



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 28 138 T2** 2008.01.03

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 347 731 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 28 138.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US01/45383**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 999 158.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/064084**

(86) PCT-Anmeldetag: **31.10.2001**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **22.08.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **01.10.2003**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **25.04.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **03.01.2008**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61B 5/00** (2006.01)

**A61K 49/00** (2006.01)

**G01N 21/64** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**245306 P**      **02.11.2000**      **US**

(73) Patentinhaber:

**Cornell Research Foundation, Inc., Ithaca, N.Y., US**

(74) Vertreter:

**Henkel, Feiler & Hänzel, 80333 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**HYMAN, Bradley T., Charlestown, MA 02129, US;**

**CHRISTIE, Richard, Boston, MA 02130, US;**

**BACSKAI, Brian, Charlestown, MA 02129, US;**

**WEBB, Watt W., Ithaca, NY 14850, US; ZIPFEL,**

**Warren R., Ithaca, NY 14850, US**

(54) Bezeichnung: **IN VIVO MULTIPHOTON DIAGNOSTISCHE DETEKTION UND BILDDARSTELLUNG EINER NEU-RODEGENERATIVEN ERKRANKUNG**

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

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

**Beschreibung**

## GEBIET DER ERFINDUNG

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft die In-vivo-Mehrphotonenbildgebung von Hirngewebe von einem Säuger.

## HINTERGRUND DER ERFINDUNG

**[0002]** Alzheimer-Krankheit ist eine verheerende Krankheit, von der nahezu 4 Millionen Amerikaner befallen sind, die das Land Milliarden Dollar zur direkten Versorgung, verloren gegangene Einkommen kostet und – was sehr wichtig ist – Millionen amerikanischer Familien unsäglichen Schmerz kostet.

**[0003]** Die Krankheitssymptome beginnen schleichend mit relativ unspezifischen Zeichen und Symptomen. Subtiler Gedächtnisschwund, gelegentliche Wortfindungsschwierigkeiten, Reizbarkeit und Aggressivität können aus klinischer Sicht alles Zeichen eines Krankheitsprozesses sein, der das Hirn bereits wesentlich befallen hat. Im Laufe mehrerer Jahre schreitet die Erkrankung bis zu einer tiefen Amnesie zu einem Punkt fort, an dem die Patienten sich selbst oder ihre Familie nicht kennen. Häufig ist diese Amnesie von Frustration und Paranoia begleitet. Schließlich verlieren die Patienten jede Fähigkeit, für sich selbst zu sorgen – sich selbst zu kleiden, zu baden, sogar ihren Darm und ihre Blase zu kontrollieren. Ihre letzten Jahre verbringen sie häufig in einem Pflegeheim. Da das durchschnittliche Alter der Bevölkerung wächst, explodiert die Zahl der Alzheimer-Patienten, da dies eine stark altersbedingte Krankheit ist.

**[0004]** Während diese klinischen Symptome weiterlaufen, werden die Änderungen im Hirn deutlich. Zum Zeitpunkt, an dem die ersten klinischen Symptome auftreten, bestehen zahllose mikroskopische Ablagerungen eines als Amyloid ("A-beta" oder "A $\beta$ ") bezeichneten Proteins sowie Veränderungen in den Hirnzellen selbst. Während die Erkrankung fortschreitet, schrumpft das Hirn und verliert bis zu 50% von dessen Zellen.

**[0005]** Genetische Risikofaktoranalyse und Molekularbiologie legen stark nahe, dass es die Ablagerung von A $\beta$  ist, die der kritische Aspekt dieses Krankheitsprozesses ist. Die Beobachtung von A $\beta$  und einer Neuronenveränderung, Neurofibrillenknäuel, im Hirn unter dem Mikroskop liefert dem Neurpathologen eine definitive Diagnose. Jedoch sind diese Änderungen viel zu klein (100-mal zu klein), um von selbst den hochentwickeltesten klinischen Bildgebungsvorrichtungen, wie Computertomographie oder Magnetic Resonance Imaging, beobachtet zu werden.

**[0006]** Die Fähigkeit zur Detektion einer Amyloidablagerung und von neurofibrillen Veränderungen in Neuronen in vivo würde einen definitiven diagnostischen Test für Alzheimer-Krankheit und Vergleiche mit ganz unspezifischen klinischen Symptomen am Beginn des Krankheitsprozesses liefern. Darüber hinaus würde die Fähigkeit zur Sichtbarmachung und quantitativen Bestimmung dieser Veränderungen ein definitives Mittel zum Verfolgen des Fortschreitens einer Erkrankung und der Wirksamkeit potentieller Therapeutika liefern.

**[0007]** Die vorliegende Erfindung ist auf die Überwindung der Mängel des Standes der Technik durch Bereitstellen eines Verfahrens zur Bildgebung von Hirngewebe von einem Säuger gerichtet.

## ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0008]** Die vorliegende Erfindung ist auf ein Verfahren zur Erstellung eines Bildes von Hirngewebe von einem Säuger durch Aktivieren von Hirngewebe eines Säugers mit Strahlung, die unter Bedingungen appliziert wird, die zur Förderung einer gleichzeitigen Mehrphotonenanregung des Hirngewebes und zum Hervorrufen von Fluoreszenz wirksam sind, gerichtet. Die Fluoreszenz wird dann zum Erstellen eines Bildes des Hirngewebes gesammelt.

**[0009]** Der derzeitige Stand der Technik besteht darin, dass eine Diagnose von Alzheimer-Krankheit erst nach klinischen Manifestationen von deutlichem Gedächtnisschwund und dem Auftreten anderer kognitiver Beeinträchtigungen erfolgt. Neuropathologische Untersuchungen legen nahe, dass der Krankheitsprozess tatsächlich viele Jahre vor diesen offenkundigen Symptomen beginnt. Eine Bildgebungstechnologie, die die Detektion des pathologischen Prozesses vor klinischen Symptomen ermöglicht, würde Behandlungen mit dem Ziel einer Verhinderung der Progression statt einer einfachen Behandlung von Symptomen ermöglichen. Idealerweise kann ein Biomarker dieser Natur zur präsymptomatischen Identifizierung von Patienten, als Verfahren zur Verfolgung der Wirksamkeit einer Therapie und als Verfahren für direkte unterschiedliche Therapien verwendet

werden. Jede dieser Anwendungen würde einen wesentlichen Fortschritt gegenüber dem derzeitigen Stand der Angelegenheit ergeben.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

**[0010]** Die **Fig. 1A–C** zeigen verschiedene Ausführungsformen zur Bildgebung des Hirns eines Säugers gemäß der vorliegenden Erfindung. **Fig. 1A** erläutert die Weise, in der ein Bild des Schädels eines Patienten erstellt wird. In **Fig. 1B** wird die Bildgebung mit einem spektroskopischen System durchgeführt. **Fig. 1C** erläutert die Bildgebung mit einer optischen Einmodenfaser und einer terminalen Linse.

**[0011]** Die **Fig. 2A–E** zeigen die Präparation eines Schädels zur In-vivo-Bildgebung. **Fig. 2A** zeigt das grobe Aussehen eines Schädels durch ein Seziermikroskop vor der Bildgebung. Das Piagefäßsystem ist durch den intakten, jedoch ausgedünnten Bereich des Schädels sichtbar. Vordere und Mittelnähte sind in dem Bild ebenfalls sichtbar. Skalenmarkierungen sind 1 mm voneinander beabstandet. **Fig. 2B** ist ein Schemadiagramm des Mikroskopobjektivs während der Bildgebung. Der ausgedünnte Bereich des Schädels wird in einem Pool von künstlichem Liquor (hellgrau), der von einem Ring aus Knochenwachs (dunkelgrau) gehalten wird, gebadet. Ein kleiner Durchbruch wird in der Seitenwand des ausgedünnten Bereichs gemacht, um den Eintritt von Thioflavin-S zu ermöglichen. **Fig. 2C** ist die In-vivo-Sichtbarmachung von Thioflavin-S-positivem ("ThioS") Amyloid in einer 15 Monate alten Tg2576-Maus. Einzelner optischer Schnitt nahe der Oberfläche des Schädels. Eine Thioflavin-S-positive Amyloidangiopathie ist sichtbar, wobei sie die Piaarteriole in diesem Bild umringt. Die schwächere Autofluoreszenz des Schädelknochens ist im unteren rechten Eck sichtbar und die faserförmige Autofluoreszenz der Dura ist als Band rechts unten sichtbar. **Fig. 2D** zeigt einen weiteren optischen Schnitt aus der gleichen z-Reihe wie in **Fig. 2C**, jedoch 50 µm tiefer im Hirn, wobei dieser eine Thioflavin-S-positive Amyloidablagerung in Schicht 1 des Mauscortex zeigt. **Fig. 2E** zeigt die vertikale Volumenordnung des gesamten Bilderstapels, wobei der Schädel oben sichtbar ist, das Amyloid-verkrustete Piagefäß unmittelbar darunter und die Thioflavin-S-positive Plaque tief im lebenden Hirn. Die autofluoreszierende Dura kann ebenfalls als schwache Schicht zwischen dem Gefäß und dem Schädel beobachtet werden. Die näherungsweise Höhen der optischen Schnitte, die in den **Fig. 2C** und **2D** gezeigt sind, sind durch gestrichelte Linien angegeben. Die Maßstabsbalken in den **Fig. 2C–E** sind 25 µm.

**[0012]** Die **Fig. 3A–C** bestätigen, dass die Thioflavin-S-positiven Strukturen tatsächlich senile Plaques waren. Dies wurde durch Applizieren von Thioflavin S und einem monoklonalen Anti-Amyloid-beta-Antikörper, cy3-labeled 10D5 (Elan Pharmaceuticals, South San Francisco, Californien) auf die Oberfläche eines fixierten, jedoch intakten Tg2576-Hirns belegt. In **Fig. 3A** zeigt die Fluoreszenzemission im Bereich von 380–480 nm Thioflavin S, das den Amyloidkern einer Plaque etwa 40 µm tief im Hirn anfärbt. In **Fig. 3B** zeigt die Emission im Bereich 560–650 nm die Cy3-10D5-Anfärbung des gleichen Aβ, das den Thioflavin-S-positiven Kern umgibt. Maßstabsbalken = 10 µm. **Fig. 3C** zeigt gliafibrilläre saure Proteinimmunreaktivität in einem Schnitt durch den Bereich, der 2 Tage zuvor durch Mehrphotonenmikroskopie abgebildet wurde. Verstreute immunreaktive Astrocyten, die von benachbartem (nicht abgebildetem) Cortex nicht wesentlich verschieden sind, legen eine minimale Gewebereaktion auf die Abbildung bzw. Bildgebung nahe. Maßstab = 100 µm.

**[0013]** Die **Fig. 4A–E** zeigen die In-vivo-Bildgebung von Thioflavin-S-positiver Amyloidablagerung in einer Tg2576-Maus. **Fig. 4A** ist eine 3 × 3-Montage von 60× Feldern, die am ersten Bildgebungstag aufgenommen wurden. Optische Schnitte wurden alle 2 Mikrometer über eine Strecke von 200 Mikrometern von der inneren Oberfläche des Schädels erhalten; die Bilder wurden in Bezug auf die x-, y- und z-Achse ausgerichtet und dann auf ein einziges Bild projiziert, das Amyloidangiopathie und senile Plaques zeigte. Maßstabsbalken = 100 µm. **Fig. 4B** zeigt die In-vivo-Bildgebung einer Thioflavin-S-positiven Plaque in etwa 40 µm Tiefe zur Schädeloberfläche. Dieses Bild ist ein einziger optischer Schnitt durch den Körper der Plaque. Maßstabsbalken = 10 µm. **Fig. 4C** zeigt die gleiche Plaque wie in **Fig. 4B**, die zwei Tage später unter identischen Bildgebungsbedingungen erneut aufgenommen wurde. **Fig. 4D** ist ein einziger optischer Schnitt, der eine Thioflavin-S-positive Amyloidangiopathie in Verbindung mit einer Piaarteriole zeigt. Maßstabsbalken = 20 µm. **Fig. 4E** zeigt die gleiche Arteriole, die in **Fig. 4D** abgebildet ist, nach zwei Tagen.

**[0014]** Die **Fig. 5A–B** zeigen die Analyse der Variabilität von Plaquemessungen. In **Fig. 5A** zeigt die prozentuale Änderung (Mittelwert +/- Standardabweichung) für alle Plaquemessungen, die zu Gruppen von 0,5 Monaten gebündelt sind, keinen Trend sowohl im Hinblick auf die Durchschnittsmessung als auch die Variabilität der Messung über das untersuchte Zeitintervall. Die Zahlen für jede Messung sind über den Standardabweichungsbalken angegeben. **Fig. 5B** ist eine lineare Regressionsauftragung der Anfangsmessung und einer folgenden Messung für alle Zeitintervalle, die eine feste Korrelation für alle Plaquegrößen zeigt. Die Steigung der Linie kommt der Einheit nahe (0,98) mit einem Korrelationskoeffizienten ( $R^2 = 0,89$ ).

**[0015]** Die [Fig. 6](#) zeigt eine Subpopulation von Plaques, die die Größe über die Zeit ändern. Die Bilder sind Zweikanal-Volumendarstellungsstapel von Thioflavin-S-Plaques (rot) und Fluoresceinangiogrammen (grün), die von dem gleichen Tier bei der Anfangsbildgebungssitzung (linke Bilder) und 104 Tage später (rechte Bilder) aufgenommen wurden. Vier deutlich abgebildete Plaques können in diesen Volumina beobachtet werden, die durch A–D markiert sind. Die Autofluoreszenz der Dura erscheint am oberen Rand der Volumenstapel und sie erscheint in den Bildern hier und in [Fig. 7](#) etwas unterschiedlich, da die Bildstapel bei der Anfangstiefe nicht exakt zusammenfallen. Das Diagramm darunter stellt die prozentuale Änderung des Durchmessers für jede Plaque dar. Die durch A und B bezeichneten Plaques nehmen um etwa 50% an Größe zu, die Plaque C bleibt bei der gleichen Größe und die Plaque D nimmt um 40% ab. Maßstabsbalken = 20 µm.

**[0016]** Die [Fig. 7A–B](#) zeigen das Auftreten einer neuen Plaque in dem abgebildeten Bereich. [Fig. 7A](#) ist eine Volumendarstellung eines Satzes von drei Plaques während einer ersten Bildgebungssitzung. [Fig. 7B](#) ist eine Volumendarstellung des gleichen Bereichs, der 64 Tage später abgebildet wurde, die zeigt, dass die Anfangsplaques durch eine neue Thioflavin-S-positive Plaque verbunden sind. Die faserige Autofluoreszenz links unten ist Dura mater. Maßstabsbalken = 50 µm.

**[0017]** [Fig. 8](#) ist eine vereinfachte schematische Darstellung des Versuchsmusters. Eine anästhesierte Maus wird in eine Vorrichtung mit freiem Kopf gesetzt, die dann auf den Objektisch eines Mehrphotonenmikroskops montiert wird. Rotmarkiertes Dextran von Texas wird in die Schwanzvene als angiographisches Kontrastmittel injiziert. Thioflavin-S wird auf die Oberfläche des Hirns durch eine offene Kraniotomie appliziert. Nach dem Auswaschen von Thioflavin-S zeigt die Bildgebung sowohl die mikrovaskuläre Anatomie als auch Amyloidablagerungen.

**[0018]** [Fig. 9](#) zeigt Beispiele für das gleichzeitige Auftreten von Amyloidangiopathie und mikrovaskulärer Anatomie. Eine halbquantitative Bewertungsskala (nichts, mild, mäßig, schwer) wurde verwendet, wie in dieser Figur erläutert ist.

**[0019]** [Fig. 10](#) zeigt die Ermittlung eines Gefäßdurchmessers. Ein willkürlicher Startpunkt wurde gesetzt und dann wurde der Durchmesser von Gefäßen alle dreißig Mikrometer danach durch die Bildreihe ermittelt. An jedem Messpunkt wurde der Durchmesser des Gefäßes sowie das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von Amyloid festgestellt.

**[0020]** [Fig. 11](#) zeigt die Ermittlung eines Gefäßdurchmessers, die im Hinblick auf [Fig. 10](#) angegeben ist. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen Amyloid enthaltenden und kein Amyloid enthaltenden Gefäßen für milde (n = 11), mäßige (n = 10) und schwere (n = 6) Gefäße \* = p < 0,01.

**[0021]** [Fig. 12](#) zeigt ein Beispiel für eine milde Amyloidangiopathie, die nahe den Verzweigungspunkten von Gefäßen auftritt. Das Verfahren zur Ermittlung des Abstands wird durch eine Überlagerung von Zufallspunkten, von denen aus der Abstand von dem nächsten Verzweigungspunkt gemessen wird, erläutert.

**[0022]** [Fig. 13](#) zeigt den Abstand von Amyloidablagerungen vom nächsten Verzweigungspunkt. Die Messungen wurden wie unter Bezug auf [Fig. 12](#) beschrieben durchgeführt. Die signifikanten Unterschiede wurden bei sowohl milden (n = 75 Gefäßsegmente, p < 0,005) als auch mäßigen (n = 73 Gefäßsegmente, p < 0,005) Gefäßen beobachtet, wobei die Tendenz bestand, dass Amyloid nahe Verzweigungspunkten auftritt. Ein geringerer Unterschied, der keine statistische Signifikanz erreichte, wurde bei schwer befallenen Gefäßen beobachtet (n = 59).

**[0023]** [Fig. 14](#) zeigt ThioS-positive Amyloidangiopathie in der Tg2576-Maus. Das intakte fixierte Hirn einer 16 Monate alten Tg2576-Maus wurde mit ThioS (0,005%) angefärbt und unter Verwendung von Zweiphotonenanregung bei 750 nm abgebildet. Dieses Bild ist eine Montage einer 4 × 8-z-Reihe, die mit einem 20×-Objektiv aufgenommen wurde. Die Mittellinie des Hirns befindet sich oben an der Figur und das Hirn wurde mit dem vorderen Pol nach links ausgerichtet. Die extreme Krümmung am seitlichen Rand des Hirns störte die Erstellung der Montage, wobei der untere Teil des Bildes verzerrt wurde. Die Arteria cerebri media tritt von hinter dem seitlichen Rand des Hirns rechts hervor und verläuft zur Mittellinie. ThioS-positives, mit dem Gefäß verbundenes Amyloid sowie oberflächliche parenchymale ThioS-positive Plaques sind deutlich sichtbar. Oberflächenvenolen sind als negativ angefärbte Hintergrundprofile zu beobachten. Maßstabsbalken (rechts oben) = 600 µm.

**[0024]** Die [Fig. 15A–B](#) zeigen, dass die Überexpression eines mutanten Amyloidvorläuferproteins ("APP") glatte Muskelzellen unabhängig von einer Amyloidablagerung nicht zerstört. Phalloidin-markierte glatte Muskelzellen in jungen (6 Monate) Tg2576-Tieren sind gut um den Umfang des Gefäßes, ohne offensichtlichen

Zwischenraum zwischen benachbarten Zellen angeordnet. **Fig. 15A** zeigt die Phalloidin-angefärbten glatten Muskelzellen in einem Piagefäß von einem Tg<sup>-</sup>-Tier. **Fig. 15B** zeigt glatte Muskelzellen in einem Piagefäß eines Tg<sup>+</sup>-Tiers. Maßstabsbalken = 20 µm.

**[0025]** Die **Fig. 16A–F** zeigen die Wirkung einer Amyloidablagerung auf glatte Muskelzellen in 14 Monate alten und 22 Monate alten Tg2567-Tieren. Die **Fig. 16A** zeigt Phalloidinmarkierte glatte Muskelzellen in der Wand einer Piarteriole in einem 14 Monate alten Tg2576-Tier. Die **Fig. 16B** zeigt ThioS-positives Amyloid, das die Gefäße umgibt. Glatte Muskelzellen sind in Bereichen einer Amyloidablagerung im Vergleich zu nicht betroffenen Bereichen des gleichen Gefäßes klar unterbrochen. Glatte Muskelzellen, die von Amyloid umgeben sind, sind desorganisiert und isoliert, obwohl kein offensichtlicher Verlust von Zellen längs der Länge des Gefäßes auftritt. **Fig. 16D** zeigt eine Anfärbung glatter Muskelzellen in einem 24 Monate alten Tg2576-Tier. Die **Fig. 16E** zeigt ThioS-positives Amyloid, das das Gefäß umgibt. In diesem Alter ist ein offenkundiger Verlust von glatten Muskelzellen längs der Länge des Gefäßes offensichtlich, zusammen mit einem Zerbrechen verbliebener Zellen. Bereiche des Gefäßes, die nicht von Amyloid befallen sind, behalten jedoch eine normale glatte Muskelzellenorganisation bei (siehe **Fig. 16C** und **F**). Übereinandergelegte Bilder zeigen sowohl Phalloidin- als auch Thio-S-Anfärbung. Maßstabsbalken = 20 µm.

**[0026]** Die **Fig. 17** zeigt die quantitative Bestimmung der Dichte glatter Muskelzellen in amyloidbeladenen gegenüber amyloidfreien Gefäßen in 14 Monate und 24 Monate alten Tg2576-Mäusen. Die lineare Dichte glatter Muskelzellen wurde wie beschrieben ermittelt. Die Dichte wurde in befallenen und nicht befallenen Gefäßen beider Altersgruppen ermittelt. Der 24 Monate alte amyloidbeladene Satz von Gefäßen wies eine signifikant kleinere Dichte der glatten Muskelzellen ( $p < 0,01$ , ANOVA) als entweder die amyloidfreien Gefäße von dem gleichen Tier oder amyloidfreie Gefäße von jüngeren transgenen und nichttransgenen Tieren auf.

**[0027]** **Fig. 18** zeigt die Reaktion von Piagefäßen auf ACh und SNP. Maximale prozentuale Dilatation als Reaktion auf ACh ( $10^{-6}$  M) und SNP ( $0,5 \times 10^{-6}$  M) in 14 Monate alten Tg<sup>+</sup>-Mäusen ( $n = 4$  von 5, ein Ausreißer ausgeschlossen) und Tg<sup>-</sup>-Mäusen ( $n = 3$  von 3). Die Balken bedeuten Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. \*,  $p > 0,05$  durch ANOVA.

**[0028]** Die **Fig. 19A–D** zeigen die In-vivo-Bildgebung von Amyloid- $\beta$ -Ablagerungen in 20 Monate alten homozygoten PDAPP-Mäusen. Rekonstruktionen von Stapeln von Z-Reihenbildern, die mit 5- $\mu$ m-Stufen mit einem 20 $\times$ -Objektiv (**Fig. 19A–B**) und 2  $\mu$ m-Stufen mit einem 60 $\times$ -Objektiv (**Fig. 19C–D**) ausgehend von unmittelbar unter der Kortexoberfläche bis etwa 150  $\mu$ m unter der Oberfläche aufgenommen wurden. Amyloid- $\beta$  wird mit einer verdünnten Lösung des fluoresceinmarkierten monoklonalen Antikörpers 10D5 sichtbar gemacht (**Fig. 19A** und **C**). Eine erste Bildgebungssitzung zeigt zahlreiche, mit 10D5 immunreaktive Amyloid- $\beta$ -Plaques in dem Neuropil und in Verbindung mit Gefäßen in einem repräsentativen Tier (**Fig. 19B** und **D**). Drei Tage später wurden exakt die gleichen Stellen mit Fluorescein-10D5 erneut abgebildet. Überraschenderweise verbleibt sehr wenig des Neuropil-Amyloid- $\beta$ , was direkt die Aufhebung von zuvor existierenden Amyloid- $\beta$ -Ablagerungen zeigt. Es ist anzumerken, dass das gefäßassoziierte Amyloid- $\beta$  nicht deutlich verändert ist. Vergrößerungsbalken = 50  $\mu$ m in den **Fig. 19A** und **B**, 25  $\mu$ m in den **Fig. 19C** und **D**.

**[0029]** Die **Fig. 20A–D** stellen fest, ob die offensichtliche Clearance von Amyloid- $\beta$  auf der Anwendung eines Anti-Amyloid- $\beta$ -Antikörpers oder der chirurgischen Präparation, der Bildgebung und anderer nichtspezifischer Faktoren beruhte, durch Ersetzen von 10D5 in der ersten Bildgebungssitzung durch 16B5, einem monoklonalen Antikörper, der gegen humanes Tau, das mit Nagetier-Tau keine Kreuzreaktion eingeht, gerichtet ist (Sobey et al., "Effect of Nitric Oxide and Potassium Channel Agonists and Inhibitors on Basilar Artery Diameter", *Am. J. Physiol.*, 72: H256–H262 (1997)) und sie verwendeten Thioflavin S als Bildgebungsmittel. Die **Fig. 20A** und **20B** zeigen eine Thioflavin-S-positive Plaque in der ersten Bildgebungssitzung bzw. 3 Tage nach der Applikation von 10D5. **Fig. 20C** zeigt, dass sich eine Thioflavin-S-positive Plaque in einem 16B5-behandelten Tier 3 Tage später nicht änderte (**Fig. 20D**). Vergrößerungsbalken = 20  $\mu$ m.

**[0030]** Die **Fig. 21A–B** zeigen die histologische Analyse von abgebildeten Hirnen von 20 Monate alten homozygoten PDAPP-Mäusen unter Verwendung eines direkt markierten Antikörpers 3D6, die eine außerordentlich hohe Menge von Amyloid- $\beta$ -Ablagerungen über den gesamten Kortex und die Hippokampusformation zeigen. Es bestand eine deutliche Verringerung der Amyloid- $\beta$ -Anfärbung am Ort der 10D5-Applikation. **Fig. 21A** zeigt die Immunfärbung mit biotinyliertem 3D6, einem monoklonalen Anti-Amyloid- $\beta$ -Antikörper, der im Vergleich zu 10D5 (aa3-6) ein anderes Epitop (aa 1-5) aufweist, die einen 100–200  $\mu$ m tiefen Bereich zeigt, dem im wesentlichen diffuse Amyloid- $\beta$ -Ablagerungen fehlen, im Gegensatz zu den starken Ablagerungen, die in angrenzenden Bereichen oder medial oder lateral zu der Stelle gefunden werden. **Fig. 21B** zeigt, dass nach einer ersten Behandlung mit Applikation von 16B5 keine Änderungen in Bezug auf auf 3D6 immunreaktive Amylo-

id- $\beta$ -Plaques beobachtet wurden. Vergrößerungsbalken = 200  $\mu\text{m}$ .

**[0031]** Die [Fig. 22A–B](#) zeigen eine deutliche lokale Mikrogliaaktivierung, die mit biotinmarkiertem Tomatenlectin (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) festgestellt wurde, drei Tage nach der Schädelpräparation und Bildgebung in Bezug auf sowohl die 10D5-Gruppe ([Fig. 22A](#)) als auch die 16B5-Gruppe ([Fig. 22B](#)) erfolgte. Vergrößerungsbalken = 200  $\mu\text{m}$ .

**[0032]** Die [Fig. 23A–B](#) zeigen konfokale dünne Schnitte (0,2  $\mu\text{m}$ ), die rekonstruiert wurden, um die enge Beziehung von Mikroglia mit verbleibendem Amyloid- $\beta$  drei Tage nach einer Behandlung mit 10D5-Fluorescein zu erläutern. [Fig. 23A](#) zeigt fluoresceinmarkiertes Tomatenlectin, das Mikroglia detektiert, und biotinmarkiertes 3D6, das mit Cy3-Avidin detektiert wird, das Amyloid- $\beta$  detektiert. Eine deutliche Mikroglia-reaktion, die verbliebene Amyloid- $\beta$ -Plaques umgibt, wurde festgestellt. Wie in [Fig. 23B](#) gezeigt ist, ist distal zu der Stelle, beispielsweise im temporalen Lappen, die Assoziation von Mikroglia mit Amyloid- $\beta$  viel mäßiger. Vergrößerungsbalken = 20  $\mu\text{m}$ .

**[0033]** [Fig. 24A](#) zeigt die Autofluoreszenz von Neurofibrillenknäueln und Lipofusionströpfchen von postmortalem Hirngewebe bei einem humanen Alzheimer-Krankheit-Patienten. [Fig. 24B](#) zeigt die Fluoreszenz von Neurofibrillenknäueln von postmortalem Hirngewebe in einem humanen Alzheimer-Krankheit-Patienten unter Verwendung eines Antikörpers gegen das Tau-Protein; dies zeigt, dass die Fluoreszenz in [Fig. 24A](#) dem Tau-Protein zuzuordnen ist.

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0034]** Die vorliegende Erfindung ist auf ein Verfahren zur Herstellung eines Bildes von Hirngewebe von einem Säuger durch Aktivieren von Hirngewebe eines Säugers mit Strahlung, die unter Bedingungen appliziert wird, die zur Förderung einer gleichzeitigen Mehrphotonenanregung des Hirngewebes und zum Hervorrufen von Fluoreszenz wirksam sind, gerichtet. Die Fluoreszenz wird dann gesammelt, um ein Bild des Hirngewebes zu erstellen.

**[0035]** Die [Fig. 1A–C](#) zeigen verschiedene Ausführungsformen zur Bildgebung einer neurodegenerativen Erkrankung bei einem Patienten gemäß der vorliegenden Erfindung.

**[0036]** [Fig. 1A](#) erläutert, wie der Schädel eines Patienten P durch Platzieren der Bildgebungsvorrichtung **2** gegen den Schädel abgebildet wird.

**[0037]** [Fig. 1B](#) führt die Bildgebung mit einem spektroskopischen System durch. Dieses System umfasst den dichroitischen Spiegel **4**, die Linse **6**, die spektroskopische Selektionsvorrichtung **8** und den Photodetektor **10**. Bei der Verwendung wird Mehrphotonenstrahlung L von einem Laser gegen den dichroitischen Spiegel **4** gerichtet, der diese Strahlung durch die Linse **6** zurückdirigiert. Die Linse **5** ist gegen einen dünnen Teil des Schädels des Patienten P so platziert, dass Mehrphotonenstrahlung L durch die Haut, den Schädel, die Dura mater, die Arachnoidea und Subarachnoidea und die Pia mater und in den Kortex des Patienten dringt. In dem Kortex bewirkt die Strahlung L, dass Fluoreszenz F auftritt und diese Fluoreszenz läuft durch die Linse, den dichroitischen Spiegel **4** und zur spektroskopischen Selektionsvorrichtung **8**, die mit dem Photodetektor **10** ausgestattet ist. Der Photodetektor **10** empfängt die Fluoreszenz F, die die spektroskopische Selektionsvorrichtung **8** durchlaufen hat, und er bewirkt die Erzeugung eines Bildes. Dieses Bild wird dann zum Zwecke der Diagnostizierung von Alzheimer-Krankheit oder anderen neurodegenerativen Erkrankungen untersucht.

**[0038]** [Fig. 1C](#) zeigt eine zweite Ausführungsform zur Durchführung des Verfahrens der vorliegenden Erfindung. Bei dieser Version der vorliegenden Erfindung werden eine optische Einmodenfasern **100**, eine terminale Linse **102** und ein Detektor **104** zur Durchführung des Bildgebungsverfahrens der vorliegenden Erfindung verwendet. Bei der Verwendung durchläuft die Mehrphotonenstrahlung L die Haut, den Schädel, die Dura mater, die Arachnoidea und Subarachnoidea und die Pia mater und in den Kortex des Patienten oder es können eine oder alle dieser Schichten penetriert werden, um ein zur Kortexoberfläche näheres Eindringen der Faser zu ermöglichen. Im Kortex bewirkt die Strahlung L, dass Fluoreszenz F auftritt, und diese Fluoreszenz gelangt in den Detektor **104**, wo ein Bild erzeugt wird. Dieses Bild wird dann untersucht.

**[0039]** Wie in den [Fig. 18–c](#) gezeigt ist, kann das Bildgebungsverfahren der vorliegenden Erfindung nichtinvasiv durch Applizieren der Strahlung L auf den Kopf des Patienten durchgeführt werden. Alternativ kann der Schädel des Patienten durch Bohren oder Abtragen des Schädels ausgedünnt werden. Alternativ kann das Gehirn durch chirurgisches Öffnen des Schädels freigelegt und das Hirn dann der Strahlung L unterworfen wer-

den.

**[0040]** Die Detektion der durch mehrere Photonen angeregten Fluoreszenz und der zweiten und dritten Harmonischen der Laseranregung, die im Gewebe erzeugt werden, kann durch eine optische Faser, die die Anregung liefert, und natürlich durch umgebende Fasern in einem Bündel oder durch dicke optische Röhren zur effizienten Sammlung von Licht, das nahe der Spitze der Einmodenanregungsfaser oder -fasern angeregt wird, durchgeführt werden. Es besteht ein signifikanter Vorteil in Bezug auf die Fluoreszenzsammelleffizienz für Mehrphotonengewebefluoreszenz gegenüber einer Einphotonenanregung, da die Emission nahe der Faser Spitze lokalisiert ist, wo sie Sammeloptik am besten zugänglich ist. Günstigerweise wird die vorliegende Erfindung mit einer Mehrzahl optischer Fasern, die eine einzige Anregungsfaser, die von einer Mehrzahl von Sammelfasern umgeben ist, umfassen, durchgeführt.

**[0041]** Eine effektive Mehrphotonenmolekülanregung wird gemäß der vorliegenden Erfindung durch die Kombination von (a) der sehr hohen lokalen unmittelbaren Intensität und (b) der zeitlichen Konzentration eines gepulsten Lasers ermöglicht. Eine monochromatische Lichtquelle hoher Intensität, langer Wellenlänge, die bis zur Beugungsgrenze fokussierbar ist, wie ein Mode-Locked-Titan-Saphir-Festkörperlaser, wobei jeder Puls eine Dauer von etwa 100 Femtosekunden ( $100 \times 10^{-15}$  s) mit einer Wiederholrate von etwa 80 MHz aufweist. Andere Laser, die ebenfalls zur Mehrphotonenanregung und Harmonischenerzeugung wirksam sind, können ebenfalls verwendet werden. Wegen der hohen unmittelbaren Energie, die durch die intensiven Pulse sehr kurzer Dauer, die auf die Beugungsgrenze fokussiert sind, bereitgestellt wird, besteht eine deutliche Wahrscheinlichkeit, dass ein Fluorophor (ein fluoreszierender Farbstoff), der in dem Target enthalten ist und normalerweise durch ein einziges Photon hoher Energie mit einer kurzen Wellenlänge, typischerweise im Ultraviolettbereich, anregbar ist, zwei Photonen langer Wellenlänge von der Laserquelle gleichzeitig absorbiert. Diese Absorption kombiniert die Energie der zwei Photonen in dem Fluorophormolekül, wodurch der Fluorophor auf dessen angeregten Zustand gehoben wird. Wenn der Fluorophor in dessen normalen Zustand zurückkehrt, emittiert er Licht und dieses Licht gelangt dann in einen geeigneten Detektor.

**[0042]** Die Mehrphotonenanregung von Fluorophoren durch hochintensive kurze Lichtpulse stellt eine generelle Fluoreszenzmikroskoptechnik zur Bildgebung dar, die eine verbesserte Hintergrunddiskriminierung liefert und ein Photoausbleichen der Fluorophore verringert. Der Grund hierfür liegt darin, dass die in dem Mikroskop gelieferte fokussierte Beleuchtung einen konvergierenden Kegel füllt, wenn sie in die Probe gelangt. Das gesamte Licht, das die Brennebene an der Spitze des konvergierenden Kegels erreicht, mit Ausnahme eines winzigen Bruchteils, der in dem Fluorophor absorbiert wird, tritt dann an der entgegengesetzten Seite der Probe durch einen divergierenden Kegel aus. Nur im Bereich des Brennpunkts auf der Objektfläche an der schmalsten Stelle, die durch die konvergierenden und divergierenden Kegel gebildet wird, ist die Intensität ausreichend hoch, um eine Mehrphotonenabsorption in dem Probenfluorophor hervorzurufen und diese Intensitätsabhängigkeit ermöglicht eine Anregung mit langer Wellenlänge nur in dem kleinen lokalen Volumen der Probe, das den Brennpunkt umgibt. Diese Absorption wird mittels eines Stroms von schnellen Femtosekundenpulsen einer relativ langen Wellenlänge hoher Intensität hervorgerufen, der eine mäßige durchschnittliche Beleuchtungsintensität von Licht langer Wellenlänge über den gesamten Rest der Probe außerhalb des Bereichs des Brennpunkts beibehält. Infolgedessen wird ein Photoausbleichen des Fluorophors außerhalb der Brennebene tatsächlich eliminiert. Die Einphotonenabsorption des Lichts langer Wellenlänge ist vernachlässigbar und außerhalb der Brennebene ist die unmittelbare Intensität für eine deutliche Zweiphotonenabsorption und -anregung zu niedrig, auch wenn die zeitgemittelte Beleuchtung in der Realität nahezu gleichförmig über die Tiefe der Probe ist. Diese Wirkung verringert auch signifikant die Schädigung lebender Zellen.

**[0043]** Um dreidimensionale Auflösung zu erhalten, kann die vorliegende Erfindung eine Zweiphotonenanregung eines Fluorophors, der einen Einphotonenabsorptionspeak bei einer Wellenlänge aufweist, die die Hälfte der des anregenden Lichts überlappt oder übersteigt, nutzen. Zur Dreiphotonenanregung überlappt die Einphotonenabsorption ein Drittel der des anregenden Lichts. Um dies durchzuführen, produziert der Laser einen sehr kurzen gepulsten Laserstrahl einer hohen unmittelbaren Energie und einer relativ langen Wellenlänge, beispielsweise im sichtbaren Roten des Infrarotbereichs. Dieses Licht wird auf eine Probe, die einen Fluorophor enthält, der normalerweise durch ein einziges Photon mit einem kurzen Wellenlängenbereich (beispielsweise Ultraviolettstrahlung) angeregt wird, so gerichtet, dass zwei niederenergetische (rote) Photonen ihre Energie kombinieren müssen, um die gleiche Anregung der Probe zu ergeben, die durch ein einziges hochenergetisches (Ultraviolett) Photon bereitgestellt wurde. Sowohl die Anregung als auch damit die Fluoreszenzraten in der Probe sind proportional zum Quadrat der Intensität des einfallenden Lichts. In dem fokussierten Anregungslaserstrahl wird die Intensität des einfallenden Lichts langer Wellenlänge hoch genug, um die Fluorophore in der Probe nur im Bereich des Brennpunkts anzuregen. Dieser Brennpunkt kann in der Probe einstellbar so positioniert sein, dass Fluoreszenz und/oder Photolyse der Probe nur in einem ausgewählten Ellipsenvolu-

men um den Brennpunkt hervorgerufen werden. Daher muss gemäß der vorliegenden Erfindung nur Anregungslicht langer Wellenlänge die Probe durchlaufen und dieses Licht langer Wellenlänge wird fokussiert, um ausreichende Intensität hervorzurufen, um Fluoreszenz nur in einem sehr kleinen Bereich anzuregen. Dieses Fluoreszenz wird hervorgerufen, auch wenn das Fluorophor normalerweise nur im Ultravioletten absorbiert. Da der Brennpunkt selektiv in der Probe positioniert werden kann, wird dreidimensionale Auflösung sowohl im Hinblick auf Rasterfluoreszenzmikroskopie als auch Photolyse, die Photolyse von durch Photonen aktivierbaren Reagenzien, die durch Photolyse freigesetzt werden können, umfasst, bereitgestellt.

**[0044]** Gemäß der vorliegenden Erfindung wird die notwendige Anregungsintensität von einer Strahlungslichtquelle bereitgestellt, die beispielsweise ein Mode-Locked-Titan-Saphir-Laser sein kann, der Lichtpulse mit einer Wellenlänge im roten Bereich des Spektrums, beispielsweise etwa 700–1000 nm, oder mit Pulsen einer Breite von  $10^{-9}$  s bis  $10^{-15}$  s, günstigerweise bei einer Wiederholrate von etwa 80 MHz erzeugt. Andere helle gepulste Laser können ebenfalls zur Erzeugung von Licht bei verschiedenen, relativ langen Wellenlängen im infraroten oder sichtbaren roten Bereich des Spektrums, beispielsweise zur Erzeugung der notwendigen Anregungsphotonenenergien, die sich zu dem passenden Absorptionsenergieband aufsummieren, das durch die Fluorophore in dem Spektrum erforderlich ist, die normalerweise durch Absorption eines einzigen Photons in dem Spektralbereich, der Wellenlängen von etwa der Hälfte der Wellenlänge des einfallenden Lichts aufweist, angeregt werden, verwendet werden. Wenn kürzere Anregungswellenlängen benötigt werden, können die Laserwellenlängen durch 2, 3 oder 4 durch externe Harmonischenerzeugung geteilt werden. Daher können beispielsweise zwei Photonen im sichtbaren roten Bereich bei 750 nm kombinieren, um ein Fluorophor, das normalerweise Licht im Ultraviolettbereich bei oder über 375 nm absorbiert, anzuregen, während zwei Photonen im Infrarotbereich von beispielsweise 1070 nm ein Fluorophor anregen, das bei oder über 535 nm im sichtbaren Lichtbereich absorbiert.

**[0045]** In einer modifizierten Form der Erfindung kann die Lichtquelle einer einzigen Wellenlänge durch zwei verschiedene Laserquellen einer langen Wellenlänge so ersetzt werden, dass der einfallende Lichtstrahl aus zwei überlagerten gepulsten Lichtstrahlen einer hohen unmittelbaren Energie und unterschiedlicher Wellenlängen besteht. Die Wellenlängen des einfallenden Strahls werden so gewählt, dass ein Fluorophor angeregt wird, der bei einer kurzen Wellenlänge absorbiert, die wie im folgenden beschrieben werden kann:

$$1/\lambda_{\text{abs}} = 1/\lambda_1 + 1/\lambda_2$$

wobei  $\lambda_{\text{abs}}$  die kurze Wellenlänge des Absorbers ist und  $\lambda_1$  und  $\lambda_2$  die Laserwellenlängen des einfallenden Strahls sind.

**[0046]** Bei Zweiphotonenanregung mit einem typischen Zweiphotonenquerschnitt  $\delta$  von

$$\delta = 10^{-58} \text{ m}^4/\text{Photon}$$

mit den oben angegebenen Pulsparametern (100-fs-Pulse mit einer Wiederholrate von 80 MHz) und mit dem durch eine Linse der numerischen Öffnung  $A \approx 1,4$  fokussierten Strahl sättigt die durchschnittliche einfallende Laserleistung ( $P_0$ ) von etwa 50 mW die Fluoreszenzleistung eines Fluorophors mit der Grenze von einem absorbierten Photon pro Puls pro Fluorophor. Die Zahl  $n_0$  der pro Fluorophor pro Puls absorbierten Photonen hängt von der im folgenden angegebenen Beziehung ab:

$$n_0 \approx \frac{P_0^2 \delta}{\tau f^2} \left[ \frac{A^2}{2hc\lambda} \right]^2$$

worin

- $\tau$  die Pulsdauer ist,
- $f$  die Wiederholrate ist,
- $P_0$  die durchschnittliche einfallende Laserleistung ist,
- $\delta$  der Photonenabsorptionsquerschnitt ist,
- $h$  das Planck'sche Wirkungsquantum ist,
- $c$  die Lichtgeschwindigkeit ist und
- $A$  die numerische Öffnung der Fokussierungslinse ist.

**[0047]** Die Fluoreszenzemission kann erhöht werden, jedoch durch Erhöhen der Pulswiederholfrequenz bis zum Kehrwert der Fluoreszenzlebensdauer, die typischerweise die folgende ist:



$$\tau_f^{-1} = 10^9 \text{S}^{-1}$$

**[0048]** Zum Vergleich erfolgt die Einphotonenfluoreszenzsättigung bei einer einfallenden Leistung von etwa 3 mW.

**[0049]** Zusätzlich zur Ermittlung der intrinsischen Gewebefluoreszenz (die auch als Autofluoreszenz bekannt ist) mit Mehrphotonenanregung ist es möglich, photoaktive Mittel, die Fluoreszenzfarbstoffe umfassen, in Verbindung mit Mehrphotonenmikroskopie zur Abbildung von Eigenschaften von Zellen und Geweben zu verwenden. Geeignete photoaktive Mittel umfassen Farbstoffe, die durch Mehrphotonenanregung angeregt werden, beispielsweise organische Moleküle, deren Fluoreszenz sich ändert, wenn sie an Metallionen, wie  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  oder  $\text{K}^+$  oder  $\text{H}^+$ , binden, wobei diese Farbstoffe wie DAPI (4',6-Diamidino-2-henylindoldihydrochlorid) umfassen. Viele derartige Farbstoffe sind zur Verwendung in vivo geeignet. Derartige aktive Mittel fluoreszieren bei Bindung an Läsionen einer neurodegenerativen Erkrankung oder anderer Neuroanomalien. Bei Durchführung der ersten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die Standardfluoreszenz vor der Behandlung des Hirngewebes mit mindestens einem photoaktiven Mittel bestimmt.

**[0050]** Die Mehrphotonenbildgebungstechnik der vorliegenden Erfindung kann zur Beobachtung von Plaques und Neuronen in den Hirnen lebender Säuger verwendet werden. Ferner können auch Knäuel beobachtet werden.

**[0051]** Es gibt mehrere mögliche Ansätze zur Beobachtung der Knäuel und Plaques: Knäuel bestehen aus einer hochstrukturierten Aggregation von Tau-Protein, die unter einem Elektronenmikroskop eine als perihelikale Filamente bezeichnete Konformation einnehmen. Es wurde entdeckt, dass diese Proteinkonformation unter Verwendung von Wellenlängen, die für Mehrphotonenmikroskopie verwendet werden (Anregung von etwa 700 Nanometer, Emission von etwa 450 Nanometer) autofluoreszierend ist. Diese Beobachtung ermöglicht die Detektion von Neurofibrillenknäueln im Hirn, entweder durch Bildgebung unter Verwendung von Vorrichtungen, die zur Bereitstellung von Scanningmöglichkeiten gestaltet sind, oder durch Spektroskopie, wobei die Atomauflösung verloren geht, jedoch die einzigartige biochemische Signatur einer Proteinstruktur immer noch detektiert werden kann. Die Autofluoreszenz aufgrund von Knäueln kann von anderen Hirnstrukturen aufgrund der einzigartigen Wellenlängeneigenschaften, die für das Knäuelprotein entdeckt wurden, diskriminiert werden, sowie schließlich unter Verwendung anderer Techniken, wie Fluoreszenzlebensdauerbildgebung, zur Diskriminierung von der Autofluoreszenz im Hintergrund von niedrigem Niveau diskriminiert werden. So kann in Betracht gezogen werden, dass Licht langer Wellenlänge durch den Schädel auf die Hirnsubstanz anzuwenden und die emittierte Autofluoreszenz zu ermitteln. Das Licht langer Wellenlänge durchläuft ohne weiteres das weiche Gewebe und darüberliegendem Knochen in Systemen, die derzeit in Verwendung sind, um die Hämoglobinsättigung im Hirn zu messen, was die Durchführbarkeit dieses Ansatzes nahe legt.

**[0052]** Ein getrennter Ansatz wird zur Amyloidablagerung verwendet. Bisher scheint Amyloid nicht autofluoreszierend zu sein, so dass zum Sichtbarmachen des Amyloids ein Kontrastmittel appliziert werden muss. Es wurde ermittelt, dass ein üblicherweise verwendetes Reagens, Thioflavin S, direkt auf die Kortexoberfläche oder in die Rückenmarksflüssigkeit appliziert werden kann. Dieser Farbstoff fluoresziert intensiv nur, wenn er an Amyloidplaques gebunden ist. Daher kann Thioflavin S oder ein Farbstoff mit ähnlichen amyloidbindenden Eigenschaften in einer anderen Ausführungsform der Erfindung Patienten verabreicht werden, wobei es entweder in die Rückenmarksflüssigkeit eingeführt wird oder Verbindungen verwendet werden, die die Blut-Hirn-Schranke durchdringen, systemisch injiziert wird und das Hirn anschließend unter Verwendung von Licht langer Wellenlänge abgebildet wird. Erneut ermöglicht entweder Spektroskopie oder direkte Bildgebung die Detektion und quantitative Bestimmung der Menge von vorhandenem Amyloid. Eine derartige Technik, bei der nahes Infrarotlicht langer Wellenlänge zur Erzeugung fluoreszierender Marker einer Neurofibrillenänderung oder Amyloidablagerung verwendet wird, kann verwendet werden, um die Menge dieser im Hirn vorhandenen Änderungen zu bestimmen, wodurch eine quantitative Bestimmung für therapeutische Eingriffe bereitgestellt wird.

**[0053]** Zusätzlich zur Bildgebung von Alzheimer-Krankheit kann das Vorliegende auch zur Bildgebung anderer neurodegenerativer Erkrankungen verwendet werden. Beispiele für derartige Erkrankungen umfassen Parkinson-Krankheit, Chorea Huntington und Lou-Gehrig-Syndrom.

## Beispiel 1 – In-vivo-Bildgebung von Amyloidablagerung

**[0054]** Neun männliche Tg2576-Mäuse (mittleres Alter 18,6 Monate (Hsiao et al., "Correlative Memory Deficits", A $\beta$  Elevation, and Amyloid Plaques in Transgenic Mice", *Science*, 274: 99–102 (1996), das hierdurch in seiner Gesamtheit als Bezug aufgenommen ist) wurden zur In-vivo-Bildgebung von Plaques verwendet. Diese Mäuse exprimieren eine humane Amyloidvorstufe, die die Schwedische Mutation unter dem Hamsterprionienproteinpromotor trägt. Der Schädel wurde 2–6 Tage vor der Bildgebung präpariert. Mäuse wurden mit Avertin (Tribromethanol, 250 mg/kg IP) anästhesiert. Ein Schnellbohrer (Fine Science Tools, Foster City, CA) wurde zum Ausdünnen des Schädels in einem kreisrunden Bereich eines Durchmessers von etwa 1–1,2 mm (**Fig. 2A**) unter Verwendung eines Seziernmikroskops zur groben Sichtbarmachung der Stelle verwendet. Wärme- und Vibrationsartefakte wurden während des Bohrens durch häufige Applikation von künstlichem Liquor ("ACSF", 125 mM NaCl, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM Glucose) minimiert. Die Schädelstärke wurde wiederholt mit einer chirurgischen Sonde (Roboz, Rockville, MD) festgestellt und das Bohren wurde gestoppt, wenn der Knochen Flexibilität in einem Zentralbereich eines Durchmessers von etwa 0,6 mm zeigte. Die klare Sichtbarmachung des Pia-gefäßsystems war eine weitere Anzeige für die Dünne des Schädels. Die Kopfhaut wurde dann genäht und das Tier wurde sich erholen gelassen. Am Tag der Bildgebung wurde das Tier erneut anästhesiert, die Kopfhaut zurückgeschlagen und die geringe Menge Bindegewebe, die im Zwischenraum gewachsen war, durch Abschaben entfernt. Die Spitze einer Nadel der Größe 22 wurde verwendet, um einen kleinen Durchbruch in der Seitenwand des Schädelpräparats zu machen, um die Diffusion von Thioflavin S in das Hirn zu ermöglichen. Thioflavin S (0,005% in ACSF, Sigma Chemical, St. Louis, MO) wurde dann 20 min auf die Stelle appliziert. Ein kleiner Ring von geschmolzenem Knochenwachs wurde auf den Schädel, die Stelle umgebend appliziert und diese Vertiefung wurde mit ACSF gefüllt, um ein Wasserreservoir für die Wassertauchobjektive mit langer Arbeitsdistanz (Olympus, Tokyo, Japan) zu erzeugen. Das dünne Schädelpräparat beseitigte auch die Notwendigkeit der Anwendung eines Deckels (Svoboda et al., "In Vivo Dendritic Calcium Dynamics in Neocortical Pyramidal Neurons", *Nature*, 385: 161–165 (1997)) für die Bildgebungsstelle, da das Vorsehen dieser dünnen Knochenschicht ausreichend ist, um die bei In-vivo-Bildgebung inhärente Herz- und Atembewegung des Hirns zu stabilisieren. Das Tier wurde in maßgefertigten, auf einer Bühne montierten Ohrklappen und einem Nasenschutz einer ähnlichen Gestaltung wie eine stereotaktische Vorrichtung, immobilisiert. Die dünne Schädelstelle wurde dann direkt unter die Objektivlinse des Mikroskops (Olympus BX-50) zur Bildgebung platziert (**Fig. 2B**).

**[0055]** Zweiphotonenfluoreszenz wurde mit einer Anregung von 750 nm von einem Mode-Locked Ti:Saphir-Laser (Tsunami, Spectra Physics, Mountain View CA; 5,45 W Millenium V Pump Laser (Spectra Physics), Leistung an der rückwärtigen Öffnung des Objektivs 20 mW, Puls 60–100 fs), der auf einem im Handel erhältlichen Mehrphotonenbildgebungssystem (BioRad 1024ES, BioRad, Hercules CA) montiert war, erzeugt. Externe Detektoren, die drei Photomultiplerröhren enthalten, (Hamamatsu Photonics, Bridgewater NJ) sammelten emittiertes Licht im Bereich von 380–480 nm, 500–540 nm und 560–650 nm; alle Thioflavin-S-Figuren stammen aus dem 380–480-nm-Kanal. Die Bildgebung wurde unter Verwendung der normalen Abtastgeschwindigkeit des Abtastkopfes, Verweilzeit = 1,5  $\mu$ s pro Pixel, durchgeführt. Bis zu vier dünne Schädelpräparate wurden pro Tier hergestellt, um die Zahl der zur Messung verfügbaren Plaques zu maximieren. Thioflavin S (0,005% in ACSF) wurde bei jeder Bildgebungssitzung auf das Präparat appliziert. Die Stelle wurde zunächst mit einem 10 $\times$ -Objektiv (Feld von 1230  $\mu$ m<sup>2</sup>, NA = 0,5) abgebildet, um die Oberfläche des dünnen Schädelpräparats zu kartieren und eine Neupositionierung der Stelle während anschließender Bildgebungssitzungen zu ermöglichen. X-Y Stage Encoders (Boeckeler, Tucson AZ) wurden mit deren Ursprung am Zentrum der dünnen Schädelstelle kalibriert und zum Festhalten der relativen Koordinaten von Bildern höherer Vergrößerung innerhalb der Stelle verwendet. Neun z-Reihen unter Verwendung eines 60 $\times$ -Objektivs (205  $\times$  205  $\mu$ m; NA = 0,8) wurden dann in einer 3  $\times$  3-Anordnung, die den dünnsten Bereich der Stelle überdeckte, durch Bewegen der Bühne exakt 205  $\mu$ m in X- oder Y-Richtung gewonnen. Die z-Inkrementstufe betrug 2  $\mu$ m und die Reihen wurden von der Schädeloberfläche bis zu einer Tiefe von 150  $\mu$ m in dem Hirn gewonnen. Die Startposition des z-Achsenmotors, bezogen auf die Schädelposition, wurde für eine spätere z-Achsenausrichtung während der Montageerzeugung aufgezeichnet. Nach Durchführung der Bildgewinnung wurde das Tier von der Bühne entfernt, der Ring aus Knochenwachs entfernt, der Schädel mit steriler Kochsalzlösung gewaschen und die Kopfhaut vernäht. Das Tier wurde während der Erholung von Anästhesie auf 37°C erwärmt. Die Gesamtzeit der Anästhesie war auf 2 h beschränkt.

## Beispiel 2 – Bildanalyse

**[0056]** Die Montagen wurden zu einem einzigen Bilderstapel unter Verwendung von Scion Image (Scion

Corp., Frederick MD) rekonstruiert. Die Fläche von individuellen Plaquequerschnitten wurde in jedem optischen Schnitt durch Schwellenwertbildung bei zwei Standardabweichungen über dem Mittelwert eines benachbarten Hintergrundbereichs ermittelt. Plaques, die die Kriterien der Bildgebung nicht erfüllten, wurden aus dem Messsatz beseitigt. Plaques am Rand des Bildgebungsbereichs oder auf einer der Montagelinien wurden aufgrund der potentiellen Ungenauigkeit der Bewegung des Tiers auf der Bühne zurückgewiesen. Plaques, deren Intensität nicht ausreichend über dem Hintergrund für eine geeignete Schwellenwertbildung war, wurden ebenfalls beseitigt. Dadurch wurden viele Plaques zurückgewiesen, die typischerweise tief im Präparat lagen, die vorhanden zu sein schienen, jedoch zur Messung unter Verwendung der automatischen Schwellenwerttechnik zu schwach waren. Schließlich wurden Plaques, deren Bilder ein deutliches Bewegungsartefakt enthielten, zurückgewiesen. Der maximale Plaquedurchmesser wurde dann aus dem Querschnitt der größten Fläche für jede Plaque berechnet. Die Volumendarstellung wurde unter Verwendung von VoxBlast (VayTek, Fairfield IA) auf einer Workstation auf Basis von Windows NT (Precision 610, Dell Computer, Round Rock TX) durchgeführt.

#### Beispiel 3 – Angiographie

**[0057]** Der Schwanz des Tieres wurde auf einem Heizkissen zur Dilatation der Blutgefäße erwärmt und etwa 0,05 ml Fluorescein (25 mg/ml) in sterilem PBS wurden in eine Schwanzvene der Maus mindestens 20 min vor der Bildgebung injiziert. Der Farbstoff durchquerte die Blut-Hirn-Schranke nicht und er ermöglichte die gleichzeitige Sichtbarmachung von Blutgefäßen über das gesamte Bildgebungsvolumen im Hirn.

#### Beispiel 4 – Querschnittshistologie

**[0058]** Zwei Tiergruppen (n = 3 pro Gruppe; mittleres Alter 12,6 Monate und 22,6 Monate) wurden zur histologischen Ermittlung einer Amyloidablagerung, Ermittlung der Amyloidlast und Größenverteilung gemäß einer früheren Beschreibung (Hyman et al., "The Lack of Accumulation of Senile Plaques or Amyloid Burden in Alzheimer's Disease Suggests a Dynamic Balance Between Amyloid Deposition and Resolution", *J. Neuropathol Exp. Neurol.*, 52: 594–600 (1993)) verwendet. Bilder von mit Thioflavin S angefärbten Schnitten wurden unter Verwendung von Zweiphotonenanregung mit Licht von 750 nm gewonnen. Alle Felder des Kortex, die Thioflavin-S-positive Amyloidablagerungen enthielten, wurden in einem gegebenen Schnitt abgebildet, bis etwa 80 Plaques pro Tier abgebildet waren. Die Bilder wurden dann auf Scion Image (Scion Corp.) übertragen, wo ein Schwellenwert angelegt wurde, das Bild zur Entfernung von Rauschen leicht gefiltert wurde und Plaques automatisch durch das Teilchenanalyseprotokoll der Software dargestellt wurden. Die Bilder wurden manuell editiert, um Thioflavin-S-positive Blutgefäße und Randeartefakte zu entfernen. Schnitte, die wenige Thioflavin-S-positive Plaques enthielten, wurden erschöpfend als Probe genommen, wobei alle Plaques innerhalb dieses Kortexbereichs gezählt wurden. Eine zufällige systematische Probennahme von etwa 10 Feldern pro Schnitt wurde für die Schnitte, die schwerere Amyloidlasten enthielten, angewandt und ein 400 µm × 400 µm-Zählrahmen wurde mit automatischer Selektion und Messung zur Zählung von Thioflavin-S-positiven Plaques verwendet. Die Plaques wurden in drei Schnitten pro Tier auf diese Weise gezählt; die Adäquatheit der Probennahmestrategie wurde in Fehlerkoeffizienten von 10% oder weniger reflektiert. Die Ergebnisse wurden als die Dichte von Thioflavin-S-positiven Plaques pro Quadratmillimeter ausgedrückt. Die statistische Signifikanz der beobachteten Differenz der Plaquezahl zwischen den Gruppen wurde durch einen t-Test festgestellt.

**[0059]** Mehrphotonenmikroskopie wurde für diese Untersuchungen verwendet, da sie einzigartige Vorteile zur In-vivo-Bildgebung aufweist und deren Auflösung in der Größenordnung von einem Mikrometer ist (Denk et al., "Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy", *Science*, 248: 73–76 (1990)). Da nur akute In-vivo-Bildgebung bisher in jedem System berichtet wurde, wurde ein neuer Ansatz zur Bildgebung mit langzeitiger Wiederholung entwickelt. Ein dünnes transparentes Knochenfenster eines Durchmessers von etwa 1 mm und einer Dicke von etwa 20 Mikrometer wird mit einem Schnellbohrer im Schädel eines anästhesierten Tg2576-Maus gebildet (**Fig. 2A**). Ein kleiner Durchbruch wird in der Seitenwand der Stelle gemacht, um die Zufuhr eines Fluorophors zum Hirn zu ermöglichen, doch der Knochen bleibt ansonsten in dem ausgedünnten Bereich intakt. Ein aufrechtstehendes Olympus BX-50-Mikroskop mit fixierter Bühne, das einen modifizierten Bühneneinschub enthielt, wurde zur In-vivo-Bildgebung verwendet (**Fig. 2B**).

**[0060]** Die Thioflavin S ist ein standardmäßiger amyloidbindender Fluorophor, der im Ultraviolettbereich anregt und ein Emissionsmaximum um 450 nm aufweist. Es wurde in großem Maße zur Markierung von Amyloidablagerungen im humanem Alzheimer-Krankheit-Gewebe (Kelenyi, "Thioflavin S Fluorescent and Congo Red Anisotropic Stainings in the Histology Demonstration of Amyloid", *Acta Neuropathol (Kerl)*, 7: 336–348 (1967)) sowie in Modellen für Amyloidablagerung in transgenen Mäusen verwendet. Es gehört zu den Anfär-

bungen, die vom Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD) zur neuropathologischen Diagnose von Alzheimer-Krankheit in postmortalem Gewebe empfohlen wird (Mirra et al., "The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD), Part II. Standardization of the Neuropathologic Assessment of Alzheimer's Disease", *Neurology*, 41: 479–486 (1991)). Eine verdünnte Lösung von Thioflavin S wurde auf das Hirn einer lebenden, 18 Monate alten transgenen Tg2576-Maus zur In-vivo-Sichtbarmachung von Amyloidablagerungen unter Verwendung von Mehrphotonenmikroskopie appliziert. Dünne optische Schnitte wurden alle 2,0 Mikrometer von der Knochenfensteroberfläche bis etwa 150 Mikrometer tief zur Oberfläche unter Verwendung von Licht von 750 nm zur Zweiphotonenanregung des Fluorophors erhalten. Die Rekonstruktion dieser dünnen optischen Schnitte ergab Thioflavin-S-positives Amyloid, das Piaarteriolen umgab, mit dem klassischen Segmenterscheinungsbild von Amyloidangiopathie (Vonsattel et al., "Cerebral Amyloid Angiopathy Without and With Cerebral Hemorrhages: A Comparative Histological Study", *Ann. Neurol.*, 30: 637–649 (1991)) in Oberflächenschnitten (**Fig. 2C**). Tiefere optische Schnitte (**Fig. 2D**) zeigten parenchymale Thioflavin-S-positive Amyloidplaques. Plaques wurden auf diese Weise bis zu 150 µm tief zur Oberfläche des Kortex sichtbar gemacht.

**[0061]** Die abgebildeten Plaques weisen die gleiche Morphologie wie klassische Thioflavin-S-positive senile Plaques auf, die in Gewebe von transgenen Tieren und von Fällen von Alzheimer-Krankheit beobachtet wurden, und keine derartigen Strukturen wurden in nicht-transgenen Kontrolljungtieren beobachtet. Dass diese Strukturen tatsächlich senile Plaques sind, wurde ferner durch Inkubation des postmorten fixierten Hirns der transgenen Maus mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gegenüber Aβ (10D5, Elan Pharmaceuticals (Hyman et al., "Kunitz Protease Inhibitor-Containing Amyloid Beta Protein Precursor Immunoreactivity in Alzheimer's Disease", *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 51: 76–83 (1992)), der direkt mit Cy3 (Amersham, Piscataway, NJ) markiert war, bestätigt. Diese doppelte Anfärbung zeigte die Colokalisation von Thioflavin S mit umgebender Amyloid-β-Immunreaktivität (**Fig. 3A–B**). Wie erwartet färbt Thioflavin S Plaques mit einem dichten Kern an, wobei dies ein Teilsatz von allen Aβ-immunreaktiven Strukturen ist (Schmidt et al., "Chemical and Immunological Heterogeneity of Fibrillar Amyloid in Plaques of Alzheimer's Disease and Down's Syndrome Brains Revealed by Confocal Microscopy", *Am. J. Pathol.*, 147: 503–515 (1995)). Darüber hinaus zeigt eine histologische Analyse zwei bis sieben Tage nach einer derartigen Bildgebung keine offenkundige Schädigung, Neuronenabnahme oder Zunahme der reaktiven Astrocyten (**Fig. 3C**), was durch gliafibrilläre saure Proteinanfärbung festgestellt wird, was nahe legt, dass das dünne Schädelpräparat und Bildgebungsprotokoll vom lebenden Hirn gut toleriert werden.

**[0062]** Das Potential von Mehrphotonenmikroskopie für nicht-destruktive In-vivo-Bildgebung eröffnet die Möglichkeit einer wiederholten Sichtbarmachung von Plaques über die Zeit in einem lebenden Tier. **Fig. 4A** ist ein Beispiel für den Bildgebungsansatz in einer lebenden Maus. Der Schädel wurde präpariert, Thioflavin S wurde appliziert und eine 3 × 3-Matrix eines Bereichs von 615 µm × 615 µm der Stelle wurde unter Verwendung eines 60× Tauchobjektivs abgebildet. Nach Erholung von der Anästhesie wurde das Tier in dessen Käfig zurückgegeben, wo es kein Zeichen einer Beeinträchtigung oder von Beschwerden nach der Bildgebung zeigte. Repräsentative Bilder von einem Tier, die in einem Abstand von zwei Tagen gewonnen wurden, sind in **Fig. 4B–E** gezeigt. Ein Beispiel für eine Plaque (**Fig. 4B**) und Amyloidangiopathie (**Fig. 4D**) sind bei der ersten Bildgebungssitzung gezeigt. Zwei Tage später wurde das Tier erneut anästhesiert und erneut Thioflavin S auf den ausgedünnten Bereich des Schädels appliziert. Die Bildgebung wurde unter identischen Bedingungen wie bei der ersten Sitzung durchgeführt. Sowohl Plaques (**Fig. 4C**) als auch Amyloidangiopathie (**Fig. 4E**) wurden klar nach zwei Tagen erneut sichtbar gemacht und sie erschienen unverändert seit der ersten Bildgebungssitzung.

**[0063]** Um die natürliche Geschichte von Thioflavin-S-positiven Amyloidablagerungen zu untersuchen, wurden Plaques in fünf zusätzlichen Tieren (mittleres Alter 18,6 Monate) über zunehmend längere Zeiträume abgebildet. Insgesamt 41 Bildgebungssitzungen ergaben 29 Datensätze, die Plaques enthielten, die erfolgreich mehr als einmal abgebildet wurden, die 349 ausgerichtete Plaquepaare über Zeitintervalle im Bereich von 2 bis 150 Tagen enthielten. Bis zu 5 getrennte Bildgebungssitzungen des gleichen Volumens wurden in den einzelnen Tieren erhalten. Qualitativ bleiben die Struktur und Größe des größten Teils der Plaques über diese längeren Beobachtungszeiträume bemerkenswert stabil. Feine Einzelheiten der Morphologie individueller Plaques sind in anschließenden Bildern, die Monate später erhalten wurden, erkennbar, wobei diese fingerähnliche Anhänge und kleine Cluster von Thioflavin-S-positivem Amyloid umfassten (beispielsweise **Fig. 4B–C**).

**[0064]** Eine quantitative Analyse des Plaquedurchmessers über die Zeit, der im optischen Schnitt mit dem größten Durchmesser ermittelt wurde, bestätigt diese qualitative Beurteilung. Die Analyse von Änderungen des Plaquedurchmessers für den gesamten Satz der Messungen ist in **Fig. 5** angegeben. Bei Betrachtung als Po-

pulation ist der Grad der Variabilität bei den zwei Messungen im wesentlichen der gleiche, ungeachtet dessen, ob die Messungen in einem Abstand von 4 Tagen oder 150 Tagen erhalten wurden (**Fig. 5B**). Die Anfangsmessung der Größe einer individuellen Plaque ist eine hervorragende Vorhersage für eine folgende Messung der gleichen Plaque, ob in einem Abstand von Tagen oder Monaten. Die Steigung des linearen Regressionsgraphen, wobei die Größe einer Plaque bei der ersten Bildgebung gegen die Größe an einem späteren Zeitpunkt aufgetragen ist, wobei alle Messungen für Zeiträume über ein Intervall von 2 Tagen bis 150 Tagen genommen wurden, betrug nahezu die Einheit (Steigung = 0,98;  $R^2 = 0,89$ ). Diese Daten sind konsistent mit Plaques, die außergewöhnlich stabil in In-vivo-Objekten über einen längeren Zeitraum sind.

**[0065]** Jedoch zeigt eine genaue Untersuchung der Datensätze eine kleine Zahl von Plaques, die zwischen den Bildgebungssitzungen wesentlich gewachsen oder geschrumpft zu sein scheinen. Es bestand das Problem, dass diese offensichtliche Änderung auf technischen Faktoren beruhen könnte, und so wurden Arbeitskriterien zur Beseitigung bekannter potentieller Quellen für Messfehler systematisch angewandt. Beispielsweise wurden Daten von Plaques, die auf den Rand von einem der Felder von  $205 \mu\text{m} \times 205 \mu\text{m}$ , die die Montage umfassten, fielen, zurückgewiesen, oder wenn die Plaque die in einer gegebenen Sitzung tiefste abgebildete Plaque war. Bei mehreren Tieren wurde eine Fluoresceinangiographie gleichzeitig mit der Thioflavin-S-Bildgebung durchgeführt, um zusätzliche interne Landmarken zur Erleichterung der Ausrichtung der Plaques von einer Bildgebungssitzung zur anderen zu erzeugen. Nach sorgfältiger Beurteilung von über dreihundert Plaquepaaren wurden nur 14 klare Beispiele für deutliches Wachstum oder Auflösung (d.h. eine Änderung der Größe um 40%) gefunden. **Fig. 6** zeigt Beispiele für Plaques von einem Volumendarstellungsstapel von Bildern des gleichen Bereichs des Kortex, die in einem Abstand von 104 Tagen erhalten wurden, wobei die gleichen vier Plaques (in rot) sowie das Fluoresceinangiogramm (grün) angegeben sind. Qualitative und quantitative Analysen zeigen, dass zwei der Plaques wesentlich gewachsen sind (etwa 50%), eine wesentlich kleiner geworden ist (um über 40%) und eine die Größe überhaupt nicht geändert hat. Diese Daten zeigen, dass in dem gleichen Bereich und während der gleichen Bildgebungssitzungen einige Plaques zu wachsen scheinen, während andere schrumpfen. Technische Tatsachen, wie die Thioflavin-S-Konzentration oder die Leistung in der Brennebene können nicht dafür verantwortlich sein, dass einige in einem kleinen Bereich von nur einem einzigen dreidimensionalen Feld größer werden und andere kleiner werden, so dass die sparsamste Erklärung die ist, dass in diesen Fällen sich die Plaquegröße ändert.

**[0066]** Es ist bekannt, dass die Zahl der Thioflavin-S-positiven Plaques im Kortex mit zunehmendem Alter zunimmt (Hsiao et al., "Correlative Memory Deficits, A $\beta$  Elevation, and Amyloid Plaques in Transgenic Mice", *Science*, 274: 99–102 (1996); Irizarry et al., "APP<sup>Sw</sup> Transgenic Mice Develop Age-Related A Deposits and Neuropil Abnormalities, But No Neuronal Loss in CA1", *J. Neuropathol Exp. Neurol.*, 56: 965–973 (1997)). Daher sollte man erwarten, wenn ein Volumen des Kortex erneut abgebildet wird, fallweise neue Plaques in dem Bildgebungsvolumen zu finden. Erneut wurden rigorose Kriterien angewendet, um sicherzustellen, dass das Auftreten einer neuen Plaque nicht einfach etwas bessere Signal/Rauschen-Eigenschaften in einer zweiten Bildgebungssitzung als in der ersten, eine größere Bildgebungstiefe oder ein etwas anderes Bildgebungsvolumen widerspiegelt. Indessen traten zwingende Beispiele auf, bei denen eine neue Plaque in einem Volumen, das zuvor abgebildet worden war, erschien. **Fig. 7** zeigt ein drastisches Beispiel für ein Feld, in dem bei der ersten Bildgebungssitzung drei gut definierte charakteristische Plaques vorhanden waren und bei der zweiten Bildgebungssitzung 64 Tage später 4 vorhanden waren.

**[0067]** Die oben angegebenen In-vivo-Längsdaten legen nahe, dass der durchschnittliche Plaquedurchmesser mit dem Alter nicht variiert. Zur Untersuchung dieser Folgerung unter Verwendung herkömmlicher histologischer Analysen in Tg2576-Mäusen wurden mit Thioflavin S angefärbte Schnitte von Mäusen eines Alters von entweder 12 Monaten ( $n = 3$ ) oder 22 Monaten ( $n = 3$ ) unter Verwendung eines Bioquant Image Analysis System untersucht (Hyman et al., "The Lack of Accumulation of Senile Plaques or Amyloid Burden in Alzheimer's Disease Suggests a Dynamic Balance Between Amyloid Deposition and Resolution", *J. Neuropathol Exp. Neurol.*, 52: 594–600 (1993)). Die durchschnittliche Zahl der Plaques im Kortex nimmt nahezu 6fach über diesen Zeitraum von 10 Monaten von  $2,3 \pm 1,4$  auf  $13,7 \pm 4,3$  Plaques/ $\text{mm}^2$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $p < 0,05$ ) zu. Die Größenverteilung der Plaquedurchmesser ändert sich zwischen 12 Monaten und 22 Monaten von  $18,1 \pm 17,8$  auf  $21,4 \pm 16,2$  Mikrometer ( $p > 0,05$ , nicht signifikant) nicht deutlich. Diese Querschnittsdaten sind mit den In-vivo-Messungen konsistent, was nahe legt, dass die Plaquegröße über einen längeren Zeitraum stabil ist. Zusammengenommen mit In-vivo-Messungen sind diese Daten mit einem Modell konsistent, in dem Plaques ziemlich schnell gebildet werden und ihre maximale Größe erreichen und dann zu wachsen aufhören.

**[0068]** In diesem Bericht wurde die erfolgreiche Bildgebung von senilen Plaques in lebenden transgenen Tieren unter Verwendung von In-vivo-Mehrphotonenlaserabtastmikroskopie demonstriert. Kein anderer Bildgebungsansatz hat entweder die Auflösung, Spezifität oder Empfindlichkeit, die zur Beobachtung dieser Alzhei-

mer-Krankheit ähnlichen Läsionen notwendig sind. Daher ist sehr wenig über die natürliche Geschichte dieser Ablagerungen im lebenden Hirn bekannt. Mehrphotonenmikroskopie ermöglicht die Bildgebung von lebendem Gewebe mit hoher Auflösung mit minimaler Photolichtschädigung oder Toxizität. Die Bildgebung durch ein intaktes Schädelfenster ermöglicht eine langzeitige In-vivo-Hirnbildgebung über Zeiträume von Tagen bis Monaten. Unter Verwendung von Thioflavin S, eines empfindlichen und spezifischen fluoreszierenden Reporters für senile Plaques, wurde eine Population identifizierter Plaques über die Zeit in lebenden transgenen Mäusen verfolgt. Über Zeiträume von Tagen bis zur Länge von 5 Monaten bleiben die Größe und Morphologie individueller Plaques, die durch In-vivo-Mehrphotonenmikroskopie beobachtet wurden, bemerkenswert stabil. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Plaques, sobald sie gebildet sind, rasch stabilisiert werden. Die Konstanz der Größe von Plaques über die Zeit bei kontinuierlichem Vorhandensein von löslichem A $\beta$  bestätigt definitiv die Vorhersagen der dynamischen Feedbackhypothese (Hyman et al., "Quantitative Analysis of Senile Plaques in Alzheimer Disease: Observation of Log-Normal Size Distribution and Molecular Epidemiology of Differences Associated With Apolipoprotein E Genotype and Trisomy 21 (Down Syndrome)", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 3586–3590 (1995), Cruz et al., "Aggregation and Disaggregation of Senile Plaques in Alzheimer Disease", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 7612–7616 (1997), Urbanc et al., "Dynamic Feedback in an Aggregation-Disaggregation Model", *Phys. Rev. E.*, 60: 2120–2126 (1999), and Urbanc et al., "Dynamics of Plaque Formation in Alzheimer's Disease", *Biophys. J.*, 76: 1330–1334 (1996)). Ein höchst interessantes Gebiet für weitere Forschungen besteht darin, den Mechanismus und Zeitverlauf der ursprünglichen Plaquebildung zu verstehen. Diese Bildgebungstechnik kann die Mittel zur Beschäftigung mit diesem Punkt in der Zukunft bereitstellen. In ähnlicher Weise wurde zum ersten Mal das Schrumpfen individueller Plaques beobachtet, was die Hypothese bestätigt, dass Plaques in einem gewissen Ausmaß in einem dynamischen Gleichgewicht mit der Umgebung stehen. Dies erhöht die Möglichkeit, dass eine Clearance von Plaques, die bisher als unlöslich betrachtet wurden, mit entsprechenden zielgerichteten Therapeutika möglich sein kann.

**[0069]** Die derzeitigen Beobachtungen ergeben auch die neue Frage, warum Plaques zu wachsen aufhören. Es kann spekuliert werden, dass die Glia prompt auf das Vorhandensein einer anomalen Ablagerung im Neuropil entweder durch Umgeben derselben oder durch Phagozytose reagiert. Bei Alzheimer-Krankheit und in den untersuchten transgenen Modellen kann die Glia eine aktive Rolle in Bezug auf das Anhalten des Wachstums einer Plaque primär durch Umgeben der Ablagerungen spielen (Frautschy et al., "Microglial Response to Amyloid Plaques in APPsw Transgenic Mice", *Am. J. Pathol.*, 152: 307–317 (1998)).

**[0070]** Kürzliche Experimente unter Verwendung von Immunisierung mit Amyloid- $\beta$  in einem anderen transgenen Modell von Alzheimer-Krankheit, PDAPP-Mäuse, legen nahe, dass Mikroglia Amyloidablagerungen phagozytosieren kann, wenn sie mit Antikörpern dekoriert sind (Schenk et al., "Immunization with Amyloid-Beta Attenuates Alzheimer-Disease-Like Pathology in the PDAPP Mouse", *Nature*, 400: 173–177 (1999)). Es wird die Hypothese aufgestellt, dass eine Gliainteraktion mit Amyloidablagerungen der biologische Mechanismus sein kann, der für das in dem theoretischen Modell postulierte "dynamische Feedback" verantwortlich ist (Hyman et al., "Quantitative Analysis of Senile Plaques in Alzheimer Disease: Observation of Log-Normal Size Distribution and Molecular Epidemiology of Differences Associated With Apolipoprotein E Genotype and Trisomy 21 (Down Syndrome)", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 3586–3590 (1995); Cruz et al., "Aggregation and Disaggregation of Senile Plaques in Alzheimer Disease", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 7612–7616 (1997); Urbanc et al., "Dynamic Feedback in an Aggregation-Disaggregation Model", *Phys. Rev. E.*, 60: 2120–2126 (1999); Urbanc et al., "Dynamics of Plaque Formation in Alzheimer's Disease", *Biophys. J.*, 76: 1330–1334 (1996)), wodurch die Größe von Plaques stabilisiert und fortgesetztes Wachstum verhindert wird. Weitere Experimente, die spezifisch die Aktivität der Mikroglia hemmen, sollten sich direkt mit dieser Hypothese befassen.

**[0071]** Die obigen Daten belegen die Fähigkeit zur chronischen Beobachtung von Amyloidplaques in lebendem Hirn unter Verwendung von In-vivo-Photonenmikroskopie, die eine Auflösung der Größenordnung von konfokaler Mikroskopie in bisher nicht erreichten Tiefen mit vernachlässigbarer Gewebeschädigung ergibt. Diese Technik ermöglicht Längsstudien individueller Tiere, die Versuchsmanipulationen unterzogen wurden, und es sollte besonders mächtig zur Untersuchung von Therapeutika, die auf das Clearing von Amyloid zielgerichtet sind, sein. In ähnlicher Weise ist die Entwicklung von Fluorophoren, die andere pathologische Merkmale identifizieren, die nicht durch Thioflavin S angefärbte Amyloid- $\beta$ -Ablagerungen umfassen, vielversprechend für wesentliche Fortschritte im Verständnis der Hirmpathophysiologie in transgenen Modellen einer Erkrankung. Im Prinzip kann dieser gleiche Ansatz zur Diagnose verwendet werden und eine Amyloid- $\beta$ -Ablagerung im humanen Hirn bei Alzheimer-Krankheit verfolgen.

#### Beispiel 5 – Verfahren

**[0072]** Tiere: 10 homozygote PDAPP-Mäuse (Alter 15–21 Monate, alle weiblich) wurden zur In-vivo-Bildge-

bung von CAA verwendet. Diese Mäuse überexprimieren mutantes humanes Amyloidvorstufenprotein (APPV717F). Die transgenen PDAPP-Mäuse wurden aus der früher etablierten Line PDAPP-109 über mehrere Generationen auf Hybriduntergründen, die Kombinationen von C57BL/6, DBA und Swiss-Webster-Stämmen darstellen, gezüchtet (früher in Games et al., 1995, beschrieben).

**[0073]** Präparative Chirurgie: Mäuse wurden mit Avertin (Tribromethanol, 250 mg/kg IP) anästhesiert. Eine kleine Kraniotomie (etwa 1 mm Durchmesser) wurde sorgfältig unter Verwendung eines Schnellbohrers (Fine Science Tools, Foster City CA) unter einem Seziernmikroskop (Leica) erzeugt. Die Stelle wurde mit künstlichem Liquor ("ACSF", 125 mM NaCl, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM Glucose) befeuchtet und die Dura wurde sanft von der Oberfläche des Hirns abgelöst.

**[0074]** Bildgebungsmittel: Thioflavin S (0,005% ThioS in ACSF, Sigma Chemical, St. Louis MO) wurde topisch auf die Stelle appliziert, um ThioS-positive Amyloidablagerungen zu erkennen. Texas Red-markiertes 70.000-MW-Dextran, das die Blut-Hirn-Schranke nicht durchquert (Molecular Probes, Eugene, CO), wurde intravenös in die Schwanzvene der Mäuse injiziert, um das Lumen von Blutgefäßen sichtbar zu machen und ein fluoreszierendes Angiogram zu erhalten. Beide Mittel wurden 20 min vor der Bildgebung appliziert.

**[0075]** In-vivo-Bildgebung: Die Bildgebung wurde wie oben beschrieben durchgeführt, wobei jedoch eine z-Inkrementstufe von 5 µm verwendet wurde, um einen dreidimensionalen Stapel von Bildern von der Schädeloberfläche bis zu einer Tiefe von etwa 200 µm im Hirn zu erzeugen.

**[0076]** Bildverarbeitung: Die Bilder wurden als einzelner Bilderstapel unter Verwendung von Scion Image (Scion Corp., Frederick MD) und ImageTool (University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas) untersucht. Die Bilder wurden in drei Dimensionen rekonstruiert, und Gefäßstrukturen über Texas Red-Angiogramme und gefäßassoziierte ThioS-Amyloidablagerungen zu untersuchen, und dann zu einer XY-Projektion zusammengelegt. Bereiche von Angiogrammen, die technisch inadäquat waren (beispielsweise in den tiefsten optischen Ebenen), wurden vor der Analyse ausgeschlossen.

**[0077]** Quantitative Analyse von Bildern: Um die Wirkung von Aβ auf den Gefäßdurchmesser zu bestimmen, wurden die Breiten aller Gefäße mit klaren Angiogrammen und einem detektierbaren Grad an Amyloidangiopathie analysiert. Die Durchmesser des Innenlumens dieser Gefäße wurde alle 30 µm längs deren Länge ausgehend von einem willkürlichen Punkt ermittelt (d.h. systematische Zufallsprobennahme (Gundersen et al., "The New Stereological Tools: Disector, Fractionator, Nucleator and Point Sampled Intercepts and Their Use in Pathological Research and Diagnosis", *Apmis*, 96: 857–81 (1988)). An jedem Messpunkt wurde das Gefäßsegment als entweder Aβ-betroffen oder -nicht-betroffen notiert und es wurde eine halbquantitative Skala (0 = nichts, + = mild, ++ = mäßig, +++ = schwer) verwendet, um das Ausmaß der Aβ-Ablagerung festzustellen ([Fig. 9](#)).

**[0078]** Zum Testen der Hypothese, dass die Tendenz besteht, dass Aβ-Ablagerungen nahe Verzweigungspunkten von Gefäßen auftreten, wurde eine Selektion von Punkten im Raum im Abstand von 100 µm systematisch als Proben genommen und den Bildern überlagert. Für jeden Punkt, der ein Gefäß überlappte, wurde festgestellt, ob der Teil des Gefäßes durch Aβ betroffen oder nicht betroffen war. Der Abstand von diesem Punkt zum nächsten Verzweigungspunkt auf dem Gefäß wurde ebenfalls ermittelt.

#### Beispiel 6 – Gleichzeitige Bildgebung von Aβ und Mikroangiographie

**[0079]** ThioS, das ein grüner Fluorophor ist, und Texas Red, ein roter Fluorophor, können gleichzeitig mit verfügbaren Filtersätzen detektiert werden. Beide fluoreszieren hell bei Einwirken einer Anregung von 750 nm mit einem Mode-Locked Ti-Saphir-Laser. Ein dreidimensionaler Stapel optischer Bilder, etwa 615 × 615 × 200 µm tief, wurde zur weiteren Analyse zusammengelegt. [Fig. 9](#) zeigt das Gefäßlumen und die Ablagerungen von Aβ am Umfang, die mit Thio S angefärbt sind. Da diese zusammengelegte Bilder sind, überlappen sie sich fallweise in den Bildern; in individuellen Querschnitten umgibt die Thio-S-Anfärbung immer die Texas Red-Säule und sie überlappt nicht.

**[0080]** Zur Untersuchung der Wirkung von Aβ auf die Gefäßphysiologie wurde der Gefäßdurchmesser ermittelt. Es ist klar, dass einige Gefäße Aβ in einem Teil des Gefäßes, jedoch nicht in anderen Teilen enthalten. Diese Diskontinuität der Aβ-Ablagerung ist ein klinisches Kennzeichen einer Amyloidangiopathie und sie wiederholt sich im transgenen Modell. Unter Verwendung einer zufälligen Startposition wurde der Durchmesser alle 30 µm längs des Gefäßes ermittelt ([Fig. 10](#)). Dies stellt eine Anpassung des "systematische Zufallsprobennahme"-Ansatzes auf stereologischer Basis dar. Eine halbquantitative Bewertung wurde jedem Punkt zu-

geordnet. Die A $\beta$ -Amyloid enthaltenden Gefäßsegmente wurden mit Gefäßsegmenten, die kein Amyloid enthielten, in jedem Gefäß verglichen. Daher dient das Gefäß als dessen eigene "Kontrolle". Unter Verwendung dieser Analyse wurde ermittelt, dass die Bereiche der Gefäßsegmente, die Thio-S-positive Anfärbung enthielten, etwa 16% größer als Gefäßsegmente ohne A $\beta$  waren ( $p < 0,001$ , gepaarter t-Test). Überraschenderweise gab es keine klaren Anzeichen, dass die Schwere von Gefäßveränderungen diesen Effekt verschlimmerte ([Fig. 11](#)). Beispielsweise wies in den Gefäßen, in denen die Amyloidangiopathie nur "mild" war, das Kontrollgefäßsegment einen durchschnittlichen Innendurchmesser von 27,7  $\mu\text{m}$  auf, während das Amyloid enthaltende Gefäß einen Innendurchmesser von 32,1  $\mu\text{m}$  aufwies ( $p < 0,01$ ). Interessant ist, dass die schwer betroffenen Blutgefäße nur etwas größere Durchmesser, 30,8  $\mu\text{m}$  für kein Amyloid enthaltende Segmente und 35,5  $\mu\text{m}$  für Amyloid enthaltende Segmente, aufwiesen ( $p < 0,005$ ).

**[0081]** Diese In-vivo-Abbildung ergab auch einen einzigartigen dreidimensionalen Datensatz, in dem die Beziehung von Amyloidablagerungen rings um Blutgefäße mit der Architektur des Gefäßsystems zu untersuchen ist. In ersten Bildgebungssitzungen war die Häufigkeit, mit der Amyloidablagerungen an oder nahe Verzweigungspunkten von Gefäßen aufzutreten schienen, auffallend ([Fig. 12](#)). Zum Testen dieser Idee wurde ein Zufallsprobennamerverfahren entwickelt, um die Wahrscheinlichkeit zu beurteilen, dass Amyloidablagerungen tatsächlich wahrscheinlicher nahe an Verzweigungspunkten als nicht dort waren. Ein Probengitter wurde mit einer Sonde, die alle 100  $\mu\text{m}$  positioniert war, über den Bildern überlagert. Wenn zufällig, dass eine Sonde ein Blutgefäß überlappte, wurde dieses Gefäßsegment als Amyloidablagerungen aufweisend (oder nicht aufweisend) festgestellt und der Abstand von diesem Punkt auf dem Gefäß zu den nächsten Verzweigungspunkten ermittelt. Nur Gefäße, die etwas A $\beta$  enthalten, wurden in diese Analyse aufgenommen, da es nicht möglich war, mit Sicherheit festzustellen, ob Gefäße, die kein Amyloid enthielten, kleine Arteriolen oder Venolen waren. Es wurde angenommen, dass Gefäße mit "milden" Veränderungen sehr wahrscheinlich in der "frühen" Phase einer Amyloidablagerung waren, und dass Gefäße mit mäßigen bis schweren Veränderungen in späteren Stadien waren. In diesem Fall wurde angenommen, dass amyloidhaltige Segmente in milden Gefäßen "näher" an Verzweigungspunkten als diejenigen in mäßigen oder schweren Fällen auftreten sollten, wenn die Amyloidablagerung dazu tendierte, nahe einem Verzweigungspunkt zu beginnen und dann mehr und mehr das Gefäß "zu füllen". Die Daten stützen diese Hypothese. Von Gefäßen, die von milden Mengen A $\beta$  betroffen waren, waren Gefäßsegmente, die Amyloid enthielten, signifikant näher an Gefäßverzweigungen als nicht betroffene Gefäßsegmente ( $62 \pm 10 \mu\text{m}$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) für A $\beta$  enthaltende Gefäßsegmente gegenüber  $133 \pm 17 \mu\text{m}$  für nicht A $\beta$  enthaltende Segmente,  $p < 0,005$ , t-Test) ([Fig. 13](#)). Von Gefäßsegmenten, die von mäßigen Graden einer A $\beta$ -Ablagerung betroffen waren, waren Gefäßsegmente, die A $\beta$  enthielten, ebenfalls näher an Gefäßverzweigungen als nicht betroffene Gefäßsegmente, jedoch ist der absolute Abstand zum Verzweigungspunkt im Vergleich zu mild betroffenen Gefäßen erhöht. Der mittlere Abstand betrug  $84 \pm 10 \mu\text{m}$  für A $\beta$  enthaltende Gefäße gegenüber  $148 \pm 21 \mu\text{m}$  für nicht A $\beta$  enthaltende Gefäße ( $p < 0,005$ ). Interessanterweise war unter den schwer betroffenen Gefäßen, wobei fast die gesamte Länge der Gefäßwand von Amyloidangiopathie betroffen war, die Beziehung zwischen dem Vorhandensein von Amyloid und der relativen Nähe zu einem Verzweigungspunkt weniger offensichtlich ( $116 \pm 15 \mu\text{m}$  gegenüber  $160 \pm 26 \mu\text{m}$ , nicht signifikant).

**[0082]** In dieser Untersuchung wurde eine neue optische Bildgebungstechnik, In-vivo-Multiphotonmikroskopie, zur Untersuchung der Folgen von Amyloidablagerung an Blutgefäßen in lebenden transgenen Mäusen verwendet. Mehrere neue Beobachtungen wurden wie im folgenden beschrieben: selbst milde Grade von cerebraler Amyloidangiopathie führen zu einer Änderung der Gefäßanatomie in vivo mit einer statistisch signifikanten Dilatation des Gefäßes; dies scheint in einer abgestuften Weise der Fall zu sein, wobei mit zunehmenden Amyloidmengen die Gefäßdilatation erhöht ist. Dieses Ergebnis zeigt direkt eine Beeinträchtigung der Gefäßphysiologie in Gefäßen, die von kongophiler Amyloidangiopathie ("CAA") betroffen sind. Da dieser Effekt bei mild betroffenen Gefäßen beobachtet wird, beruht er nicht auf der direkten Abnahme von glatten Muskelzellen, die bei fortgeschrittener CAA bei Menschen beobachtet wird (Vonsattel et al., "Cerebral Amyloid Angiopathy Without and With Cerebral Hemorrhages: a Comparative Histological Study", *Ann. Neurol.*, 30: 637–49 (1991), und Kawai et al., "Degeneration of Vascular Muscle Cells in Cerebral Amyloid Angiopathy von Alzheimer Disease", *Brain Res*, 623: 142–6 (1993)). Voruntersuchungen, die Phalloidinanfärbung als Marker für glatte Muskelzellen verwenden, zeigten, dass die Dichte von glatten Muskelzellen in Gefäßen, die milde Amyloidangiopathie enthalten, gegenüber Gefäßen, die normal sind, nicht verschieden ist.

**[0083]** Darüber hinaus legen Voruntersuchungen in transgenen Tg2576-Mäusen, die ebenfalls Amyloidangiopathie entwickeln, eine Beeinträchtigung einer pharmakologisch induzierten Dilatation in Gefäßen, die CAA enthalten, nahe. Eine andere Mauslinie, die humanes APP (Schwedische Mutation) auf einem FVB-Hintergrund überexprimiert, entwickelte keine A $\beta$ -Ablagerungen, sondern sie zeigte Beeinträchtigungen von endothelabhängigen Veränderungen der Hirndurchblutung (Iadecola et al., "SOD1" Rescues Cerebral Endothelial Dysfunction in Mice Overexpressing Amyloid Precursor Protein", *Nat. Neurosci.*, 2: 157–61 (1999)). Es wurde



auch beschrieben, dass A $\beta$ -Peptid sowohl toxische Effekte auf Endothelzellen als auch glatte Muskelzellen hat (Eisenhauer et al., "Toxicity of Various Amyloid Beta Peptide Species in Cultured Human Blood-brain Barrier Endothelial Cells: Increased Toxicity of Dutch-type Mutant", J. Neurosci Res., 60: 804–10 (2000), und Van Nostrand et al., "Cerebrovascular Smooth Muscle Cell Surface Fibrillar A Beta. Alteration of the Proteolytic Environment in the Cerebral Vessel Wall", Ann NY Acad Sci, 903: 89–96 (2000)) sowie vasoaktive Eigenschaften hat (Thomas et al., "Beta-Amyloid-mediated Vasoactivity and Vascular Endothelial Damage", Nature, 380: 168–71 (1996), Wirth et al., "Amyloid Beta-(1-40) Stimulates Cyclic GMP Production Via Release of Kinins in Primary Cultured Endothelial Cells", Eur J Pharmacol, 382: 27–33 (1999) und Suo et al., "A Beta Vasoactivity In Vivo", Ann NY Acad Sci, 903: 156–63 (2000)). Zusammengenommen mit den hier beschriebenen Ergebnissen legen diese Daten stark nahe, dass die Ablagerung von A $\beta$  in Mikrogefäßen eine Veränderung in Bezug auf die Integrität der mikrovaskulären Reaktionsfähigkeit in vivo verursacht.

**[0084]** Multiphotonmikroskopie ergab auch die Möglichkeit zur Beurteilung einer ziemlich großen dreidimensionalen Rekonstruktion des cerebralen Gefäßsystems in bisher unerreichten Auflösungsgraden. In der XY-Ebene beträgt die Auflösung eines Multiphotonmikroskops, so wie es konfiguriert war, etwa 1  $\mu$ m. Daher wurden in vivo feine Kapillarstrukturen tief bis zur Oberfläche des Hirns detektiert. Die quantitative Beurteilung der Rekonstruktionen legte nahe, dass in Fällen einer milden Amyloidangiopathie die Tendenz bestand, dass das Amyloid nahe an Verzweigungspunkten von Gefäßen auftrat. Dies ist eine verblüffende Beobachtung, die in histologischen Querschnitten schwierig zu beobachten gewesen wäre, und sie erinnert in gewisser Weise an den atherosklerotischen Prozess. Diese Assoziation legt nahe, dass einzigartige vaskuläre Faktoren wahrscheinlich von Bedeutung beim Auslösen einer Amyloidablagerung sind, die potentiell Punkte wie Mikroturbulenz innerhalb des Gefäßes oder subtile Änderungen der Gefäßmorphologie nahe Verzweigungsstrukturen umfassen. Das Ausmaß, in dem sich Amyloid selektiv nahe Verzweigungspunkten befindet, verringert sich mit zunehmender Schwere von CAA, bis dieser Effekt bei schwerer CAA verschwindet. Es wird angenommen, dass bei Verwendung von Multiphotonmikroskopie über längere Beobachtungszeiträume (Monate) die Progression von Amyloidablagerungen über die Zeit verfolgt werden kann und die Möglichkeit, dass eine Gefäßneubildung auftritt, beurteilt werden kann.

#### Beispiel 7 – Transgene Mäuse

**[0085]** Tg2576-Mäuse, die hAPP(Sw) unter dem Hamster-Prionenproteinpromotor exprimieren, wurden von einer Kolonie, die mit einem Zuchtpaar gestartet wurde, erhalten. Es wurde gezeigt, dass diese Tiere altersabhängige Amyloidangiopathie sowie Kortex- und Hippokampusamyloidplaques ähnlich den in AD(4) beobachteten entwickeln. Acht Tiere, die das Transgen tragen, und acht nicht-transgene Junge wurden für die anatomische Vermessung von glatten Muskelzellen ("SMCs") in Piagefäßen verwendet. Mäuse von jedem Genotyp gehörten zwei Altersgruppen an, eine junge Gruppe eines Alters von 6 Monaten und eine ältere Gruppe eines Alters von 14 Monaten (Tabelle 1).

TABELLE 1

Gruppe	Alter (Monate)	n	pH	Blut-CO <sub>2</sub> (mmHg)	Blut-pO <sub>2</sub> (mmHg)	Mittlerer PB vorher (mmHg)	Mittlerer BP nachher (mmHg)	Gefäßdurchmesser ( $\mu$ m)
6 Monate Tg-	5,3 $\pm$ 0,6	3	7,41 $\pm$ 0,01	30,6 $\pm$ 3,4	169,2 $\pm$ 57,8	95,0 $\pm$ 5,6	91,7 $\pm$ 4,7	25,7 $\pm$ 2,3
6 Monate Tg+	6,3 $\pm$ 0,6	3	7,32 $\pm$ 0,06	37,5 $\pm$ 6,0	127,6 $\pm$ 20,7	72,0 $\pm$ 13,0	64,7 $\pm$ 18,0	28,3 $\pm$ 0,6
14 Monate Tg-	13,7 $\pm$ 1,2	3	7,39 $\pm$ 0,06	33,0 $\pm$ 4,5	166,6 $\pm$ 23,0	66,0 $\pm$ 11,0	62,7 $\pm$ 12,7	31,3 $\pm$ 6,4
14 Monate Tg-	14,0 $\pm$ 2,6	5	7,33 $\pm$ 0,09	33,4 $\pm$ 3,2	149,0 $\pm$ 22,7	65,0 $\pm$ 7,6	61,3 $\pm$ 3,2	28,3 $\pm$ 2,9

**[0086]** Diese gleichen Tiergruppen wurden für das Gefäßreaktivitätsexperiment verwendet. Ferner wurden Amyloidablagerung und SMCs in der älteren Gruppe von drei transgenen positiven Tieren eines Alters von 24,7  $\pm$  2,3 Monaten abgebildet.

## Beispiel 8 – Bildgebung glatter Muskelzellen

**[0087]** Nach Gefäßreaktivitätsmessungen in vivo wurden die Tiere durch eine Überdosis eines Anästhetikums (Halothan) getötet. Intakte Crania wurden entfernt und in Paraformaldehyd (4% in TBS) mehrere Tage fixiert. Das Vorhandensein des intakten Schädels und Craniotomie identifizierten die gleiche Population von Gefäßen, deren Dilatation in vivo ermittelt wurde. Das Hirn wurde dann entfernt, mit TBS gewaschen, mit 0,5% Triton-X in TBS 20 min behandelt, erneut gewaschen, dann in 1% Rinderserumalbumin (BSA) in TBS 20 min inkubiert, um nichtspezifische Hintergrundanfärbung zu minimieren. Die Gefäße wurden mit einer Kombination von Alexa-568 Phalloidin (Molecular Probes, Eugene, OR) (50 µl Stammlösung/2 ml) und Thioflavin S (Thio S, Sigma, St. Louis, MO) (0,005%) in 1% BSA in TBS angefärbt. Nach 20 min in der Anfärbungslösung wurden die Hirne mit TBS gewaschen und in einer Plastikschiene mit geschmolzenen Knochenwachs stabilisiert. Die Hirne wurden in TBS überdeckt, in das ein Tauchmikroskopobjektiv zur Bildgebung abgesenkt wurde.

**[0088]** Ein BioRad 1024MP Multiphoton Imaging System mit einem Ti:Saphir-Laser (Spectra Physics), der bei 750 nm arbeitete, mit einer Leistung von 25 mW an der rückwärtigen Öffnung des Objektivs wurde zur Bildgebung verwendet. Das System war auf einem aufrechtstehenden Olympus BX-50-Mikroskop, das mit Tauchobjektiven einer langen Arbeitsdistanz ausgestattet war (10×, NA 0,5; 60×, NA 0,8, montiert. Externe Detektoren wurden zur Verstärkung der Detektion von emittiertem Licht verwendet. Der verwendete Filtersatz trennte emittiertes Licht in drei Kanäle auf: 360–430 nm, 485–505 nm und 525–650 nm. Die Signale von ThioS und Alexa-568 fielen klar in die ersten zwei Kanälen bzw. den dritten Kanal.

## Beispiel 9 – Ermittlung der Dichte von glatten Muskelzellen

**[0089]** Eine Serie von 60× optischen Schnitten mit einem Abstand von 2 µm wurde durch Äste der vorderen und mittleren Hirnarterie am dorsalen Aspekt des intakten Hirns aufgenommen. Jeder optische Schnitt wurde mit langsamer Scan-Geschwindigkeit mit Kalman-Filterung von zwei aufeinanderfolgenden Scans zur Rauschenverringern aufgenommen. Die Gefäßstruktur wurde dann durch eine Projektion maximaler Intensität des Stapels optischer Schnitte rekonstruiert. Eine computergenerierte Indexlinie einer willkürlichen Länge wurde senkrecht zum Gefäßdurchmesser gezogen (Scion Image). Die lineare SMC-Dichte wurde als die Zahl von SMCs längs dieser Linie, geteilt durch die Länge der Linie in Mikron, berechnet. Drei Gefäße wurden von jedem Tier vermessen; um eine Verzerrung der ermittelten SMC-Dichte durch ein schräg liegendes Gefäß zu minimieren, waren die ausgewählten Gefäße diejenigen, deren Längsachse am nächsten zur Bildgebungsebene passten. Zwar machte das offensichtliche Vorhandensein von Amyloid an den Gefäßen eine blinde Auswahl in Bezug auf den Genotyp unmöglich, doch war die Ermittlung von phalloidinangefärbten SMCs blind in Bezug auf das Alter des abgebildeten Tiers.

## Beispiel 10 – Tierpräparation zur Gefäßreaktivitätsmessung

**[0090]** Alle Experimente wurden gemäß den National Institutes of Health and Massachusetts General Hospital Institutional Guidelines durchgeführt. Die Tiere erhielten Futter und Wasser nach Belieben. Die Anästhesie wurde mit 2,6% Halothan induziert und in 1,0% Halothan in 67% N<sub>2</sub>O und 33% O<sub>2</sub> aufrechterhalten. Die Mäuse wurden transoral intubiert, in einen Stereotaxierahmen gesetzt und künstlich beatmet (SAR-830/P, CWE, Ardmore, PA). Endexpiratorisches CO<sub>2</sub> wurde kontinuierlich durch ein Mikrocapnometer (Columbus Instruments, Columbus, OH) überwacht. Die Femoralarterie und -vene wurden mit einem Polyethylenkatheter (PE-10, Intramedic, Becton Dickinson) zur kontinuierlichen Überwachung von arteriellem Blutdruck und Herzfrequenz und zur Arzneistoffinfusion kanüliert. Alpha-Chloralose (80 mg/kg i.v.) wurde injiziert und Halothan wurde zum Vertiefen der Anästhesie allmählich abgezogen. Ergänzungsdosen von Alpha-Chloralose wurden nach Bedarf gegeben, um einen stabilen Anästhesiegrad aufrechtzuerhalten, der periodisch durch die Reaktion von arteriellem Blutdruck und Herzfrequenz auf Schwanzkneifen getestet wurde. Arterieller Blutgas und pH-Wert wurden vor der Arzneistoffsuperfusion analysiert. Die rektale Temperatur wurde mit einer thermostatkontrollierten Matte (Temperaturkontrolle, FHC, Brunswick, ME) bei 37°C gehalten.

## Beispiel 11 – Präparation von geschlossenem kranialem Fenster

**[0091]** Die zur Ermittlung von Gefäßdurchmesseränderungen bei Mäusen verwendeten Techniken waren ähnlich den beschriebenen. Der Kopf wurde in einem Stereotaxierahmen fixiert und der Schädel wurde durch einen longitudinalen Hautschnitt freigelegt. Ein Edelstahlschädelfenster (7,0 mm Innendurchmesser, 1,7 mm Höhe), der drei Durchflussöffnungen enthielt, wurde an dem Schädel in einer Schleife von Knochenwachs angebracht. Eine Craniotomie (2 × 1,5 mm) wurde im linken Os parietale innerhalb des Rings des Fensters durchgeführt. Die Dura wurde dann geöffnet, während die Hirnoberfläche mit künstlichem Liquor ("ACSF") su-

perfundiert wurde. Ein Deckglas wurde auf den Ring gegeben und mit dentalem Acrylmaterial fixiert. Die Öffnungen wurden mit Einfließ- und Ausfließanschlüssen verbunden, die eine direkte Superfusion von Lösungen an dem freigelegten Hirn ermöglichen, wobei das Volumen unter dem Fenster etwa 0,1 ml betrug. ACSF war wie im folgenden (in mMol/l): Na<sup>+</sup> 156,5, K<sup>+</sup> 2,95, Ca<sup>++</sup> 1,25, Mg<sup>++</sup> 0,67, Cl<sup>-</sup> 138,7, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 24,6, Dextrose 3,7 und Harnstoff 0,67. ACSF wurde bei einem pH-Wert von 7,35–7,45 durch Equilibrierung mit 6,5% CO<sub>2</sub>, 10% O<sub>2</sub> und 83,5% N<sub>2</sub> gehalten. ACSF wurde durch eine Infusionspumpe (0,4 ml/min) über PE-50-Schlauchleitungen, die mit der Einlassöffnung verbunden waren, zirkuliert. Der intrakranielle Druck wurde bei 5–8 mm Hg durch Einstellen der Auslassschlauchleitung auf eine passende Höhe über dem Niveau des Fensters gehalten; die ACSF-Temperatur innerhalb des Fensters wurde bei 36,5–37,0°C gehalten.

#### Beispiel 12 – Ermittlung von Gefäßdurchmesser

**[0092]** Piagefäße wurden mit einem Videomikroskopsystem sichtbar gemacht, das aus einem intravitalem Mikroskop (Leitz, Deutschland), einer LCD-Videokamera (Modell 1300, Cohu Inc., San Diego, USA), einer Kamerasteuervorrichtung (C2400, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan), einem Videomonitor (Song, Japan) und einem Videorecorder (Panasonic, Japan) bestand. Die Bilder wurden kontinuierlich auf Videoband aufgezeichnet. Der Durchmesser einer einzelnen Piaarteriole (20–30 µm) wurde per Experiment durch einen Videobreitenanalysator (C3161, Hamamatsu Photonics) ermittelt und unter Verwendung des MacLab Data Acquisition and Analysis System aufgezeichnet. ACSF wurde 20–30 min superfundiert, bis ein stabiler Grundlindurchmesser erhalten wurde. Acetylcholin ("ACh") (10 und 25 µM) und Natriumnitroprussid (SNP, Sigma) (0,5 µM), das in ACSF gelöst war, wurden dann appliziert, um eine Gefäßdilatation sicherzustellen. Die Arzneistoffe wurden 10 min superfundiert, worauf eine ACSF-Superfusion während weiterer 20 min zum Auswaschen und zur Rückkehr zum Grundliniengefäßdurchmesser folgte. Die Reihenfolge der Applikation der zwei Arzneistoffe wurde willkürlich gewählt. In einem Teilsatz von Tieren (n = 6) wurde zwei kumulative Konzentrationen von ACh superfundiert, ohne zwischen der niedrigen und hohen Dosis zur Grundlinie zurückzukehren. Für jede Arzneistoffapplikation wurde die maximale Durchmesseränderung gegenüber der Grundlinie verglichen. Die Gefäßbildung und Datenanalyse wurden ohne Kenntnis des Experimentators in Bezug auf den Genotyp und das Alter des Tiers durchgeführt. Tiere, die signifikante Hypertonie (n = 2) oder Hyperkapnie (n = 1) während des Verfahrens zeigten, wurden a priori von der Analyse ausgenommen.

**[0093]** Um die Wirkung dieser Amyloidablagerung auf die Struktur der Gefäßwand sicherzustellen, wurden SMCs in Verbindung mit Amyloid unter Verwendung einer Kombination von fluoreszenzmarkiertem Phalloidin und Thioflavin S (ThioS) sichtbar gemacht. Phalloidin bindet an Actinfilamente, insbesondere F-Actin, und es wurde zur Sichtbarmachung von SMCs unter einer Vielzahl von Bedingungen verwendet. (Wilson et al., "A Pulmonary Artery Endothelial Factor Causes Unidirectional Alignment of Smooth Muscle Cells", *Tissue Cell*, 19: 177–828 (1987), und Kobayashi et al., "Emergence and Distribution of Intimal Smooth Muscle Cells in the Postnatal Rat Aorta", *Cell Tissue Res*, 289: 487–97 (1997)). Phalloidin färbt vaskuläre SMCs in fixierten Maus-Piagefäßen an und es kann konjugiert an Alcexa 568 in einem getrennten Emissionskanal gegenüber ThioS abgebildet werden. Auf diese Weise können die Organisation und Zahl von SMCs in einer Strecke einer Piaarteriole in Bezug auf das umgebende Amyloid untersucht werden. Eine Anfärbung kann in intakten fixierten Hirnen erreicht werden und eine dreidimensionale Bildgebung kann mit MPSLM durchgeführt werden.

**[0094]** **Fig. 14** zeigt das Muster einer Amyloidangiopathie an leptomeningealen Gefäßen einer 16 Monate alten Tg2576-Maus. Diese Montage von 32 Bildern erläutert, wie der Befall der mittleren Gehirnarterie längs deren Länge variiert und sie ist typisch für alle untersuchten Gefäße. Der Gefäßbereich eines größeren Durchmessers scheint der am frühesten und am schwersten befallene zu sein, wobei das Amyloid vollständige Ringe rings um den Umfang des Gefäßes bildet. Das klassische segmentartige Aussehen des Amyloids ist offensichtlich und in den am schwersten betroffenen Bereichen des Gefäßes setzt sich das Amyloid ohne Unterbrechung über Strecken von mehreren Hundert Mikron fort. Gefäße einer geringen Größe weisen weniger Amyloid mit selteneren Ablagerungen auf, die manchmal isolierte Amyloidspäne an der Gefäßwand bilden. Eine Amyloidablagerung trat ausschließlich an den Wänden von Arteriolen auf, während Venolen, deren Silhouetten im Figurenhintergrund erscheinen, nicht betroffen blieben.

**[0095]** Die Morphologie von SMCs bei Amyloidangiopathie wurde an drei Altersstufen untersucht. Nicht-transgene Junge und transgene Tiere, die zu jung für eine Amyloidablagerung waren (6 Monate), zeigten eine regelmäßige Anordnung von SMCs. SMCs waren umfassend um das Gefäß angeordnet und einander benachbart längs der Länge des Gefäßes ohne offensichtlichen Raum zwischen diesen gepackt (**Fig. 15**).

**[0096]** Im Gegensatz dazu zerbricht ThioS-positives Amyloid SMCs in 14 Monate und 24 Monate alten transgenen Tieren wesentlich (**Fig. 16**). Bereiche von spärlichem Amyloid waren durch Bruchstücke von Thio-S-po-

sitivem Material zwischen benachbarten SMCs gekennzeichnet. Stärker befallene Bereiche von Gefäßen zeigten Amyloid, das individuelle SMCs einhüllte, von benachbarten Zellen distanzierte und schließlich vollständig isolierte. Während die Organisation von SMCs in betroffenen Gefäßen der 14 Monate alten Gruppe klar anomal war (**Fig. 16A–B**), schienen sich SMCs dem Beeinträchtigen durch Amyloid durch Kontraktion längs ihrer seitlichen Abmessung angepasst zu haben; längs der Länge des Gefäßes war kein SMC-Verlust offensichtlich. Gemäß dieser qualitativen Beobachtungen zeigte die quantitative Analyse (**Fig. 17**), dass keine signifikante Änderung im Hinblick auf die lineare Dichte von SMCs innerhalb der ThioS-positiven Bereiche von Gefäßen im Vergleich zu ThioS-negativen Bereichen von Gefäßen in Tg2576-Tieren von 14 Monaten oder im Vergleich zu Messungen in nicht-transgenen Kontrolljungtieren vorlag.

**[0097]** Die älteste Gruppe der untersuchten Tiere (24 Monate) verlor jedoch SMCs längs der Länge des Gefäßes in den Bereichen der schwersten Amyloidablagerung (**Fig. 16C–D**). Die Dichte von SMCs längs der Länge des Gefäßes wurde für Gefäßbereiche, die von Amyloid betroffen und nicht-betroffen waren, berechnet; im Alter von 24 Monaten verloren amyloidbeladene Gefäße über die Hälfte der SMCs in Bezug auf nicht-betroffene Gefäße der gleichen Tiere. Die SMC-Dichte in amyloidfreien Gefäßen oder Gefäßbereichen war zwischen den 14 Monate alten und 24 Monate alten Gruppen nicht signifikant verschieden (**Fig. 17**), noch unterschied sie sich signifikant von der SMC-Dichte in Gefäßen von nicht-transgenen 14 Monate alten, nicht-transgenen 6 Monate alten oder transgenen 6 Monate alten Tieren. Die anschließende Untersuchung von Nissl-angefärbten histologischen Schnitten ergab die Konservierung von Endothelzellen auch in schwer betroffenen Bereichen der Gefäße. Keine Beweise für hämorrhagische Schlaganfälle wurden beobachtet.

**[0098]** Es ist sicher, dass der Verlust von SMCs in der Gefäßwand, der bei den 24 Monate alten Tieren beobachtet wird, die Dilatation als Reaktion auf physiologische oder pharmakologische Stimulation ändert; die Folge des Zerbrechens von SMCs, was in den 14 Monate alten Tieren beobachtet wird, ist unbekannt. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Vorhandensein von Amyloid in der Gefäßwand die Gefäßfunktion auch vor einem SMC-Verlust beeinträchtigt. Daher wurde die Physiologie von Piagefäßen unter Verwendung einer Präparation eines geschlossenen Kranialfensters in den jungen (6 Monate) und älteren (14 Monate) transgenen und nicht-transgenen Kontrolltieren direkt untersucht. Die Änderung des Gefäßdurchmessers auf die Applikation von entweder Acetylcholin ("ACh"), die eine endothelabhängige Vasodilatation durch einen von Stickoxid abhängigen Mechanismus verursacht (10), oder Natriumnitroprussid ("SNP"), ein Stickoxiddonor, der direkt auf SMCs wirkt (**Fig. 17**), wurde ermittelt. Zum Testen der Möglichkeit, dass die Überexpression des APP-Gens und Überproduktion von A $\beta$ -Peptid eine Wirkung auf die Gefäßfunktion unabhängig von der Amyloidablagerung hat, wurde auch die Gefäßreaktion in den 6 Monate alten transgenen und nicht-transgenen Tieren ermittelt. Die physiologischen Parameter der vier Messgruppen sind in Tabelle 1 angegeben. Keine signifikanten Unterschiede wurden für den pH-Wert, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> von arteriellem Blut oder dem Grundliniengefäßdurchmesser für die vier Gruppen beobachtet ( $p > 0,05$ , ANOVA). Ein signifikanter Unterschied wurde zwischen den Messungen des arteriellen Blutdrucks für die junge, nicht-transgene Gruppe und den für die anderen drei Gruppen beobachtet ( $p < 0,05$ , ANOVA), wobei der Blutdruck sowohl vor als auch nach der Gefäßreaktivitätsmessung in dieser jüngeren Gruppe wesentlich höher ist. Kein Unterschied wurde jedoch zwischen dem mittleren Blutdruck vor dem Experiment und dem Blutdruck nach dem Experiment für eine der Versuchsgruppen beobachtet.

**[0099]** Der Prozentsatz der Dilatation auf die Applikation von ACh und SNP für die vier Gruppen ist in **Fig. 18** angegeben. Kein Unterschied in Bezug auf die Reaktion auf entweder ACh- oder SNP wurde zwischen den 6 Monate alten Tg<sup>+</sup>- und Tg<sup>-</sup>-Gruppen beobachtet. Im Gegensatz dazu war in den 14 Monate alten Tieren Gefäßdilatation als Reaktion auf sowohl Dosen von ACh als auch SNP in vier von fünf transgenen Tieren im Vergleich zur nicht-transgenen Gruppe deutlich geschwächt. Die Gefäßdilatation in diesen Tieren war tatsächlich auf etwa 25% von der von Kontrolltieren verringert. Ein Ausreißer in der transgenen positiven Gruppe zeigte im wesentlichen normale Reaktionen auf sowohl ACh als auch SNP, Werte, die sechs Standardabweichungen vom Mittelwert der übrigen Mitglieder der transgenen positiven Gruppe entfernt waren. Kein Unterschied in Bezug auf alle physiologischen Parameter dieses individuellen Tiers konnte diese deutliche Diskrepanz gegenüber anderen Gruppenmitgliedern ausmachen.

**[0100]** Nach der physiologischen Untersuchung wurden die Tiere perfundiert und wie oben angegeben zur detaillierten MPLSM-Analyse präpariert. Bei der Bildgebung waren die Gefäße in dem 14 Monate alten "Ausreißer" mit ThioS-positivem Amyloid in dem gemessenen Gefäßsegment nicht unähnlich anderen Mitgliedern der Gruppe mäßig befallen, obwohl die vollständigen Amyloidringe, die in den meisten schwer betroffenen Gefäßen vorhanden waren, fehlten. Der Ausschluss von Daten von diesem außerhalb liegenden Tier führt zu einem hoch signifikanten ( $p < 0,005$ , ANOVA) Unterschied zwischen den transgenen Tieren und nicht-transgenen Jungtieren für sowohl Dosen von ACh als auch SNP. Der Einschluss dieses Ausreißers führt zu einem

mäßigeren, jedoch signifikanten Ergebnis für die  $10^{-5}$ -M-Verabreichung von ACh ( $p < 0,05$ ) und nicht signifikanten Unterschieden für die höhere Dosis von ACh und für SNP.

**[0101]** Unter Verwendung von transgenen Tg2576-Mäusen wurde die natürliche Geschichte einer A $\beta$ -Ablagerung in Hirngefäßen untersucht und die Hypothese, dass eine Amyloidablagerung zu sowohl struktureller als auch funktionaler Zerstörung von betroffenen Gefäßen führt, getestet.

**[0102]** Die Daten zeigen, dass eine amyloidassoziierte Zerstörung von SMCs die Reaktion gegenüber sowohl endothelabhängigen als auch endothelunabhängigen Vasodilatoren in einem Alter, das vor den Zeiten eines Verlustes von SMCs in diesen Gefäßen liegt, beeinträchtigt. Mehrere Möglichkeiten für den Mechanismus dieses Eingreifens von Amyloid in die Gefäßfunktion existieren. Amyloid kann ein mechanisches Hindernis für Gefäßdilatation bilden, das die Gefäßwand relativ steif macht. Diese Möglichkeit wird durch die lange bestehende Beobachtung gestützt, dass Gefäße mit Amyloidangiopathie in postmortalem Gewebe nicht kollabieren, was ihnen das klassische "Ofenrohr"-Aussehen verleiht (Vonsattel et al., "Cerebral Amyloid Angiopathy Without and With Cerebral Hemorrhages: A Comparative Histological Study", *Ann Neurol*, 30: 637–49 (1991)). Die gleiche Inflexibilität, die den Gefäßdurchmesser post mortem aufrechterhält, kann in vivo die Dilatation physisch beschränken. Alternativ kann eine physikalische Trennung benachbarter SMCs durch Amyloid eine Kontraktion, die von deren koordinierter Aktion abhängig ist, zerstören. Eine dritte Möglichkeit unter der Annahme, dass die Ansammlung von Amyloid rings um diese Gefäße schließlich signifikanten Tod von SMC ergibt, kann eine schwachgradige Toxizität von Amyloid auf die SMC, die deren Fähigkeit zur entsprechenden Dilatation stört, vielleicht durch Änderung der Expression von Kanalproteinen (beispielsweise  $Ca^{++}$ -abhängige  $K^{+}$ -Kanäle (Taguchi et al., "ATP-sensitive  $K^{+}$  Channels Mediate Dilatation of Cerebral Arterioles During Hypoxia", *Circ Res*, 4: 1005–8 (1994)), wodurch eine NO-abhängige Relaxation in Hirngefäßen vermittelt wird (Sobey et al., "Effect of Nitric Oxide and Potassium Channel Agonists and Inhibitors on Basilar Artery Diameter", *Am J Physiol*, 72: H256–H262 (1997)), sein. Amyloid ist toxisch für Endothelzellen in Kultur (Thomas et al., "Beta Amyloid-mediated Vasoactivity and Vascular Endothelial Damage", *Nature*, 80: 68–71 (1996)) und eine mutierte Form des A $\beta$ -Peptids ist toxisch für SMCs in Kultur, obwohl die 1-40-Form, die in der Tg2576-Maus überwiegt, keine direkte Toxizität für SMCs zeigte (Davis et al., "Enhanced Pathologic Properties of Dutch-type Mutant Amyloid Beta-Protein", *Proc Natl Acad Sci USA*, 3: 2996–3000 (1996), und Wang et al., "Toxicity of Dutch (E22Q) and Flemish (A21G) Mutant Amyloid Beta Proteins to Human Cerebral Microvessel and Aortic Smooth Muscle Cells", *Stroke*, 31: 534–538 (2000)). Der klare In-vivo-Verlust der SMC-Funktion kann dann ein Vorstadium in einer Kaskade von Ereignissen, die zu Zellverlust führen, widerspiegeln. Der SMC-Verlust, der in dem Tg2576-Mausmodell der Amyloidablagerung beobachtet wird, ist eine Parallele zu dem, der früher auf Ultrastrukturniveau in postmortalen humanen AD-Fällen beschrieben wurde (Vinters et al., "Microvasculature in Brain Biopsy Specimens from Patients with Alzheimer's Disease: An Immunohistochemical and Ultrastructural Study", *Ultrastruct Pathol* 18: 333–48 (1994)). Überraschenderweise präsentiert ein derartiges Modell einer amyloidinduzierten SMC-Dysfunktion die Möglichkeit einer Wiederherstellung der Gefäßfunktion, wenn das Amyloid vor einem SMC-Verlust in betroffenen Gefäßen entfernt werden kann. Die Entwicklung therapeutischer Ansätze zur Amyloidclearance (Schenk et al., "Immunization with Amyloid-beta Attenuates Alzheimer-disease-like Pathology in the PDAPP Mouse", *Nature* 00: 173–7 (1999)) sollte das Testen dieser Hypothese bei diesen Tieren ermöglichen.

**[0103]** Die Hirngefäßfunktion wurde früher an Mäusen, die APP(Sw) exprimieren, auf einem FVB-Hintergrund (Tg1130H) untersucht. Diese Mäuse entwickeln keine Amyloidablagerungen und sterben in einem relativ jungen Alter. Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen zeigten die Tg1130H-Mäuse beeinträchtigte endothelabhängige, jedoch nicht endothelunabhängige Veränderungen der Hirndurchblutung (Iadecola et al., "SOD1 Rescues Cerebral Endothelial Dysfunction in Mice Overexpressing Amyloid Precursor Protein", *Nat Neurosci* 2: 5761 (1999)). Unterschiede im Hinblick auf das Alter, den Hintergrundstamm (die Tg2576 sind auf einem C67 B/J1 F1-Hintergrund) oder die genauen Messprotokolle (Blutfluss gegenüber Gefäßdurchmesser) können auch zu beobachteten Unterschieden beitragen. Zusammengenommen zeigen die Daten jedoch eine tiefe Beeinträchtigung der funktionalen Integrität von cerebrovaskulären Reaktionen aufgrund einer Überexpression von mutiertem APP und A $\beta$ -Ablagerung und sie implizieren, dass funktionale Veränderungen wahrscheinlich auch bei CAA und Alzheimer-Krankheit auftreten. Diese In-vivo-Ergebnisse stützen zusammen mit Beobachtungen, dass A $\beta$  eine positive inotrope Wirkung auf Aortaringe hat, die ex vivo untersucht wurden (Paris et al., "Soluble Beta-amyloid Peptides Mediate Vasoactivity Via Activation of a Pro-inflammatory Pathway", *Neurobiol Aging* 21: 183–97 (2000), und Crawford et al., "Characteristics of the In Vitro Vasoactivity of Beta-amyloid Peptides", *Exp. Neurol* 150: 159–68 (1998)), die Hypothese, dass gefäßassoziiertes A $\beta$  eine physiologisch relevante Beeinträchtigung der cerebrovaskulären Gefäßstruktur und -funktion verursacht.

**[0104]** Diese Experimente folgen der Beobachtung, dass die Immunisierung von PDAPP-Mäusen mit Amyloid- $\beta$  zur Entwicklung von Antikörpern gegen Amyloid- $\beta$  und zur anschließenden Verhinderung von neuen Amyloid- $\beta$ -Ablagerungen führt (Schenk et al., *Nature* 400: 173–7 (1999)). Die Hypothese, dass die Interaktion eines Anti-Amyloid- $\beta$ -Antikörpers mit einer Plaque in vivo zu deren Clearance führt, wurde getestet. Es wurde daher versucht, Amyloid- $\beta$ -Ablagerungen in vivo vor und nach einer therapeutischen Intervention abzubilden. Ein fluoreszenzmarkierter Amyloid- $\beta$ -Antikörper wurde direkt am Kortex appliziert. Die erste Abbildung des Kortex in einer lebenden 20 Monate alten PDAPP-Maus, die homozygot für das mutierte APP-Transgen war, ergab zahlreiche Amyloid- $\beta$ -Ablagerungen, von denen einige die Charakteristiken eines diffusen Amyloids aufwiesen, einige diskrete Kerne aufwiesen. Ein Stapel optischer Dünnschnitte in Stufen von 2 Mikron wurde bis zu ~100–150 Mikron tief zur Hirnoberfläche erhalten (**Fig.** 19A und C). Dreidimensionale Rekonstruktion der Bilder (Voxblast, VayTek, Fairfield IA) auf einer Workstation auf Windows-NT-Basis (Precision 610, Dell Computer, Round Rock TX) ergab außergewöhnliche Einzelheiten der Amyloid- $\beta$ -Ablagerungen, auch mehr als 100 Mikron tief zur Hirnoberfläche. Die diffusen Ablagerungen wiesen eine feine Morphologie mit häufigen Auskragungen, unregelmäßigen Formen und Clustern auf, die identisch mit dem Bild waren, das durch herkömmliche histologische Immunfärbung von PDAPP-Mäusen beobachtet wurde. Amyloidangiopathie wurde in ähnlicher Weise abgebildet, wobei diese einige Piagefäße umgab. Daher diffundierten fluoreszenzmarkierte Anti-Amyloid- $\beta$ -Antikörper, die auf die Oberfläche des Kortex appliziert wurden, in den Kortex und sie markierten spezifisch Amyloid- $\beta$ -Ablagerungen. Diese Markierung ermöglichte die Identifizierung und Bildgebung von existierenden Ablagerungen durch Multiphotonmikroskopie.

**[0105]** Das Tier erholte sich nach der Bildgebung ohne Ereignis. Drei Tage später wurde das Tier reanästhesiert und das gleiche Volumen abgebildet. Texas Red-Angiographie und Tischpositionierung stellten sicher, dass das exakt gleiche Volumen abgebildet wurde. Eine erste Abbildung zeigte, dass sehr wenig oder keine detektierbare Fluoreszenz von der Bildgebungssitzung drei Tage zuvor verblieben war. Fluoreszenzmarkierter Anti-Amyloid- $\beta$ -Antikörper wurde dann erneut direkt am Kortex appliziert. Wiederholte Abbildung einer Z-Serie von Bildern, die alle 2 Mikron von der Oberfläche des Kortex bis 100 bis 150 Mikron tief erhalten wurden, wurde erhalten. Die Bildgebung zeigte wenige oder keine der Amyloid- $\beta$ -Ablagerungen, die bei der ersten Abbildung vorhanden waren, doch wurde Amyloidangiopathie immer noch detektiert (**Fig.** 19B und D). Daher wurde an diesem Zeitpunkt nach einer einzigen Applikation eines Anti-Amyloid- $\beta$ -Antikörpers eine dramatische Auflösung von Amyloid- $\beta$ -Ablagerungen beobachtet. Die Wiederholung dieses Experiments mit einer Verzögerung von 3 bis 8 Tagen nach der ersten Abbildung an einer oder zwei Stellen in jedem von sechs von sechs Tieren zeigte nahezu identische Ergebnisse. Zur Untersuchung der Möglichkeit, dass 10D5 einfach das Amyloid- $\beta$  während der zweiten Bildgebungssitzung maskierte, wurde eine Bildgebung während der zweiten Bildgebungssitzung mit 3D6, einem Antikörper, der gegen ein anderes Epitop an dem N-Terminus von Amyloid- $\beta$  gerichtet ist, mit identischen Ergebnissen durchgeführt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass das in der ersten Bildgebungssitzung vorhandene Amyloid- $\beta$  revertiert war, d.h. dass es durch Applikation des Antikörpers entfernt wurde.

**[0106]** Eine alternative Erklärung wurde untersucht: dass die Entfernung des Schädels und der Dura, die Applikation eines monoklonalen Antikörpers und die Bildgebung eine nichtspezifische Wirkung auf Amyloid- $\beta$ -Ablagerungen haben könnten. Zur Behandlung dieser Möglichkeit wurden Scheinexperimente an fünf Tieren durchgeführt, wobei die erste Bildgebungssitzung Fluorescein-markierten Antikörper 1655, einen monoklonalen Antikörper, der gegen ein intrazelluläres Epitop von humanen Tau gerichtet ist, der mit Nagetier-Tau keine Kreuzreaktion eingeht, verwendete (Vigopelfry et al., *Neurology* 46: 788–793 (1995)). Die erste Bildgebungssitzung unter Verwendung des Antikörpers 16B5 bildete überhaupt kein Amyloid- $\beta$  ab, wie erwartet wurde, da der monoklonale Antikörper nicht gegen ein auf senilen Plaques vorhandenes Epitop gerichtet war. Eine wiederholte Bildgebung 3 bis 5 Tage später unter Verwendung von fluoreszenzmarkiertem 10D5 bildete zahlreiche Amyloid- $\beta$ -Ablagerungen ab, die von den ersten Bildgebungssitzungen von jeder der 6 Mäuse, die am Anfang mit 10D5 abgebildet wurden, nicht unterscheidbar waren. Daher hat es nicht den Anschein, dass die chirurgische Präparation, Applikation eines irrelevanten monoklonalen Antikörpers oder die Bildgebung als solche zur Auflösung von Amyloid- $\beta$ -Ablagerungen führten.

**[0107]** Zur Untersuchung der Frage, ob die Applikation von Anti-Amyloid- $\beta$ -Antikörpern sowohl diffuse als auch kompakte fibrilläre Ablagerungen veränderte, wurde eine alternative Bildgebungsstrategie unter Verwendung von Thioflavin S entwickelt. Thioflavin S ist eine Standardfluoreszenzanzfärbung, die spezifisch an Amyloidproteinablagerungen bindet; sie wird üblicherweise bei neuropathologischen Untersuchungen von Alzheimer-Krankheit verwendet. Die Applikation einer verdünnten Lösung (0,005% in ACSF) von Thioflavin S (das im blaugrünen Bereich fluoresziert) auf die Kortexoberfläche gleichzeitig mit der Applikation von Fluores-

cein-markiertem 10D5 oder 16B5 ermöglichte die gleichzeitige Beobachtung von sowohl dichten kernhaltigen Thioflavin-S-positiven Plaques als auch allen Amyloid- $\beta$ -Ablagerungen. Neun Tiere wurden willkürlich einer 10D5 (n = 4, 7 Stellen)- oder 16B5 (n = 5, 7 Stellen)-Behandlung wie oben zugeordnet. Zwei unabhängige Ableser bepunkteten das Vorhandensein von Thioflavin-S-Plaques in jeder von 28 Bildgebungssitzungen und sie verglichen erste und zweite Bildgebungssätze, um zu bestimmen, ob individuelle Thioflavin-S-Plaques entfernt waren. In der 10D5-Gruppe waren 45 von 65 Plaques (70%) 3 Tage nach der ersten Bildgebung entfernt. In der 16B5-Gruppe konnten nur 9 von 45 Plaques 3 Tage später nicht reidentifiziert werden (20%) ( $\chi^2 = 30,5$ ,  $p < 0,001$ ). Dieses Ergebnis belegt, dass sowohl diffuse als auch fibrilläre Amyloid- $\beta$ -Ablagerungen durch die Applikation von 10D5 revertiert werden, und es dient ferner als technische Kontrolle, die zeigt, dass das Fehlen von Amyloid- $\beta$  in der zweiten Bildgebungssitzung nicht auf einer antikörpervermittelten Änderung des Epitops, sondern auf der Clearance der Ablagerungen beruht.

**[0108]** Zur weiteren Analyse der Wirkungen einer Bildgebung und Behandlung mit 10D5 wurde eine histologische Untersuchung der Mäuse nach der zweiten Bildgebungssitzung durchgeführt. Maushirne wurden in 4% Paraformaldehyd fixiert, in 15% Glycerin kryogeschützt und mit 40 Mikron auf einem Gefrierschlittenmikrotom geschnitten. Immunfärbung mit biotinyliertem oder fluoreszenzmarkiertem 3D6 zeigte einen Bereich, etwa 100–200 Mikron tief von der Oberfläche der Schädelöffnung, der deutlich verringerte Amyloid- $\beta$ -Ablagerungen nahe der Oberfläche (**Fig. 21**) in allen mit 10D5 behandelten Mäusen, jedoch in keiner der scheinbehandelten Mäuse zeigte, was durch einen Beobachter, der den Behandlungsstatus nicht kannte, beurteilt wurde. Es ist anzumerken, dass 3D6 und 10D5 benachbarte, jedoch nicht überlappende Epitope aufweisen und senile Plaques doppelt anfärben können, ungeachtet der Reihenfolge, in der sie appliziert werden. Diese Ergebnisse sind konsistent mit der Hypothese, dass die Amyloid- $\beta$ -Ablagerungen nach einer ersten Behandlung des Kortex mit direkter Applikation von 10D5 entfernt waren.

**[0109]** Histochemische Anfärbung mit Tomatenlectin (Sigma), die Mikrogliazellen detektiert, ergab eine deutliche Hochregulation von Mikroglia an der Stelle der Bildgebung (**Fig. 22**), auch in mit 16B5 behandelten Tieren. Höchstens eine mäßige Astrocytenreaktion wurde unter Verwendung von Immunfärbung mit antiglialem fibrillärem saurem Protein beobachtet. Diese Daten legen nahe, dass die Clearance von Amyloid- $\beta$  nach Einwirken von 10D5 eine spezifische Reaktion auf Anti-Amyloid- $\beta$ -Antikörper statt einer nichtspezifischen Reaktion auf eine Läsion ist.

**[0110]** Die Interaktion zwischen Amyloid- $\beta$  und Mikroglia an der Stelle einer Antikörperapplikation wurde als nächstes untersucht, da die Immunisierung mit Amyloid- $\beta$  zu einem offensichtlichen Verdau von Amyloid- $\beta$  durch Mikroglia führt (Schenk et al., *Nature* 400: 173–7 (1999)). Unter Verwendung von doppelter Immunfluoreszenz mit Fluorescein-markiertem Tomatenlectin und biotinmarkiertem 3D6 (detektiert mit Avidin-cy3 (Jackson Immunoresearch)) wurde eine deutliche Mikrogliareaktion, die die geringen Mengen von verbleibendem Amyloid- $\beta$  an der Behandlungsstelle im frontalen/parietalen Kortex vollständig umgab, beobachtet (**Fig. 23A**). Distal zu der Stelle, beispielsweise im Schläfenlappen, wiesen typische Plaques nur wenig assoziierte Mikroglia auf (**Fig. 23B**). Obwohl die Aktivierung von Mikroglia sowohl in den behandelten als auch Kontrolltieren nahe der Bildgebungsstelle auftrat, war die Assoziation von Mikroglia mit Amyloid- $\beta$ -Ablagerungen dramatisch verschieden.

**[0111]** Zusammengefasst zeigen die obigen Daten zum ersten Mal die Revertierung von existierenden Amyloid- $\beta$ -Ablagerungen im Hirn aufgrund eines experimentellen Eingriffs. Es besteht eine deutliche Beseitigung von sowohl diffusen als auch kompakten Thioflavin-S-angefärbten Amyloid- $\beta$ -Ablagerungen innerhalb von 3 Tagen einer Behandlung mit einem Anti-Amyloid- $\beta$ -Antikörper durch direkte Applikation am Kortex. Das verbleibende Amyloid- $\beta$  scheint von Mikroglia umgeben zu sein. Parallele Untersuchungen, die in einem Ex vivo-System durchgeführt wurden, zeigen, dass Mikroglia zur Aufnahme von Amyloid- $\beta$  über Fc-vermittelte Phagozytose, die zu anschließendem Peptidabbau führt, fähig sind. Antikörper können auch die Fibrillogenese von Amyloid- $\beta$  ändern<sup>13</sup>. Die derzeitigen Experimente dienen auch zur Bestätigung und Ausweitung der Ergebnisse einer Immunisierung mit Amyloid- $\beta$ <sup>3</sup>, da die derzeitige Behandlung eine passive Applikation eines Antikörpers war. Diese Daten legen nahe, dass es die humorale Reaktion ist, die die Abschwächung einer Amyloid- $\beta$ -Ablagerung nach Immunisierung mit Amyloid- $\beta$  vermittelt, statt zwangsläufig eine zelluläre Immunreaktion. Infolgedessen stützen diese Daten die Idee, dass eine passive Immuntherapie zur Prävention oder Beseitigung von Amyloid- $\beta$ -Ablagerungen bei Alzheimer-Krankheit wirksam sein könnte, ein Ansatz, der die klinischen Vorteile aufweist, dass er selbstbeschränkend ist, ein Reagens verwendet, das so gestaltet ist, dass es optimale Epitopeigenschaften aufweist, und die Notwendigkeit, Immunisierungsergebnisse mit hohem Titer in einer Population älterer Patienten zu erhalten, vermeidet.

**[0112]** Eine leistungsfähige In-vivo-Multiphotonbildgebungstechnologie wird beschrieben, die die Sichtbar-

machung von deutlichen Hirnläsionen in einer lebenden anästhesierten Maus mit einer Auflösung von etwa 1 Mikron ermöglicht. Dies ergibt außerordentliche In-vivo-Bilder von individuellen Zellen oder pathologischen Strukturen mit einer Auflösung, die andere In-vivo-Technologien weit übersteigt. Im Prinzip kann jedes extrazelluläre Epitop mit einem entsprechenden direkt markierten Antikörper sichtbar gemacht werden. Die Antikörperpenetration in den Kortex war kein beschränkender Faktor und der Antikörper drang so tief ein, wie es das Multiphotonmikroskop detektieren konnte – etwa 100 bis 150 Mikron, ausgehend von der Oberfläche des Hirns oder in Schichten II oder III des Mausekortex. Andere Fluoreszenzmarker (entweder Fluorescein oder Texas Red) zeigen die Gefäßanatomie zur Bildung von Geländemarken und sie sind klar für Untersuchungen, die auf Gefäßpathologie oder Amyloidangiopathie gerichtet sind, verwendbar. Eine breite Vielzahl fluoreszierender Reportermoleküle ist verfügbar, die metabolische und physiologische Aktivität in vivo überwachen können. Eine wiederholte Bildgebung der gleichen Stelle Stunden oder Tage später kann ohne weiteres erhalten werden. Vorversuche zeigen, dass dieses Zeitfenster mit einigen Modifikationen in den Bildgebungsprotokollen auf Monate verlängert werden kann. Das beste Bildgebungsmittel, fluoreszenzmarkiertes 10D5, scheint eine überraschende therapeutische Wirkung zu haben, doch wird angenommen, dass Modifikationen dieses Ansatzes nutzbare Bildgebungsmittel ergeben, die zum Testen anderer therapeutischer Ansätze mit In-vivo-Multiphotonmikroskopie verwendet werden können. Die Fähigkeit zur longitudinalen Abbildung der gleichen Stelle macht diesen Bildgebungsansatz ideal für Untersuchungen diverser therapeutischer Interventionen und sie ermöglicht die unwiderstehbare Folgerung, dass eine Behandlung mit Anti-Amyloid- $\beta$ -Antikörpern Amyloid- $\beta$ -Ablagerungen revertiert.

**[0113]** Neurofibrillenknäuel sind das andere intrazelluläre neuropathologische Kennzeichen von Alzheimer-Krankheit und sie besetzen Neuronen in der Schicht II, III und V des Kortex. Das primäre Protein, das die Neurofibrillenknäuel bildet, ist das mikrotubuliassozierte Protein, Tau, das Selbstaggregation in A $\beta$ -Faltblattproteinkonfirmation zeigt. Dieses  $\beta$ -Faltblatt hat die gleiche Art einer Struktur wie das Amyloid- $\beta$ -Protein in senilen Plaques und daher binden ähnliche Farbstoffe daran. Thioflavin S bindet auch an Neurofibrillenknäuel wie Kongorot und alle Verbindungen, die in ähnlicher Weise an Amyloid binden. Fluoreszierende Varianten dieser Verbindungen sind daher zur In-vivo-Detektion von Neurofibrillenknäueln verwendbar. Hierin wurde ex vivo gezeigt, dass diese Verbindungen Knäuel anfärben und dass sie durch Multiphotonmikroskopie detektiert werden können.

**[0114]** Ferner ist ein zweiter Ansatz zur Detektion von Neurofibrillenknäueln die vorteilhafte Nutzung einer singulären autofluoreszierenden Signatur dieser Proteinstruktur.

**[0115]** Fig. 24A zeigt ein typisches Neurofibrillenknäuel in einer gefrorenen Probe von postmortalem humanem Hirn, das aufgrund von dessen singulären Autofluoreszenzeigenschaften, wenn es mit Licht langer Wellenlänge bestrahlt wurde, abgebildet wurde. Zur Feststellung von dessen Identität zeigt Immunhistochemie mit Anti-Phospho-Tau-Antikörpern die gleiche Zelle. Das singuläre Emissionsspektrum des Knäuels nach Einwirken von Licht mit 800 nm ist in Fig. 24B dargestellt.

**[0116]** Die Fähigkeit zur Detektion und Bildgebung einer neurodegenerativen Erkrankung in Tieren unter Verwendung von Multiphotonanregung von Hirngewebe zeigt die Verwendbarkeit von Multiphotonanregung zur Detektion und Bildgebung einer derartigen Erkrankung in größeren Lebewesen einschließlich Menschen.

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines Bildes von Hirngewebe von einem Säuger, das das Aktivieren von Hirngewebe eines Säugers mit Strahlung, die unter Bedingungen appliziert wird, die zur Förderung einer gleichzeitigen Mehrphotonenanregung des Hirngewebes und zum Hervorrufen einer Fluoreszenz wirksam sind, und das Sammeln der Fluoreszenz zum Erstellen eines Bildes des Hirngewebes umfasst.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das abzubildende Hirngewebe von einer neurodegenerativen Erkrankung betroffen ist.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die neurodegenerative Erkrankung aus der Gruppe von Alzheimer-Krankheit, Parkinson-Krankheit, Chorea Huntington und Lou-Gehrig-Syndrom ausgewählt ist.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die neurodegenerative Erkrankung Alzheimer-Krankheit ist.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei Amyloidplaques im Hirn des Säugers detektiert werden.



6. Verfahren nach Anspruch 4, wobei Neurofibrillenknäuel im Hirn des Säugers detektiert werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Hirngewebe mindestens ein photoaktives Mittel vor dem Aktivieren umfasst.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das photoaktive Mittel bei Bindung an Läsionen einer neurodegenerativen Erkrankung oder anderer Neuroanomalien fluoresziert.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Strahlung durch einen Laser erzeugt wird.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Strahlung gepulst ist.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Strahlung mit einer Pulsbreite zwischen etwa  $10^{-9}$  bis  $10^{-15}$  s gepulst ist.
12. Verfahren nach Anspruch 9, wobei der Laser ein Modelock-Laser ist.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Verfahren in vivo durchgeführt wird.
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Aktivieren durch Hindurchschicken der Strahlung durch den Schädel des Säugers durchgeführt wird.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Fluoreszenz Autofluoreszenz ist.
16. Vorrichtung zur Diagnostizierung einer neurodegenerativen Erkrankung in einem Säuger, die
  - (i) Mittel zur Applikation von Strahlung auf Hirngewebe eines Säugers unter Bedingungen, die zur Förderung einer gleichzeitigen Mehrphotonenanregung des Hirngewebes und zur Emission einer Fluoreszenzcharakteristik wirksam sind, und
  - (ii) Mittel zur Sammlung und/oder Detektion der Fluoreszenzcharakteristik und
  - (iii) Mittel zum Vergleich einer detektierten Fluoreszenzcharakteristik mit einer Standardfluoreszenzcharakteristik, die von gesundem Hirngewebe des Säugers unter den gleichen Bedingungen emittiert wird, umfasst.
17. Vorrichtung nach Anspruch 16, wobei das Mittel zur Applikation von Strahlung einen Laser umfasst.
18. Vorrichtung nach Anspruch 17, wobei der Laser ein Modelock-Laser ist.
19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 18, wobei die Strahlung gepulst ist.
20. Vorrichtung nach Anspruch 19, wobei die Strahlung mit einer Pulsbreite zwischen etwa  $10^{-9}$  bis  $10^{-15}$  s gepulst ist.
21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 20, wobei das Mittel zur Detektion der Fluoreszenzcharakteristik eine optische Faser umfasst.
22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 21, wobei die Fluoreszenzcharakteristik eine Autofluoreszenzcharakteristik ist.
23. Kit, das die Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 22 und mindestens ein photoaktives Mittel umfasst.
24. Verwendung eines photoaktiven Mittels bei der Herstellung einer Zusammensetzung zur Verwendung in einem Verfahren zur Detektion einer neurodegenerativen Erkrankung bei einem Säuger, wobei das Verfahren das Aktivieren von Hirngewebe des Säugers durch Applikation von Strahlung unter Bedingungen, die zur Förderung einer gleichzeitigen Mehrphotonenanregung des Gehirngewebes und zur Emission einer Fluoreszenzcharakteristik wirksam sind, das Vergleichen der Fluoreszenzcharakteristik mit einer Standardfluoreszenz, die durch Anregung von gesundem Hirngewebe des Säugers unter den gleichen Bedingungen, die zur Durchführung der Aktivierung verwendet wurden, emittiert wurde, und das Identifizieren des Hirngewebes, wo die Fluoreszenzcharakteristik von der Standardfluoreszenz verschieden ist, als potentiell eines, das eine neu-

rodegenerative Erkrankung aufweist, umfasst.

25. Verwendung einer Vorrichtung, die

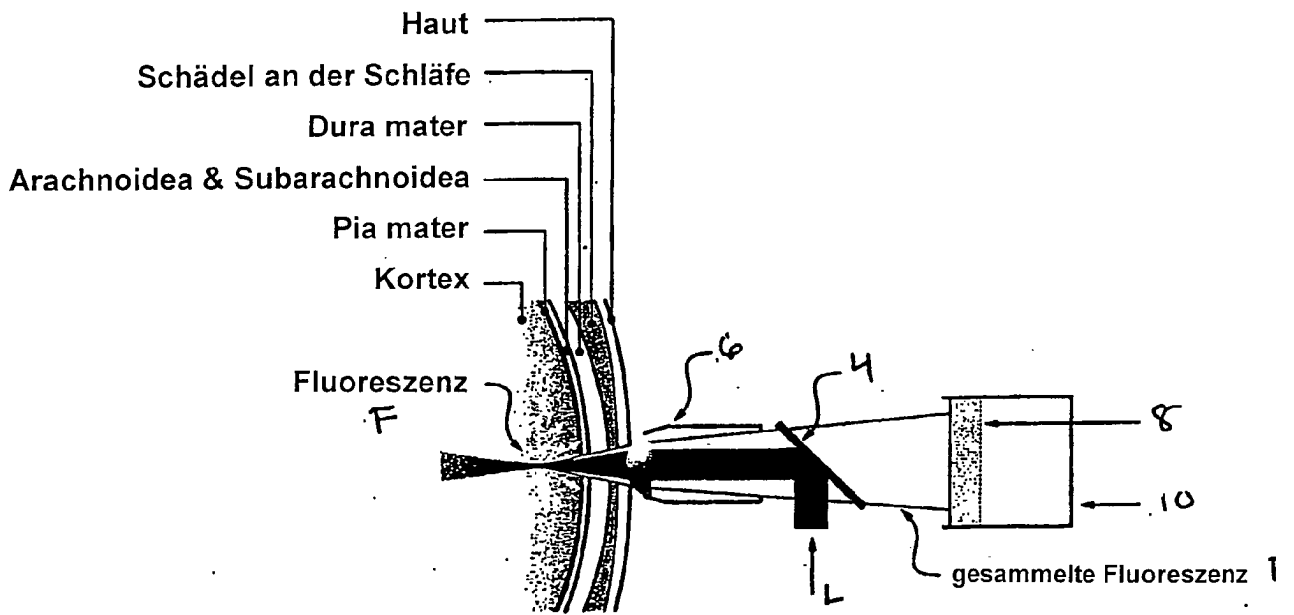
- (i) Mittel zur Applikation von Strahlung auf Hirngewebe eines Säugers unter Bedingungen, die zur Förderung einer gleichzeitigen Mehrphotonenanregung des Hirngewebes und zum Hervorrufen einer Fluoreszenz wirksam sind, und
- (ii) Mittel zum Sammeln der Fluoreszenz zum Erstellen eines Bildes des Hirngewebes umfasst, um ein Bild des Hirngewebes eines Säugers zu erstellen.

Es folgen 26 Blatt Zeichnungen

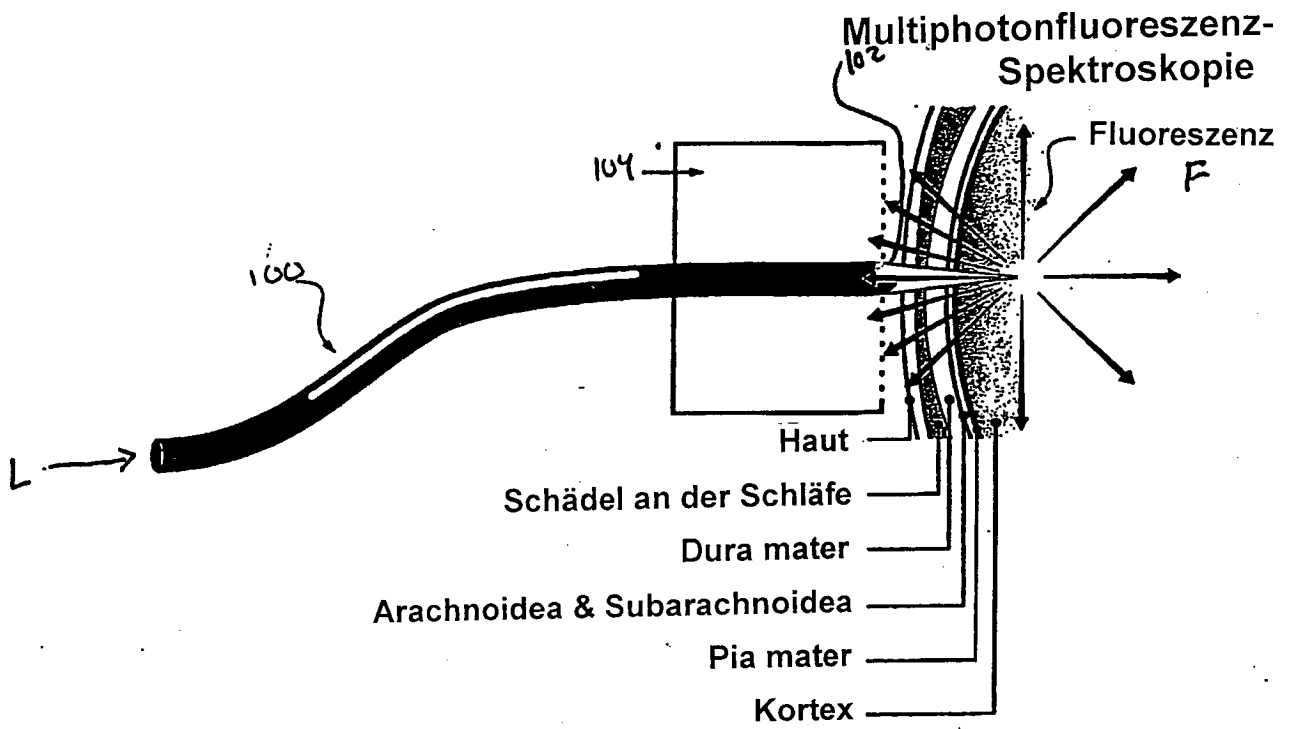


**FIGUR 1A**

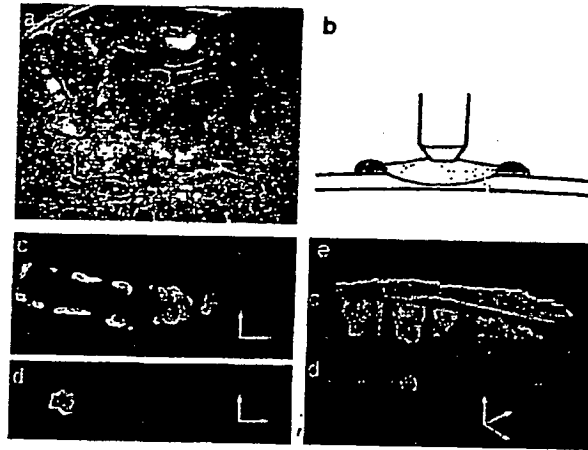
Bildgebung



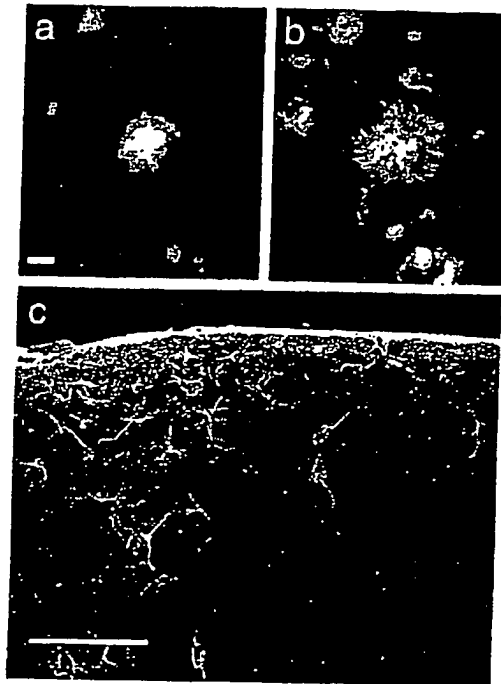
FIGUR 1B



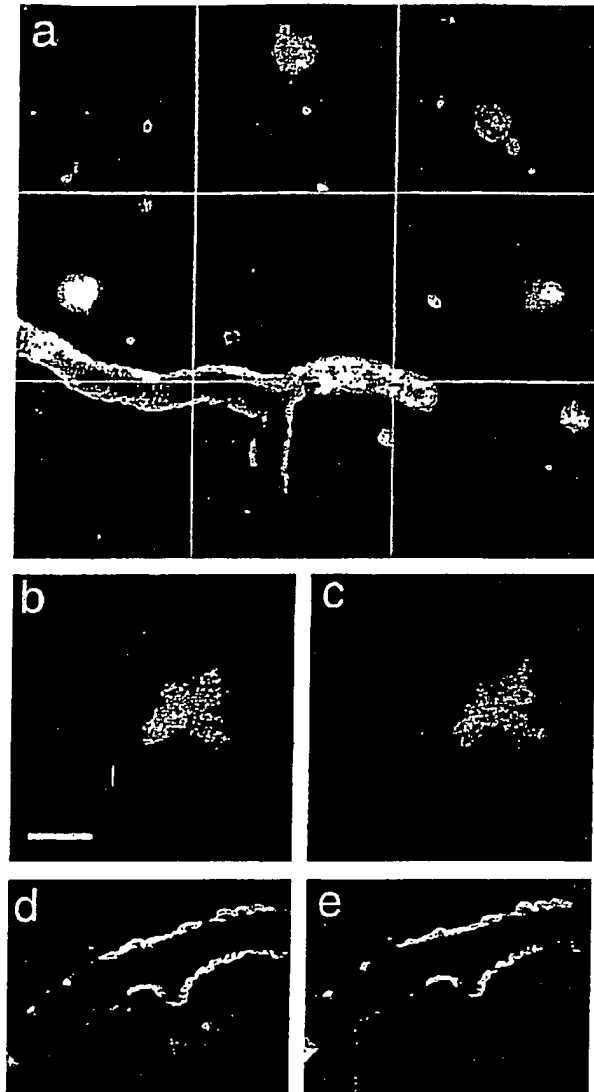
FIGUR 1C



FIGUREN 2A-E

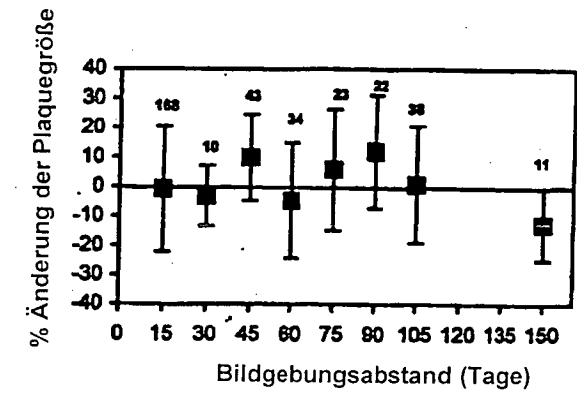


FIGUREN 3A-C

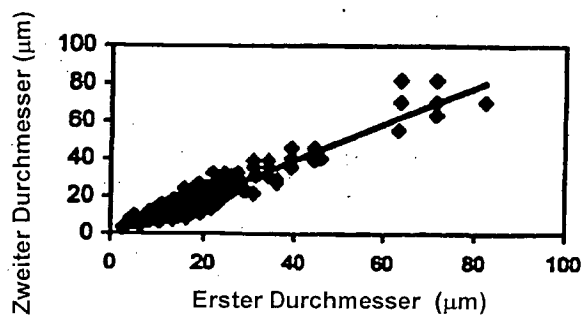


FIGUREN 4A-E



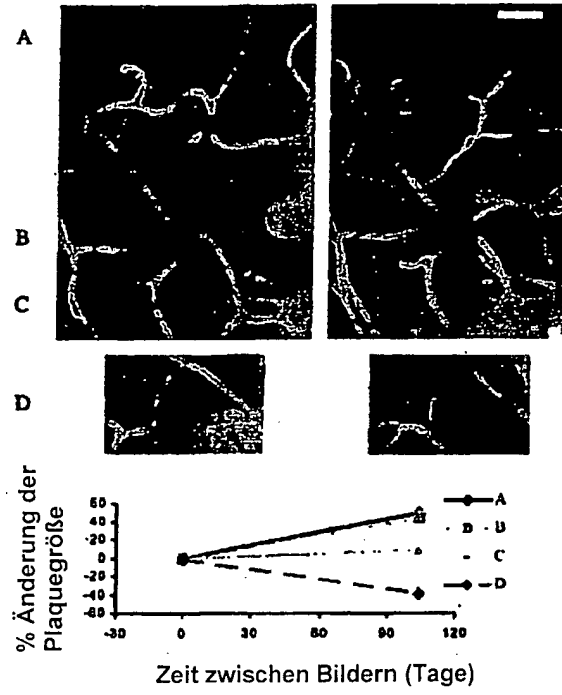


A

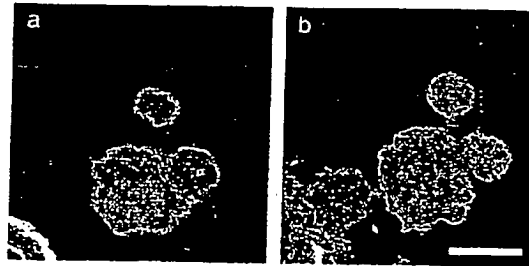


B

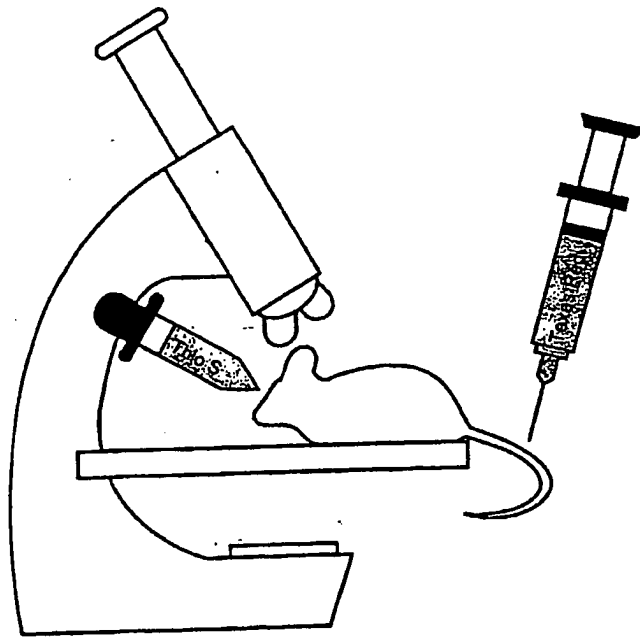
FIGUREN 5A-B



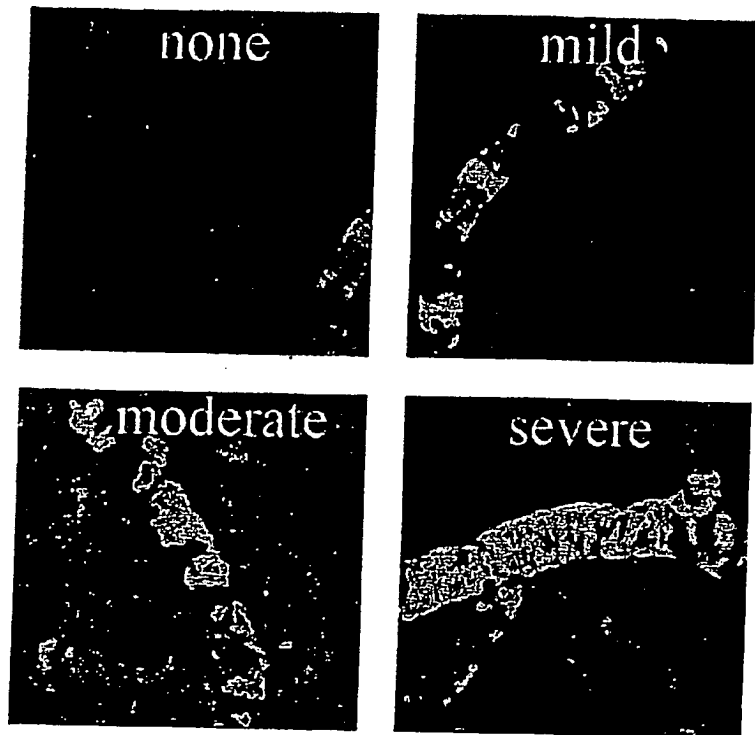
**FIGUR 6**



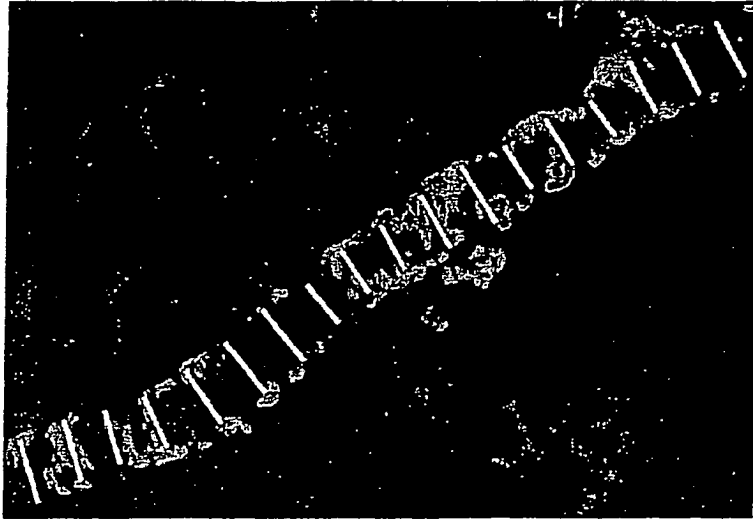
FIGUREN 7A-B



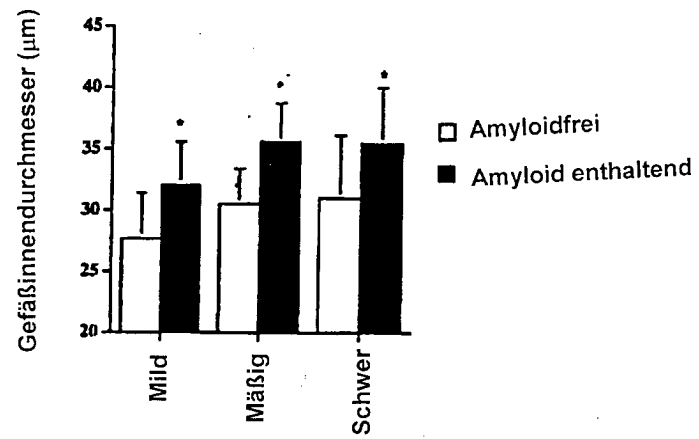
**FIGUR 8**



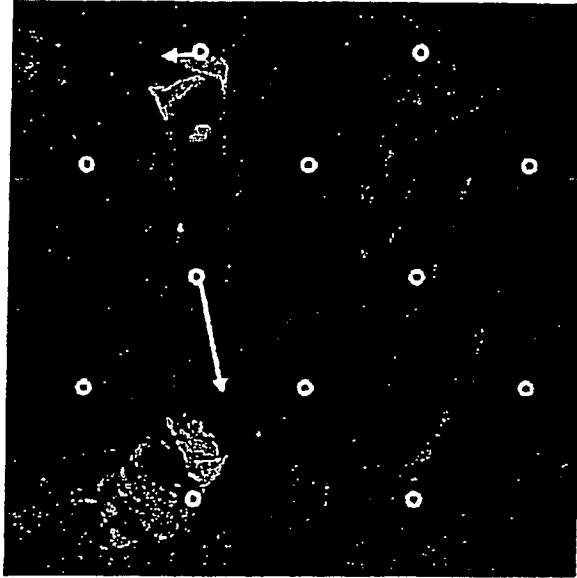
**FIGUR 9**



**FIGUR 10**

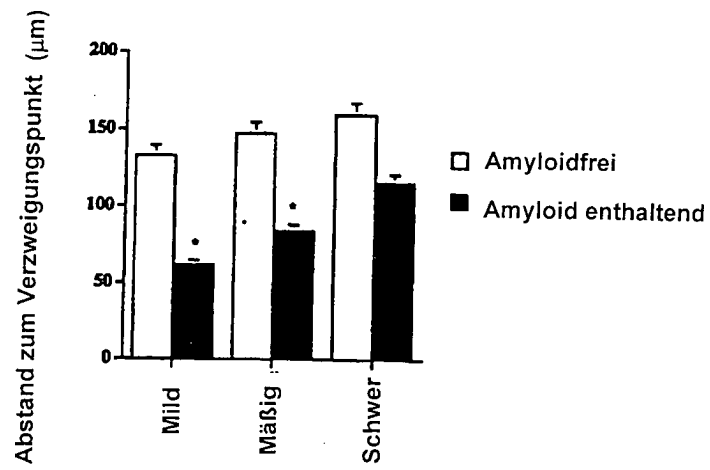


**FIGUR 11**

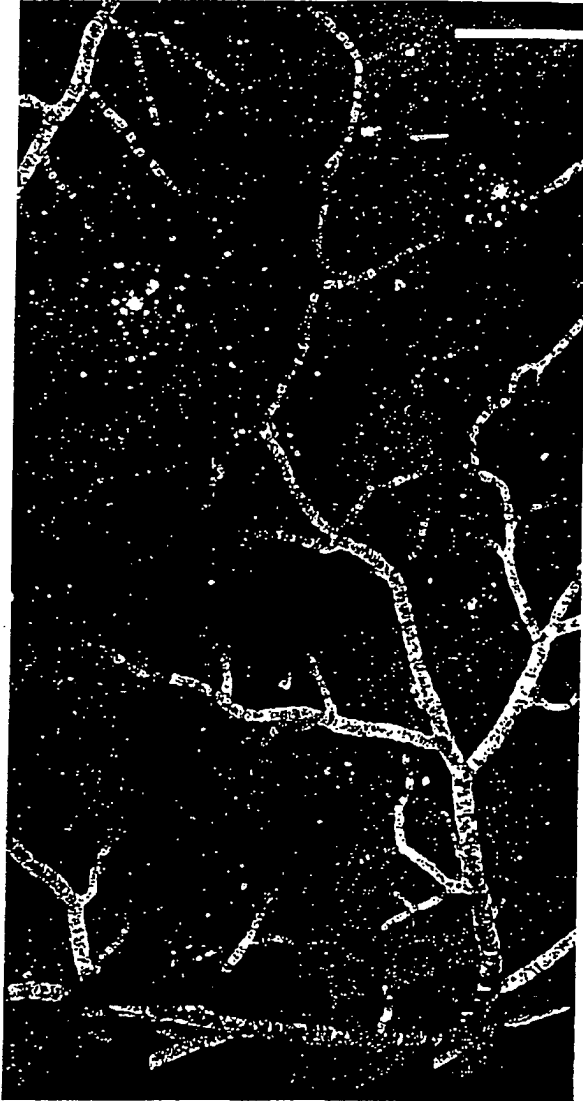


**FIGUR. 12**

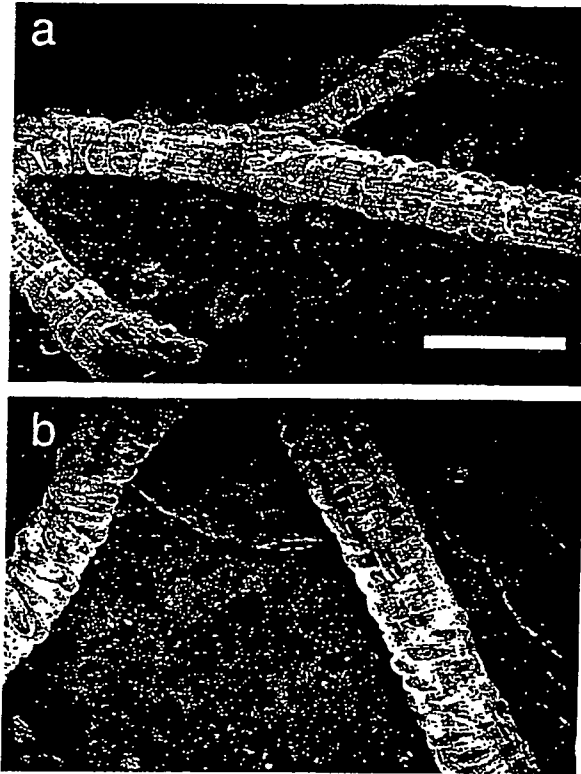




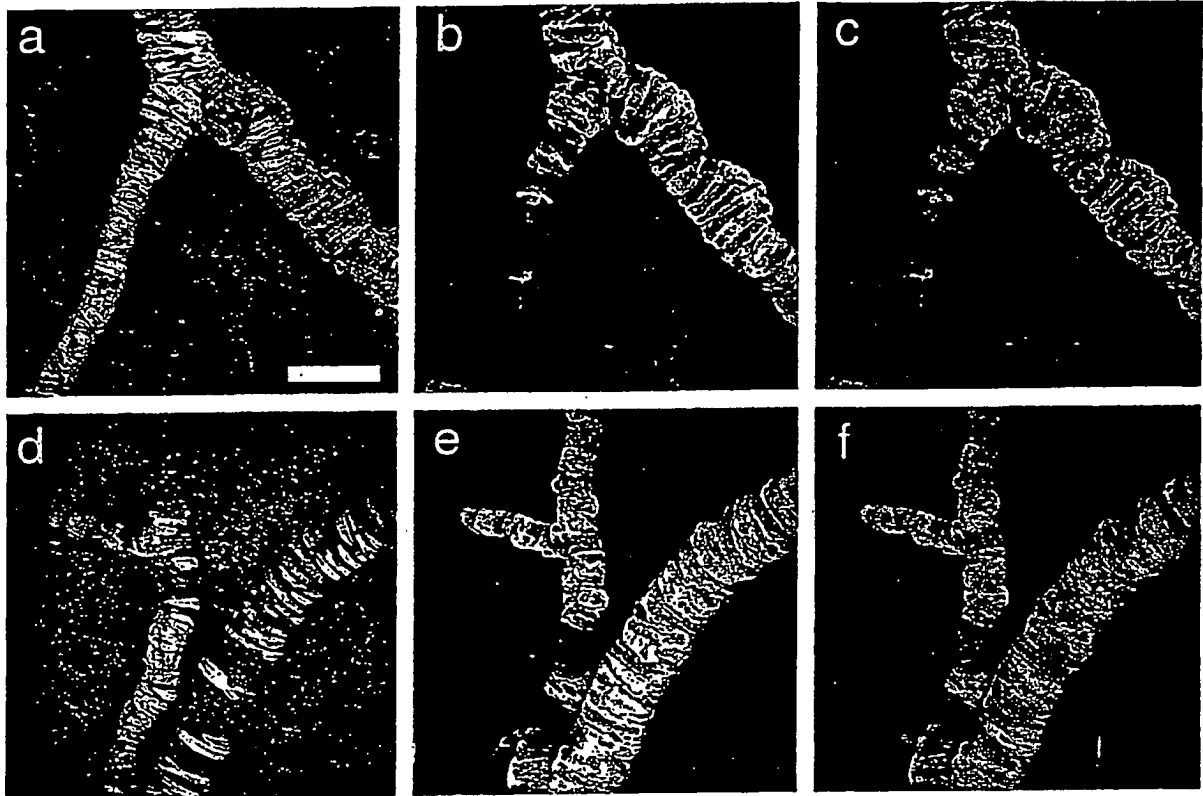
**FIGUR 13**



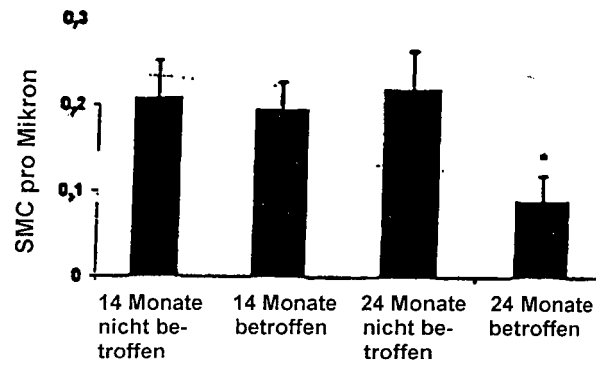
**FIGUR 14**



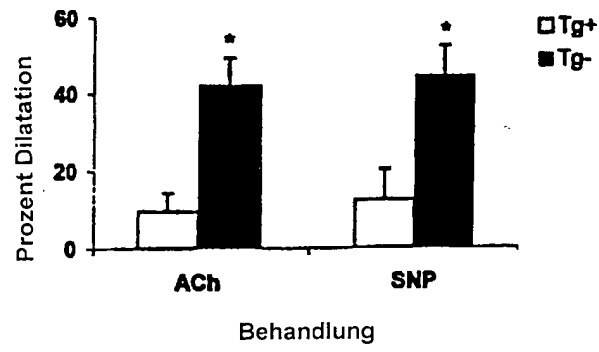
**FIGUREN 15A-B**



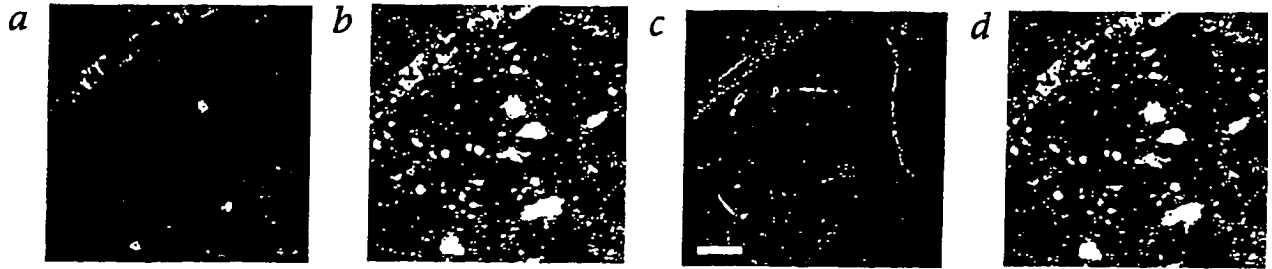
**FIGUREN 16A-F**



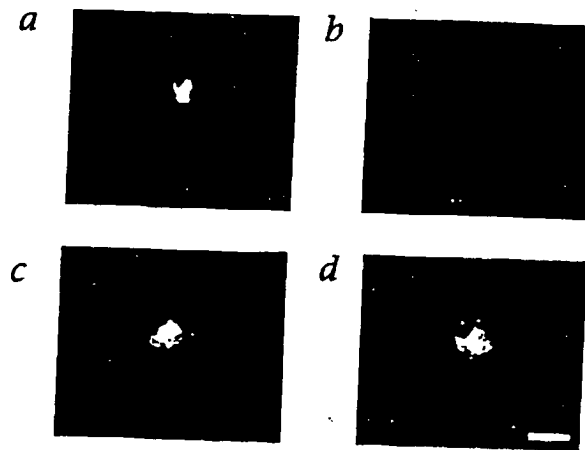
**FIGUR 17**



**FIGUR 18**

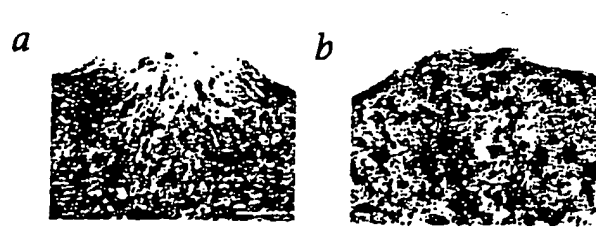


**FIGURE 19A-D**

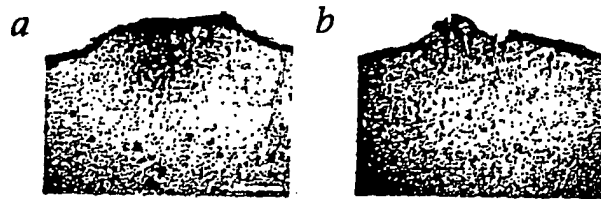


**FIGUREN 20A-D**

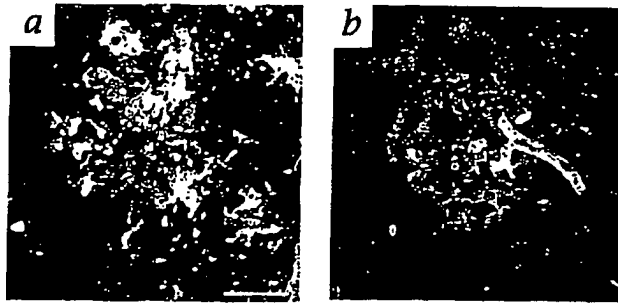




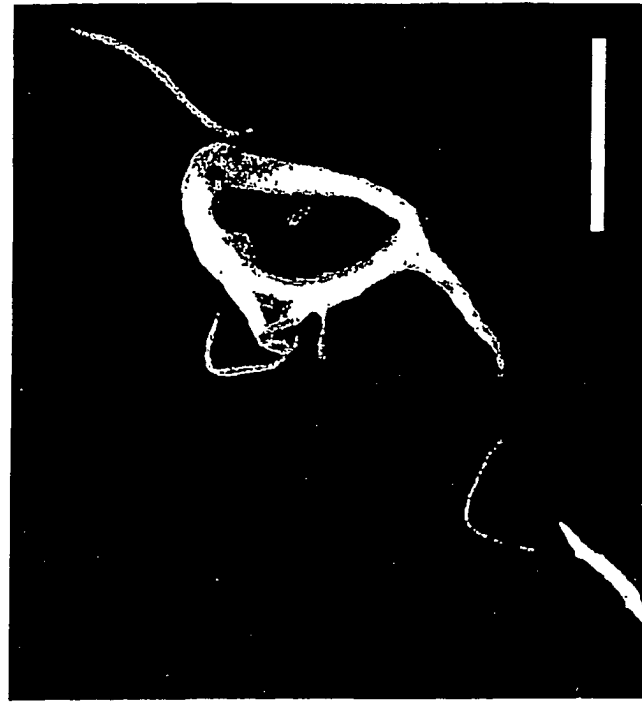
**FIGUREN 21A-B**



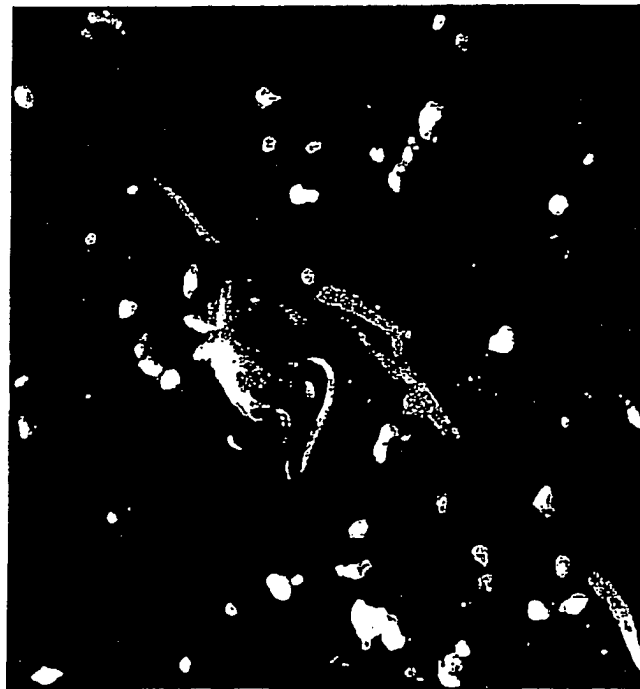
**FIGUREN 22A-B**



**FIGUREN 23A-B**



PHF-tau



Autofluoreszenz

B

A

FIGUREN 24A-B