunospezifität, die derjenigen von Antikörper 266 entspricht, bevorzugt.

Beispiel 1

Sequestrierung von zugegebenem A β -Peptid in humanen Flüssigkeiten

[0074] Proben von humaner Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) (50 μ L) und von humanem Plasma (50 μ L) wurden eine Stunde bei Raumtemperatur wie folgt inkubiert:

1. alleine
2. zusammen mit 5 ng A β ₄₀-Peptid, oder
3. 5 ng A β ₄₀-Peptid plus 1 mg monoklonaler Antikörper 266 (beispielsweise in US-Patent 5.766.846 beschrieben, hier durch Bezugnahme aufgenommen).

[0075] Die Proben wurden anschließend auf einem 4–25%-nicht-denaturierenden Gradientengelelektrophoretisch getrennt, d. h. einer nicht denaturierenden Gradientenelektrophorese (NDGGE) unterzogen und auf Nitrocellulose transferiert. Die Blots wurden anschließend mit Ponceau S angefärbt oder für einen Western-Blot mit Biotin-markiertem monoklonalem Antikörper (3D6) sondiert, der gegen die ersten fünf Aminosäuren von A β -Peptid gerichtet ist, mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase entwickelt und mittels verstärkter Chemolumineszenz (ECL) nachgewiesen. Die hydratisierten Durchmesser der in den Banden auf den Blots enthaltenen Materialien wurden unter Verwendung von Molekulargewichtsmarkern von Pharmacia abgeschätzt. Somit würde das A β -Peptid, wenn es an andere Moleküle gebunden ist, bei der Größe des resultierenden Komplexes laufen.

[0076] Western-Blots von CSF entweder mit oder ohne 5 ng A β -Peptid zeigen keinen Hinweis auf das A β -Peptid als Reaktion auf einen durch den Antikörper 3D6 vermittelten Nachweis. Ähnliche Ergebnisse werden für humanes Plasma erhalten. Dies war der Fall, trotz der Tatsache, dass A β -Peptid durch SDS-PAGE und anschließenden Western-Blot unter Verwendung der gleichen Technik und in den gleichen CSF-Proben nachgewiesen werden konnte. Vermutlich wurde der Nachweis des A β -Peptids durch Wechselwirkungen zwischen diesem Peptid und anderen Faktoren in den getesteten Flüssigkeiten verhindert. Wenn jedoch mAb 266 zu der Inkubation zugegeben wird, sind sowohl im Plasma als auch in der CSF charakteristische Banden vorhanden, die sequestriertes A β -Peptid darstellen, das an den Antikörper komplexiert ist. Die Hauptbande liegt bei einem hydratisierten Durchmesser von ungefähr 11 nm, was einem Antikörper-Monomer entspricht, mit einer zusätzlichen kleineren Bande bei 13 nm, die einem Antikörper-Dimer entspricht.

Beispiel 2

Spezifität des sequestrierenden Antikörpers

[0077] Es wurden Proben verwendet, die 50 μ L humane CSF oder 10 μ L APP V^{717F} -CSF enthalten. APP V^{717F} sind transgene Mäuse, die ein Mausmodell der Alzheimer-Erkrankung darstellen, bei denen das humane Amyloid-Vorläuferprotein, das mit einer familiären Alzheimer-Mutation transgen ist, exprimiert wird und zur Bildung von humanem A β -Peptid im Zentralnervensystem führt.

[0078] Die Proben wurden mit oder ohne verschiedene mAbs (1 μ g) während 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend, wie in Beispiel 1 beschrieben, auf einer 4–25% NDGGE einer elektrophoretisch getrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Die Antikörper waren die folgenden:

mAb 266 (bindet an die Positionen 13–28);
 mAb 4G8 (bindet an die Positionen 17–24);
 QCBpan (Kaninchen-Polyklonal für die Positionen 1–40);
 Maus-IgG (nicht spezifisch);
 mAb 3D6 (bindet an die Positionen 1–5);
 mAb 21F12 (bindet an die Positionen 33–42);
 mAb 6E10 (bindet an die Positionen 1–17); und
 QCB_{40,42} (Kaninchen-Polyklonale gegen A β ₄₀ und A β ₄₂).

[0079] Der Nachweis des Komplexes aus A β -Peptid und Antikörper erfolgte gemäß Beschreibung in Beispiel 1 durch Biotin-markierten 3D6 (gegen den N-Terminus von A β -Peptid), gefolgt von Streptavidin-HRP und ECL. Ein ähnlicher Nachweis erfolgte in humarer CSF unter Inkubation mit mAb 266, wobei in einigen Fällen QCB_{40,42}, das an den Carboxyterminus von A β -Peptid bindet, 3D6 ersetzte.

[0080] Die Ergebnisse zeigten, dass von den getesteten Antikörpern lediglich mAb 4G8 und mAb 266 den Nachweis von A β -Peptid erlaubten.

[0081] Die Ergebnisse zeigten, dass bei humarer CSF lediglich mAb 266 und mAb 4G8 in der Lage waren, einen Antikörper-A β -Komplex in nachweisbaren Mengen zu sequestrieren (ohne jeglichen Antikörper wird wiederum kein A β nachgewiesen). MAb 266 war ferner in der Lage, mit CSF von APP V^{717F} -transgenen Mäusen ähnliche Ergebnisse wie jene zu liefern, die mit humarer CSF erhalten wurden. A β -Peptid konnte in humarer CSF unter Verwendung von mAb 266 sequestriert werden, ungeachtet, ob 3D6- oder QCB_{40,42}-Antikörper zur Entwicklung des Western-Blots verwendet wurde.

Beispiel 3

Darstellung eines A β -Peptid-mAb-266-Komplexes mittels zweidimensionaler Elektrophorese

[0082] Eine 50 ng A β_{40} -Peptid enthaltende Probe wurde mit 2 μ g mAb 266 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Eine entsprechende Inkubation von mAb 266 alleine wurde als Kontrolle verwendet.

[0083] Die Proben wurden anschließend einer zweidimensionalen Gelelektrophorese unterzogen.

[0084] In der ersten Dimension wurden die inkubierten Proben, wie in Beispiel 1 beschrieben, einer NDGGE unterzogen. Das Polyacrylamidgel wurde anschließend in einzelne Bahnen, rechtwinklig zur Richtung des erstdimensionalen Fließens geschnitten und eine Geltrennung unter denaturierenden/reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE (Tricin-Harstoffgel) wurde in der zweiten Dimension durchgeführt. Das Vorhandensein der Banden wurde entweder mittels Ponceau-S-Anfärbung (jegliches Protein) oder durch spezifische Entwicklung unter Verwendung von 6E10 mAb (Senetek, Inc.) und biotinyliertes Anti-Maus-A β in dem auf HRP basierenden Nachweissystem nachgewiesen.

[0085] Die Ponceau-S-Anfärbung der Nitrocelluloseblots nach dem Transfer gestattete die Visualisierung der schweren und leichten Ketten von mAb 266 alleine. Es wurde bestätigt, dass sich das A β -Peptid in einem Komplex mit mAb 266 befand, da eine Bande bei 4 kD beobachtet wurde, die mit der Größe des eine volle Länge aufweisenden mAb 266, die nach der Erstdimensions-NDGGE gesehen wird, in Einklang steht.

Beispiel 4

Nachweis der Nicht-Äquivalenz von Bindung und Sequestrierung

[0086] Es wird angenommen, dass A β -Peptid, wie es im Plasma und der CSF zirkuliert, in einem Komplex mit Proteinen, einschließlich Apolipoprotein E, enthalten ist. Das vorliegende Beispiel zeigt, dass Antikörper gegen ApoE, obwohl sie in der Lage sind, an den Komplex zu binden, ApoE nicht von dem Rest des Komplexes sequestrieren.

[0087] ApoE-Komplexe (500 ng) wurden mit monoklonalen Antikörpern oder polyklonalen Antikörpern gegen ApoE (2 μ g) eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die inkubierten Proben wurden anschließend einer NDGGE unter Verwendung der in Beispiel 1 beschriebenen Techniken unterzogen. Nach der NDGGE wurde ein Western-Blot mit affinitätsgereinigten Ziege-anti-ApoE-Antikörpern unter Nachweis mittels ECL durchgeführt. Wenn kein Antikörper vorhanden ist, kann ApoE bei 8 bis 13 nm nachgewiesen werden, was mit seinem Vorhandensein in Lipoproteinteilchen konsistent ist. Die Anwesenheit von monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern gegen ApoE führt zu einem Populationsshift von ApoE zu größeren molekularen Spezies, einem "Supershift". Dies zeigt, dass die gegen ApoE gerichteten Antikörper ApoE nicht sequestrierten, d. h. nicht aus einem Lipoproteinteilchen entfernten, sondern dass sie vielmehr an ApoE auf den Lipoproteinen unter Erzeugung einer größermolekularen Spezies binden.

Beispiel 5

Sequestrierung von A β -Peptid wird nicht durch Anti-ApoE-Antikörper gestört

[0088] Eine Probe von 100 μ L humaner CSF wurde entweder mit mAb 266 alleine oder mit polyklonalem Anti-ApoE oder mit beiden Antikörpern während 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend mittels NDGGE gemäß Beschreibung in Beispiel 1 analysiert und die Detektion der Banden wurde gemäß Beschreibung in Beispiel 1 durchgeführt.

[0089] Die Ergebnisse zeigen, dass soweit mAb 266 zu der Probe zugegeben wurde, die Bande bei einem Durchmesser von etwa 11 nm, die für den sequestrierten 266-A β -Komplex charakteristisch ist, sichtbar war. Dies ist der Fall, unabhängig davon, ob Anti-ApoE vorhanden ist oder nicht. Diese Bande, die sequestriertes A β aufzeigt, erscheint ebenfalls, wenn 50 ng A β -Peptid zu dem Inkubationsgemisch in Anwesenheit von mAb 266 zugegeben wird. Somit stört eine Veränderung des Molekulargewichts von ApoE durch die Anwesenheit von Anti-ApoE-Antikörpern nicht die Sequestrierung von A β -Peptid durch mAb 266.

Beispiel 6

Sequestrierung von A β -Peptid in vivo

A. Transgene APP V^{717F} -Mäuse, die auch als PDAPP-Mäuse bezeichnet werden, überexprimieren eine mutante Form von humanem APP-Protein. Diese Mäuse produzieren humanes A β im ZNS und weisen erhöhte Spiegel von humanem A β -Peptid auf, das in der CSF und dem Plasma zirkuliert. Acht Monate alten Mäusen wurde intravenös entweder Kochsalzlösung oder 100 μ g mAb 266 injiziert. Sie wurden 10 Minuten nach der anfänglichen Injektion und erneut 20 Stunden nach der anfänglichen Injektion zur Ader gelassen.

[0090] 20 μ L Plasma von jedem Tier enthaltende Proben wurden mittels NDGGE und Western-Blot mit Antikörper 3D6 gemäß Beschreibung in Beispiel 1 analysiert. Die Tiere, denen Kochsalzlösung injiziert worden war, zeigten nicht die Anwesenheit der charakteristischen 11 nm-Bande von sequestriertem A β -Peptid nach 10 Minuten oder nach 20 Stunden. Jedoch zeigten die zwei Tiere, denen mAb 266 injiziert worden war, das Erscheinen dieser Bande nach 20 Stunden.

B. Zwei Monate alte APP V^{717F} -Mäuse wurden in dieser Studie verwendet. Am Tag 0 erhielten die Mäuse entweder keinen mAb 266, 1 mg mAb 266 oder 100 μ g dieses Antikörpers. Plasmaproben wurden zwei Tage vor der Verabreichung der Antikörper und an den Tagen 1, 3, 5 und 7 entnommen. Die Plasmaproben wurden einer NDGGE und anschließend einem Western-Blotten und einer Detektion mit 3D6 gemäß Beschreibung in Beispiel 1 unterzogen. An sämtlichen Zeitpunkten nach Verabreichung von mAb 266 wurde der 266/A β -Komplex nachgewiesen, wenn die Plasmaprobe nicht mit Protein G, das an Immunoglobulin bindet und dadurch den mAb 266 wirksam entfernt, behandelt worden war. Es wurden konsistente Spiegel des Komplexes über den getesteten Zeitraum hinweg festgestellt, mit Ausnahme eines leichten Abfalls am Tag 7 bei Tieren, denen 100 μ g mAb 266 injiziert worden war; im Allgemeinen waren die Spiegel in Tieren, denen 100 μ g verabreicht worden waren, durchgehend niedriger als diejenigen, die bei Mäusen gefunden wurden, denen 1 mg dieses Antikörpers verabreicht worden war.

C. Zwei Monate alten APP V^{717F} -Mäusen wurde 1 mg mAb 266 intravenös verabreicht und eine Plasmaprobe von 25 μ L wurde jedem Tier entnommen. Die Plasmaprobe wurde einer NDGGE und anschließend einem Western-Blot gemäß obiger Beschreibung unterzogen, mit der Ausnahme, dass einem Binden mit biotinyliertem 3D6 eine Detektion mit Streptavidin 125 I (Amersham) und Exposition mit einem Phosphorimager (Radiographiebildschirm) folgten. Der Spiegel des Komplexes wurde im Vergleich zu einer Standardkurve unter Verwendung bekannter Mengen von mit Sättigungsspiegeln von mAb 266 komplexiertem A β_{40} abgeschätzt und in ähnlicher Weise nachgewiesen. Die Menge von A β -Peptid, das an mAb 266 gebunden ist, wurde bei etwa 100 ng/mL geschätzt, was eine Erhöhung von etwa dem 1000-Fachen über dem endogenen A β -Peptid bei diesen Mäusen, das gemäß Bestimmung etwa 100 pg/mL beträgt, darstellt. Dies ist ferner ähnlich zu dem Spiegel von A β -Peptid im APP V^{717F} -Gehirn vor der A β -Ablagerung (50 bis 100 ng/g); humanes APP und humanes A β werden in APP V^{717F} -Tg-Mäusen nahezu ausschließlich im Gehirn gebildet. Somit scheint es, dass die Anwesenheit von mAb 266 im Plasma als eine A β -Peptid-Senke wirkt, die den Netto-Efflux von A β -Peptid aus dem ZNS in das Plasma erleichtert. Dieser erhöhte Netto-Efflux resultiert wahrscheinlich sowohl aus einer Erhöhung des A β -Effluxes aus dem ZNS in das Plasma als auch davon, dass im Plasma befindliches A β an einem erneuten Eintreten in das Gehirn gehindert wird.

[0091] Die korrekte Größe für das sequestrierte A β -Peptid wurde durch Laufenlassen von 20 μ L umfassenden Plasmaproben, die aus APP V^{717F} -Mäusen 24 Stunden nach Injektion mit 1 mg mAb 266 erhalten wurden, auf TRIS-Tricin SDS-PAGE-Gelen und anschließendes Western-Blotten unter Verwendung von Anti-A β -Antikörper 6E10 vor oder nach einer Exposition mit Protein G unter Verwendung von Protein-G-gebundenen Perlen bestätigt. Eine Bande, die durch Protein G abgereichert wurde, wurde bei 4 bis 8 kD nachgewiesen, was mit der Anwesenheit von Monomeren und möglicherweise Dimeren von A β -Peptid übereinstimmt.

D. Zwei Monate alte APP V^{717F} -Mäuse wurden entweder mit PBS ($n = 7$) oder 500 μ g biotinyliertem mAb 266 – d. h. m266B ($n = 9$) – intraperitoneal behandelt. Sowohl vor als auch 24 Stunden nach der Injektion wurde das Plasma auf Gesamt-A β -Peptid unter Verwendung einer Modifikation des ELISA-Verfahrens von K. Johnson-Wood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94: 1550–1555; und K. R. Bales et al., Nature Genet (1997) 17: 263–264. analysiert. Das Gesamt-A β , das an m266B gebunden hatte, wurde unter Verwendung von 96 Mulden aufweisenden Optiplatten (Packard, Inc.), die mit m3D6 beschichtet waren, gemessen. Verdünnte Plasmaproben und Standards (variierende Konzentrationen von A β_{40} und m266B) wurden über Nacht in den beschichteten Platten inkubiert und die Menge von Gesamt-A β /m266B-Komplex wurde unter Verwendung von 125 I-Streptavidin bestimmt. Zusätzlich wurden am 24-Stunden-Zeitpunkt die Plasmaproben zuerst mit Protein G behandelt, um nicht an mAb 266 gebundenes A β -Peptid zu quantifi-

zieren, und A β _{Gesamt} und A β ₄₂ wurden mittels ELISA in der CSF bestimmt. Bei Tieren, denen PBS injiziert worden war, betragen die Plasmaspiegel von A β -Peptid sowohl vor als auch nach der Injektion 140 pg/mL. Die Plasmaspiegel waren ähnlich bei den mit mAb 266 injizierten Mäusen vor der Injektion, jedoch waren die Spiegel von nicht an mAb 266 gebundenem A β -Peptid 24 Stunden nach Injektion nicht nachweisbar.

[0092] Die Spiegel in der CSF wurden ebenfalls gemessen; die CSF stellt ein extrazelluläres Kompartiment innerhalb des ZNS dar und die Konzentration von Molekülen in der CSF spiegelt zu einem gewissen Ausmaß die Konzentration von Substanzen im Extrazellulärraum des Gehirns wieder. Die CSF wurde aus dem Kompartiment der Cisterna magna isoliert. Die Mäuse wurden mit Pentobarbital anästhesiert und die Muskulatur von der Schädelbasis bis zu den ersten Rückenwirbeln wurde entfernt. CSF wurde durch vorsichtiges Punktieren der Arachnoidmembran, die die Zisterne bedeckt, mit einer Mikronadel unter einem Präpariermikroskop und Aufziehen der CSF in eine Mikropipette aus Polypropylen gesammelt. 24 Stunden nach der Injektion wurde eine Erhöhung des Gesamt-A β -Peptids in der CSF von Mäusen, denen mAb 266 injiziert worden war, festgestellt und es wurde in der CSF eine etwa zweifache Erhöhung hinsichtlich A β ₄₂ im Vergleich zu Mäusen, denen PBS injiziert worden war, erhalten. Dies wurde unter Verwendung denaturierender Gelelektrophorese, gefolgt von Western-Blotten mit für A β ₄₂ spezifischem Antikörper 21F12, bestätigt.

[0093] In einem zusätzlichen Experiment wurde drei Monate alten APP^{V717F}-Tg-Mäusen entweder PBS oder mAb 266 intravenös injiziert und sowohl die A β ₄₀- als auch die A β ₄₂-Spiegel wurden in der CSF wie folgt bestimmt:

Zur Messung von A β ₄₀ wurde der monoklonale Antikörper mG2G3, der für A β ₄₀ spezifisch ist, verwendet. Der beschriebene ELISA (K. Johnson-Wood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94: 1550–1555) wurde in einen RIA modifiziert, indem das Streptavidin-HRP-Reagens durch ¹²⁵I-Streptavidin ersetzt wurde. Bei Plasma- und CSF-Proben wurde das Verfahren unter nicht-denaturierenden Bedingungen ohne Guanidin in den Puffern durchgeführt. Für die Bestimmung von Carbonat-löslichem und -unlöslichem A β in Gehirnhomogenat wurden die Proben mit 10 mM Carbonat, 40 mM NaCl, pH-Wert 11,5 (4°C) homogenisiert, 15 min bei 10000 × g zentrifugiert und A β wurde in den Überstands-(löslich) und Pellet-(unlöslich)-Fraktionen des gemäß obiger Beschreibung (K. Johnson-Wood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94: 1550–1555) und Auflistung bestimmt. Die Messung des A β /mAb-266-Komplexes im Plasma wurde mittels eines modifizierten RIA durchgeführt. Den Mäusen wurde biotinylierter mAb 266 (mAb 266B) injiziert und das Plasma wurde an mehreren Zeitpunkten isoliert. Gesamt-A β , das an mAb 266 gebunden ist, wurde unter Verwendung von 96 Mulden aufweisenden Optiplatten (Packard, Inc.), die mit m3D6 beschichtet waren, gemessen. Verdünnte Plasmaproben und Standards (variierende Konzentrationen von A β ₄₀ und mAb 266B) wurden über Nacht in den beschichteten Platten inkubiert und die Menge an Gesamt-A β /mAb-266-B-Komplex wurde unter Verwendung von ¹²⁵I-Streptavidin bestimmt.

[0094] Drei Stunden nach der intravenösen Injektion von mAb 266 wurde in der CSF eine zweifache Erhöhung der A β ₄₀-Spiegel und eine nicht signifikante Erhöhung von A β ₄₂ beobachtet. Jedoch wurde sowohl am Zeitpunkt 24 Stunden als auch 72 Stunden eine zwei- bis dreifache Erhöhung sowohl bei A β ₄₀ als auch A β ₄₂ in der CSF festgestellt. Ähnliche Ergebnisse wurden unter Verwendung einer Analyse mit denaturierendem Gel und anschließendem A β -Western-Blotten von gepoolter CSF erhalten. Der Efflux von A β über die Gehirngewebsflüssigkeit, der zu einem gewissen Ausmaß durch die CSF-Spiegel widergespiegelt wird, ist wahrscheinlich für die beobachtete Erhöhung bei A β in der CSF verantwortlich.

[0095] Es ist bedeutsam, dass die Veränderung der Spiegel von A β -Peptid in der CSF nicht auf einem Eintritt von mAb 266 in die CSF beruhen kann, da die 24 Stunden nach Injektion gemessenen Spiegel, die weniger als 0,1% der Plasmaspiegel von mAb 266 betragen, nicht ausreichen, um der Grund für die Veränderungen zu sein. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass A β -Peptid aus dem Gehirn-Parenchym in die CSF durch die Anwesenheit des Antikörpers im Blutstrom entzogen werden.

[0096] Formen von A β -Peptid, die in PBS oder Carbonatpuffer löslich sind, wurden in Homogenaten des zerebralen Cortex bei den gleichen Mäusen gemessen, denen mAb 266 injiziert worden war, und bei denen die CSF wie oben beschrieben analysiert wurde. Es wurden ähnliche Erhöhungen hinsichtlich dieser löslichen Formen in den kortikalen Homogenaten beobachtet.

Beispiel 7

mAb 266 wirkt als eine A β -Peptid-Senke in vitro

[0097] Eine Dialysekammer wurde als ein in vitro-System zum Testen der Fähigkeit von mAb 266, als eine Senke für A β -Peptid zu wirken, konstruiert. 1 mL humane CSF wurde in die oberen Kammer eines Polypropylenröhrcchens eingebracht, die durch eine Dialysemembran mit einem spezifizierten Cutoff im Bereich von 10 bis 100 kD von einer unteren Kammer getrennt war, die 75 μ L PBS mit oder ohne 1 μ g mAb 266 enthielt.

[0098] Gemäß Bestimmung durch Messen des Materials in der unteren Kammer mit Harnsäuregelen und anschließendes Western-Blotten auf A β -Peptid mit 6E10 zu verschiedenen Zeitpunkten schien das Gleichgewicht nach 3 Stunden erreicht zu sein. Die Proben wurden in Ameisensäure auf eine Endkonzentration von 80% (Vol/Vol) denaturiert und mit β -Mercaptoethanol (1%) reduziert. Die Proben wurden in einem 0,9 M Essigsäure-Laupuffer durch ein 4–35% Polyacrylamid-Gradientengel, das 6 M Harnstoff, 5% (Vol/Vol) Eisessig und 2,5% TEMED enthielt, elektrophoretisch aufgetrennt (Anode zu Kathode). Der saure pH-Wert des Gels wurde vor dem Transfer auf Nitrocellulose neutralisiert. Anschließend wurden Western-Blot-Standardtechniken zum Identifizieren von A β verwendet. Die nachgewiesenen Banden entsprechen 4 kD.

[0099] Die aus der oberen Kammer entfernte A β -Menge wurde auf diese Weise mittels ELISA-Analyse sowohl der oberen als auch der unteren Kammern ($n = 4$) nach 3 Stunden bestimmt. Die Ergebnisse für verschiedene Molekulargewicht-Cutoffs in Gegenwart und Abwesenheit von mAb 266 sind in [Fig. 1](#) gezeigt. Während, wie dargestellt, lediglich minimale Mengen von A β -Peptid die Membran durchquerten, wenn PBS in die untere Kammer eingebracht wurde, wurden 50% des A β -Peptids in der unteren Kammer sequestriert, wenn mAb 266 vorhanden war und der Cutoff des Molekulargewichts betrug 25 kD; ansteigende Mengen durchquerten (die Membran) bei einem Erhöhen des Molekulargewichts-Cutoffs auf 100 kD, wo nahezu 100% des A β -Peptids durch die Membran gezogen wurden.

[0100] Es wurde ferner beobachtet, dass die Anti-N-terminalen-A β -Antikörper 3D6 und 10D5 in der Lage waren, A β -Peptid in diesem System durch die Membran zu ziehen, obwohl sie nicht dazu fähig waren, A β -Peptid in den in Beispiel 1 beschriebenen Assays zu sequestrieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass Antikörper gegen das A β -Peptid unter diesen Bedingungen eine ausreichende Affinität besitzen, um das Peptid in physiologischen Lösungen von anderen bindenden Proteinen zu sequestrieren, dass jedoch mAbs wie 266, die mit einem Epitop an den Positionen 13 bis 28 immunoreaktiv sind, wesentlich wirksamer sind und mit höherer Affinität binden.

[0101] In ähnlichen Assays wies durch Astrozyten sezerniertes ApoE4, das gemäß Beschreibung von R. B. DeMattos et al., J. Biol. Chem. (1998) 273: 4206–4212; Y. Sun et al., J. Neurosci. (1998) 18: 3261–3272 gereinigt wurde, einen kleinen, aber statistisch signifikanten Effekt hinsichtlich der Erhöhung der Masse von A β -Peptid in der unteren Kammer auf. Keine ersichtliche Wirkung wurde beobachtet, wenn mAb 266 durch polyklonales IgG oder BSA ersetzt wurde.

Beispiel 8

Ausfluss von A β -Peptid in das Plasma aus dem ZNS

A. 1 μ g Ab₄₀ wurde in 5 μ L Ratten-CSF gelöst, um es löslich zu halten, und wurde anschließend in den Subarachnoidalraum der Cisterna magna von Swiss-Webster-Mäusen vom Wildtyp injiziert, die zuvor i. v.-Injektionen von entweder PBS ($n = 3$) oder 200 μ g biotinyliertem mAb 266 ($n = 3$) erhalten hatten. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung wurde A β _{Gesamt} im Plasma der Mäuse mittels A β -ELISA unter Verwendung von 3D6 als beschichtendem Antikörper und A β -Standards, die mit einem Überschuss biotinyliertem 266 vermischt waren, bestimmt. Jede Plasmaprobe wurde mit einem Überschuss an biotinyliertem 266 nach Entfernung aus jedem Tier zur Bestimmung von A β in dem ELISA gespiked. Bei den Mäusen, denen PBS injiziert worden war, wurden minimal nachweisbare Mengen des Peptids bei Spiegeln von 0,15 ng/mL als Peakwerte nach 30 bis 60 Minuten nachgewiesen, nach dieser Zeit lagen die Spiegel nahezu bei null. Bei den Mäusen, denen mAb 266 verabreicht worden war, erreichte das Plasma-A β -Peptid nach 60 Minuten jedoch Spiegel, die 330-fach höher waren als diejenigen, die bei Mäusen, denen PBS injiziert worden war, nachgewiesen wurden (etwa 50 ng/mL) und erreichte Werte von etwa 90 ng/mL nach 180 Minuten.

B. Dieses Verfahren wurde unter Verwendung entweder von 200 µg (n = 3) oder 600 µg (n = 3), i. v. injiziert in zwei Monate alte APP^{V717F}-Mäuse, wiederholt. MAbs 266 wurde i. v. in drei Monate alte APP^{V717F+/+}-Mäuse mit den obigen Dosen injiziert. Vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach i. v.-Injektion wurde die Plasmakonzentration von an mAb 266 gebundenem Aβ mittels RIA bestimmt. Die detaillierten Ergebnisse aus einer als Beispiel dienenden Maus sind in [Fig. 2](#) gezeigt.

[0102] Es wurde festgestellt, dass die Konzentration von an den monoklonalen Antikörper mAb 266 gebundem Aβ von Basalspiegeln bei 150 pg/mL auf Spiegel über 100 ng/mL innerhalb von vier Tagen anstieg. Durch Analysieren früher Zeitpunkte auf der Kurve wurde bestimmt, dass die Nettorate des Eintritts von Aβ_{Gesamt} in das Plasma der APP^{V717F}-Tg-Mäuse 42 pg/mL/min in Gegenwart von Sättigungsspiegeln des Antikörpers betrug.

[0103] Die Auswirkungen von mAb 266 auf die Plasma-Aβ-Spiegel sowohl bei Wildtyp- als auch bei APP^{V717F}-Tg-Mäusen, sowie die Auswirkungen des Antikörpers auf die Aβ-Konzentration in der CSF zeigen, dass die Anwesenheit von zirkulierendem mAb 266 zu einer Veränderung des Gleichgewichts des Aβ-Ausflusses oder -Transports zwischen dem ZNS und dem Plasma führt.

Beispiel 9

Auswirkung von mAb 266 auf Aβ im Gehirn

[0104] Vier Monate alte APP^{V717F+/+}-Mäuse wurden alle 2 Wochen für einen Zeitraum von 5 Monaten mit i. p.-Injektionen von Kochsalzlösung, mAb 266 (500 µg) oder murinem Kontroll-IgG (100 µg, Pharmigen) behandelt. Die Mäuse wurden im Alter von neun Monaten geopfert und die Ablagerung von Aβ im Cortex wurde bestimmt. Der durch Aβ-Immunoreaktivität gemäß Identifikation mit einem Kaninchen-pan-Aβ-Antikörper (QCB, Inc.) gedeckte prozentuale Flächenbereich wurde im Cortex, der unmittelbar den dorsalen Hippocampus gemäß Beschreibung von D. M. Holtzman et al., Ann. Neurol. (2000) 97: 2892–2897 überlagert, quantifiziert. Die Ergebnisse sind in [Fig. 3A](#) gezeigt. In diesem Alter hatte etwa die Hälfte jeder Gruppe noch nicht begonnen, eine Aβ-Ablagerung zu entwickeln. Jedoch war der prozentuale Anteil der Mäuse mit einer > 50%igen Aβ-Last im Cortex in der mit 266 behandelten Gruppe signifikant geringer (p < 0,02, Chi-Quadrat-Test). Während APP^{V717F}-Mäuse große Mengen an Aβ-Ablagerungen im Alter von neun Monaten entwickeln können, besteht eine hohe Variabilität dahingehend, dass etwa 50% keine Ablagerungen zeigen und etwa 50% wesentliche Ablagerungen zeigen. Bei mit PBS und IgG behandelten Tieren waren bei 6/14 und 5/13 Mäusen mehr als 50% des Cortex gemäß Aβ-Färbung bedeckt, während lediglich eine von 14 mit mAb 266 behandelten Mäuse diesen Grad an Anfärbung aufwies. Nahezu 50% der Tiere in allen Gruppen hatten im Alter von neun Monaten noch keine Aβ-Ablagerung entwickelt. Letzteres scheint auf den parentalen Ursprung der einzelnen Maus in unserer Kohorte zurückzuführen zu sein, da, obwohl alle untersuchten Mäuse als APP^{V717F+/+} bestätigt waren, hohe Niveaus einer Aβ-Ablagerung lediglich bei Mäusen beobachtet wurden, die von 4/8 Zuchtpaaren abstammten (Würfe mit hoher Pathologie). Mäuse, die von den anderen 4 Zuchtpaaren abstammten, waren nahezu frei von Aβ-Ablagerungen (Würfe mit geringer Pathologie). Unter Verwendung des elterlichen (parentalen) Ursprungs als Co-Variate wurde ein starker, signifikanter Effekt von mAb 266 beim Verringern einer Ablagerung von Aβ beobachtet (p = 0,0082, [Fig. 3B](#)).

Beispiel 10

Peripher injizierter mAb 266 bindet nicht an Plaques bei APP^{V717F}-Tg-Mäusen

[0105] Zur Bestimmung, ob über 5 Monate i. p. injizierter mAb 266 an Aβ im Gehirn gebunden wurde, wurden Hirnschnitte aus 9 Monate alten APP^{V717F+/+}-Tg-Mäusen, die Aβ-Ablagerungen enthielten und mit entweder mAb 266, Kochsalzlösung oder Kontroll-IgG behandelt worden waren, verwendet. Die Gewebeverarbeitung und Immunofärbung wurde wie beschrieben durchgeführt (K. R. Bales et al., Nature Genet. (1997) 17: 263–264). Gewebe aus allen Gruppen von Tieren wurde mit Fluorescein-markiertem Anti-Maus-IgG (Vector, Inc.) inkubiert und anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Es wurde in keiner der Gruppen eine spezifische Anfärbung von Aβ-Ablagerungen beobachtet. Im Gegensatz dazu wurden Aβ-Ablagerungen klar nachgewiesen, wenn mAb 266 auf die Schnitte vor der Inkubation der Schnitte mit Anti-Maus-IgG appliziert wurde.

Beispiel 11

Auswirkung der Verabreichung von Antikörper 266 auf die Kognition
bei 24 Monate alten transgenen hemizygoten PDAPP-Mäusen

[0106] 16 (sechzehn) hemizygote transgene Mäuse (APP^{V717F}) wurden verwendet. Die Mäuse waren am Beginn der Studie etwa 24 Monate alt. Alle Injektionen erfolgten intraperitoneal (i. p.). Die Hälfte der Mäuse erhielt wöchentliche Injektionen von phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, "Kontrolle") und die andere Hälfte erhielt 500 Mikrogramm Maus-Antikörper 266, gelöst in PBS. Die Injektionen wurden über einen Zeitraum von 7 Wochen (42 Tagen) für insgesamt 6 Injektionen durchgeführt. Drei Tage nach der letzten Injektion wurde das Verhalten der Tiere unter Verwendung einer Objektwiedererkennungsaufgabe im Wesentlichen gemäß Beschreibung bei J.-C. Dodart et al., Behavioral Neuroscience, 113 (5) 982–990 (1999) beurteilt. Ein Wiedererkennungsindex ($T_B \times 100)/(T_B - T_A)$ wurde berechnet. Die Ergebnisse sind nachfolgend in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1: Deskriptive Statistik für den Wiedererkennungsindex

Wiedererkennungsindex (Minuten)

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler
Kontrolle (PBS)	8	71,2**	8,80	3,11
Antikörper 266	8	54,35	7,43	2,62

**p = 0,0010

[0107] Die Verabreichung von 500 Mikrogramm von Antikörper 266 wöchentlich an 24 Monate alte hemizygote transgene Mäuse war mit einer signifikanten Veränderung des Verhaltens verbunden. Mit Antikörper behandelte transgene Mäuse hatten Wiedererkennungsindizes, die ähnlich zu Kontrolltieren vom Wildtyp waren [J.-C. Dodart et al]. Der Unterschied hinsichtlich des Wiedererkennungsindex war bei dem 0,001-Wahrscheinlichkeitsgrad signifikant. Der erhöhte Wiedererkennungsindex ist ein Hinweis darauf, dass die Behandlung mit einem Antikörper, der an das beta-Amyloidpeptid in der Region der Aminosäuren 13 bis 28 bindet, die Verhaltensbeeinträchtigungen rückgängig macht, die in diesem Mausmodell der Alzheimer-Erkrankung dokumentiert wurden. Daher wird die Verabreichung von Antikörpern, die beta-Amyloidpeptid in der Region der Aminosäuren 13 bis 28 binden, Erkrankungen wie Alzheimer-Erkrankung und Down-Syndrom behandeln und wird den typischerweise mit einem Fortschreiten der Erkrankung verbundenen kognitiven Verfall zum Stillstand bringen (aufhalten).

[0108] Die Amyloidlast (der prozentuale Flächenbereich, der nach Anfärben mit den Anti- $\text{A}\beta$ -Antikörpern 3D6 oder 21F12 durch immunoreaktives Material bedeckt ist) wurde im Cortex, der unmittelbar den Hippocampus überlagert, einschließlich Gebieten des cingulären und parietalen Cortex, aus den Gehirnen der 24 Monate alten Tiere, die 7 Wochen lang mit Mausantikörper 266 behandelt wurden, wie oben beschrieben quantifiziert. Die Ergebnisse werden in der nachfolgenden Tabelle dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen sind statistisch nicht signifikant.

Tabelle 2: Amyloidplaque last bei $APP^{V717F+/-}$ -Mäusen nach Behandlung mit Maus-266-anti- $\text{A}\beta$ -Antikörper

Plaque last (%)

	N	Unter Verwendung von 3D6		Unter Verwendung von 21F12	
		Mittelwert	Standardfehler	Mittelwert	Standardfehler
Kontrolle (PBS)	7	44,3	5,93	0,77	0,14
Antikörper 266	8	38,0	2,96	0,93	0,11

[0109] Bei diesen sehr alten Tieren führte eine Behandlung mit Mausantikörper 266 nicht zu einer signifikant unterschiedlichen Amyloidlast im Vergleich zu der mit PBS behandelten Gruppe, bei Messung unter Verwendung von entweder 3D6 oder unter Verwendung von 21F12. Des Weiteren war die $\text{A}\beta$ -Last wesentlich höher und signifikant erhöht im Vergleich zu der Amyloidlast bei jüngeren Tieren (siehe nachfolgend), die nicht in der

Lage waren, ein neues Objekt von einem vertrauten Objekt bei der Objektwiedererkennungsaufgabe zu unterscheiden. Am überraschendsten ist, dass diese Ergebnisse zeigen, dass Anti-A β -Antikörper kognitive Defizite rückgängig machen können, ohne dass eine Verringerung der Amyloidlast per se erforderlich ist.

[0110] Nach 7-wöchiger Behandlung war der Wiedererkennungsindex der mit m266 behandelten Gruppe nicht signifikant anders, als es für eine Kohorte von 24 Monate alten Mäusen vom Wildtyp erwartet werden würde! Dies weist auf eine vollständige Umkehr des kognitiven Verfalls bei diesen transgenen Tieren hin.

Beispiel 12

Auswirkung der Verabreichung von Antikörper 266 auf die Kognition bei jungen transgenen hemizygoten PDAPP-Mäusen

[0111] Vierundfünfzig (54) homozygote transgene Mäuse (APP V^{717F}) wurden verwendet. Dreiundzwanzig (23) Mäuse waren bei Beginn der Studie etwa zwei Monate alt. Die verbleibenden Mäuse waren bei Beginn der Studie etwa vier Monate alt. Die Dauer der Behandlung betrug fünf Monate. Somit waren bei Beendigung der Studie die Mäuse entweder etwa sieben (7) Monate oder etwa neun (9) Monate alt.

[0112] Sämtliche Injektionen erfolgten intraperitoneal (i. p.). Jede Maus in den "PBS"-Kontrollgruppen erhielt eine wöchentliche Injektion von phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS; 200 μ L). Jede Maus in den "IgG"-Kontrollgruppen erhielt eine wöchentliche Injektion von IgG1 $_{\kappa}$ 1-Isotyp-Kontrolle (100 μ g/Maus/Woche). Jede Maus in den Gruppen mit "hoher Dosis" erhielt eine wöchentliche Injektion von 500 Mikrogramm von Antikörper 266, gelöst in PBS ("HD"). Jede Maus in der Gruppe mit "niederer Dosis" erhielt eine wöchentliche Injektion von 100 Mikrogramm von Antikörper 266, gelöst in PBS ("LD"). Drei Tage nach der letzten Injektion wurde das Verhalten der Tiere unter Verwendung einer Objektwiedererkennungsaufgabe gemäß Beschreibung in obigem Beispiel 10 bewertet und ein Unterscheidungsindex wurde als der Unterschied zwischen der Zeit, die mit einem neuen Objekt verbracht wurde, und der Zeit, die mit einem vertrauten Objekt verbracht wurde, berechnet. Die Ergebnisse sind nachfolgend in Tabelle 3 gezeigt. Die Daten sind nach dem Alter der Mäuse am Ende der Studie gruppiert.

Tabelle 3: Deskriptive Statistik für den Unterscheidungsindex

Unterscheidungsindex (Minuten)

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler
7 Monate alt				
PBS	7	2,12	4,22	1,59
IgG	8	0,81	3,64	1,29
HD	8	10,04*	6,52	2,30
9 Monate alt				
PBS	7	1,87	3,54	1,34
IgG	8	0,96	3,51	1,24
LD	8	10,75*	6,44	2,28
HD	8	12,06***	7,82	2,76

*p < 0,05

***p < 0,0001

[0113] Zusammengenommen unterstützen diese Daten die Schlussfolgerung, dass die Verabreichung von Antikörper 266, eines Antikörpers, der gegen die zentrale Domäne von A β gerichtet ist, die Plaqueablagerung bei 7 bis 9 Monate alten, transgenen APP V^{717F} -Mäusen vermindert und die zuvor charakterisierten Verhaltensbeeinträchtigungen rückgängig macht. Die Behandlung von Patienten mit einem gegen die zentrale Domäne

des A β -Peptids gerichteten Antikörpers wird den typischerweise mit einem Fortschreiten der Erkrankung verbundenen kognitiven Verfall hemmen oder verhüten und wird diesen rückgängig machen.

[0114] Der Unterscheidungsindex bei behandelten Tieren war nicht signifikant anders als für Mäuse vom Wildtyp des gleichen Alters erwartet werden würde. Somit machte die Behandlung mit m266 genau wie bei den älteren Tieren (Beispiel 11) den kognitiven Verfall bei diesen jüngeren transgenen Tieren vollständig rückgängig.

Beispiel 13

Synthese des humanisierten Antikörpers 266

[01115] Zellen und Antikörper: Die murine Myelomzelllinie Sp2/0 wurde von ATCC (Manassas, VA) bezogen und in DME-Medium, das 10% FBS (Kat.-Nr. SH32661.03, HyClone, Logan, UT) enthielt, in einem CO₂-Incubator bei 37°C gehalten. Murine 266-Hybridomzellen wurden zuerst in RPMI 1640-Medium gezüchtet, das 10% FBS (HyClone), 10 mM HEPES, 2 mM Glutamin, 0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat, 25 µg/mL Gentamicin enthielt, und anschließend in serumfreiem Medium (Hybridoma SFM, Kat.-Nr. 12045-076, Life Technologies, Rockville, MD), das 2% Niedrig-Ig-FBS (Kat.-Nr. 30151.03, HyClone) enthielt, auf ein Volumen von 2,5 Litern in Rollerflaschen expandiert. Muriner monoklonaler Antikörper 266 (Mu266) wurde aus dem Kulturüberstand durch Affinitätschromatographie unter Verwendung einer Protein G-Sepharose-Säule gereinigt. Biotinylierter Mu266 wurde unter Verwendung von EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Kat.-Nr. 21338ZZ, Pierce, Rockford, IL) hergestellt.

[0116] Klonierung von cDNAs der variablen Regionen: Gesamt-RNA wurde aus etwa 10⁷ Hybridomzellen unter Verwendung von TRIzol-Reagens (Life Technologies) extrahiert und poly(A)⁺ RNA wurde mit dem PolyATract mRNA Isolationssystem (Promega, Madison, WI) gemäß den Protokollen des Herstellers isoliert. Doppelsträngige cDNA wurde unter Verwendung des SMART™RACE cDNA Amplifikations-Kits (Clontech, Palo Alto, CA) gemäß dem Protokoll des Herstellers synthetisiert. Die cDNAs der variablen Regionen für die leichten und schweren Ketten wurden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung von 3'-Primern, die jeweils an die konstanten Regionen der murinen kappa- und gamma-Kette hybridisieren, und eines universellen 5'-Primers, der im SMART™RACE cDNA Amplifikations-Kit geliefert wird, amplifiziert. Für die VL-PCR besitzt der 3'-Primer die Sequenz:

5' - TATAGAGCTAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATAACAGTTGGTGC - 3'

[SEQ ID Nr.: 13],

wobei die Reste 17 bis 46 an die murine Ck-Region hybridisieren. Für die VH-PCR besitzen die 3'-Primer die degenerierte Sequenz:

A G T

5' - TATAGAGCTCAAGCTTCCAGTGGATAGACCGATGGGGCTGTCGTTTGGC - 3'

T

[SEQ ID Nr.: 14],

wobei die Reste 17 bis 50 an die murine gamma-Kette CH1 hybridisieren. Die VL- und VH-cDNAs wurden in pCR4Blunt-TOPO-Vektor (Invitrogen, Carlsbad, CA) zur Sequenzbestimmung subkloniert. Die DNA-Sequenzierung wurde mittels PCR-Zyklus-Sequenzierungsreaktionen mit fluoreszierenden Didesoxyketteterminatoren (Applied Biosystems, Foster City, CA) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Diese Sequenzierungsreaktionen wurden auf einem DNA-Sequenziergerät Modell 377 (Applied Biosystems) analysiert.

[0117] Konstruktion von variablen Regionen von humanisiertem 266 (Hu266): Die Humanisierung der murinen Antikörper-V-Regionen wurde gemäß Darstellung durch Queen et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029–10033 (1988)] durchgeführt. Das humane V-Region-Framework, das als ein Akzeptor für die Mu266-CDRs verwendet wurde, wurde auf Basis der Sequenzhomologie ausgewählt. Die Computerprogramme ABMOD und ENCAD [M. Levitt, J. Mol. Biol. 168: 595–620 (1983)] wurden zum Konstruieren eines Molekülmodells der variablen Regionen verwendet. Aminosäuren in den humanisierten V-Regionen, die gemäß Vorhersage mit den CDRs in Kontakt treten würden, wurden durch die entsprechenden Reste von Mu266 ersetzt. Dies wurde an den Resten 46, 47, 49 und 98 in der schweren Kette und am Rest 51 in der leichten Kette durchgeführt. Die Aminosäuren in der humanisierten V-Region, von denen festgestellt wurde, dass sie in der gleichen V-Region-

Untergruppe selten sind, wurden in die Konsensusaminosäuren geändert, um eine mögliche Immunogenität zu verhindern. Dies wurde an den Resten 42 und 44 in der leichten Kette durchgeführt.

[0118] Die Gene der variablen Regionen der leichten und schweren Ketten wurden unter Verwendung von acht überlappenden synthetischen Oligonucleotiden, die hinsichtlich der Länge in einem Bereich von etwa 65 bis 80 Basen liegen, konstruiert und amplifiziert [C. Y. He et al., J. Immunol. 160: 029–1035 (1998)]. Die Oligonucleotide wurden paarweise hybridisiert und mit dem Klenow-Fragment von DNA-Polymerase-I verlängert, was zu vier doppelsträngigen Fragmenten führte. Die erhaltenen Fragmente wurden denaturiert, paarweise hybridisiert und mit Klenow verlängert, was zwei Fragmente lieferte. Diese Fragmente wurden denaturiert, paarweise hybridisiert und erneut verlängert, was ein eine volle Länge aufweisendes Gen lieferte. Das erhaltene Produkt wurde mittels PCR unter Verwendung des Expand High Fidelity PCR-Systems (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) amplifiziert. Die mittels PCR amplifizierten Fragmente wurden mit Gel gereinigt und in pCR4Blunt-TOPO-Vektor kloniert. Nach Sequenzbestätigung wurden die VL- und VH-Gene mit MluI und XbaI verdaut, mit Gel gereinigt und jeweils in Vektoren zur Expression von leichten und schweren Ketten subkloniert, um pV_k-Hu266 und pV_g1-Hu266 herzustellen (siehe [Fig. 6](#) bzw. [Fig. 7](#) hierin) [MS. Co et al., J. Immunol. 148: 1149–1154 (1992)]. Der aus diesen Plasmiden exprimierte reife humanisierte 266-Antikörper besitzt die leichte Kette der SEQ ID Nr.: 11 und die schwere Kette die SEQ ID Nr.: 12.

[0119] Stabile Transfektion: Eine stabile Transfektion in die murine Myelomzelllinie Sp2/0 wurde durch Elektroporation unter Verwendung einer Gen Pulser-Apparatur (BioRad, Hercules, CA) bei 360 V und 25 µF gemäß Beschreibung (Co et al., 1992) bewerkstelligt.

[0120] Vor der Transfektion wurden pV_k-Hu266- und pV_g1-Hu266-Plasmid-DNAs unter Verwendung von FspI linearisiert. Etwa 10⁷ Sp2/0-Zellen wurden mit 20 µg pV_k-Hu266 und 40 µg pV_g1-Hu266 transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden in DME-Medium, das 10% FBS enthielt, suspendiert und in mehreren 96 Mulden aufweisende Platten ausplattiert. Nach 48 h wurde Selektionsmedium (DME-Medium, das 10% FBS, HT-Mediumsupplement, 0,3 mg/mL Xanthin und 1 µg/mL Mycophenolsäure enthält) angewendet. Etwa 10 Tage nach Initiierung der Selektion wurden die Kulturüberstände mittels ELISA bezüglich der Antikörperproduktion wie nachfolgend gezeigt untersucht. Eine hohe Ausbeute liefernde Klone wurden in DME-Medium expandiert, das 10% FBS enthielt, und weiter hinsichtlich der Antikörperexpression analysiert. Die selektierten Klone wurden anschließend an ein Wachstum in Hybridom-SFM adaptiert.

[0121] Messung der Antikörperexpression mittels ELISA: Die Mulden einer 96 Mulden aufweisenden ELISA-Platte (Nunc-Immuno-Platte, Kat.-Nr. 439454, NalgeNunc, Naperville, IL) wurden mit 100 µL von 1 µg/mL Ziege-anti-Human-IgG, für Fcγ-Fragment spezifischen polyklonalen Antikörpern (Kat.-Nr. 109-005-098, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) in 0,2 M Natriumcarbonat-/Bicarbonat-Puffer (pH-Wert 9,4) über Nacht bei 4°C beschichtet. Nach Waschen mit Waschpuffer (PBS, das 0,1% Tween 20 enthält) wurden die Mulden mit 400 µL Superblock Blockierungspuffer (Kat.-Nr. 37535, Pierce) während 30 min blockiert und anschließend mit Waschpuffer gewaschen. Hu266 enthaltende Proben wurden in geeigneter Weise in ELISA-Puffer (PBS, enthaltend 1% BSA und 0,1% Tween 20) verdünnt und auf ELISA-Platten (100 µL pro Mulde) appliziert. Als Standard wurde der humanisierte monoklonale Anti-CD33-IgG1-Antikörper HuM195 (Co, et al., 1992, oben) verwendet. Die ELISA-Platte wurde 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und die Mulden wurden mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 100 µL von 1/1000-verdünnten, HRP-konjugierten Ziege-anti-Human-kappa-polyklonalen Antikörpern (Kat.-Nr. 1050-05, Southern Biotechnology, Birmingham, AL) in ELISA-Puffer in jede Mulde appliziert. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und Waschen mit Waschpuffer wurden 100 µL ABTS-Substrat (Kat.-Nrn. 507602 und 506502, Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) zu jeder Mulde zugegeben. Die Farbentwicklung wurde durch Zugabe von 100 µL 2%iger Oxalsäure pro Mulde gestoppt. Die Extinktion wurde bei 415 nm unter Verwendung eines OPTImax-Mikroplattenlesegeräts (Molecular Devices, Menlo Park, CA) gelesen.

[0122] Reinigung von Hu266: Einer der in hohem Maße Hu266 exprimierenden stabilen Sp2/0-Transfektanden (Klon 1D9) wurde an das Wachstum in Hybridom-SFM adaptiert und in Rollerflaschen auf 2 Liter expandiert. Der verbrauchte Kulturüberstand wurde geerntet, wenn die Zelllebensfähigkeit 10% oder weniger erreichte, und wurde auf eine Protein-A-Sepharose-Säule geladen. Die Säule wurde mit PBS gewaschen, bevor der Antikörper mit 0,1 M Glycin-HCl (pH-Wert 2,5), 0,1 M NaCl eluiert wurde. Das eluierte Protein wurde gegen 3 Austausche von 2 Liter PBS dialysiert und durch ein 0,2 µm-Filter filtriert und anschließend bei 4°C gelagert. Die Antikörperkonzentration wurde durch Messen der Extinktion bei 280 nm bestimmt (1 mg/mL = 1,4 Ex₂₈₀). Die SDS-PAGE in Tris-Glycinpuffer wurde gemäß Standardverfahren auf einem von 4–20% Gradientengel (Kat.-Nr. EC6025, Novex, San Diego, CA) durchgeführt. Der gereinigte humanisierte Antikörper 266 wird reduziert und auf einem SDS-PAGE-Gel laufen gelassen. Der Gesamtantikörper zeigt zwei Banden mit unge-

fähren Molekulargewichten von 25 kDa und 50 kDa. Diese Ergebnisse stimmen mit den Molekulargewichten der leichten Kette und der schweren Kette oder des schwere Ketten-Fragments überein, die aus deren Aminosäurezusammensetzungen berechnet wurden.

Beispiel 14

In vitro-Bindeeigenschaften des humanisierten Antikörpers 266

[0123] Die Effizienz der Bindewirkung von humanisiertem Antikörper 266, der wie oben beschrieben synthetisiert und gereinigt wurde, wurde mit dem murinen Antikörper 266 unter Verwendung von biotinyliertem murinem Antikörper 266 in einem vergleichenden ELISA verglichen. Die Mulden einer 96 Mulden aufweisenden ELISA-Platte (Nunc-Immuno plate, Kat.-Nr. 439454, NalgeNunc) wurden mit 100 µL β-Amyloidpeptid (1–42), konjugiert an BSA, in 0,2 M Natriumcarbonat/Bicarbonat-Puffer (pH-Wert 9,4) (10 µg/mL) über Nacht bei 4°C beschichtet. Das Aβ₁₋₄₂-BSA-Konjugat wurde durch Lösen von 7,5 mg Aβ₁₋₄₂-Cys₄₃ (C-terminales Cystein Aβ₁₋₄₂, AnaSpec) in 500 µL Dimethylsulfoxid und anschließendes sofortiges Zugeben von 1500 µL destilliertem Wasser hergestellt. Zwei (2) Milligramm Maleimid-aktiviertes Rinderserumalbumin (Pierce) wurde in 200 µL destilliertem Wasser gelöst. Die zwei Lösungen wurden vereinigt, gründlich vermischt und zwei (2) Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Eine Gelchromatographiesäule wurde verwendet, um nicht umgesetztes Peptid von dem Aβ₁₋₄₂-Cys-BSA-Konjugat zu trennen.

[0124] Nach Waschen der Mulden mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS), die 0,1% Tween 20 (Waschpuffer) enthielt, unter Verwendung eines ELISA-Plattenwäschers wurden die Mulden durch Zugeben von 300 µL SuperBlock-Reagenz (Pierce) pro Mulde blockiert. Nach 30-minütigem Blockieren wurden die Mulden mit Waschpuffer gewaschen und die überschüssige Flüssigkeit wurde entfernt.

[0125] Ein Gemisch von biotinyliertem Mu266 (0,3 µg/ml Endkonzentration) und Kompetitor-Antikörper (Mu 266 oder Hu266; beginnend bei einer Endkonzentration von 750 µg/mL und serielle dreifache Verdünnungen) in ELISA-Puffer wurden in Dreifachansätzen mit einem Endvolumen von 100 µL pro Mulde zugegeben. Als Nicht-Kompetitor-Kontrolle wurden 100 µL von 0,3 µg/ml biotinyliertem Mu266 zugegeben. Als Hintergrundkontrolle wurden 100 µL ELISA-Puffer zugegeben. Die ELISA-Platte wurde 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen der Mulden mit Waschpuffer wurden 100 µL von 1 µg/mL HRP-konjugiertem Streptavidin (Kat.-NR. 21124, Pierce) zu jeder Mulde zugegeben. Die Platte wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit Waschpuffer gewaschen. Zur Farbentwicklung wurden 100 µL/Mulde ABTS-Peroxidasesubstrat (Kirkegaard & Perry Laboratories) zugegeben. Die Farbentwicklung wurde durch Zugeben von 100 µL/Mulde 2%iger Oxalsäure gestoppt. Die Extinktion wurde bei 415 nm abgelesen. Die Extinktionen wurden gegen den Logarithmus der Kompetitor-Konzentration aufgetragen, die Kurven wurden an die Datenpunkte (unter Verwendung von Prism) angepasst und die IC₅₀ wurde für jeden Antikörper unter Verwendung von auf dem einschlägigen Fachgebiet wohlbekannten Verfahren bestimmt.

[0126] Die mittlere IC₅₀ für Maus-mAb-266 betrug 4,7 µg/mL (drei getrennte Experimente, Standardabweichung = 1,3 µg/mL) und betrug für humanisierten mAb-266 7,5 µg/mL (drei getrennte Experimente, Standardabweichung = 1,1 µg/mL). Ein zweiter Satz von drei Experimenten wurden im Wesentlichen gemäß obiger Beschreibung durchgeführt und, wie ermittelt wurde, betrug die mittlere IC₅₀ für Maus-mAb-266 3,87 µg/mL (SD = 0,12 µg/mL) und für Human-mAb-266 betrug die IC₅₀ 4,0 µg/mL (SD = 0,5 µg/mL). Auf Basis dieser Ergebnisse ziehen wir die Schlussfolgerung, dass humanisierter 266 Eigenschaften aufweist, die sehr ähnlich zu denjenigen des murinen Antikörpers 266 sind. Daher erwarten wir, dass humanisierter 266 sehr ähnliche in vitro- und in vivo-Aktivitäten im Vergleich zu Maus-266 besitzt und bei Menschen die gleichen Wirkungen zeigen wird, die mit Maus-266 bei Mäusen nachgewiesen wurden.

Beispiel 15

In vitro-Bindeeigenschaften der Maus-Antikörper 266 und 4G8

[0127] Die Antikörperaffinität (KD = Kd/Ka) wurde unter Verwendung eines BIACore Biosensors 2000 bestimmt und die Daten wurden mit BIAevaluation(Version 3.1)-Software analysiert. Ein Capture-Antikörper (Kaninchen-anti-Maus) wurde über freie Aminogruppen an Carboxylgruppen an der Flusszelle 2 eines Biosensor-Chips (CM5) unter Verwendung von N-Ethyl-N-dimethylaminopropyl-carbodiimid und N-Hydroxysuccinimid (EDC/NHS) gekuppelt. Ein nicht-spezifisches Kaninchen-IgG wurde an Flusszelle 1 als Hintergrundkontrolle gekoppelt. Monoklonale Antikörper wurden eingefangen, um 300 Resonanzeneinheiten (RU) zu erhalten. Amyloid-beta 1–40 oder 1–42 (Biosource International, Inc.) wurde anschließend in absteigenden Konzentrationen (1000

auf 0,1 Mal KD) über den Chip fließen gelassen. Zur Regeneration des Chips wurde gebundener Anti-A β -Antikörper von dem Chip unter Verwendung einer Waschflüssigkeit mit Glycin-HCl (pH-Wert 2) eluiert. Eine Kontrollinjektion, die kein Amyloid-beta enthielt, diente als Kontrolle zur Basisliniensubtraktion. Sensorgramme, die Assoziations- und Dissoziationsphasen darstellen, wurden analysiert, um Kd und Ka zu bestimmen. Unter Verwendung dieses Verfahrens wurde festgestellt, dass die Affinität von Maus-Antikörper 266 sowohl für A β_{1-40} als auch für A β_{1-42} 4 pM beträgt. Die Affinität von 4G8 für A β_{1-40} lag bei 23 nM und für A β_{1-42} lag sie bei 24 nM. Trotz einem 6000-fachen Unterschied hinsichtlich der Affinitäten für A β sequestrieren sowohl 266 als auch 4G8, die an Epitope zwischen den Aminosäuren 13 und 28 von A β binden, in wirksamer Weise A β aus humarer CSF. Daher ist die örtliche Lage des Epitops eher als die Bindeaffinität bei der Bestimmung der Fähigkeit eines Antikörpers, A β zu sequestrieren und die nutzbringenden und überraschenden Vorteile der vorliegenden Erfindung zu liefern, vorrangig.

Beispiel 16

Epitopkartierung von Maus-Antikörper 266 unter Verwendung der BiaCore-Methodik und löslicher Peptide

[0128] BIACore ist ein automatisiertes Biosensorsystem zum Messen von molekularen Wechselwirkungen [R. Karlsson et al., J. Immunol. Methods 145: 229–240 (1991)]. Der Vorteil von BiaCore gegenüber anderen Bindungsassays besteht darin, dass ein Binden des Antigens gemessen werden kann, ohne das Antigen markieren oder immobilisieren zu müssen (d. h. das Antigen behält eine nativere Konformation). Die BiaCore-Methodik wurde zum Beurteilen der Bindung von verschiedenen Amyloid- β -Peptidfragmenten an Maus-Antikörper 266 im Wesentlichen gemäß obiger Beschreibung in Beispiel 12 verwendet, mit der Ausnahme, dass sämtliche Verdünnungen mit HEPES-gepufferter Kochsalzlösung, die Tween 20 enthielt, durchgeführt wurden, eine Vielzahl von Fragmenten von A \square (BioSource International) injiziert wurden und eine Einzelkonzentration von jedem Fragment injiziert wurde (440 nM).

[0129] Die Amyloid-beta-Fragmente 1–28, 12–28, 17–28 und 16–25 banden an Maus-Antikörper 266, wohingegen die A β -Fragmente 1–20, 10–20 und 22–35 nicht banden. Die Fragmente 1–20, 10–20 und 22–35 banden an andere mAbs mit bekannter Epitopspezifität für diese Regionen von A β . Unter Verwendung dieser Methodik scheint das Bindeepitop für den Maus-Antikörper 266 zwischen den Aminosäuren 17 und 25 von A β zu liegen. Da eine Bindung üblicherweise mit mindestens 3 vorhandenen Resten des Epitops erfolgt, könnte man weiter schlussfolgern, dass das Epitop innerhalb der Reste 19–23 enthalten ist.

Beispiel 17

In vitro-Bindeeigenschaften des humanisierten Antikörpers 266

[0130] Die Affinität (KD = Kd/Ka) von humanisiertem Antikörper 266, der wie oben beschrieben synthetisiert und gereinigt wurde, wurde im Wesentlichen gemäß obiger Beschreibung in Beispiel 15 bestimmt. Unter Verwendung dieses Verfahrens wurde festgestellt, dass die Affinität des humanisierten Antikörpers 266 für A β_{1-42} 4 pM beträgt.

Patentansprüche

1. Humanisierter Antikörper oder Fragment hiervon, umfassend:
a) eine leichte Kette, umfassend drei komplementaritätsbestimmende Regionen (CDRs) der leichten Kette, die die folgenden Aminosäuresequenzen aufweisen:
CDR1 der leichten Kette:

1 5 10 15
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His
(SEQ ID-Nr. 1)

oder

1 5 10 15
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His
(SEQ ID-Nr. 15)

CDR2 der leichten Kette:

1 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser 5 (SEQ ID-Nr. 2)

und CDR3 der leichten Kette:

und eine Frameworksequenz der leichten Kette aus einer humanen leichten Kette eines Immunglobulins und b) eine schwere Kette, umfassend drei CDRs einer schweren Kette mit den folgenden Aminosäuresequenzen: CDR1 der schweren Kette:

1 Arg Tyr Ser Met Ser **5** (SEQ ID-Nr. 4)

CDR2 der schweren Kette:

1 5 10 15
Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly
(SEQ ID-Nr. 5)

oder

1 5 10 15
Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly
(SEQ ID-NR. 16)

und CDR3 der schweren Kette:

Gly Asp Tyr (SEQ ID-Nr. 6)

und eine Frameworksequenz einer schweren Kette aus einer humanen schweren Kette eines Immunglobulins, wobei der Antikörper oder das Fragment spezifisch an ein innerhalb der Positionen 13 bis 28 von A β enthaltenes Epitop bindet.

2. Humanisierter Antikörper oder Fragment hiervon nach Anspruch 1, wobei die CDR der leichten Kette

i 5 10 15
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His
(SEQ ID-Nr. 1)

ist und wobei die CDR2 der schweren Kette

1 5 10 15
Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly
 (SEQ ID-Nr. 5)

ist.

3. Humanisierter Antikörper oder Fragment hiervon nach Anspruch 1, umfassend eine variable Region einer humanisierten leichten Kette, die die folgende Sequenz umfasst:

1	5	10	15
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 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-Nr. 7) ;

worin Xaa an der Position 2 für Val oder Ile steht;
 Xaa an der Position 7 für Ser oder Thr steht;
 Xaa an der Position 14 für Thr oder Ser steht;
 Xaa an der Position 15 für Leu oder Pro steht;
 Xaa an der Position 30 für Ile oder Val steht;
 Xaa an der Position 50 für Arg, Gln oder Lys steht;
 Xaa an der Position 88 für Val oder Leu steht;
 Xaa an der Position 105 für Gln oder Gly steht;
 Xaa an der Position 108 für Lys oder Arg steht; und
 Xaa an der Position 109 für Val oder Leu steht;
 und eine variable Region einer schweren Kette, die die folgende Sequenz umfasst:

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-Nr. 8)

worin Xaa an der Position 1 für Glu oder Gln steht;
 Xaa an der Position 7 für Ser oder Leu steht;
 Xaa an der Position 46 für Glu, Val, Asp oder Ser steht;
 Xaa an der Position 63 für Thr oder Ser steht;
 Xaa an der Position 75 für Ala, Ser, Val oder Thr steht;
 Xaa an der Position 76 für Lys oder Arg steht;
 Xaa an der Position 89 für Glu oder Asp steht; und

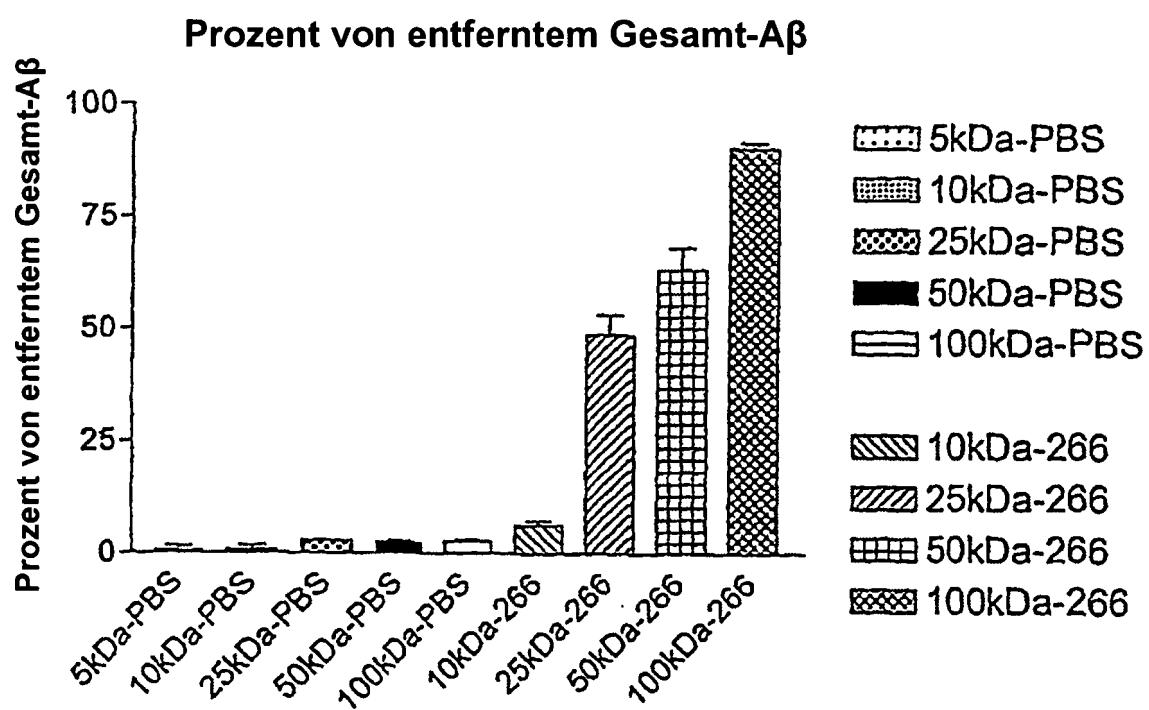
Xaa an der Position 107 für Leu oder Thr steht.

4. Humanisierter Antikörper oder Fragment hiervon nach Anspruch 1, der bzw. das eine variable Region einer leichten Kette mit der durch SEQ ID-Nr. 9 gegebenen Sequenz und eine variable Region einer schweren Kette, die durch die SEQ ID-Nr. 10 angegeben ist, aufweist.
5. Humanisierter Antikörper oder Fragment hiervon nach Anspruch 4, der bzw. das eine leichte Kette mit der durch die SEQ ID-Nr. 11 angegebenen Sequenz und eine schwere Kette mit der durch die SEQ ID-Nr. 12 angegebene Sequenz aufweist.
6. Humanisiertes Antikörperfragment nach Anspruch 1 oder 5.
7. Humanisierter Antikörper oder Fragment nach Anspruch 1, der bzw. das ein IgG₁-Immunglobulin-Isotyp ist.
8. Humanisierter Antikörper oder Fragment nach Anspruch 1, wobei der Antikörper oder das Fragment hier-von in einer Wirtszelle erzeugt wird, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einer Myelomzelle, einer Ovar-zelle vom chinesischen Hamster, einer Ovarzelle vom syrischen Hamster und einer humanen embryonalen Nierenzelle besteht.
9. Polynukleinsäure, umfassend eine Sequenz mit Codierung für die leichte Kette oder die schwere Kette des humanisierten Antikörpers oder Fragments nach Anspruch 1.
10. Polynukleinsäure nach Anspruch 9, umfassend eine Sequenz mit Codierung für die variable Region der leichten Kette, die durch die SEQ ID-Nr. 7 oder SEQ ID-Nr. 9 angegeben ist.
11. Polynukleinsäure nach Anspruch 9, umfassend eine Sequenz mit Codierung für die variable Region einer schweren Kette, die durch die SEQ ID-Nr. 8 oder SEQ ID-Nr. 10 angegeben ist.
12. Polynukleinsäure nach Anspruch 9, umfassend eine Sequenz mit Codierung für die leichte Kette, die durch die SEQ ID-Nr. 11 angegeben ist.
13. Polynukleinsäure nach Anspruch 9, umfassend eine Sequenz mit Codierung für die schwere Kette, die durch die SEQ ID-Nr. 12 angegeben ist.
14. Polynukleinsäure, umfassend eine Sequenz mit Codierung für die leichte Kette oder die schwere Kette des humanisierten Antikörpers oder Fragments nach Anspruch 5.
15. Polynukleinsäure, die bei Expression in einer geeigneten Wirtszelle den Antikörper oder das Fragment nach Anspruch 1 liefert.
16. Polynukleinsäure, die bei Expression in einer geeigneten Wirtszelle den Antikörper oder das Fragment nach Anspruch 5 liefert.
17. Expressionsvektor zum Exprimieren des Antikörpers oder des Fragments nach Anspruch 1, umfassend Nukleotidsequenzen mit Codierung für den Antikörper oder das Fragment.
18. Zelle, die mit dem Expressionsvektor nach Anspruch 17 transfiziert ist.
19. Zelle, die mit zwei Expressionsvektoren nach Anspruch 17 transfiziert ist, wobei der erste Vektor die Polynukleotidsequenz mit Codierung für die leichte Kette umfasst und der zweite Vektor die Sequenz mit Co-dierung für die schwere Kette umfasst.
20. Expressionsvektor zum Exprimieren des Antikörpers oder Fragments nach Anspruch 5, umfassend Nu-kleotidsequenzen mit Codierung für den Antikörper oder das Fragment.
21. Zelle, die mit dem Expressionsvektor nach Anspruch 20 transfiziert ist.
22. Zelle, die mit zwei Expressionsvektoren nach Anspruch 20 transfiziert ist, wobei ein erster Vektor die Polynukleotidsequenz mit Codierung für die leichte Kette umfasst und ein zweiter Vektor die Sequenz mit Codierung für die schwere Kette umfasst.

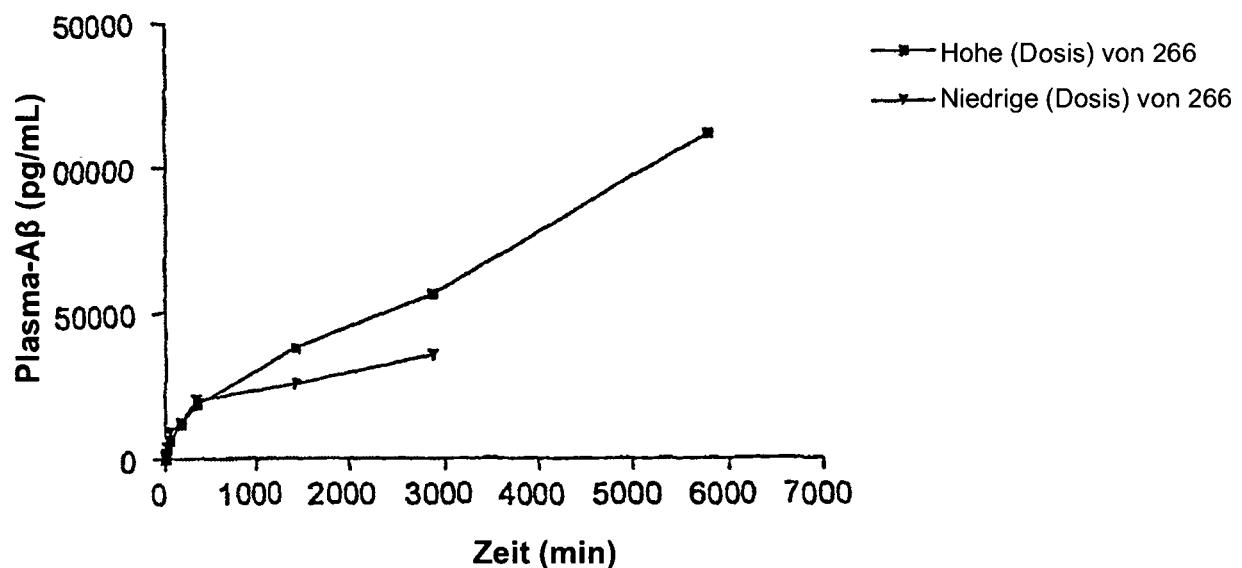
23. Zelle, die mit einem Expressionsvektor zum Exprimieren des humanisierten Antikörpers oder Fragments hiervon nach Anspruch 1 oder Anspruch 5 transfiziert ist.
24. Pharmazeutische Zusammensetzung, die den humanisierten Antikörper oder das Fragment nach einem der Ansprüche 1 oder 5 und einen pharmazeutisch akzeptablen Hilfsstoff umfasst.
25. Verwendung des humanisierten Antikörpers oder eines Fragments hiervon nach einem der Ansprüche 1 oder 5 zur Herstellung eines Medikaments zum Behandeln einer klinischen oder präklinischen Alzheimer-Erkrankung, Down-Syndrom oder einer klinischen oder präklinischen zerebralen amyloiden Angiopathie.
26. Verwendung eines humanisierten Antikörpers oder Fragments nach einem der Ansprüche 1 oder 5 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung, Vorbeugung oder Umkehrung von kognitivem Verfall bei klinischer oder präklinischer Alzheimer-Erkrankung, Down-Syndrom oder klinischer oder präklinischer zerebraler Amyloidangiopathie.
27. Verwendung des humanisierten Antikörpers oder Fragments nach einem der Ansprüche 1 oder 5 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Alzheimer-Erkrankung.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

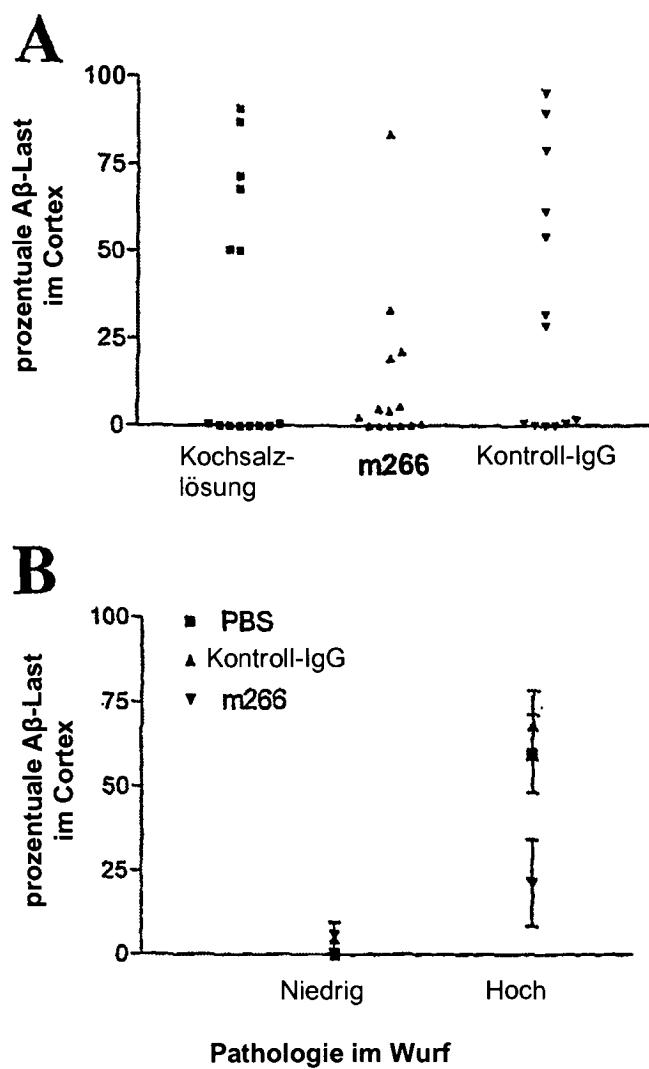
Anhängende Zeichnungen

**Figur 1**

**A β -Spiegel im Plasma nach intravenöser Injektion
von 266 bei APP V717F -Mäusen**



Figur 2



Figur 3

Figur 4. pV_k-Hu266-Polynucleotidsequenzen zum Exprimieren von humanisierten 266-Leichtketten und Einzelaminosäurecodes für die exprimierte humanisierte 266-Leichtkette

```

619 ACGCGTCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGTGATGTTCTGGATTCCCTGCTTCCAGGTGTGATGTTGTGATG
M K L P V R L L V L M F W I P A S R C D V V M

699 ACCCAGAGCCCCTCTCCCTGCCCTGTCACCCCTGGACAACCAGCCTCCATCTCTTGCGAGATCTAGTCAGAGCCTTATATA
T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C R S S Q S L I Y

779 TAGTGATGGAAACGCCATTACATTGGTCTTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAGGCTCTGATCTACAAAGTTCCA
S D G N A Y L H W F L Q K P G Q S P R L L I Y K V S N

859 ACCGATTCTGGGTCCCAGACAGGTCAGTGGCAGTGGATCTGGACAGATTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAG
R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E

939 GCCGAGGATGTGGAGTTTATTACTGTTCTCAAAGTACACATGTTCCGTGGACGTTGGTCAAGGCACCAAGGTGGAAAT
A E D V G V Y Y C S Q S T H V P W T F G Q . G T K V E I

1019 CAAACGTGAGTAGAATTAACTCTAGAAATTCTAAACTCTGAGGGGCTGGATGACGTGGCATTCTTGCCAAAGCATT
K R

1099 GAGTTACTGCAAGGTCAAGAAAGCATGCAAAGCCCTCAGAATGGCTGCAAAGAGCTCCAACAAAACAATTAGAACATT

1179 ATTAAGGAATAGGGGAAGCTAGGAAGAAACTCAAACATCAAGATTAAATACGTTCTGGTCTCCTTGCTATAATT

1259 ATCTGGATAAGCATGCTTTCTGCTGTCCTAACATGCCCTGTGATTATCCGAAACACACACCCAGGGCAGAA

1339 CTTTGTACTAAACACCATCCTGTTGCTTCTTCAGGAACGTGGCTGCACCATCTGCTTCATCTCCGCCAT
T V A A P S V F I F P P S

1419 CTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCCTGTTGTGTCCTGCTGAATAACTCTATCCAGAGGGCAAAGTACAG
D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W

1499 TGGAAGGTGGATAACGCCCTCAAATCGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACACCAAGGACAGCACCTACAG
K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L

1579 CCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAAAAGTCTACGCCCTGCCAGTCACCCATCAGGGCC
S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L

1659 TGAGCTGCCGTCAAAAGAGCTAACAGGGAGAGTGTAGAGGGAGAAAGTGCACCTGCTCCTCAGTTCCAG
S S P V T K S F N R G E C .

1739 CTGACCCCTCCATCTTGGCTCTGACCCCTTTCCACAGGGACCTACCCATTGCGGTCTCCAGCTCATCTT
1819 CACCTCACCCCCCTCTCTCTGGCTTAATTATGCTAATGTTGGAGGAATGAATAATAAAAGTGAATCTTGCA
1899 CTGGGGTTCTCTCTTCTCATTTAAATTATCTGTTTACCAACTACTCAATTCTCTTATAAGGGACTAA
1979 ATATGAGTCATCCTAACCGCATAACCATTTATAAAATCATCCTCATTCTATTACCCATTATCCTCTGCAAGAC
2059 AGTCCTCCCTCAAACCCACAAGCCTCTGCTCACAGTCCCTGGGCGATGGTAGGAGAGACTTGCTTCTGTTTCC
2139 CCTCCTCAGCAAGCCCTCATGTCCTTTAAGGGTGCAGGGCTTACAGTCATATATCCTTGATTCAATTCCCTGAGA
2219 ATCACCAAAGCAAATTTCAAAAGAAGAAACCTGCTATAAGAGAAATCATTGCAACATGATAAAATAAACAC
2299 ACAATAAAAGCAATTAAATAACAAACATAGGGAAATGTTAAGTCATCATGGTACTTAGACTTAATGGAAATGTCATG
2379 CCTTATTACATTAAACAGGTACTGAGGGACTCCTGTCGCCAGGGCGTATTGAGTACTTCCACACCTAATT
2459 AATCCACACTATACTGTGAGATTAAAACATTCTTAAAGGTCTATAAAAGCTGAGAGACAAATATATTC
2539 TATAACTCAGCAATCCACTCTAGGATCC

```

Die vollständige Sequenz des Hu266-Leichtkettengens ist zwischen den MluI- und BamHI-Stellen in pV_k-Hu266 lokalisiert. Die Nucleotidnummer gibt ihre Position in pVgk-Hu266 an. Die V_k- und C_k-Exons werden im Einzelbuchstabencode translatiert; der Punkt gibt das Translationsterminationscodon an. Die reife schwere Kette beginnt an der doppelt unterstrichenen Asparaginsäure (D). Die Intronsequenzen sind kursiv geschrieben.

Figur 5. pVgl-Hu266-Polynukleotidsequenzen zum Expressieren von humanisierten 266-schwere-Ketten und Einzearminosäurecodes für exprimierte humanisierte 266-schwere-Kette

619 ACGCGTCCACCATGAATTGGGCTCAGCTTGATTTCCCTGCTGTGTTAAAGGTGTCCTGTGAAGTCAGCTG
M N F G L S L I F L V L V L K G V L C E V Q L

699 GTGGAGTCTGGGGAGGTTAGTGCAGCCTGGAGGGCTCCTGAGACTCTCCTGTCAGCCTCTGGATTCACTTTAGTAG
V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S R

779 GTATTCCATGTCTTGGGTCGCCAGGCCTCAGGCAAGGGCTGGAATTGGTCGCACAAATTAAAGTGTGGTAATAGCA
Y S M S W V R Q A P G K G L E L V A Q I N S V G N S

859 CCTACTATCCAGACACTGTAAAGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCCTGTACCTGCCAAATGAAAC
T Y Y P D T V K G R F T I S R D N A K N T L Y L Q M N

939 TCCCCTGAGGGCCGAAGACACGGCCGTGATTACTGTCAAGCGGAGACTACTGGGCCAAGGCACCCCTGGTGACAGTC
S L R A E D T A V Y Y C A S G D Y W G Q G T L V T V S

1019 CTCAGGTGAGTCCTCACAACTCTAGAGCTTCTGGGCCAGGCCAGGCTGACCTTGGCTTGGGCTGGGAGGGAGGGGCTA
S

1099 AGGTGAGGCAGGTGGGCCAGCCAGGTGCAACCCAATGCCATGAGCCAGACACTGGACGCTGAACCTCGCGGACAGT
1179 TAAGAACCCAGGGCCCTCTGGCCCTGGGCCAGCTGTCCCACACCGCGGTCAATGGCACACCCTCTTGCAGCCT
A

1259 CCACCAAGGGCCATGGCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGCCACAGCGGCCCTGGCTGCC
S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A A L G C L

1339 GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGCTGTGAACTCAGCGCCCTGACCAGCGCGTGACACCTTCCCGC
V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A

1419 TGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCCTCCAGCAGCTGGCACCCAGACCTACA
V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y

1499 TCTGCAACGTGAATCACAGGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGT
I C N V N H K P S N T K V D K K V

1579 TCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCGCTCTGCCTGGACGCATCCCCGCTATGCAGCCAGTCCAGGGCAGCAAGGCAGGCC
1659 CGCTCTGCCCTCTTCACCGGAGGCCCTGCCCCCCCCTCATGCTCAGGGAGGGCTCTGGCTTCTCCAGGCT
1739 CTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCTAACCGGCCCTGCACACAAGGGGAGGTGCTGGCTCAGACCTGCCAGAG
1819 CCATATCCGGGAGGACCCCTGCCCTGACCTAACGCCACCCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTGGACACCTTC
1899 TCTCCCTCCAGATTCCAGTAACCTCCAACTCTCTCTGCAGAGCCAAATCTTGACAAAACTCACACATGCCACCG
E P K S C D K T H T C P P

1979 TGCCCAGTGAAGCCAGGCCAGGCCCTCCAGCTCAAGGGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCAATCCAGGGACA
C P

2059 GGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCCCTGACGCCCTGAACCTCCTGGGGGACCGTCAGTC
A P E L L G G P S V F L

2139 TTCCCCCCTAAACCCAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGA
F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E

2219 AGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q

2299 ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGCTCTCACCGCTCTGCACCCAGGACTGGCTGAATGCCAAGGAGTACAAGTGAAG
Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K

2379 GTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGTGGACCCGTGGGTGGAGGGCC
V S N K A L P A P I E K T I S K A K

2459 ACATGGACAGAGGCCGGCTGGGCCACCCCTGCCCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGCTTACAGGGCAGCCC
G Q P

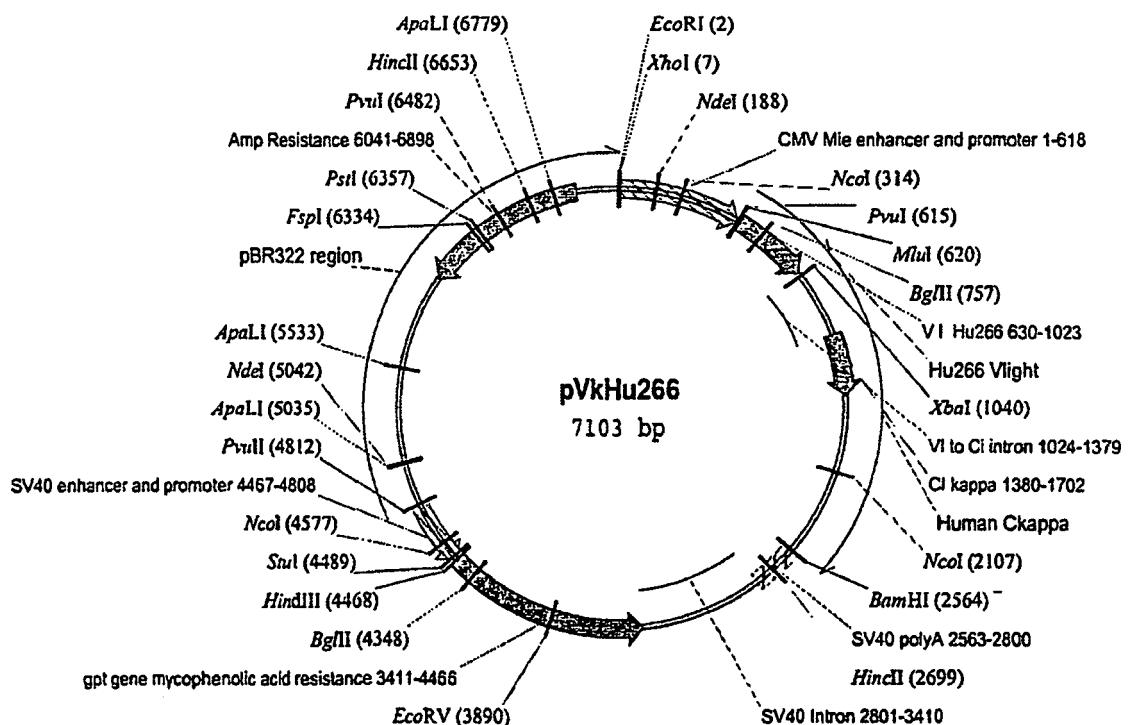
2539 CGAGAACACAGGTGACACCCCTGCCCTGCCCCATCCCCGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTACGCCCTGACCTGCC
R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K

2619 AGGCTTCTATCCAGCAGATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGGCCAGAACAACTACAAGACCACGCC
C

G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P
 2699 TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTC
 V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F
 2779 TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCTCCGGTAAATGAGTGCG
 S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K .
 2859 ACGGCCGGCAAGCCCCCGCTCCCCGGCTCTCGGTCGCACAGGATGCTGGCACGTACCCCCTGTACATACTTCCCG
 2939 GGCCGCCAGCATGGAAATAAAGCACCCAGCGCTGCCCTGGCCCCCTCGAGACTGTGATGGTTCTTCCACGGGTCAAGC
 3019 CGACTCTGAGGCTGAGTGCATGAGGAGGGAGAGCGGGTCCACTGTCCCACTGGCCAGGCTGTGCAGGTGTC
 3099 CTGGGGCCGCCTAGGGTGGGCTCAGCCAGGGCTGCCCTCGGAGGGTGGGGATTGCAAGCGTGGCCCTCCCTCCAGC
 3179 AGCACCTGCCCTGGCTGGCACCGGAAGCCCTAGGAGCCCTGGGGACAGACACACAGGCCCTGCCCTGTAGGAGAC
 3259 TGTCTCTGTTCTGTGAGCGCTGTCCCTCCAGCCACTCGGGGGCATGCCCTAGTCCATGTGCTTAGGGACAGG
 3339 CCCTCCCTCACCCCATCTACCCCCACGGCAGTACCCCTGGCTGCCCTGGCAGCTGGCAACCGCATGGGGACACACCG
 3419 ACTCCGGGGACATGCACCTCTGGGCCCTGGAGGGACTGGTGAGATGCCACACACACACTCAGCCAGACCCGTTCA
 3499 ACACACCCCGCACTGAGGTTGGCCGGCACACGGCCACACACACACGTGCACCCCTCACACAGGAGCCTCACCCGG
 3579 GCGAACTGCACAGCACCCAGACCAGCAAGGTCTCGCACACGTGAAACACTCTCGGACACAGGCCCAAGGCCCA
 3659 CGCGCACCTCAAGGCCACGGAGCCTCTGGCACTTCTCCACATGCTGACCTGCTCAGACAAACCCAGCCCTCTCA
 3739 CAAGGGTGCCCTGCAGCCCAACACACACAGGGATCACACACACCACGTCACTGCCCTGGCCACTTCCAG
 3819 TGCCGCCCTTCCCTGCAGGATCC

Die vollständige Sequenz des Hu266-schwere-Kette-Gens ist zwischen den MluI- und BamHI-Stellen in pVgl-Hu266 lokalisiert. Die Nucleotidnummer gibt ihre Position in pVg1-Hu266 an. Die V_H- und C_H-Exons werden im Einzelbuchstabencode translatiert; der Punkt gibt das Translationsterminationscodon an. Die reife schwere Kette beginnt an der doppelt unterstrichenen Glutaminsäure (E). Die Intronsequenzen sind kursiv geschrieben.

Figur 6. Plasmid pVkHu266



Figur 7. Plasmid pVg1-Hu266

