



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02810291.6

[43] 公开日 2005年2月9日

[11] 公开号 CN 1578910A

[22] 申请日 2002.3.20 [21] 申请号 02810291.6

[30] 优先权

[32] 2001. 3.20 [33] GB [31] 0106953.3

[86] 国际申请 PCT/GB2002/001318 2002. 3. 20

[87] 国际公布 WO2002/075318 英 2002. 9. 26

[85] 进入国家阶段日期 2003. 11. 20

[71] 申请人 阿伯丁大学理事会

地址 英国苏格兰阿伯丁

[72] 发明人 克劳德·M·维希克

查尔斯·R·哈林顿

珍妮特·E·里卡德 戴维·霍斯利

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 张平元 赵仁临

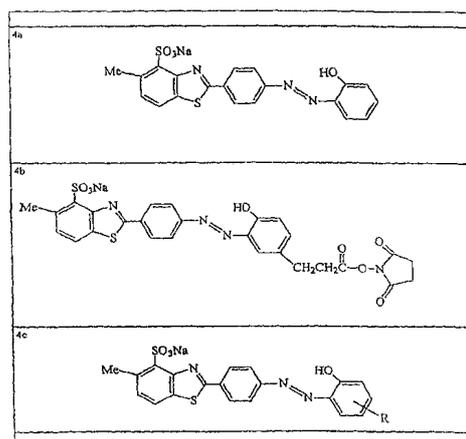
权利要求书 23 页 说明书 55 页 附图 54 页

[54] 发明名称 神经原纤维标记物

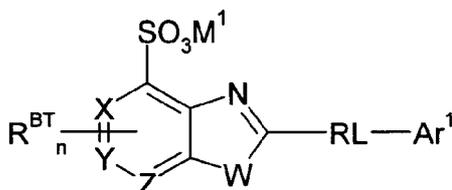
[57] 摘要

本发明公开了与 τ 蛋白疾病关联的神经原纤维变性分期的测定方法，其用于据信罹患疾病的患者，该方法包括如下步骤：(i) 将能标记聚集成对螺旋丝(PHF) τ 蛋白的配体引入研究对象，(ii) 测定研究对象脑中颞叶处与细胞外聚集 PHF τ 相结合的配体的存在及/或其量，(iii) 将(ii)中测定的结果与研究对象神经原纤维变性的程度进行关联。本方法可用于诸如阿尔茨海默病(AD)的前期诊断及分期。优选的配体包括磺化苯并噻唑类及二氨基吩噻嗪类化合物。也提供了新型配体(如磺化苯并噻唑类)。本方法也可包括使用“阻断配体”以阻断竞争位点。本发明的其它方面提供了能够识别可标记聚集 PHF τ 蛋白配体的体外方法，其包括以下步骤：(i) 提供第一种怀疑能够标记聚集 PHF τ 蛋白的试剂，(ii) 将(a)包含 τ 核心片段的 τ 蛋白或其衍生物，其与固相结合以显露其高亲和力的 τ

捕获位点，与(b)液相 τ 蛋白或其衍生物，其可与固相 τ 蛋白或其衍生物相结合，(c)所述已选择的第一种试剂以及(d)已知的第二种 τ - τ 结合抑制剂的试剂相接触，(iii)选择第一种试剂，其全面或部分地解除抑制剂(d)对(b)液相 τ 蛋白或其衍生物对(a)固相 τ 蛋白或其衍生物结合的抑制。配体可经测试以确定其不是自身抑制剂。



1. 一种判断据信罹患 τ 蛋白疾病患者中该疾病关联的神经原纤维变性分期的方法，该方法包括如下步骤：
- 5 (i) 将能标记聚集的成对螺旋丝状(PHF) τ 蛋白配体引入患者；
(ii) 测定患者脑中颞叶处与细胞外聚集的 PHF τ 相结合的配体的存在及/或其量，
(iii) 将(ii)中测定的结果与患者神经原纤维变性的程度进行关联。
2. 权利要求 1 所述的方法，其中，步骤(ii)中的测定用于确定配体结合
- 10 密度。
3. 权利要求 1 或权利要求 2 所述的方法，其中，步骤(iii)中的关联参考过去的数据进行。
4. 前述权利要求中任何一项所述的方法，其中， τ 蛋白疾病为阿尔茨海默病(AD)。
- 15 5. 权利要求 4 所述的方法，其中，神经原纤维变性的程度与根据图 2c 所述的层次系统的 AD 进程神经病理学分期有关。
6. 前述权利要求中任何一项所述的方法，其中，配体能穿过血脑屏障。
7. 前述权利要求中任何一项所述的方法，其中，配体与可检测基团偶联、螯合或以其它方式相结合。
- 20 8. 权利要求 7 所述的方法，其中，配体经标记供 SPECT 检测，不被胞内所吸收。
9. 权利要求 8 所述的方法，其中，配体包含镓螯合基团。
10. 权利要求 7 所述的方法，其中，配体经标记供 PET 检测。
11. 权利要求 10 所述的方法，其中，配体包含发射正电子的碳原子，
- 25 任选掺入到存在于配体的甲基。
12. 前述权利要求中任何一项所述的方法，其中，配体为具有下式结构的化合物：



其中:

W 为 S、O 或 NH;

X、Y 及 Z 之一为 CH 或 N;

5 X、Y 及 Z 中其它的为 CH;

M^1 为选自 Li、Na、K 或 Cs 的碱金属阳离子;

RL 为刚性连接基团;

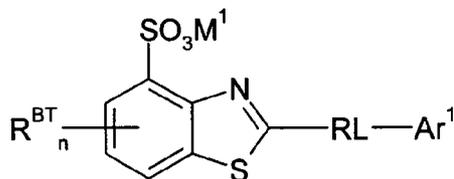
Ar^1 为 C_{5-20} 芳基;

n 为 0~3 的整数; 并且,

10 每个 R^{BT} 独立地为核心取代基。

13. 权利要求 12 所述的方法, 其中, 各 X、Y 及 Z 为 CH。

14. 权利要求 13 所述的方法, 其中配体为下式化合物



其中:

15 M^1 为选自 Li、Na、K 或 Cs 的碱金属阳离子;

RL 为刚性连接基团;

Ar^1 为 C_{5-20} 芳基;

n 为 0~3 的整数; 并且

每个 R^{BT} 独立地为苯并噻唑取代基。

20 15. 权利要求 12~14 中任何一项所述的方法, 其中, 每个刚性基团 RL 及芳基 Ar^1 基本上是平面的。

16. 权利要求 12~15 中任何一项所述的方法, 其中, 刚性连接基团 RL, 芳基 Ar^1 与核心基团共同形成基本上也是共平面的化合物。

25 17. 权利要求 12~16 中任何一项所述的方法, 其中, 扭曲程度不超过图 16 化合物的扭曲度数。

18. 权利要求 12~17 中任何一项所述的方法, 其中, 化合物长度为约 14.7AU~15.3AU。

19. 权利要求 12~18 中任何一项所述的方法, 其中, 每个 R^{BT} 独立地为 C_{1-4} 烷基、羟基、 C_{1-4} 烷氧基、硝基、卤素或氨基。

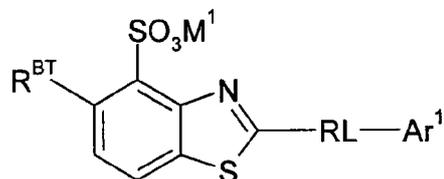
20. 权利要求 19 所述的方法, 其中, 每个 R^{BT} 独立地为 -Me、-Et、-nPr、-iPr、-OH、-OMe、-OEt、-O (nPr)、-O (iPr)、-NO₂、-CN、-F、-Cl、-Br、-I、-NH₂、-NH₂、-NHMe、-NHEt、-NH (iPr)、-NH (nPr)、-NMe₂、-NEt₂、N(iPr)₂ 或 -N(nPr)₂。

5 21. 权利要求 19 所述的方法, 其中, 每个 R^{BT} 独立地为 C₁₋₄ 烷基。

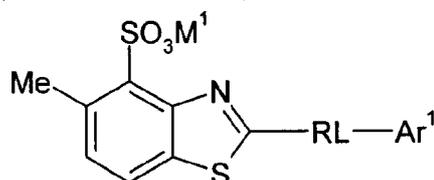
22. 权利要求 19~21 中任何一项所述的方法, 其中, n 为 1 及 R^{BT} 独立地为 -Me、-Et、-nPr 或 -iPr。

23. 权利要求 12~22 中任何一项所述的方法, 其中, 配体具有下式结构:

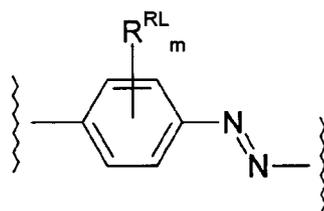
10



24. 权利要求 23 所述的方法, 其中, 配体具有下式结构:



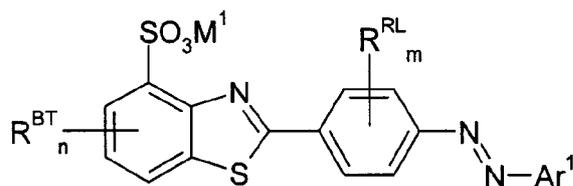
15 25. 权利要求 12~24 中任何一项所述的方法, 其中, RL 为具有下式结构的基团:



其中:

m 为 0~4 的整数, 及

20 每个 R^{RL} 独立地为刚性连接基芳基取代基, 并且配体具有下式结构:

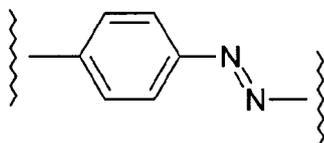


26. 权利要求 25 所述的方法, 其中, 每个 R^{RL} 独立地为 C_{1-4} 烷基、羟基、 C_{1-4} 烷氧基、硝基、氰基、卤素及氨基。

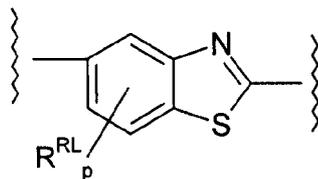
27. 权利要求 26 所述的方法, 其中每个 R^{RL} 独立地为 -Me、-Et、-nPr、
5 -iPr、-OH、-OMe、-OEt、-O(nPr)、-O(iPr)、-NO₂、-CN、-F、-Cl、-Br、-I、
-NH₂、-NHMe、-NHEt、-NH(iPr)、-NH(nPr)、-NMe₂、-NEt₂、N(iPr)₂
或 -N(nPr)₂。

28. 权利要求 26 所述的方法, 其中, 每个 R^{RL} 独立地为 C_{1-4} 烷基。

29. 权利要求 1~24 中任何一项所述的方法, 其中, RL 为具有下式结
10 构的基团:



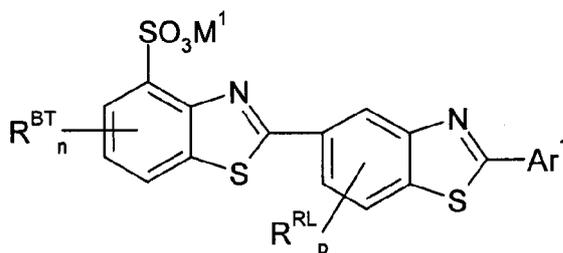
30. 权利要求 1~24 中任何一项所述的方法, 其中, RL 为具有下式结
构的基团:



15 其中:

p 为 0~3 的整数, 并且

每个 R^{RL} 独立地为刚性连接基芳基取代基, 并且化合物具有下式结构:



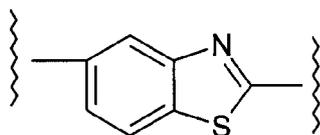
20

31. 权利要求 31 所述的方法, 其中, 每个 R^{RL} 独立地为 C_{1-4} 烷基、羟基、 C_{1-4} 烷氧基、硝基、氰基、卤素或氨基。

32. 权利要求 31 所述的方法, 其中, 每个 R^{RL} 独立地为 -Me、-Et、-nPr、-iPr、-OH、-OMe、-OEt、-O(nPr)、O(iPr)、-NO₂、-CN、-F、-Cl、-Br、-I、-NH₂、-NH₂、-NHMe、-NHEt、-NH(iPr)、-NH(nPr)、-NMe₂、-NEt₂、N(iPr)₂ 或 -N(nPr)₂。

5 33. 权利要求 31 所述的方法, 其中, 每个 R^{RL} 独立地为 C₁₋₄ 烷基。

34. 权利要求 12~24 及 30~33 中任何一项所述的方法, 其中, RL 为具有下式结构的基团:



10

35. 权利要求 12~34 中任何一项所述的方法, 其中, Ar¹ 选自衍生自苯(C₆)、萘(C₁₀)、蒽(C₁₄)、菲(C₁₄)、并四苯(C₁₈)、芘(C₁₆)的基团。

36. 权利要求 12~34 中任何一项所述的方法, 其中, Ar¹ 选自:

15 C₅ 杂芳基, 其衍生自呋喃(oxole)、噻吩(thiole)、吡咯(azole)、咪唑(1,3-二唑)、吡唑(1,2-二唑)、三唑、噁唑、异噁唑、噻唑、异噻唑、噁二唑及噁三唑; 以及

C₆ 杂芳基, 其衍生自异噁嗪、吡啶(吡嗪)、哒嗪(1,2-二嗪)、嘧啶(1,3-二嗪)、吡嗪(1,4-二嗪)、三嗪、四唑及噁二唑(呋唑)。

37. 权利要求 12~34 中任何一项所述的方法, 其中, Ar¹ 为选自:

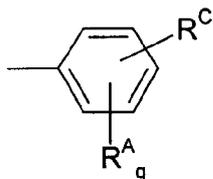
20 C₉ 杂环基团, 其衍生自苯并呋喃、异苯并呋喃、吲哚、异吲哚、嘌呤、苯并咪唑;

C₁₀ 杂环基团, 其衍生自喹啉、异喹啉、苯并二嗪、吡啶并吡啶、喹喔啉;

C₁₃ 杂环基团, 其衍生自咔唑; 以及

25 C₁₄ 杂环基团, 其衍生自吡啶、占吨、phenoxathiin、吩嗪、吩噁嗪及吩噻嗪。

38. 权利要求 35 所述的方法, 其中, Ar¹ 为含有苯核的芳基, 并具有下式结构:



其中

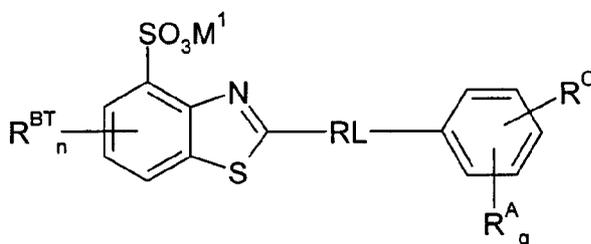
q 为 0~5 整数; 以及

每个 R^A 独立地为芳基取代基;

5 R^C , 如果存在, 为具有反应活性的偶联取代基, 或

R^C 为, 或包含可检测的标记;

并且该化合物具有具有下式结构:



10

39. 权利要求 38 所述的方法, 其中, R^C 如果存在, 并为具有反应活性的偶联取代基, 以及 R^C 为, 或包含活性官能团, 其可与另一分子通过化学反应在两者间形成共价键与之相连接。

40. 权利要求 39 所述的方法, 其中, R^C 存在, 并为或包含活泼酯。

15 41. 权利要求 40 所述的方法, 其中, R^C 存在, 并为或包含琥珀酰亚胺基酯。

42. 权利要求 39 所述的方法, 其中, R^C 存在, 为具有反应活性的偶联取代基, 并为或包含, 适合以强非共价相互作用与另一分子相连接的基团。

43. 权利要求 42 所述的方法, 其中, R^C 存在, 并为或包含生物素。

20 44. 权利要求 39 所述的方法, 其中, R^C 存在, 并为具有反应活性的连接取代基, 并为或包含, 适合以形成复合物或螯合物与另一分子相连接的基团。

45. 权利要求 44 所述的方法, 其中, R^C 存在, 并为或包含镆螯合基团。

25 46. 权利要求 45 所述的方法, 其中, R^C 存在, 并为或包含二亚乙基三胺五乙酸。

47. 权利要求 38 所述的方法, 其中, R^C 存在, 为或包含可检测标记。

48. 权利要求 47 所述的方法, 其中, R^C 存在, 为或包含染料、荧光标记物、抗原基团、稳定及不稳定同位素或发射正电子的碳原子。

49. 权利要求 48 所述的方法, 其中, R^C 存在, 为或包含 ^{18}F 。

5 50. 权利要求 48 所述的方法, 其中, R^C 存在, 为或包含发射正电子的碳原子。

51. 权利要求 38 ~ 50 中任何一项所述的方法, 其中, 每个 R^A 独立地选自:

-OH、-NH₂、-NHR¹、-NR¹R²、-SO₃M² 及 C₁₋₄ 烷基;

10 其中:

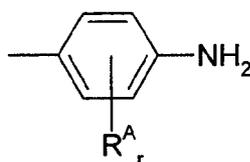
R¹ 及 R² 各为 C₁₋₄ 烷基, 以及

M² 为选自 Li、Na、K、或 Cs 的碱金属阳离子。

52. 权利要求 51 所述的方法, 其中, 至少一个 R^A 为 -OH 或 -NH₂。

53. 权利要求 52 所述的方法, 其中, Ar¹ 为含有氨基取代的苯核的芳基,

15 其具有下式结构:



其中

r 为 0 ~ 4 的整数, 并且

每个 R^A 独立地为芳基取代基。

20 54. 权利要求 53 所述的方法, 其中, 每个 R^A 独立地选自:

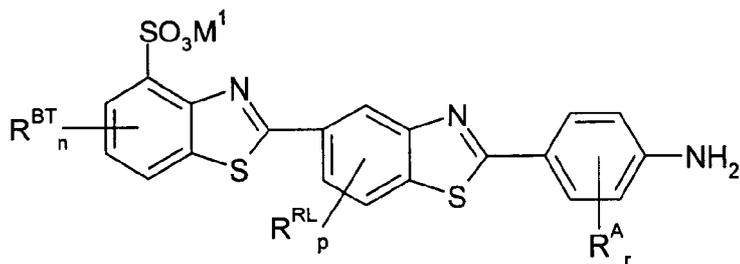
-OH、-NH₂、-NHR¹、-NR¹R²、-SO₃M² 及 C₁₋₄ 烷基;

其中:

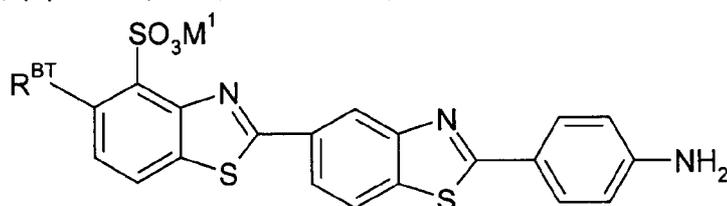
R¹ 及 R² 各为 C₁₋₄ 烷基, 以及

M² 为选自 Li、Na、K、或 Cs 的碱金属阳离子。

25 55. 权利要求 54 所述的方法, 其中, 所述配体具有下式结构:

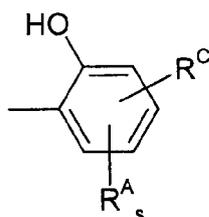


56. 权利要求 55 所述的方法，其中，所述配体具有下式结构：



5

57. 权利要求 52 所述的方法，其中， Ar^1 为含有羟基取代的苯核的芳基，并具有下式结构：



其中：

10 s 为 0~4 的整数，以及

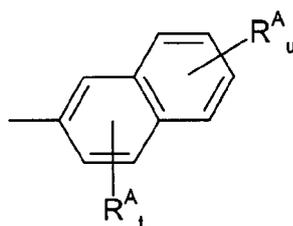
每个 R^A 独立地为上述芳基取代基，以及

R^C 如果存在，其为具有反应活性的偶联取代基，或

R^C 为或包含，可检测的标记。

15 58. 权利要求 57 所述的方法，其中，配体如权利要求 108 ~ 150 中任何一项所定义。

59. 权利要求 35 所述的方法，其中， Ar^1 为具有萘核的芳基，并具有下式结构：



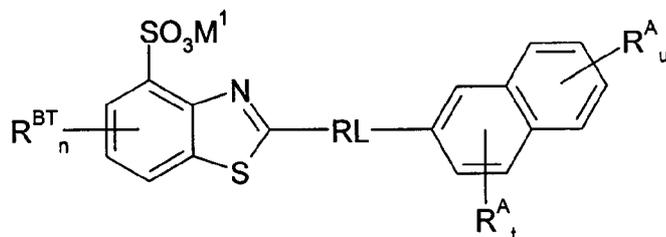
其中:

t 为 0~3 的整数,

u 为 0~4 的整数, 以及

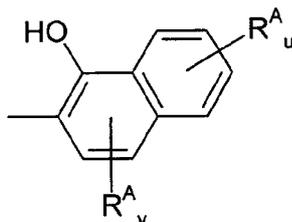
每个 R^A 独立地为芳基取代基, 并且所述化合物具有下式结构:

5



60. 权利要求 59 所述的方法, 其中, Ar^1 为含有羟基取代的萘核的芳基, 并具有下式结构:

10



其中:

v 为 0~2 的整数,

u 为 0~4 的整数, 以及

15 每个 R^A 独立地为芳基取代基。

61. 如权利要求 59 或权利要求 60 所述的方法, 其中, 每个 R^A 独立地选自:

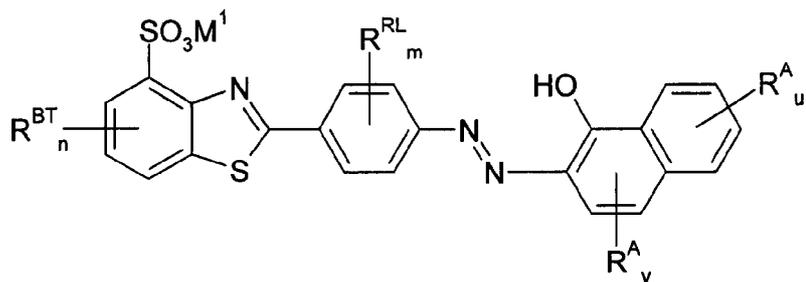
-OH、-NH₂、-NHR¹、-NR¹R²、-SO₃M² 及 C₁₋₄ 烷基;

其中:

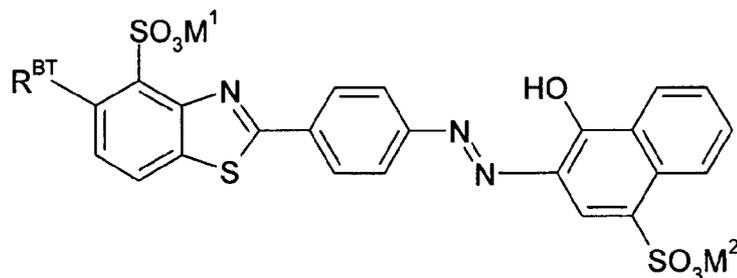
20 R¹ 及 R² 各为 C₁₋₄ 烷基, 以及

M² 为选自 Li、Na、K、或 Cs 的碱金属阳离子。

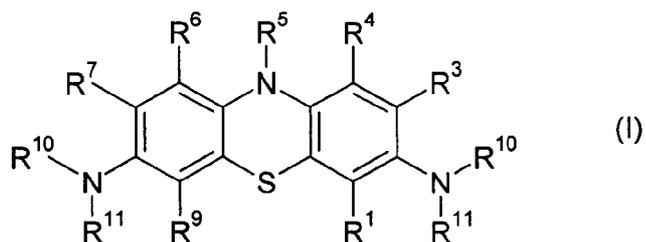
62. 权利要求 61 所述的方法, 其中, 所述配体具有下式结构:



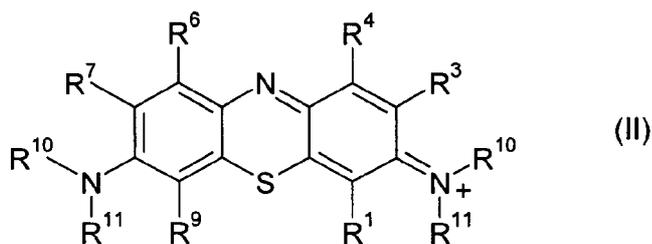
63. 权利要求 62 所述的方法，其中，所述配体具有下式结构：



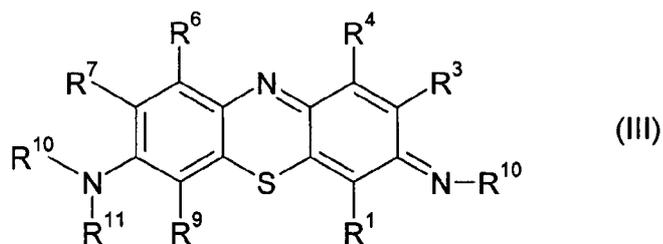
64. 权利要求 1~11 中任何一项所述的方法，其中，所述配体为具有下述结构之一的化合物：



(I)

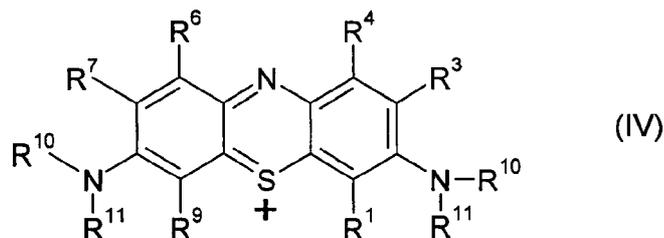


(II)



(III)

10



其中：

各 R^1 、 R^3 、 R^4 、 R^6 、 R^7 及 R^9 独立地为氢原子、卤素、羟基、羧基、取代或未取代烷基、卤代烷基或烷氧基；

- 5 R^5 独立地为氢原子、羟基、羧基、取代或未取代烷基、卤代烷基、或烷氧基；

R^{10} 及 R^{11} 独立地选自氢原子、羟基、羧基、取代或未取代烷基、卤代烷基或烷氧基；

或其药学上可接受的盐。

- 10 65. 权利要求 64 所述的方法，其中：

R^1 、 R^3 、 R^4 、 R^6 、 R^7 及 R^9 独立地为氢原子、卤素、羟基、羧基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基、 C_{1-4} 卤代烷基或 C_{1-6} 烷氧基；

R^5 独立地为氢原子、羟基、羧基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基、 C_{1-4} 卤代烷基或 C_{1-6} 烷氧基；

- 15 R^{10} 及 R^{11} 独立地选自氢原子、羟基、羧基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基、 C_{1-4} 卤代烷基或 C_{1-6} 烷氧基；

66. 权利要求 65 所述的方法，其中，所述 C_{1-6} 烷基选自甲基、乙基、正丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、异戊基、叔戊基、己基、异己基。

- 20 67. 权利要求 65 或权利要求 66 所述的方法，其中，所述的取代 C_{1-6} 烷基的取代基选自：巯基、硫醚、硝基、氨基、芳氧基、卤素、羟基、羧基、 C_{5-20} 芳基、 C_{1-6} 环烷基及非芳基 C_{3-20} 杂环基。

- 25 68. 权利要求 65 ~ 67 中任何一项所述的方法，其中，所述 C_{1-4} 卤代烷基选自氯甲基、2-溴甲基、1-氯异丙基、3-氟丙基、2,3-二溴丁基、3-氯异丁基、碘代叔丁基、三氟甲基。

69. 权利要求 64 ~ 68 中任何一项所述的方法，其中，配体为权利要求述及的化合物与酸形成的酸加成盐。

70. 权利要求 69 所述的方法，其中，所述的酸为无机酸或有机酸。

71. 权利要求 70 所述的方法, 其中, 所述的配体为氯化物盐。

72. 权利要求 70 所述的方法, 其中, 所述的有机酸选自乙酸、柠檬酸、马来酸、富马酸、酒石酸, 甲磺酸以及对甲苯磺酸。

73. 权利要求 64 ~ 72 中任何一项所述的方法, 其中:

5 R_1 、 R_3 、 R_4 、 R_6 、 R_7 及 R_9 独立地为 -H、-CH₃、-C₂H₅ 或 -C₃H₇ ;

R_{10} 及 R_{11} 独立地为 -H、-CH₃、-C₂H₅ 或 -C₃H₇;

R_5 独立地为 -H、-CH₃、-C₂H₅ 或 -C₃H₇。

74. 权利要求 73 所述的方法, 其中配体如图 8b 所示。

75. 权利要求 64 ~ 74 中任何一项所述的方法, 其中配体包含发射正电
10 子的碳。

76. 前述权利要求中任何一项所述的方法, 其中(ii) 进一步包括附加的测定步骤, 即测定位于受试对象大脑新皮质结构中 与细胞内聚集 τ 结合的配体存在及/或其量。

77. 权利要求 76 所述的方法, 其中, 用于与中颞叶处胞外聚集 PHF τ
15 及大脑新皮质结构处胞内聚集 PHF τ 结合的配体进行明显不同地标记。

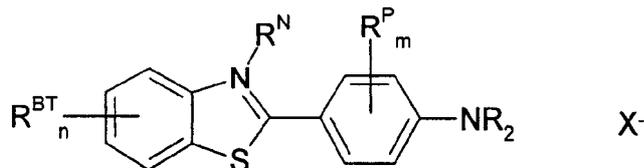
78. 权利要求 76 或权利要求 77 所述的方法, 其中, 用于与胞内聚集 τ 结合的配体为权利要求 64 ~ 75 中任何一项所述的配体。

79. 前述权利要求中任何一项所述的方法, 其中, 关于位于大脑相关区域的竞争结合位点, 配体优先结合聚集 PHF τ 。

80. 前述权利要求中任何一项所述的方法, 其中, 方法的步骤(i)和/或(ii) 与另一步骤一起进行, 该步骤向患者引入另一种阻断配体, 该配体标记位于脑相关区域竞争结合位点, 所述结合位点与该配体的结合优于与用来结合聚集 PHF τ 的配体的结合。

81. 权利要求 80 所述的方法, 其中, 阻断配体为 [¹⁸F] FDDNP。

25 82. 权利要求 80 所述的方法, 其中, 阻断配体为具有下式结构的苯并噻唑:



其中:

n 为 0 ~ 4 的整数;

- 每个 R^{BT} 独立地为阻断配体苯并噻唑取代基；
m 为 0~4 的整数；
每个 R^P 独立地为亚苯基取代基；
每个 R 独立地为氢或氨基取代基； 以及
- 5 或者：
 R^N 及 X 不存在，以及关联的(三级)氮原子为中性；
或者：
 R^N 为苯并噻唑取代基，且关联的(四级)氮原子带正电荷，X 为反离子。
83. 权利要求 80 所述的方法，其中，阻断配体为硫黄素-T。
- 10 84. 权利要求 82 所述的方法，其中，每个 R^{BT} 独立地为 C_{1-4} 烷基、 $-SO_3H$ 或 $-SO_3M^3$ ，其中 M^3 为阳离子。
85. 权利要求 84 所述的方法，其中， M^3 为选自 Li、Na、K、或 Cs 的碱金属阳离子。
86. 权利要求 82~85 中任何一项所述的方法，其中 n 为 1，以及 R^{BT} 为
- 15 -Me、-Et、-nPr 或 -iPr。
87. 权利要求 86 所述的方法，其中，n 为 1 及 R^{BT} 为 -Me。
88. 权利要求 84 所述的方法，其中， R^{BT} 之一为 $-SO_3H$ 或 $-SO_3M^3$ 及另一个 R^{BT} 基团为 C_{1-4} 烷基。
89. 权利要求 82~85 中任何一项所述的方法，其中，n 为 2，并且一个
- 20 R^{BT} 为 C_{1-4} 烷基，一个 R^{BT} 为 $-SO_3H$ 或 $-SO_3M^3$ 。
90. 权利要求 89 所述的方法，其中，n 为 2，一个 R^{BT} 为 -Me，一个 R^{BT} 为 $-SO_3H$ 或 $-SO_3M^3$ 。
91. 权利要求 82~90 中任何一项所述的方法，其中， R^N 及 X 不存在，以及相关的(三级)氮原子为中性。
- 25 92. 权利要求 82~90 中任何一项所述的方法，其中， R^N 为苯并噻唑取代基，且相关的(四级)氮原子带正电荷，X 为反离子。
93. 权利要求 82~90 中任何一项所述的方法，其中， R^N 为 C_{1-4} 烷基。
94. 权利要求 93 所述的方法，其中 R^N 为 -Me、-Et、-nPr、或 -iPr。
95. 权利要求 82~90 中任何一项所述的方法，其中 X 为 Cl^- 、 Br^- 及 I^- 。
- 30 96. 权利要求 82~95 中任何一项所述的方法，其中 R^P 为 C_{1-4} 烷基。

97. 权利要求 82 ~ 96 中任何一项所述的方法, 其中每个 R 为-H, 及氨基为-NH₂。

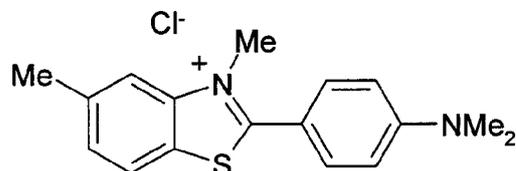
98. 权利要求 82 ~ 96 中任何一项所述的方法, 其中一个 R 为-H, 一个 R 为氨基取代基。

5 99. 权利要求 82 ~ 96 中任何一项所述的方法, 其中每个 R 为氨基取代基。

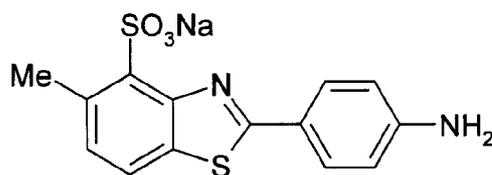
100. 权利要求 99 所述的方法, 其中每个氨基取代基为 C₁₋₄ 烷基。

101. 权利要求 82 ~ 96 中任何一项所述的方法, 其中氨基-NR² 为-NH₂、-NHMe、-NH₂Et、-NH(iPr)、-NH(nPr)、-NMe₂、-NEt₂、N(iPr)₂ 或-N(nPr)₂。

10 102. 权利要求 101 所述的方法, 其中阻断配体为下式结构的苯并噻唑:



103. 权利要求 101 所述的方法, 其中所述阻断配体为下式结构的苯并噻唑:



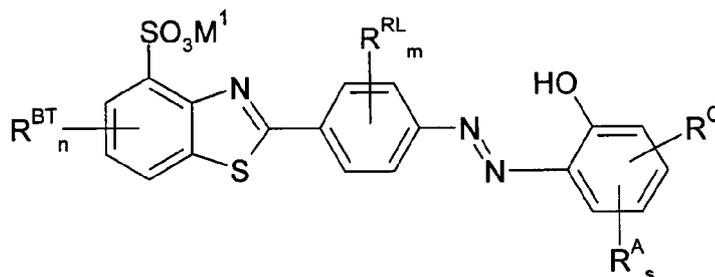
15 104. 前述权利要求中任何一项所述的方法, 用于据信罹患 τ 蛋白疾病患者的诊断及预后。

105. 权利要求 104 所述的方法, 其中 τ 蛋白疾病为 AD。

106. 权利要求 1 ~ 79 中任何一项所述的配体, 用于据信罹患 τ 蛋白疾病患者的诊断及预后的方法中, 该方法如权利要求 104 或权利要求 105 所述。

20 107. 权利要求 1 ~ 79 中任何一项所述的配体, 其用于判断以 τ - τ 聚集抑制剂抑制患者的神经原纤维变性的治疗有效性的方法中, 该方法包括使用权利要求 1 ~ 103 中任何一项所述的方法。

108. 下式结构的配体:



其中:

M^1 为碱金属阳离子;

n 为 0~3 的整数;

5 每个 R^{BT} 独立地为苯并噻唑取代基;

m 为 0~4 的整数;

每个 R^{RL} 独立地为刚性连接基团芳基取代基;

s 为 0~4 的整数;

每个 R^A 独立地为芳基取代基; 以及

10 R^C 如果存在, 为活性结合基团, 或

R^C 为, 或包含, 可检测标记。

109. 权利要求 108 所述的配体, 其中 M^1 为 Li、Na、K 或 Cs。

110. 权利要求 108 或权利要求 109 所述的配体, 其中每个 R^{BT} 独立地为 C_{1-4} 烷基、羟基、 C_{1-4} 烷氧基、硝基、氰基、卤素或氨基。

15 111. 权利要求 110 所述的配体, 其中每个 R^{BT} 独立地为 -Me、-Et、-nPr、-iPr、-OH、-OMe、-OEt、-O(nPr)、O(iPr)、-NO₂、-CN、-F、-Cl、-Br、-I、-NH₂、-NH₂、-NHMe、-NH₂Et、-NH(iPr)、-NH(nPr)、-NMe₂、-NEt₂、N(iPr)₂ 或 -N(nPr)₂。

112. 权利要求 110 所述的配体, 其中每个 R^{BT} 独立地为 C_{1-4} 烷基。

20 113. 权利要求 112 所述的配体, 其中每个 R^{BT} 独立地为 -Me、-Et、-nPr 或 -iPr。

114. 权利要求 113 所述的配体, 其中每个 R^{BT} 为 -Me。

115. 权利要求 113 所述的配体, 其中 n 为 1 及 R^{BT} 独立地为 -Me、-Et、-nPr 或 -iPr。

25 116. 权利要求 115 所述的配体, 其中 n 为 1 及 R^{BT} 为 -Me。

117. 权利要求 108 ~ 116 中任何一项所述的配体, 其中苯并噻唑基团具有下式结构:



118. 权利要求 117 所述的配体，其中配体具有下式结构：

5



119. 权利要求 108 ~ 118 中任何一项所述的配体，其中每个 R^{RL} 独立地为 C_{1-4} 烷基、羟基、 C_{1-4} 烷氧基、硝基、氰基、卤素或氨基。

10 120. 权利要求 119 所述的配体，其中每个 R^{RL} 独立地为 -Me、-Et、-nPr、-iPr、-OH、-OMe、-OEt、-O(nPr)、O(iPr)、-NO₂、-CN、-F、-Cl、-Br、-I、-NH₂、-NH₂、-NHMe、-NHEt、-NH(iPr)、-NH(nPr)、-NMe₂、-NEt₂、N(iPr)₂ 或 -N(nPr)₂。

121. 权利要求 120 所述的配体，其中每个 R^{RL} 独立地为 C_{1-4} 烷基。

15 122. 权利要求 108 ~ 121 中任何一项所述的配体，其中每个 R^A 独立地选自 -OH、-NH₂、-NHR¹、-NR¹R²、-SO₃M² 及 C_{1-4} 烷基；
其中：

R^1 及 R^2 各为 C_{1-4} 烷基，并且

M^2 为碱金属阳离子。

20 123. 权利要求 122 所述的配体，其中 M^2 为 Li、Na、K 或 Cs。

124. 权利要求 108 ~ 123 中任何一项所述的配体，其中 R^C 如果存在，为具有反应活性的偶联取代基，并且为，或包含，适合与另一分子通过化学反应在两者间形成共价键与之相连接的活性官能团。

125. 权利要求 124 所述的配体，其中 R^C 为，或包含活性的酯。

25 126. 权利要求 125 所述的配体，其中 R^C 为，或包含琥珀酰亚胺基酯。

127. 权利要求 124 所述的配体, 其中 R^C 存在并且为具有反应活性的偶联取代基, 并为或包含适合以强非共价相互作用与另一分子相连接的基团。

128. 权利要求 127 所述的配体, 其中 R^C 存在, 并为或包含生物素。

129. 权利要求 124 所述的配体, 其中 R^C 存在并为具有反应活性的偶联取代基, 并为或包含适合以形成复合物或螯合物与另一分子相连接的基团。

130. 权利要求 129 所述的配体, 其中 R^C 存在, 并为或包含钆螯合基团。

131. 权利要求 130 所述的配体, 其中 R^C 存在, 并为或包含二亚乙基三胺五乙酸。

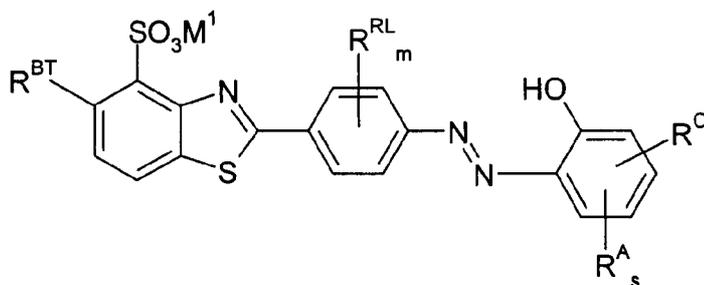
132. 权利要求 108 ~ 123 中任何一项所述的配体, 其中 R^C 存在, 并为或包含可检测标记。

133. 权利要求 132 所述的配体, 其中 R^C 存在, 并为或包含染料、荧光标记物、抗原基团、稳定及不稳定同位素或发射正电子的碳原子。

134. 权利要求 133 所述的配体, 其中 R^C 存在, 并为或包含 ^{18}F 。

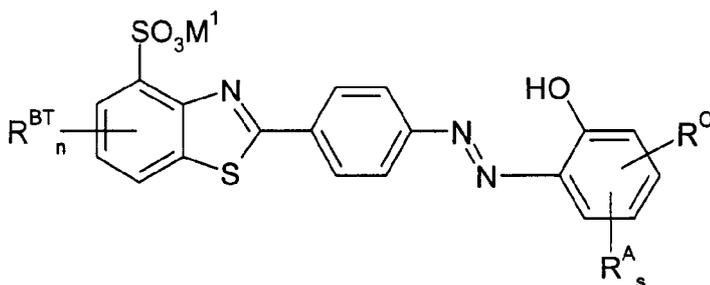
135. 权利要求 134 所述的配体, 其中 R^C 存在, 并为或包含发射正电子的碳原子。

136. 权利要求 108 ~ 135 中任何一项所述的配体, 其中所述配体具有下式结构:

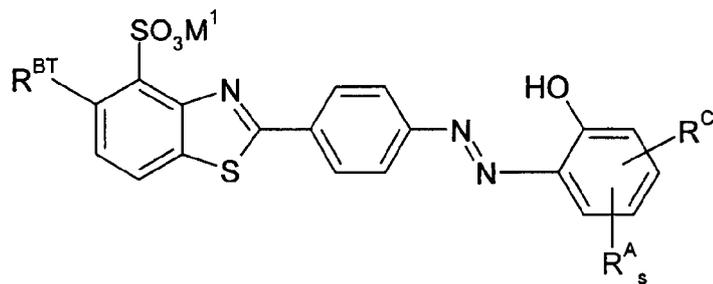


20

137. 权利要求 136 所述的配体, 其中所述配体具有下式结构:

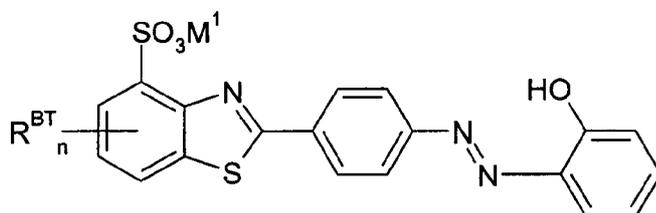


138. 权利要求 137 所述的配体，其中所述配体具有下式结构：



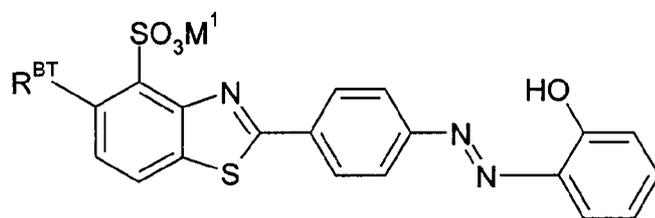
5

139. 权利要求 137 所述的配体，其中所述配体具有下式结构：



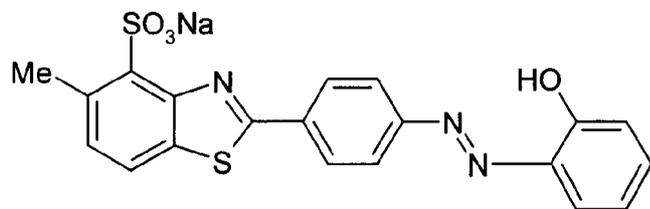
10

140. 权利要求 139 所述的配体，其中所述配体具有下式结构：

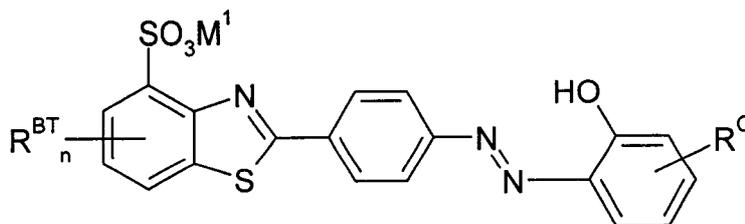


141. 权利要求 140 所述的配体，其中所述配体具有下式结构：

15

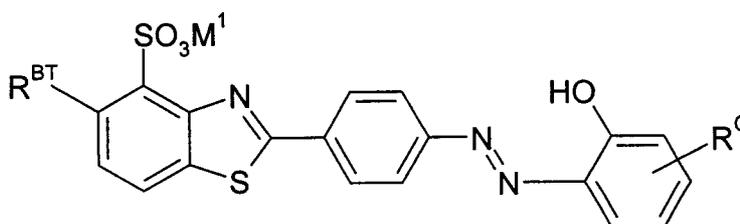


142. 权利要求 137 所述的配体，其中所述配体具有下式结构：



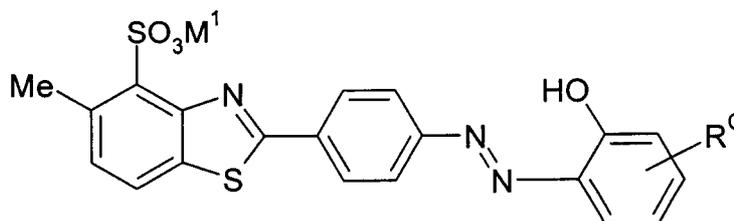
143. 权利要求 142 所述的配体, 其中所述配体具有下式结构:

5



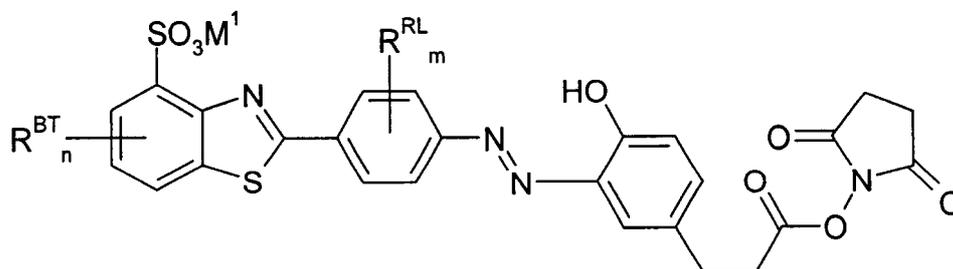
144. 权利要求 143 所述的配体, 其中所述配体具有下式结构:

10

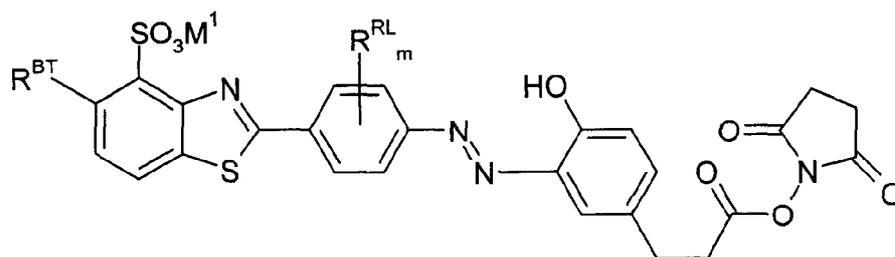


145. 权利要求 142 所述的配体, 其中所述配体具有下式结构:

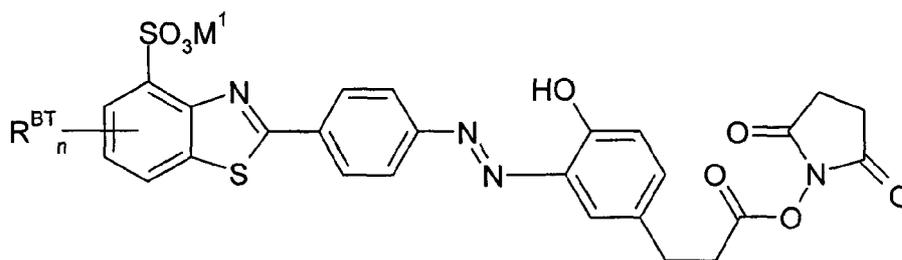
15



146. 权利要求 145 所述的配体, 其中所述配体具有下式结构:

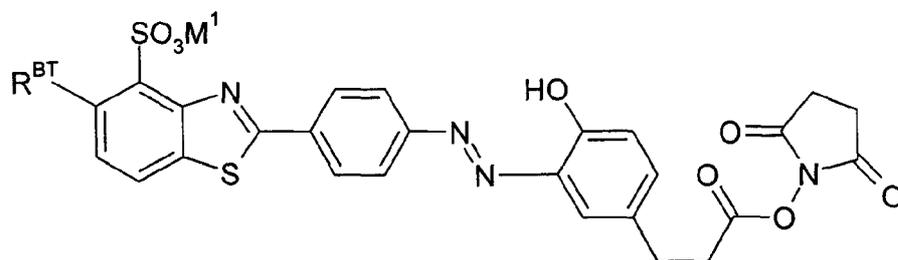


147. 权利要求 145 所述的配体，其中所述配体具有下式结构：



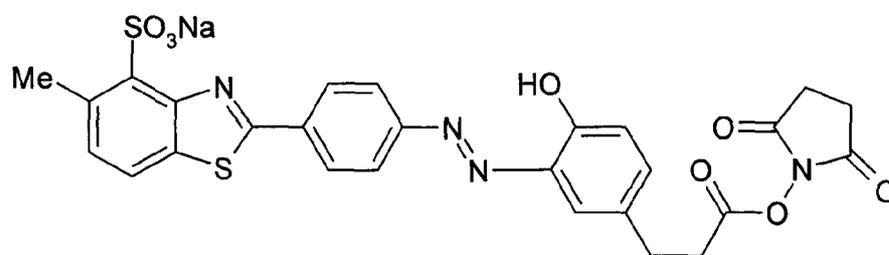
5

148. 权利要求 147 中所述的配体，其中所述配体具有下式结构：



10

149. 权利要求 148 所述的配体，其中所述配体具有下式结构：



15

150. 权利要求 136 ~ 149 中任何一项所述的配体，其可与可检测的化学基团偶联、螯合或以其它方式相结合。

151. 一种诊断组合物，包括作为活性成分的至少 90%、95%及 98%的权利要求 108 ~ 150 中任何一项所述的配体。

152. 权利要求 151 所述的诊断组合物，进一步包含载体物质或其它可药用及生理可接受的赋形剂。

5 153. 一种标记聚集 τ 或 τ 类分子的方法，包括将聚集分子与权利要求 108 ~ 152 中任何一项所述的配体或组合物相接触。

154. 一种体外诊断或预后 τ 蛋白疾病的方法，其应用于据信罹患疾病的患者，包括(i)自患者中获取合适的组织样品；(ii)将样品与权利要求 108 ~ 152 中任何一项所述的配体或组合物相接触；(iii)检测与样品结合的配体的量及位置；(iv) 将(iii)的结果与患者疾病的分期及严重程度进行关联。

155. 权利要求 153 所述的方法，其中 τ 蛋白疾病为 AD。

156. 根据权利要求 108 ~ 150 中任何一项所述的配体，其用于诊断、预测或治疗人或动物罹患的 τ 蛋白疾病的方法中。

157. 权利要求 156 所述的配体，其中 τ 蛋白疾病为 AD。

15 158. 一种识别能够结合聚集 τ 蛋白的化合物的方法，该方法包括

(i) 提供权利要求 108 ~ 150 中任何一项所述的配体结合的聚集 τ 蛋白的样品，

(ii) 将样品与推定的 τ 结合化合物接触，

(iii) 测定推定化合物使配体从聚集 τ 蛋白置换的程度，

20 (iv) 将(iii)中测定的结果与化合物和聚集 τ 结合的能力进行关联。

159. 权利要求 158 所述的方法，其中聚集 τ 蛋白在溶液或结合于固相。

160. 一种识别可标记聚集 PHF τ 蛋白配体的体外方法，所述方法包括以下步骤：

25 (i)提供怀疑能够标记聚集 PHF τ 蛋白的第一种试剂，

(ii)将 (a)含 τ 核心片段的 τ 蛋白或其衍生物，其与固相结合以显露其高亲和力的 τ 捕获位点，与(b)液相 τ 蛋白或其衍生物，其能与固相 τ 蛋白或其衍生物相结合，以及(c) 所述已选择的第一种试剂及(d)已知的第二种 τ - τ 结合抑制剂的试剂相接触，

30 (iii)选择第一种试剂，其全面或部分地解除抑制剂(d)对(b)液相 τ 蛋白或其衍生物对(a)固相 τ 蛋白或其衍生物结合的抑制。

161. 权利要求 160 所述的方法, 其中步骤(ii)结合下述步骤进行:

(ibis) 将 (a)包含 τ 核心片段的 τ 蛋白或其衍生物, 其与固相结合显露高亲和力的 τ 捕获位点, 与(b)液相 τ 蛋白或其衍生物, 其能与固相 τ 蛋白或其衍生物相结合以及(c)选择的第一种试剂进行接触, 并

5 (ibis.1) 检测 τ - τ 结合的抑制, 其通过对(b)液相 τ 蛋白或其衍生物与(a)固相 τ 蛋白或其衍生物结合的抑制显示,

(ibis.2) 选择第一种试剂, 其具有最小或没有作为 τ - τ 结合抑制剂的活性和/或任选增加 τ - τ 结合。

162. 权利要求 160 或权利要求 161 所述的方法, 其中所述抑制剂为权利要求 64 ~ 74 中任何一项所述的二氨基吩噻嗪。

163. 权利要求 162 所述的方法, 其中所述抑制剂为 DMMB。

164. 权利要求 160 ~ 163 中任何一项所述的方法, 其中液相 τ 蛋白或其衍生物被制备成在暴露于固相之前发生部分聚集。

165. 权利要求 174 所述的方法, 其中液相 τ 蛋白或衍生物的制备包括
15 下述步骤:

(i)超声该 τ 蛋白或衍生物和/或

ii)通过半透性膜将该 τ 蛋白或衍生物暴露于 PEG。

166. 权利要求 160 ~ 165 中任何一项所述的方法, 其中将该试剂与液相 τ 蛋白或衍生物与该固相 τ 蛋白或衍生物的接触步骤在 PH9-10 的碱性缓冲液
20 中进行。

167. 权利要求 160 ~ 165 中任何一项所述的方法, 其中将该试剂与液相 τ 蛋白或衍生物与该固相 τ 蛋白或衍生物的接触步骤在生理缓冲液条件进行。

168. 权利要求 160 ~ 165 中任何一项所述的方法, 其中将该试剂与液相 τ 蛋白或衍生物与该固相 τ 蛋白或衍生物的接触步骤在 50-400 mM 氯化钠或
25 相当离子强度的盐或盐溶液中进行, 且 PH 范围为 4-10。

169. 权利要求 160 ~ 168 中任何一项所述的方法, 其中液相 τ 蛋白或衍生物经标记。

170. 权利要求 160 ~ 168 中任何一项所述的方法, 其中液相 τ 蛋白或衍生物与固相 τ 蛋白或衍生物在免疫学上可区分, 且结合经抗体检测。

171. 权利要求 160~170 中任何一项所述的方法，其中对应于核心片段及终止于 Ala-390(dGA)的截短 τ 蛋白在不利于 τ - τ 结合的缓冲液条件下置于固相。

172. 权利要求 160~171 中任何一项所述的方法，其中对应于核心片段及终止于 Glue-392(dGAE)的截短 τ 蛋白或全长蛋白连同试剂或每种试剂加入液相。

173. 权利要求 158~172 中任何一项所述的方法，其进一步包括将试剂制备为诊断或预后试剂的步骤。

174. 权利要求 158~172 中任何一项所述的方法，其进一步包括权利要求 1~11 中任何一项所述的方法中将试剂用作配体的步骤。

神经原纤维标记物

5 发明领域

本发明涉及广泛地用于神经纤维缠结标记及检测的材料、方法及模型。此外，还涉及适于神经病理分期的配体的鉴定及开发以及及其在诸如阿尔茨海默病的诊断、预后及治疗中的用途。

10 发明背景

神经病理分期及 AD

由 Braak(Braak, H 等(1991), Acta. Neuropathol. 82, 239-259)提出的神经病理分期提供了相对单纯的阿尔茨海默型神经原纤维退化的最佳定义，其可用于 AD 的诊断(Wischik 等 (2000), “Neurobiology of Alzheimer’s Disease”, Eds. Dawbarn 等, The Molecular and Cellular Neurobiology Series, Bios Scientific Publishers, Oxford)。在图 2B 中，示意性地从脑区的角度显示了这种分期，其基于神经原纤维缠结(NFT)的有序区域层次而进行。较早出现层次的脑区与较晚出现层次的脑区相比，具有更多的缠结及更少地侵袭严重病例。

AD、痴呆症与神经病理学分期之间的关系

20 Braak 分期提供的有效前期评估可用于 AD 的评估和治疗，其常需与下列病症相鉴别，包括 Lewy 体痴呆、帕金森病、各种形式的额颞及皮质基底变性、进行性核上性麻痹以及一些少见的神经综合征。

Braak 原型基本上仅是定性的，还没涉及痴呆症及症状发展的阈值。

25 按照 DSM-IV 标准评定的痴呆症出现，统计学上，其介于 Braak 3 期与 4 期的过渡阶段(图 2c)。DSM-IV 标准(Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, IV 版, American Psychiatric Association, American Psychiatric Press, Washington DC (1994))定义的痴呆症相当于 MMSE 定义的(Mini Mental State Examination)约 18 的临界值，其发病率大约占 65 岁以上人口的 5%(65 岁以上人口约占总人口的 17%)。

Gertz 等((1996)Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. 246, 132-6))采用从常规检查到尸检的手段研究病例, 其临床特征严格依据 CAMDEX 进行描述 (Roth 等, 1988, “剑桥老年人精神病测试” 剑桥大学出版社)。在排除尸检发现的患不同程度血管疾病的所有病例后, 根据 Braak 标准进行尸检分期, 在 5 该过渡值处仍有约三分之一的病例不能确定。即约三分之一具有 AD 临床诊断的病例实际处于 Braak 分期的早期(1-3 期), 其罹患血管疾病或合并 Lewy 体病症。因此, 即使是最佳的研究实施规范仍存在很高的不确定性。在 AD 的常规临床诊断中, 实际存在的神经病理学底物甚至更不可靠。

最近有报道称, 给经临床及神经病理学确诊的阿尔茨海默病的病例注射 10 FDDNP 分子(FDDNP, 2-(1-{6-[(2- [¹⁸F]氟乙基) (甲基)氨基]-2-萘基}亚乙基)丙二腈)后, PET 显影表明, 其中颞叶脑区(海马, 内嗅皮质及扁桃体)有较长的相对保留时间(RRT) (Shoghi-Jadid 等, Am. J. Geriatr. 精神病学 2002, 10: 24-35)。

尽管该化合物结合 NFTs 及淀粉样斑块的情况已被讨论, 但与 NFTs 的 15 结合情况并不清楚, 尽管在体外其对合成的 β -淀粉样原纤维具有很高的亲和力。

在排除血管疾病的神经疾病患者中, 将病例与相应的 MMSE 评分确定的疾病严重程度相匹配后, 发现 Shoghi-Jadid 等报道的 RRT 值与斑块计数具有相关性, 但与神经原纤维缠结病理测量不相关, 结果如下。

20 Spearman 秩相关系数:

	MTL AP	Global AP	MTL NFT	Global NFT
RRT	0.665**	0.654**	0.244	0.189
p	< 0.01	< 0.01	> 0.1	> 0.1

25 Pearson 相关系数:

	MTL AP	Global AP	MTL NFT	Global NFT
RRT	0.602*	0.596*	0.266	0.275
P	< 0.05	< 0.05	> 0.3	> 0.3

此处, 参数定义如下:

30 MTL AP 指中颞叶淀粉样斑块
Global AP 指 12 脑区内平均淀粉样斑块负荷

MTL NFT 指中颞叶神经原纤维缠结
Global NFT 指 12 脑区内平均神经原纤维缠结负荷

然而, β 淀粉样沉积不能区分正常的年龄相关老化与阿尔茨海默病(此处参见图 2d), 并且 β 淀粉样沉积不能提供神经病理学分期的合理基础。因此,

5 FDDNP-RRT 不能作为阿尔茨海默病体内神经病理学分期的方法。

尽管借助更特异的神经心理学指示手段(如分散注意力法、样本的延迟匹配等), 临床方法的进一步改进可能提高临床诊断的准确度, 然而, 其基本难题在于开发能够直接检测生命过程中潜在的神经病理学的方法, 尤其是能够直接检测阿尔茨海默型神经原纤维变性的程度。

10 神经原纤维变性及 τ 的进展

如上所述, 基于 τ 相关的 AD 病理学是表型的主要特征。其与神经元破坏的程度高度相关(Wischik 等综述 (2000) loc cit)。

据信, 在细胞水平上, 从 τ 到 NFTs 形成进程如下。在 NFTs 形成及聚集过程中, 成对螺旋丝(PHF)首先在胞浆中聚集成丝, 其可能源于 PHF 聚集之前进程中截短的早期 τ 寡聚体(见参考文献 26、27)。随后, 形成经典的细胞内 NFTs。此时, PHFs 由截短的 τ 的核心及包含全长 τ 的绒状外层组成(Wischik 等 (2000) loc. cit.)。该聚集过程呈指数级进行, 消耗细胞库中的正常功能 τ 并诱导合成新的 τ 以弥补不足(参考文献 29)。最终, 神经元的功能损伤发展至细胞死亡, 产生细胞外的 NFT。细胞死亡与细胞外 NFTs 的数目高度相关(Bondaref, W.等 (1993) Arc. Gen. Psychiatry 50: 350-6)。当外部神经元胞膜被破坏后, NFTs 释放入细胞外空间, 导致神经元的绒状外层的进行性丧失, 同时伴随相应的 N 端 τ 免疫反应活性的丧失, 但保留了与 PHF 核相关的 τ 免疫反应活性(图 3; 参考文献 30)。

在聚集过程中, τ 蛋白的重复结构域发生构象变化, 同时伴随半重复相移(见参考文献 32、33)。生成了蛋白水解稳定片段, 其与成对螺旋丝(PHF)核心处发现的片段完全相同, 该成对螺旋丝构成典型 AD 的神经原纤维缠结特征。与其它蛋白聚集体系类似地, 该过程极有可能涉及 α 螺旋至 β 链的构象改变(Wischik 等综述 (2000) loc. cit.)。

因此, 一般说来, τ 的聚集可分为三期: 细胞内寡聚体; 细胞内成丝(图 30 3 中的 1 期)以及细胞外成丝(图 3 中的第 2 和 3 期)。

然而,迄今,仍未找到这些阶段之间确切的相关性,各阶段发生在细胞水平且可能不同脑区具有不同的速率以及具有不同的概率,以及具有不同的上述的 Braak 层次的病理进程, Braak 系统是最佳的现有相对单纯神经原纤维变性的限界。

5 评估 AD 的创伤性方法

腰椎穿刺 CSF 检测能够区别 AD、对照及其它神经疾病,但腰椎穿刺较之核医学途径更具有创伤性,且风险更大(见参考文献 17~21)。EEG 神经学诊断也已发展起来(参考文献 22~25),但在这方面仍缺乏可资医师使用的廉价操作器械。

10 脑萎缩性神经原纤维变性——SPECT 及 PET

已有大量研究表明,全大脑萎缩及特定的中颞叶萎缩,尤其是海马回,与潜在的阿尔茨海默型神经原纤维变性密切相关,并对于早期 AD 诊断非常宝贵(见参考文献 1-8)。

然而,尽管通过监测全大脑萎缩诊断 AD 可作为研究的方法,但在定义及检测特定脑区的萎缩方面仍存在困难,同样地,这些困难在检测全大脑新皮质萎缩也会存在。在任何情况下,基于可检测的萎缩作出的诊断将延误有效治疗。

近年来,随着 SPECT 扫描(参考文献 9-12; HMPAO SPECT 检测灌注损伤的特征类型)、PET 扫描(参考文献 13-15; 以葡萄糖代谢特征检测代谢缺损)以及 MRI 扫描(参考文献 16; 全大脑萎缩,脑叶萎缩的特征类型)诊断特征的认识,诊断在方法学上已有进展。在这些手段中,以 MRI 与 SPECT 最为可行,因为 PET 目前仅限于当地拥有特定的回旋加速器的中心使用,且这些中心需具备制备短半衰期的可注射放射配体的放射的化学条件(Aberdeen, London, Cambridge in UK)。值得指出的是, HMPAO SPECT 检测到的 AD 患者中特征性的早期颞顶灌注损伤与经生物化学测定的 τ 病理学类型密切一致(图 1)。生物化学变化先于 NFTs 明显神经原纤维变性的出现(图 2; Mukaetova-Ladinska 等, 2000 美国病理学杂志. Vol.157, No.2, 623-636)。

然而,尽管 MRI 及 SPECT 扫描可用于检测具有 AD 的灌注损伤的特定类型,但是,辨别不同神经病理分期或辨别 AD 与其它类型的痴呆症仍然十分困难。

例如, SPECT 可用于检测具有 AD 特征的双侧颞顶灌注损伤的特定类型(见参考文献 9-11),其甚至可用于极早期疾病的检测。然而, SPECT 变化区

分神经病理分期的效果很差(参考文献 12)。此外,其区别 AD 与 Lewy 体痴呆也相当困难。由于两者都具有双侧颞顶灌注损伤,但仅后者存在枕骨灌注损伤的倾向。同种类型的损伤可经 PET 检测葡萄糖代谢证实(参照文献 13~15),但识别 Lewy 体痴呆的困难一直存在。

5 因此,从参考文献 12 的数据可以推断出, SPECT 成功检测出 Braak1&2 期病例的概率是 50%、3&4 期的概率是 60%。仅在 5&6 期病例, SPECT 阳性的概率是 95%。相反地, SPECT 阳性检测病例处于 1&2 期的概率为 20%, 3&4 期为 20%或 5&6 期为 60%。因此, SPECT 不能检测 40-50%的 4 期以前的目标人群,因而无法提供早期的诊断及治疗干预。进一步的研究表明(未显示数据), SPECT 诊断与临床诊断的总体一致率为 50%。

因而,在发展具体针对阻止阿尔茨海默型神经原纤维变性的治疗时,极其需要同时开发筛选治疗病人的非侵入性方法,以及根据明确及可重复的定义进行治疗以及监测治疗反应。

15 发明内容

发明概述

本发明使用免疫化学特性(见参考文献 26、27、30)以区分细胞内缠结与细胞外缠结。在前瞻性病例组中,测定了两类缠结病例的频率(即概率)及数目(即计数/mm²),并按照 Braak 系统将其分入代表病理进程分期的脑区。

20 详述如下,这些抗体研究首次证实,通过采用细胞内外特异性的比较,在定义的脑区, PHF- τ 沉积为 AD 神经原纤维变性的经验分期提供了基础。

因而,本发明一方面提供了一种测定 τ 蛋白疾病(tauopathy)(如 AD)相关的神经原纤维变性分期的方法,其用于据信罹患该疾病的研究对象,该方法包括如下步骤:

25 (i)将能标记聚集 PHF τ 蛋白的配体引入研究对象,

(ii)测定研究对象脑中颞叶处与细胞外聚集 PHF τ 相结合的配体是否存在及/或其量,

(iii)将 (ii)中测定的结果与患者中神经原纤维变性的程度进行关联。

30 如简介中所述,神经原纤维变性的进展具有确定的 Braak 神经病理学分期,其反过来又是 AD 进展的已知最佳的神经病理学定义。因此,本发明方法可用于提供真实的 Braak 分期结果。在优选实施方案中,其可用于诊断

Braak 早期阶段(例如 Braak 第 2 期)的患者,该诊断甚至在临床指征显现之前即可用于提供直接及时的治疗和建议。

有趣的是, Gertz 等基于 NFTs 的免疫检测结果(1996, loc cit), 该结果不能区分细胞内、外缠结,也不能表明发狂对象(一般为 Braak 4-6 期)与非发狂对象(一般为 Braak 1-3 期)颞叶结构中测定的缠结数目之间的差异(参见图 1 及表 2, 相关结构为标记的 Pre alpha ent., CA1, Pri Ento.)。因而,本发明证实的相关性特别令人惊讶!

本发明进一步提供了用于标记 τ 聚集物的新型配体,此外,也提供了发现这些配体的新筛选方法。

10 现详细阐述本发明上述的一些方面。

对象选择

本方法的合适对象的选择可基于传统因素进行。因而,患者的最初选择可能涉及一或多个下列因素:经验丰富的医师作出的严格评估;以辅助实验室检查或其它检查尽可能排除非 AD 诊断;使用神经病理学认可的方案客观
15 评估认知功能水平。

配体

配体能够标记聚集 PHF τ , 后者形成如上所述。配体可特异地或优先地与 τ 结合(优先结合脑部相关区域的竞争结合位点)。适合的配体(包括新配体)及其识别方法如下。

20 更具体说来,本发明公开,即基于此处描述的方法评估 Braak 分期,在选择和/或发展用于诊断标记的配体方面具有重大意义。免疫方法具有缺陷,即抗体不易以定量方式穿过血脑屏障,此外,由于抗体注入体内将引发副反应,因而该方法不适合用于临床。因此,基于活体中免疫反应活性的不同类型来区别 τ 聚集不同分期是十分困难的。

25 因此,本发明的发明人考察了与神经原纤维缠结相结合的化合物的重要化学特征。他们在此提供了结合所需要的最小化学结构,在开发用于神经原纤维缠结的化合物中具有重要意义,这些方法、应用及化合物构成了本发明的另一方面。

30 优选的配体,包括新型配体此后详细公开,尤其是包括磺化苯并噻唑类化合物(参见如图 4a),二氨基吩噻嗪类化合物(参见如图 8)以及具有这些化合物中任一种共有的合适的最小化学结构的类似化合物。组合物形成了本发明

的多种方面,所述组合物包括此处公开的配体组合(优选可区别的配体,如从标记的角度而言)和/或配体与阻断剂的组合(如下),或其由这些组合组成。

与细胞外 τ 结合

上述(ii)的测定基于细胞外聚集 τ 。总的说来,在本发明中,其可通过细胞外缠结测定(参见例如参考文献 26、27 及实施例、方法及材料、表)。

先前的组织学研究表明,在聚集过程中, τ 蛋白需要与诸如噻嗪红及硫黄素-S 的结合位点(见参考文献 26、27)。已知结合位点位于缠结内部而非外源蛋白内(参考文献 34)。因而,细胞内及细胞外缠结都在一定程度上被配体标记,如组织学所判定。

一般说来,细胞外结合位点(相对于总的结合位点或细胞内结合位点)的概率或数量既可使用太大不易进入细胞内的配体测定,也可使用可在细胞内起作用的配体,其既定浓度(相对较低),在该浓度下细胞外的结合作用更有利。

大螯合配体,例如,那些易经 SPECT 检测的配体,其至少应可到达合适的细胞外靶标并与之结合。直接为 PET 标记的化合物可潜在地检测细胞内或细胞外的靶标,后者在低浓度时更有利。因而,本发明者的工作表明,当使用合适的缠结结合配体时,这两种检测方法在 Braak 分期上都有应用潜力。尽管如此,根据本发明,为方便地以 NFT 计数评估 Braak 分期,应意识到采用下述配体是重要的,即配体不但能穿过血脑屏障并特异地标记细胞内或细胞外沉积的 τ 聚集物,而且优选地在与其他化合物结合时能够保持其这种特性。

然而,毋庸置疑,配体可经任何合适的手段显现或检测,本领域普通技术人员将意识到能够用本领域任何合适的检测手段替代这些实例。

优先的 τ 结合增强

在本发明的一个实施方案中,步骤(i)和/或(ii)再增加一个步骤(优选在前)进行,即向研究对象再引入第二种配体,该配体竞争标记脑中相关区域(即非聚集 τ)结合位点,该标记与位点结合优于第一种配体。

因而,这些方法及此处的其它实施方案可包含步骤:

(ibis)将阻断配体引入研究对象,其标记对象脑部非聚集 τ 结合位点,该结合优于与能够标记聚集 PHF τ 的配体的结合。

竞争结合位点可由诸如淀粉样斑块提供,如可存在于患者体内。通过引入第二配体(或可指为阻断配体),与聚集 τ 结合的第一配体的相对或有效浓

度得到增强。合适的第二配体如下述，其尤其包括苯并噻唑类，例如图 5 所示的化合物 1B 及 2。另一种合适的阻断剂是前述的 FDDNP(Shoghi-Jadid 等, Am. J. Geriatr.Psychiatr. 2002, 10: 24-35)

脑区

- 5 中颞叶的意义，即图 25、27 及 29 所示的脑 E2/Trans(内嗅皮质层 2/过渡性内嗅皮质层)，E4/HC(内嗅皮质层 4 及海马)区，还包括大脑新皮质结构(F/T/P 区域-额叶、颞叶及顶叶)。

在一个实施方案中，该方法仅包括分析中颞叶细胞外 NFTs 的数据。

- 10 在另一实施方案中，分析了该区域及大脑新皮质结构的数据。在后一种情况中，优选分析细胞内的 PHF 沉积。

因而，此处的方法及其它实施方案可再包括一步骤：

(iib)另外地测定研究对象的大脑新皮质结构处与细胞内聚集 PHF τ 结合的配体存在和/或配体的量，

随后的步骤为：

- 15 (iii) 将(ii)及任选(iib)中测定的结果与患者神经原纤维变性的程度进行关联，藉此可确定患者的 AD 状态。

原则上，用于细胞内标记的配体可与细胞外标记的配体一样，但优选不同和/或标记有区别(如此，其可经任何可用的显影方法区别)。

尤其优选额外步骤，以其评估或确证 Braak2-6 期的神经原纤维变性。

20 神经原纤维变性的确定

- 既定区域存在的结合可确定神经原纤维变性。该测定然后可涉及无病理特征的病例(即假定 Braak 分期为 1 的病例)的正常值范围，或参考值范围，其已经测定了连续 Braak 分期，用于确定测定值对应的既定神经病学期。该相关可借助于查阅表或图完成，如，基于实施例 1 中的图及表 1 表征密度的数据。此外，给定的测定可能涉及参考既定的阈值，病例处于 1 期后某个分期的概率(例如，基于相应概率表的数据)，因此，给出概率有助于阿尔茨海默病的正确诊断。

方法的使用

- 30 测定可作为诊断和预后方法的一部分。其可用于治疗患者的选择，或者评估处理或治疗的效果，如对患者施用 τ - τ 组合抑制剂。

本发明相关实施方案包括：

一种能够标记细胞外聚集 PHF τ 配体，其在患者 AD 诊断或预后方法中的用途，所选研究对象据信罹患疾病，该方法包括如下步骤：

(i) 将标记聚集 PHF τ 的配体引入研究对象，

5 (ii) 测定研究对象脑中颞叶处与细胞外聚集 PHF τ 相结合的配体的存在及/或其量，

(iii) 将(ii)中测定的结果与研究对象神经原纤维变性的程度进行关联，并因此可确定患者的 AD 状态。

一种能够标记细胞外聚集 PHF τ 配体在制备诊断或预后试剂的方法中用途，该试剂适用于确证 AD 相关神经原纤维变性的分期，所选研究对象据信罹患疾病，该方法包括如下步骤：

(i) 将能标记聚集 PHF τ 该试剂引入受试对象，

(ii) 测定受试对象脑中颞叶处与细胞外聚集 PHF τ 相结合的试剂的存在及/或其量，

(iii) 将(ii)中测定的结果与研究对象神经原纤维变性的程度进行关联。

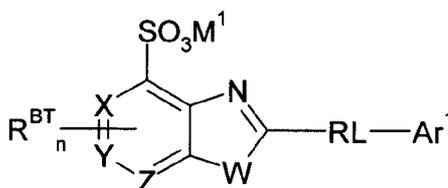
15 本发明另一方面提供了一种实施上述应用及方法的试剂盒，包含一或多种本发明提供的配体或衍生物，该配体或衍生物可与聚集分子相结合。其可包含能够增加这些化合物检测能力的物质，如钆螯合基团，以及任选能与配体偶联结合的物质，以及任选钆。此处，试剂盒包含本发明公开的化合物的衍生物，其可经由诸如荧光检定，如本发明说明书其他地方所讨论。试剂盒

20 也可包含检测或显现配体的方法，例如，此处配体引入生物素基团，试剂盒优选包含抗生物素抗体。类似地，试剂盒可包含检测化合物固有荧光的方法，检测光敏性基团以及标记的抗体的方法等。

现将本发明中的方法及其它实施方案中使用的各种优选配体予以详述。在每种情况下，本领域技术人员将意识到不直接应用配体，而是使用前体形式，其再经存在于，或施用于同一对象体内的活化剂作用转变为活性形式。

磺化-苯并噻唑类配体

用于本发明该方面的合适配体，为具有下列通式的化合物：



其中：

30 W 为 S、O 或 NH；

X、Y 及 Z 之一为 CH 或 N；

X、Y 及 Z 中其它的为 CH;

M^1 为碱金属阳离子;

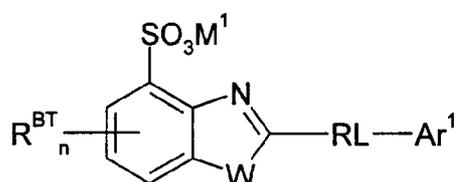
RL 为刚性连接基团;

Ar^1 为 C_{5-20} 芳基;

5 n 为 0~3 的整数; 且,
每个 R^{BT} 为核心取代基。

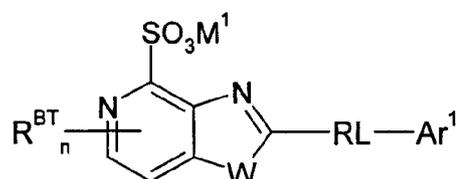
在一个实施方案中, 各 X、Y 及 Z 为 CH, 并且所述化合物具有下式结构:

10



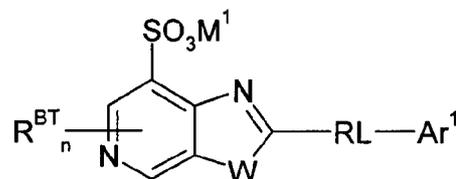
在一个实施方案中, X 为 N; Y 及 Z 各为 CH; 并且所述化合物具有下式结构:

15

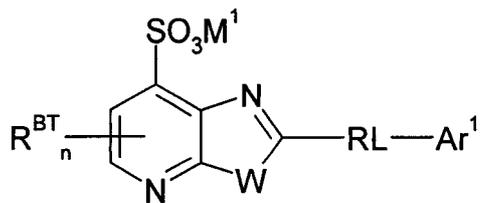


在一个实施方案中, Y 为 N; X 及 Z 各为 CH; 并且化合物具有下式结构:

20

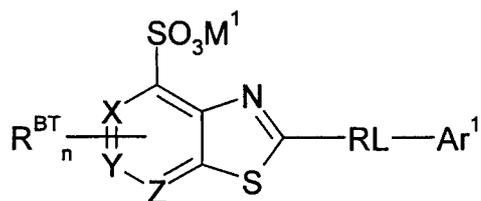


在一个实施方案中, Z 为 N; X 及 Y 各为 CH; 并且所述化合物具有下式结构:



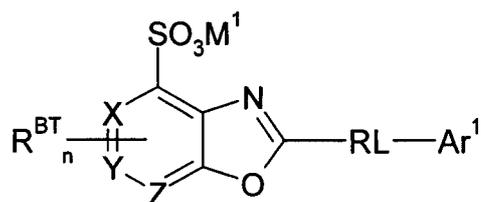
在一个实施方案中，W 为 S，并且所述化合物具有下式结构：

5



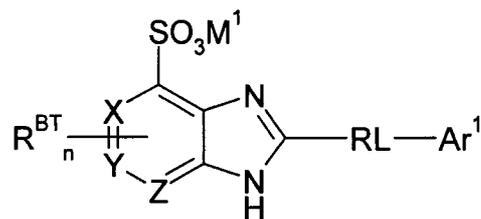
在一个实施方案中，W 为 O，并且所述化合物具有下式结构：

10



在一个实施方案中，W 为 NH，并且所述化合物具有下式结构：

15



在一个实施方案中，X、Y 及 Z 各为 CH；并且 W 为 S。

在一个实施方案中，X、Y 及 Z 各为 CH；并且 W 为 O。

在一个实施方案中，X、Y 及 Z 各为 CH；并且 W 为 NH。

20

在一个实施方案中，X 为 N；Y 及 Z 各为 CH；并且 W 为 S。

在一个实施方案中，X 为 N；Y 及 Z 各为 CH；并且 W 为 O。

在一个实施方案中, X 为 N; Y 及 Z 各为 CH; 并且 W 为 NH。

在一个实施方案中, Y 为 N; X 及 Z 各为 CH; 并且 W 为 S。

在一个实施方案中, Y 为 N; X 及 Z 各为 CH; 并且 W 为 O。

5 在一个实施方案中, Y 为 N; X 及 Z 各为 CH; 并且 W 为 NH。

在一个实施方案中, Z 为 N; X 及 Y 各为 CH; 并且 W 为 S。

在一个实施方案中, Z 为 N; X 及 Y 各为 CH; 并且 W 为 O。

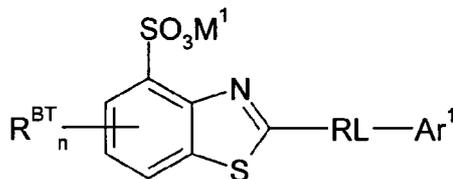
在一个实施方案中, Z 为 N; X 及 Y 各为 CH; 并且 W 为 NH。

10

包含 W、X、Y 及 Z 的二环基团表示为“核心基团”。当 X、Y 及 Z 各为 CH, 并且 W 为 S 时, 化合物可视为苯并噻唑化合物, 并可认为具有苯并噻唑核心基团。“核心取代基”因而指“苯并噻唑取代基”。

用于本发明该方面的优选配体, 为式(I)的化合物:

15



其中:

M¹ 为碱金属阳离子;

20 RL 为刚性连接基团;

Ar¹ 为 C₅₋₂₀ 芳基;

n 为 0~3 的整数; 并且,

每个 R^{BT} 独立地为苯并噻唑取代基。

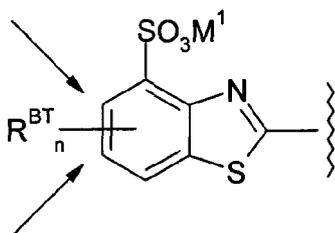
25

刚性连接基团 RL 及芳基 Ar¹ 基本上都是共平面的。此外, 刚性连接基团 RL, 芳基 Ar¹ 以及核心基团(例如, 苯并噻唑基团)共同形成基本上是共平面的化合物。“基本上共平面”是指化合物部分或整体具有高度的共平面性, 例如, 使用标准化学模型及假设定量计算, 其中各部分之间的扭曲小于 5、4、3、2 或 1°。优选的扭曲程度不超过图 16 化合物的扭曲度数。

在一个实施方案中，化合物长度为约 14.7AU~15.3AU。

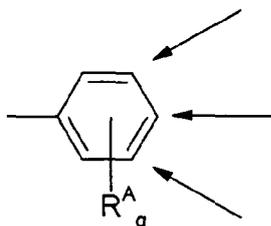
本发明的发明人已确定具有上述特征的化合物尤其适于发明中的 Braak 分期方法。这些化合物可为本领域的已知化合物，也可为新化合物，详述如下。

- 5 “化合物长度”指两个相距最远芳香环原子(指“参考原子”)之间的距离，例如苯并噻唑化合物，在分子的苯并噻唑“端”，参考原子为标示的二个原子之一：



10

在分子的芳基“端”，当 Ar^1 为具有苯核的芳基(见下)时，参考原子为标示的三个原子之一：



- 15 此处使用的“距离”可用'Chemical Database Service', Daresbury 及 Cambridge Structure Database, 使用'化学结构搜索及检索软件'进行计算。这些数据及软件在公共领域可得到。

在一个实施方案中，M 为 Li、Na、K 或 Cs。

- 20 在一个实施方案中，M 为 Na 或 K。

在一个实施方案中，n 为 0。 在一个实施方案中，n 为 1。

在一个实施方案中，n 为 2。 在一个实施方案中，n 为 3。

在一个实施方案中，每个 R^{BT} 独立地选自 C_{1-4} 烷基、羟基、 C_{1-4} 烷氧基、硝基、氰基、卤素及氨基。

在一个实施方案中，每个 R^{BT} 独立地选自 -Me、-Et、-nPr、-iPr、-OH、-OMe、-OEt、-O(nPr)、-O(iPr)、-NO₂、-CN、-F、Cl、-Br、-I、-NH₂、-NH₂、
5 -NHMe、-NHEt、-NH(iPr)、-NH(nPr)、-NMe₂、-NEt₂、N(iPr)₂ 及 -N(nPr)₂。

在一个实施方案中，每个 R^{BT} 独立地选自 C_{1-4} 烷基。在一个实施方案中，每个 R^{BT} 选自 -Me、-Et、nPr、及 -iPr。在一个实施方案中，每个 R^{BT} 为 -Me。

在一个实施方案中，n 为 1 及 R^{BT} 为 -Me、-Et、-nPr 或 -iPr。在一个实施方案中，n 为 1 及 R^{BT} 为 -Me。

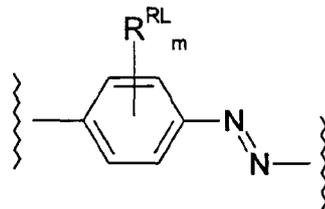
10 在一个实施方案中，化合物具有下式结构：



在一个实施方案中，化合物具有下式结构：

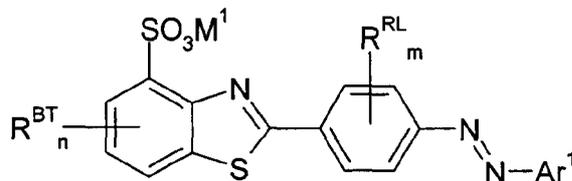


在一个实施方案中，RL 为如下式的基团：



15

其中 m 为 0~4 的整数，及每个 R^{RL} 独立地为刚性连接基芳基取代基，并且化合物具有下式结构：



20

在一个实施方案中，m 为 0。在一个实施方案中，m 为 1。
在一个实施方案中，m 为 2。在一个实施方案中，m 为 3。

在一个实施方案中， m 为 4。

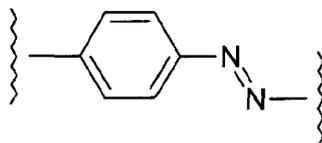
在一个实施方案中，每个 R^{RL} 独立地选自 C_{1-4} 烷基、羟基、 C_{1-4} 烷氧基、硝基、氰基、卤素及氨基。

- 5 在一个实施方案中，每个 R^{RL} 独立地选自 -Me、-Et、-nPr、-iPr、-OH、-OMe、-OEt、-O(nPr)、-O(iPr)、-NO₂、-CN、-F、Cl、-Br、-I、-NH₂、-NH₂、-NHMe、-NHEt、-NH(iPr)、-NH(nPr)、-NMe₂、-NEt₂、N(iPr)₂ 及 -N(nPr)₂。

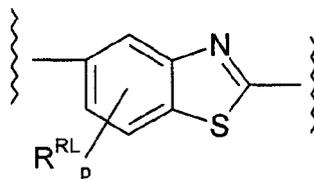
在一个实施方案中，每个 R^{RL} 独立地选自 C_{1-4} 烷基。

在一个实施方案中，RL 为具有下式结构的基团：

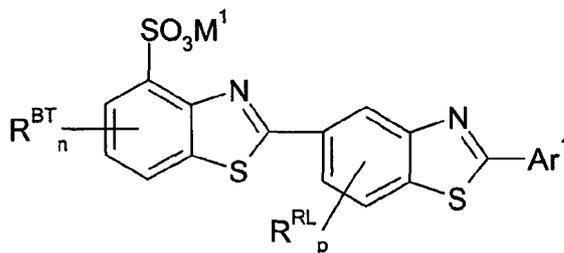
10



在一个实施方案中，RL 为具有下式结构的基团：



- 15 其中 p 为 0~3 的整数，并且每个 R^{RL} 独立地为刚性连接基芳基取代基，并且化合物具有下式结构：



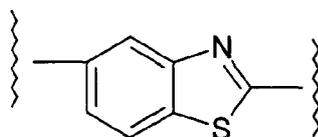
- 20 在一个实施方案中， p 为 0。在一个实施方案中， p 为 1。
在一个实施方案中， p 为 2。在一个实施方案中， p 为 3。

在一个实施方案中，每个 R^{RL} 独立地选自 C_{1-4} 烷基、羟基、 C_{1-4} 烷氧基、硝基、氰基、卤素及氨基。

在一个实施方案中，每个 R^{RL} 独立地选自 -Me、-Et、-nPr、-iPr、-OH、-OMe、-OEt、-O(nPr)、-O(iPr)、-NO₂、-CN、-F、Cl、-Br、-I、-NH₂、-NH₂、
5 -NHMe、-NHEt、-NH(iPr)、-NH(nPr)、-NMe₂、-NEt₂、N(iPr)₂ 及 -N(nPr)₂。

在一个实施方案中，每个 R^{RL} 独立地选自 C_{1-4} 烷基。

在一个实施方案中，RL 为具有下式结构的基团：



10

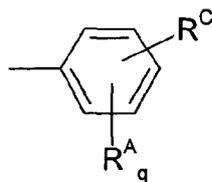
芳基 Ar^1 为 C_{5-20} 芳基。此处使用的术语“ C_{5-20} 芳基”为从 C_{5-20} 芳香化合物的芳环原子上脱去一个氢原子形成的单价基团，该芳香化合物含有一个或二个或多个环(例如，稠合)，并有 5~20 个环原子，其中，至少一个环为芳香环。优选地，每个环含有 5~7 环原子。“ C_{5-20} ”指环原子，或为碳原子
15 或为杂原子。

环上无杂原子的 C_{5-20} 芳基(即 C_{5-20} 碳芳基)的实例包括，但不限于衍生自苯(即苯基)(C_6)、萘(C_{10})、蒽(C_{14})、菲(C_{14})、并四苯(C_{18})以及芘(C_{16})的基团。

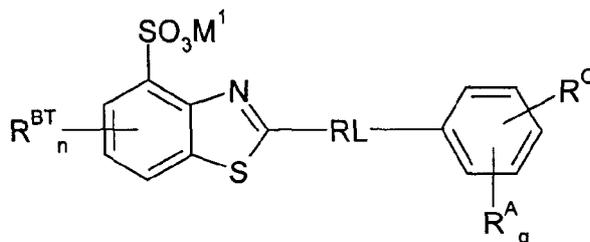
C_{5-20} 杂芳基的实例包括，但不限于， C_5 杂芳基，其衍生自呋喃(oxole)、噻吩(thiole)、吡咯(azole)、咪唑(1,3-二唑)、吡唑(1,2-二唑)、三唑、噁唑、异
20 噁唑、噻唑、异噻唑、噁二唑及噁三唑；以及 C_6 杂芳基，其衍生自异噁嗪、吡啶(吡嗪)、哒嗪(1,2-二嗪)、嘧啶(1,3-二嗪、如胞嘧啶、胸腺嘧啶及尿嘧啶)、吡嗪(1,4-二嗪)、三嗪、四唑及噁二唑(呋咱)。

包括稠环的 C_{5-20} 杂环基团(包括 C_{5-20} 杂芳基)的实例包括，但不限于，
25 C_9 杂环基团，其衍生自苯并呋喃、异苯并呋喃、吲哚、异吲哚、嘌呤(如腺嘌呤、鸟嘌呤)、苯并咪唑； C_{10} 杂环基团，其衍生自喹啉、异喹啉、苯并二嗪、吡啶并吡啶、喹喔啉； C_{13} 杂环基团，其衍生自卟啉； C_{14} 杂环基团，其衍生自吡啶、占吨、phenoxathiin、吩嗪、吩噁嗪及吩噻嗪。

在一个实施方案中， Ar^1 为含有苯核的芳基，其具有下式结构：



其中 q 为 0~5 整数; 每个 R^A 独立地为芳基取代基; R^C 存在, 为具有反应活性的偶联取代基, 或 R^C 为或包含可检测的标记; 并且该化合物具有下式结构:



5

在一个实施方案中, R^C 如果存在, 为具有反应活性的偶联取代基, 并为适于与另一分子或化学物质相连接的基团。

10 在一个实施方案中, R^C 如果存在, 为具有反应活性的偶联取代基, 并且为或包含, 可与另一分子通过化学反应在两者间形成共价键与之相连接的活性官能团。合适的活性官能团实例包括活泼的酯(如琥珀酰亚胺基酯)。

在一个实施方案中, R^C 如果存在, 为具有反应活性的偶联取代基, 并为或包含, 适合以强非共价相互作用与另一分子相连接的基团。这些基团的实例包括生物素(与带有亲和素、链亲和素的分子相结合)。

15 在一个实施方案中, R^C 如果存在, 为具有反应活性的偶联取代基, 并为或包含, 适合以形成复合物或螯合物与另一分子相连接的活性基团, 例如, 螯合基团。这些基团的实例包括能与诸如金属离子, 如镓离子形成复合物或螯合物的基团。这些基团的实例包括二亚乙基三胺五乙酸。

20 在一个实施方案中, R^C 如果存在, 其为或包含可检测的标记。可检测标记的实例包括诸如染料、荧光标记物、抗原基团、稳定及不稳定同位素以及发射正电子的碳原子。在一个实施方案中, R^C 如果存在, 其为或包含含稳定同位素的检测标记。在一个实施方案中, R^C 如果存在, 其为或包含一含不稳定同位素的检测标记。在一个实施方案中, R^C 如果存在, 其为或包含 ^{18}F 。在一个实施方案中, R^C 如果存在, 其为或包含含发射正电子的碳原子的检测标记。

25 其它 R^C 取代基如下述。

在一个实施方案中, R^C 存在, 并如上所定义。

在一个实施方案中, q 为 0。在一个实施方案中, q 为 1。

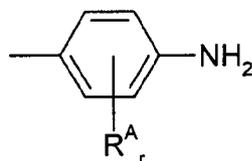
在一个实施方案中, q 为 2。在一个实施方案中, q 为 3。

5 在一个实施方案中, q 为 4。在一个实施方案中, q 为 5。

在一个实施方案中, 每个 R^A 独立地为选自 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^1$ 、 $-NR^1R^2$ 、 $-SO_3M^2$ 、 C_{1-4} 烷基, 其中 R^1 及 R^2 各为 C_{1-4} 烷基的基团, 并且 M^2 为上述的阳离子。

10 在一个实施方案中, 至少一个 R^A 为 $-OH$ 或 $-NH_2$ 。

在一个实施方案中, Ar^1 为含有氨基取代的苯核的芳基, 其具有通式:



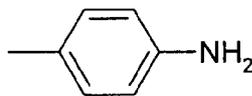
其中 r 为 0~4 的整数, 每个 R^A 独立地为上述定义的芳基取代基。

15 在一个实施方案中, r 为 0。在一个实施方案中, r 为 1。

在一个实施方案中, r 为 2。在一个实施方案中, r 为 3。

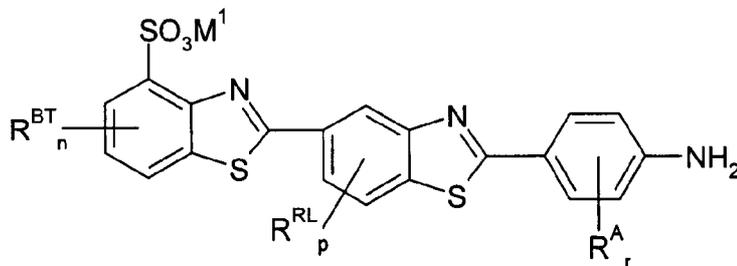
在一个实施方案中, r 为 4。

在一个实施方案中, r 为 1, 并且 Ar^1 为下式的基团:

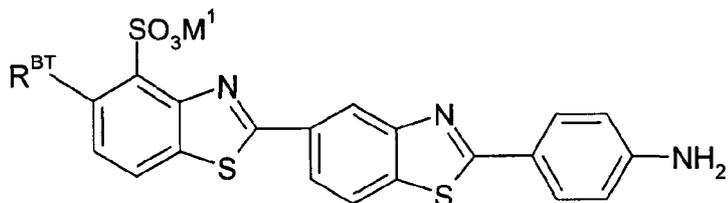


20

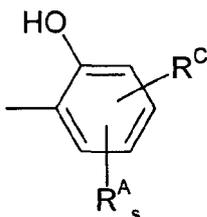
在一个实施方案中, 化合物具有下式结构:



在一个实施方案中, 化合物具有下式结构:



在一个实施方案中， Ar^1 为含有羟基取代的苯核的芳基，并具有如下结构：

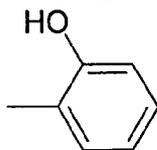


5

其中 s 为 0~4 的整数，每个 R^A 独立地为如上述定义的芳基取代基； R^C 存在，为具有反应活性的偶联取代基，或 R^C 为，或包含上述定义的可检测标记。

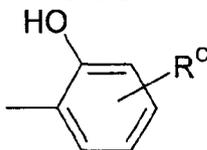
- 10 在一个实施方案中， s 为 0。在一个实施方案中， s 为 1。
 在一个实施方案中， s 为 2。在一个实施方案中， s 为 3。
 在一个实施方案中， s 为 4。

在一个实施方案中， Ar^1 为下式的基团：

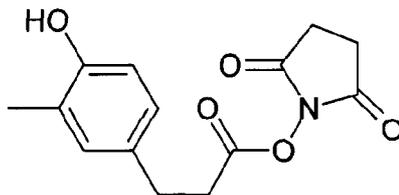


15

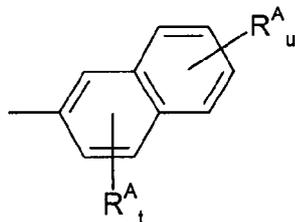
在一个实施方案中， Ar^1 为下式的基团：



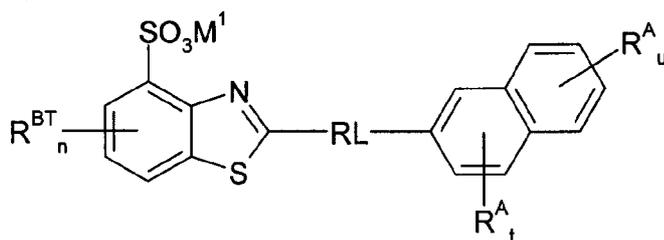
在一个实施方案中， Ar^1 为下式的基团：



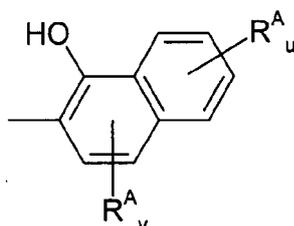
在一个实施方案中， Ar^1 为具有萘核的芳基，其结构如下：



其中 t 为 0~3 的整数， u 为 0~4 的整数，每个 R^A 独立地为如上述定义的芳基取代基，并且化合物通式如下：



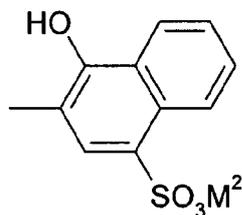
在一个实施方案中， Ar^1 为含有羟基取代的萘核的芳基，并具有如下结构：



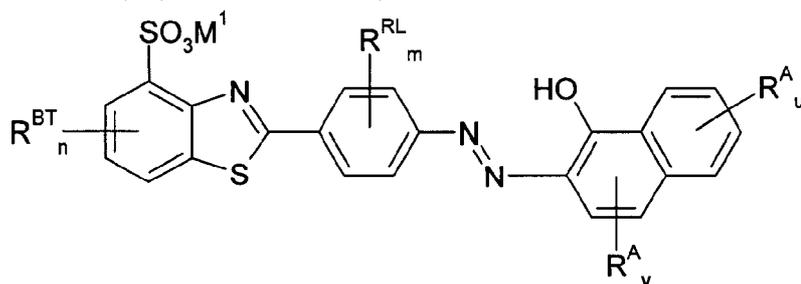
10

其中 v 为 0~2 的整数， u 为 0~4 的整数，每个 R^A 独立地为芳基取代基。

在一个实施方案中， Ar^1 具有下式结构：

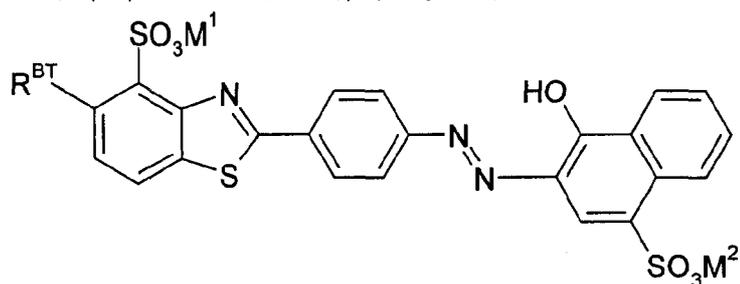


在一个实施方案中，化合物具有下式结构：



15

在一个实施方案中，化合物具有下式结构：



在一实施方案中，配体为下面在“优选的磺化苯并噻唑类配体”的标题
5 下描述的化合物。

用于本发明诊断方法中的上述类型化合物，例如，通式(I)中的化合物，
可经由常规方法制备，例如参见参考 31。

此处描述的所有化合物(或其衍生物)，其具有合适的结构、大小、共平
面性及活性，此后可通指为，但不限于“磺化苯并噻唑类化合物”或“SB 配
10 体”。这些化合物一般地为聚集 τ 分子的配体，例如所述聚集 τ 分子在成对螺
旋丝或神经原纤维缠结处发现。

此处描述的配体可被合适地检测，其通过将发射正电子的碳原子掺入到
在此处公开的化合物的甲基上，再应用本领域熟知的正电子发射断层摄影
(PET)检测。或者，或以其它方法，如可向化合物(例如，此处描述的化合物的
15 的 R^C 基团)中引入含镅的螯合物，如此，可选择性地检测细胞外缠结。优选
的螯合基团中， R^C 为二亚乙基三胺五乙酸。

配体可与其它化学基团、染料、荧光标记物、抗原基团、疗效基团或任
何其它有助于预后、诊断或治疗使用的实物共轭、螯合或以其它方式相结合。
例如，当配体与染料或荧光基团结合时，结合物可用作聚集 τ 或类 τ 分子的
20 标记。因而，其可用于细胞内或细胞外 AD 特征的缠结标记。

吩噻嗪

此前，本发明的发明人已确认出另一类化合物，这些化合物可裂解 PHFs
的结构，并逆转 PHF 核的蛋白水解稳定性(WO 96/30766)。

图 8a 中的结构表示 WO 96/30766 中描述的二氨基吩噻嗪类化合物。其
25 中，为清楚起见，式(IV)表示了(II)的不同共振形式。除化合物(I)为还原形外，
化合物(II)-(IV)皆为氧化形。这些化合物(此后指“二氨基吩噻嗪”或“吩噻

嗪”)包括诸如托洛氯铵(tolonium chloride)及亚甲基蓝。实例见图 8b。其中,所有这些化合物都为氧化形式,除劳氏紫(thionine)外都以稳定的盐的形式存在。

此处描述的方法中应用的化合物具有图 8a 显示的通式,其中:

5 各 R_1 、 R_3 、 R_4 、 R_6 、 R_7 及 R_9 皆独立地为氢原子、卤素、羟基、羧基、取代或未取代的烷基、卤代烷基或烷氧基;

R_5 为氢原子、羟基、羧基、取代或未取代烷基、卤代烷基或烷氧基; 以及,

10 R_{10} 及 R_{11} , 独立地为氢原子、羟基、羧基、取代或未取代的烷基、卤代烷基或烷氧基;

及其药学可接受的盐。

在一个实施方案中,各 R_1 、 R_3 、 R_4 、 R_6 、 R_7 及 R_9 独立地为氢原子、卤素、羟基、羧基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基、 C_{1-4} 卤代烷基或 C_{1-6} 烷氧基;

15 R_5 独立地为氢原子、羟基、羧基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基、 C_{1-4} 卤代烷基或 C_{1-6} 烷氧基;

R_{10} 及 R_{11} 独立地为氢原子、羟基、羧基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基、 C_{1-4} 卤代烷基或 C_{1-6} 烷氧基;

20 此处使用的术语“烷基”指直链或支链基团,优选含有 1~8,更优选 1~6 个碳原子。例如,“烷基”可指甲基、乙基、正丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、异戊基、叔戊基、己基、异己基等。本发明使用的取代烷基的合适取代基包括巯基、硫醚、硝基、氨基、芳氧基、卤素、羟基及羰基、以及芳基、环烷基及非芳基杂环基团。

术语“烷氧基”指上述定义的烷基基团,其带一个氧原子,该氧原子介于烷基及与相连的底物残基之间。

25 术语“卤代烷基”指含有 1~4 个碳原子的直链或支链烷基链,其携带 1、2 或 3 卤素原子。典型的卤代烷基包括氯甲基、2-溴甲基、1-氯异丙基、3-氟丙基、2,3-二溴丁基、3-氟异丁基、碘代叔丁基、三氟甲基等。

“卤素”指氟、氯、溴或碘。

30 一些吩噻嗪类化合物含有一个或多个不对称的取代碳原子,因而,其存在消旋或光学纯的活性形式。本发明包含消旋化合物及其光学纯活性形式。

酸加成的盐可以图 8a 或 8b 中的碱性化合物与无机酸, 例如氢卤酸, 如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸以及磷酸等, 或有机酸, 如乙酸、柠檬酸、马来酸、富马酸、酒石酸、甲磺酸以及对甲苯磺酸等之间形成。

- 5 在一个特别优选的实施方案中, 本发明使用吩噻嗪, 其中:
 R_1 、 R_3 、 R_4 、 R_6 、 R_7 及 R_9 皆独立地为 -H、-CH₃、-C₂H₅ 或 -C₃H₇;
 R_{10} 及 R_{11} 独立地为 -H、-CH₃、-C₂H₅、或 -C₃H₇;
 R_5 独立地为 -H、-CH₃、-C₂H₅、或 -C₃H₇;
 或其药学可接受的盐类。

10

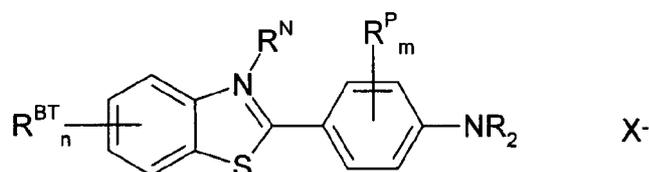
本发明的发明人此处指出, 这些吩噻嗪类化合物可在特定位点与 PHFs 结合, 基于其结合特性, 该位点与上述苯并噻唑类化合物能够结合的位点不同。据认为, 吩噻嗪化合物与该位点结合可影响 τ 聚集的抑制。

- 15 引入适当的标记(可用 PET 检测, 见图 11、11b、12、13)后, 吩噻嗪化合物可用于上述描述方法及上述其它实施方案中。当这些化合物以发射正电子的官能团标记后, 其可用作所有的 τ 聚集物的配体, 且可以透过血脑屏障(参考文献 36)并进入细胞。

在另一实施方案中, 根据此处公开内容, 应该意识到的是, 基于 τ - τ 结合抑制剂的治疗效果, 尤其是治疗进程可以用 SB 配体监测。

20 阻断配体

优选地阻断配体为具有下式结构的苯并噻唑:



其中:

- 25 n 为 0~4 的整数;
 每个 R^{BT} 独立地为阻断配体苯并噻唑取代基;
 m 为 0~4 的整数;
 每个 R^P 独立地为亚苯基取代基;
 每个 R 独立地为氢或氨基取代基; 以及

或者:

R^N 及 X 都不存在, 以及相关的(三级)氮原子为中性;

或者:

R^N 为苯并噻唑取代基, 且相关的(四级)氮原子带正电荷, X 为反离子。

- 5 优选的苯并噻唑包括硫黄素 T(thioflavin T)。如下述实施例所示, SB 配体(如图 5 中的 1a)可使这些化合物(如图 5 中的 1b 或 2)从 NFTs 上被置换, 然而, 这些化合物的确优先与淀粉样蛋白结合。

在一个实施方案中, n 为 0。在一个实施方案中, n 为 1。

- 10 在一个实施方案中, n 为 2。在一个实施方案中, n 为 3。

在一个实施方案中, n 为 4。在一个实施方案中, n 为 0, 1 或 2。

- 15 阻断配体苯并噻唑取代基 R^{BT} 的实例包括, 但不限于, C_{1-4} 烷基、 $-SO_3H$ 及 $-SO_3M^3$, 其中 M^3 为阳离子。在一个实施方案中, M^3 为碱金属阳离子。在一个实施方案中, M^3 为 Li、Na、K 或 Cs。在一个实施方案中, M^3 为 Na 或 K。 C_{1-4} 烷基的实例包括, 但不限于 $-Me$ 、 $-Et$ 、 $-nPr$ 及 iPr 。

- 20 在一个实施方案中, 每个 R^{BT} 独立地为 C_{1-4} 烷基。在一个实施方案中, 每个 R^{BT} 选自 $-Me$ 、 $-Et$ 、 $-nPr$ 及 iPr 。在一个实施方案中, 每个 R^{BT} 为 $-Me$ 。在一个实施方案中, n 为 1 及 R^{BT} 为 $-Me$ 、 $-Et$ 、 $-nPr$ 或 iPr 。在一个实施方案中, n 为 1 及 R^{BT} 为 $-Me$ 。

- 25 在一个实施方案中, 一个 R^{BT} 基团为 $-SO_3H$ 或 $-SO_3M^3$ 。在一个实施方案中, 一个 R^{BT} 基团为 $-SO_3H$ 或 $-SO_3M^3$ 及另一个 R^{BT} 基团为 C_{1-4} 烷基。在一个实施方案中, n 为 2, 一个 R^{BT} 为 C_{1-4} 烷基及一个 R^{BT} 为 $-SO_3H$ 或 $-SO_3M^3$ 。在一个实施方案中, n 为 2, 一个 R^{BT} 为 $-Me$ 及一个 R^{BT} 为 $-SO_3H$ 或 $-SO_3M^3$ 。

在一个实施方案中, R^N 及 X 都不存在, 以及相关的(三级)氮原子为中性;

在一个实施方案中, R^N 为苯并噻唑取代基, 且相关的(四级)氮原子带正电荷, X 为反离子。苯并噻唑取代基 R^N 的实例包括, 但不限于 C_{1-4} 烷基。

- 30 在一个实施方案中, R^N 为 $-Me$ 、 $-Et$ 、 $-nPr$ 及 iPr 。在一个实施方案中, R^N 为 $-Me$ 。反离子的实例包括, 但不限于 Cl^- , Br^- 及 I^- 。在一个实施方案中, R^N 为 $-Me$ 及 X 为 Cl^- 。

在一个实施方案中, m 为 0。在一个实施方案中, m 为 1。

在一个实施方案中, m 为 2。在一个实施方案中, m 为 3。

在一个实施方案中, m 为 4。

5

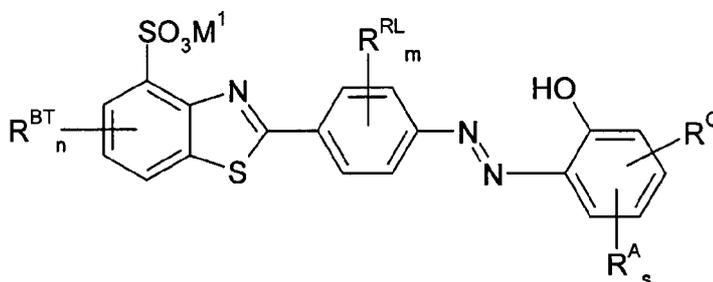
亚苯基取代基 R^P 的实例包括, 但不限于 C_{1-4} 烷基。

在一个实施方案中, 每个 R 为 $-H$ 及氨基为 $-NH_2$ 。在一个实施方案中, 一个 R 为 $-H$ 及一个 R 为氨基取代基。在一个实施方案, 每个 R 为氨基取代基。氨基取代基的实例包括, 但不限于 C_{1-4} 烷基。在一个实施方案中, 氨基为 $-NH_2$ 、 $-NHMe$ 、 $-NHEt$ 、 $-NH(iPr)$ 、 $NH(nPr)$ 、 $-NMe_2$ 、 $-NEt_2$ 、 $N(iPr)_2$ 或 $-N(nPr)_2$ 。

阻断配体的优选实施方案如图 5 所示的化合物 1b 及 2。

优选的磺化-苯并噻唑类配体

本发明一方面, 用于标记存在于 NFTs 中的聚集 τ , 优选细胞外聚集 τ 的配体, 为具有下述通式(II)的化合物:



其中:

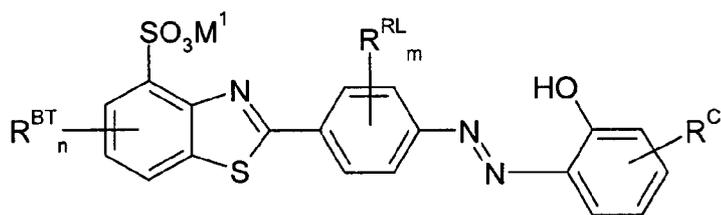
- M^1 为碱金属阳离子;
- 20 n 为 0~3 的整数;
- 每个 R^{BT} 独立地为苯并噻唑取代基;
- m 为 0~4 的整数;
- 每个 R^{RL} 独立地为刚性连接基团芳基取代基;
- s 为 0~4 的整数;
- 25 每个 R^A 独立地为芳基取代基; 以及
- R^C 如果存在, 为活性偶联基团, 或
- R^C 为, 或包含可检测标记。

在实施方案中, M^1 、 n 、每个 R^{BT} 、每个 R^{RL} 、每个 R^A 及 R^C 如此所述(如, 在上述的“磺化苯并噻唑类配体,”标题下)。

刚性连接基团 RL 、芳基 Ar^1 以及苯并噻唑基团, 共同形成基本共平面的化合物, 即其具有高度的共平面性。

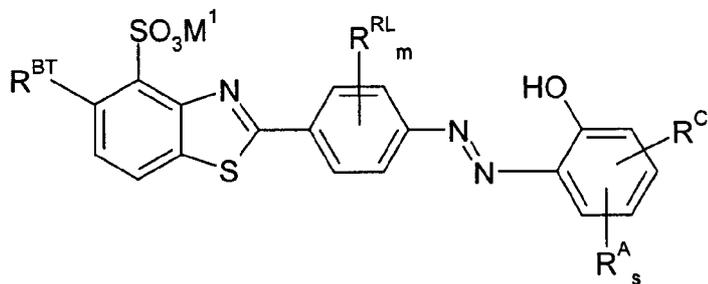
- 5 正如此处所述, 为便于检测, 在这些化合物中引入大体积的基团 R^C 时特别有效。

在一个实施方案中, 化合物具有下式结构:



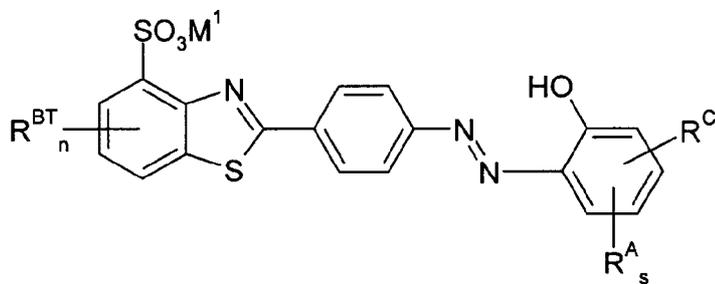
10

在一个实施方案中, 化合物具有下式结构:



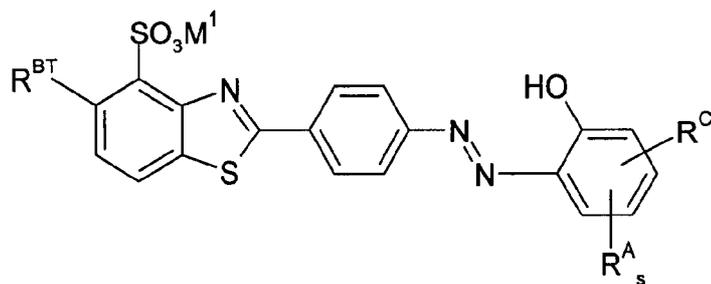
15

在一个实施方案中, 化合物具有下式结构:



在一个实施方案中, 化合物具有下式结构:

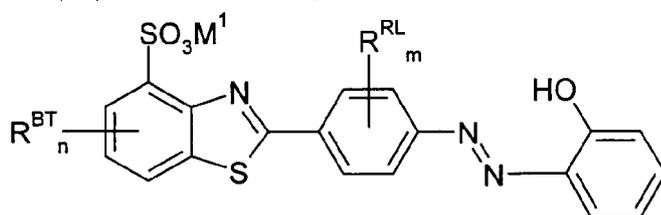
20



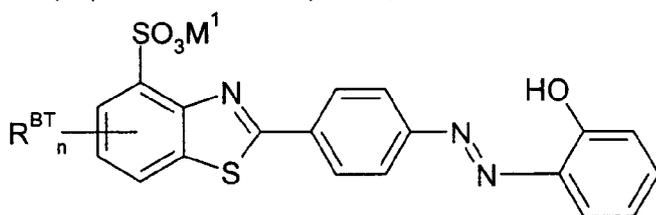
在不同实施方案中，s 为如上所定义。

在一个实施方案中，每个 R^A 独立地选自上述与通式(I)相关的取代基。

5 在一个实施方案中，化合物具有下式结构：

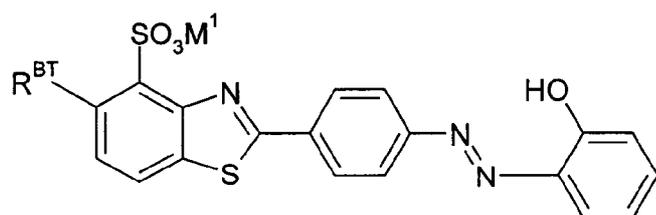


在一个实施方案中，化合物具有下式结构：

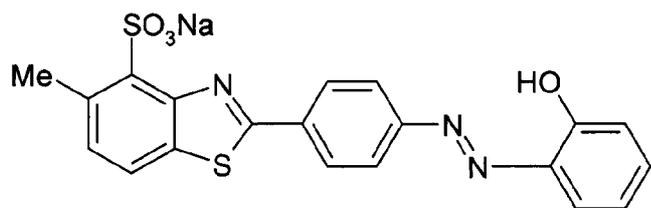


在一个实施方案中，化合物具有下式结构：

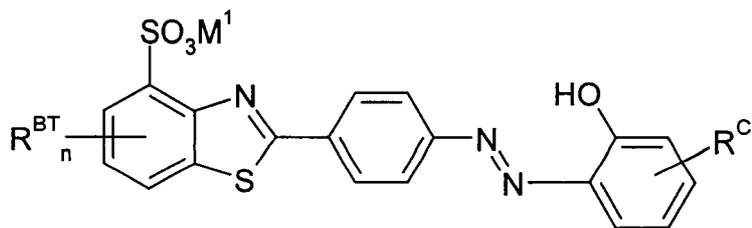
10



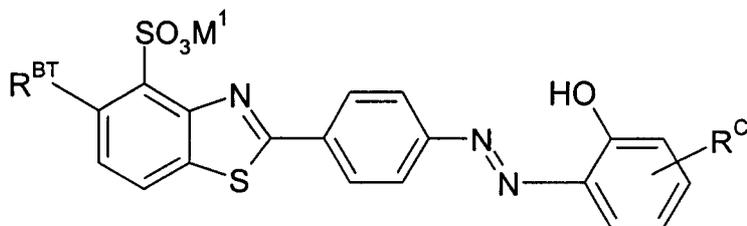
在一个实施方案中，化合物具有下式结构：



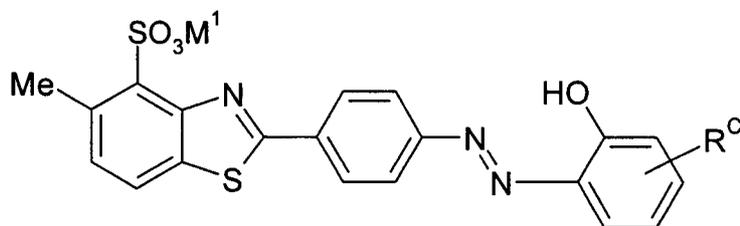
15 在一个实施方案中，化合物具有下式结构：



在一个实施方案中，化合物具有下式结构：

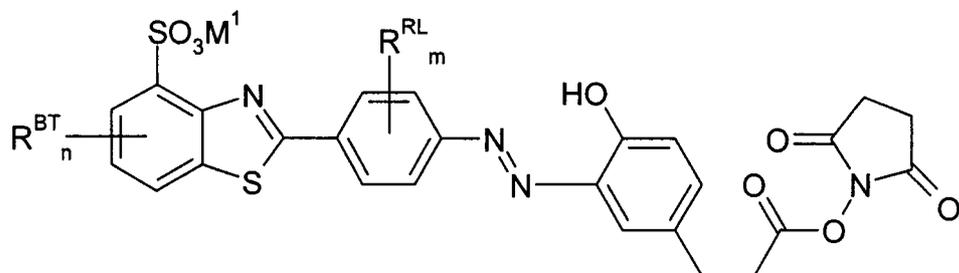


5 在一个实施方案中，化合物具有下式结构：

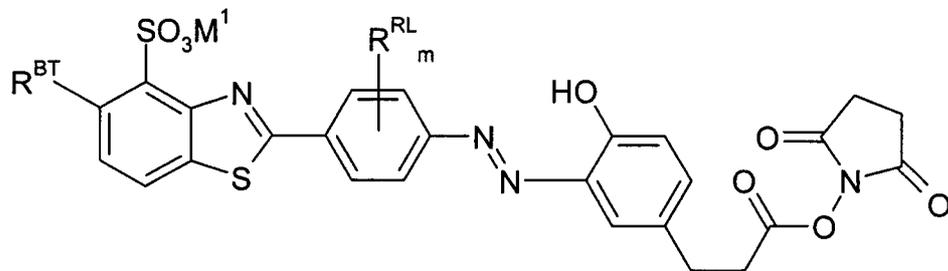


不同的 R^c 取代基将另行讨论。

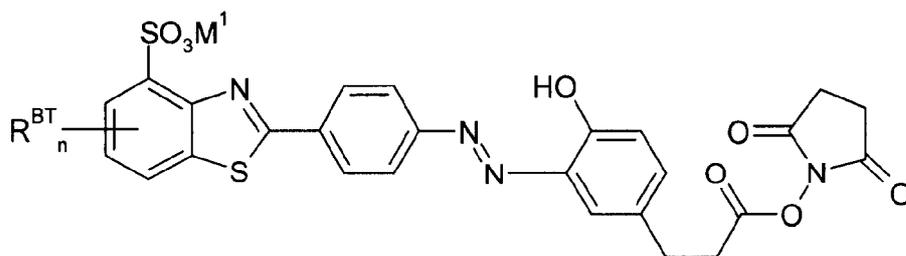
在一个实施方案中，化合物具有下式结构：



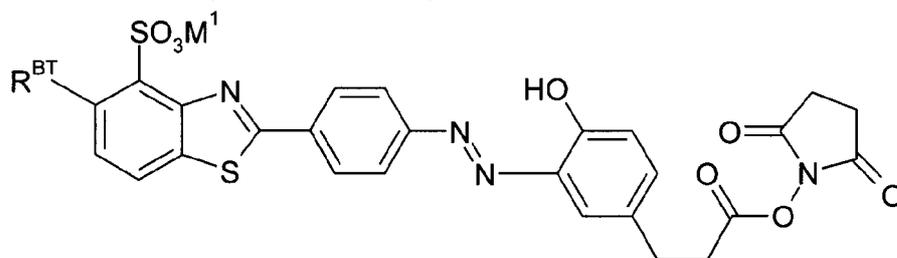
10 在一个实施方案中，化合物具有下式结构：



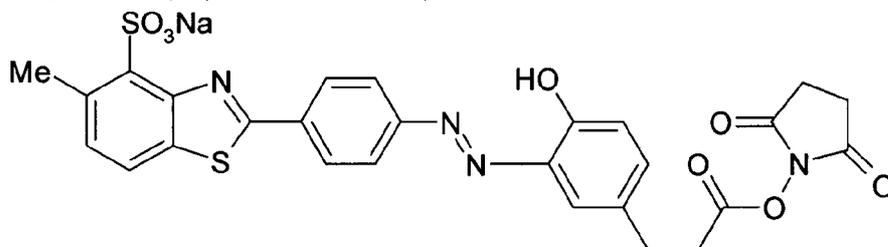
在一个实施方案中，化合物具有下式结构：



在一个实施方案中，化合物具有下式结构：



在一个实施方案中，化合物具有下式结构：



5

一些优选化合物及其衍生物如图 4a-c 所示。

因而，本发明一方面提供了图 4a 表示的化合物或其衍生物，如其中 R^c 为上述偶联基团。如后面实施例所示，这些衍生物(如化合物 4b)保持适当地结合活性。

10

此处公开的新化合物(如式(II)化合物)，尤其可用作诸如 AD 特征的神经原纤维缠结。与这些缠结结合需要的最小关键结构的发现为设计靶向这些缠结的高亲和力配体并进而用于诸如 AD 疾病的诊断、预后或治疗，提供了可能性。

15 这些化合物随后指优选的 SB 配体。

优选 SB 配体的类似物

一般说来，设计一个具有既定靶标性质(在本例中为优选的 SB τ - τ 聚集配体)的化合物的类似物需经历几个步骤，其中，最重要的是确定对靶标性质具有至关重要和/或重要的化合物具体部分。本发明提供的具有与聚集 τ 分子相结合的高亲和力必需的最小关键结构解决了该步骤。

20

化合物 4a 的最小关键结构可根据下述性质模拟, 物理性质, 如立体化学、成键情况、大小和/或电荷, 可用各种来源的数据, 如光谱技术、X 射线衍射数据及 NMR。计算分析、相似性拟合(其模拟的是配体的电荷和/或体积, 而不是原子间的成键)以及其它可用于此模拟过程的技术。

- 5 在此过程中, 优选 SB 配体及其结合物的三维结构被模拟。当配体和/或其结合物在结合时构象产生改变, 且这种改变在设计类似物的模拟过程予以考虑时, 该方法尤其有用。然后选择模板分子, 再将类似的最小关键结构的化学基团引入其中。模板分子及引入其中的化学基团可方便地选择以利于合成, 且可能为药理学可接受, 在保持所需的生物活性时又不在体内降解。
- 10 通过此种途径发现的类似物可经筛选以观察其是否具有目标属性或体现目标属性的程度。然后经过进一步的优化和修饰以找到一个或多个可用于测试和筛选的最终类似物, 例如, 用于体内或临床测试。优化方法包括选择上述类似物, 将类似物与制备的聚集 τ 分子(例如, 在溶液中, 或与固相结合, 或分离的已聚集的 τ , 见 WO96/30776 及后述的测定)相接触并测定待测物质
- 15 与聚集 τ 分子结合和/或从分子中置换化合物 4a 的程度。

标记聚集 τ 的方法

本发明一方面提供了标记聚集 τ 或 τ 类分子的方法, 包括以此处提供的优选 SB 配体化合物或其衍生物与聚集 τ 分子相接触, 并检测该化合物或衍生物的存在。其可参照参考文献第 26-34 中给出的配体使用用法。

- 20 此处使用的术语“ τ 蛋白”一般指 τ 蛋白家族中任何一类蛋白。 τ 蛋白是大量蛋白家族中的一类, 其为在装配及拆解周期中以微管进行共纯化为特征的蛋白(Shelanski 等 (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70., 765-768), 因而被称为微管相关蛋白(MAPs)。 τ 家族的成员具有共同的特征, 即其包含特征性 N 端片段, 其中嵌入约 50 个氨基酸的序列, 其受大脑的逐步调节, 该特
- 25 征串联重复区由包含 31-32 个氨基酸的 3 或 4 个串联重复及 C 端尾部组成。

- “ τ 类”分子包括诸如 MAP2, 其是细胞体树状部位(somatodendritic compartment)主要的微管相关蛋白(Matus, A., 在“Microtubules” [Hyams 及 Lloyd, eds.] pp 155-166, John Wiley 及 Sons, NY)。MAP2 亚型的串联重复区域与 τ 蛋白几乎一样, 但在 N 端域的序列及范围上两者有本质的差异
- 30 (Kindler 及 Garner (1994) Mol. Brain Res. 26, 218-224)。尽管如此, 串联重

复区域的聚集对 τ 重复域并非选择性的。因而，应当意识到此处有关 τ 或 τ - τ 聚集讨论也应涉及 τ -MAP2 及 MAP2-MAP2 的聚集等。

5 优选的 SB 配体可与其它基团或任何其它具有诊断、预后或治疗目的或效果的实物共轭、螯合或以其它方式相结合，例如，配体与荧光基团结合有助于神经原纤维缠结的显影。

诊断组合物及其应用

一般地，本发明的优选 SB 配体(如式(II)化合物)可由分离和/或经纯化的形式提供，即基本纯净。这可能包括在组合物中，其至少约占 90%有效成分，更优选约占 95%及更优选约占 98%。然而，此组合物包含惰性载体或其它药
10 学及生理学可接受的赋形剂。本发明的组合物除包含优选的此处公开的 SB 配体外，其还包含一种或多种其它具有诊断、预后或治疗功效的分子。

本发明中的优选 SB 配体物质或包含该配体的组合物可用于诊断、预测或治疗人或动物，尤其是其罹患诸如下述的 AD 疾病。

本发明的另一方面提供了一种诊断或预后方法，其包括给哺乳动物施用
15 诊断或预后有效剂量的一种或多种所述优选 SB 配体。该方面包括在诊断或预后方法中使用的化合物。其包括体内及体外应用。体外方法如下，其包括 (i) 自研究对象中获取合适的组织标本；(ii)将标本与优选的 SB 配体相接触；(iii)检测与标本结合的优选 SB 配体的量及位置；(iv)关联(v)中的结果与对象疾病的分期及严重程度。

20 研究对象的疾病

本发明另一方面提供了所述优选 SB 配体或其衍生物在制备用于上述疾病的诊断、预后及治疗的组合物中的用途。

疾病可为 AD，AD 类或任何其它涉及聚集蛋白分子的疾病。

值得指出的是， τ 蛋白(功能异常或其进程)不仅在阿尔茨海默病中起作用。
25 神经退行性疾病，如 Pick's 病及进行性核上性麻痹(PSP)，其发病机制似乎分别与大脑新皮质的齿状回及星状锥体细胞累积的病理性截短 τ 聚集物有关。其它痴呆，包括额颞痴呆(FTD)；17 染色体相关连性痴呆(FTDP-17)；脱抑制-痴呆-帕金森综合征-肌萎缩复合体(DDPAC)及苍白球-桥脑-黑质退化(PPND)；Guam 肌萎缩性侧索硬化症(Guam-ALS)；苍白球黑质丘脑下核变性(PNLD)；
30 皮质基底变性(CBD)等(参见 Wischik 等 2000, loc. cit, 详见表

5.1)。所有这些疾病的主要或部分特征为 τ 的异常聚集，此处称为 τ 蛋白病 (tauopathies)。

除上述的一种 SB 配体衍生物，诊断组合物可包括诊断可接受的赋形剂、载体、缓冲液、稳定剂及其它本领域技术人员熟知的物质。这些物质应当无毒且不影响与聚集 τ 相连接的物质活性或其它与物质连接的生物活性基团的功效。载体或其它物质的精细性质决定于服药方式，如口服、静脉内、皮肤及皮下、鼻腔、肌肉以及腹膜内。

口腔使用的诊断组合物可为片剂、胶囊、散剂或液体形式。片剂可包含固体载体，如凝胶或佐剂。液体诊断剂一般包含液体载体，如水、石油、动物或植物油、矿物油或合成油。生理盐水溶液、葡萄糖或其它糖溶液或甘醇，如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇。

供静脉、皮肤、皮下或痛处注射时，液体可为肠胃外给药可接受的无热源、合适的 PH 的等渗及稳定的水溶液。本领域相关技术人员使用诸如等渗赋形剂可制备合适的溶液，如氯化钠注射液、林格注射液以及乳酸钠林格注射液。按需加入防腐剂、稳定剂、缓冲溶液、抗氧化剂和/或添加剂。

上述组合物可单用或联用其它治疗，视病情同时或依次使用。

配体的识别

识别聚集 τ 配体的其它方法需要筛选测定，其可应用允许高通量筛选化学库以识别具有所需活性的化合物的筛选形式。迄今，仍无此类方法可资利用。优选方法不需预先标记化合物，由于标记过程将严重限制了化学研究能力。

本发明的另一方面提供了一种可用于高通量筛选测定的方法，其不受限于对测试物质的预先标记的需求。在优选实施方案中，该方法采用了以下步骤：

1. τ 蛋白的高容量产生，在制备过程中，其发生部分的聚集；
2. 使用该种方法制备的 τ 蛋白测定假定配体，利用 WO96/30766 提供的 τ - τ 结合测定方法，以可识别具有最小或完全没有活性的物质作为 τ 聚集抑制剂，或在高浓度增强 τ - τ 的结合；
3. 测试假定配体，在抑制浓度下典型高效 τ 聚集抑制剂，如 DMMB 存在下进行；

4. 识别假定配体, 其根据配体不能在重复域阻断 τ - τ 的结合, 但可阻断高效 τ 聚集抑制剂的抑制活性。

因此, 本发明提供了体外识别可标记聚集 PHF τ 蛋白配体的方法, 据此, 该方法包括以下步骤:

5 (i)提供第一种怀疑能够标记聚集 PHF τ 蛋白的试剂,

(ii)将 (a) 一种包含 τ 核心片段的 τ 蛋白或其衍生物, 其与固相结合以暴露其高亲和力的 τ 捕获位点(例如, 对应于核心片段及终止于 Ala390-dGA 的截短 τ 蛋白), 与(b)液相 τ 蛋白或其衍生物, 其可与固相 τ 蛋白或其衍生物相结合(如终止于 Glu-391 的 dGAE), 以及(c) 所述已选择的第一种试剂及(d) 已知的第二种 τ - τ 结合抑制剂的试剂相接触,

10 (iii)选择第一种试剂, 全面或部分地解除抑制剂(d)对(b)液相 τ 蛋白或其衍生物对(a)固相 τ 蛋白或其衍生物结合的抑制。

满足(iii)的试剂可作为配体。

优选地该方法结合下述步骤(在其之前, 之中或之后进行):

15 (ibis) 将 (a) 一种包含 τ 核心片段的 τ 蛋白或其衍生物, 其与固相结合暴露高亲和力的 τ 捕获位点, (b)液相 τ 蛋白或其衍生物, 其可与固相 τ 蛋白或其衍生物相结合, 与(c)选择的第一种试剂及,

(ibis.1) 检测 τ - τ 结合的抑制, 其通过对(b)液相 τ 蛋白或其衍生物与(a)固相 τ 蛋白或其衍生物结合的抑制展示,

20 (ibis.2) 选择第一种试剂, 其具有最小或没有作为 τ - τ 结合抑制剂的活性, 可和/或任选增加 τ - τ 连接。

满足(iii)及(ibis.2)的试剂可作为配体。

抑制剂优选地为上述的二氨基吩噻嗪(最优选 DMMB)。选择用于筛选的化合物可为任何化合物, 包括 SB 配体。

25 在优选形式中, 液相 τ 蛋白或其衍生物被制备成在暴露于固相之前发生部分聚集。除此之外, 测定可按 WO96/30766 所述的很宽范围内进行, 其细节详见后述实施例。优选的碱或生理条件(如 PBS)用于结合步骤, 其结果以免疫学方法测定。

30 参阅随后的非限制性实施例, 本发明的这些及其它方面将更为清晰, 其中, 本发明的实施方案只是以实施例的形式进行描述。附图作为参考, 其中:

附图概述

图 1 表明 PHF τ 的区域性分布, 18 例 AD 患者(A) 以抗体 mAb423 或 (B) PHF 片段经甲酸处理后用 mAb7.51 测定。选自 Mukaetova-Ladinska 等, (1993), 美国病理学杂志 143, 565-578。

- 5 图 2(a)显示在 AD 的病理阶段 τ 分子的聚集以及神经原纤维缠结的出现。选自 (Mukaetova-Ladinska, E.B.等(2000)美国病理学杂志 Vol.157, No.2, 623-636); (b)显示 Braak 提出的神经病理分期; (c)显示按照 DSM-IV 标准的临床痴呆症的出现, 其在统计学上对应 III-IV 期的过渡部分。(d)显示 SDS 不溶解的 β 淀粉样蛋白的水平, 据 Harrington 等报道(美国病理学杂志 1994 ;
- 10 145 : 1472-1484), 样品分离自对照与阿尔茨海默病病例。尽管 AD 组的平均值水平高于对照组, 但 70% 的 AD 病例的 β 淀粉样蛋白水平与对照交叠。

图 3 示意性地显示神经原纤维缠结的图表说明(顶部), 以及在疾病进程中观察到的免疫活性的改变(底部)。选自 Bondareff 等(1994) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53, 2, 158-164。

- 15 图 4 显示下述化学结构, 能以高亲和力与聚集 τ 分子相结合的最小关键结构(化合物 4a); 生物素修饰的化合物 4a (化合物 4b)及 4a 化合物的 R 取代衍生物 (化合物 4c), 其中, R 为任何合适的取代基。

- 图 5 显示下述化学结构: 其包括樱草灵(化合物 1a); 硫磺素-T (化合物 1b); 2- (4-氨基苯基)-6-甲基-1-磺化苯并噻唑 (化合 2); 噻嗪红(化合物 3a); 噻嗪黄(化合物 3b)。
- 20

图 6 显示樱草灵溶液(左)及其与纯 PHFs 制剂相结合 (右)的荧光峰。

- 图 7 显示樱草灵溶液与 PHFs 相结合的荧光峰, 分别对应柠康酞不存在 (左)及存在(右)的情况。如之所示, 柠康酞可破坏 PHFs 结构并释放游离的 τ 及游离未结合的樱草灵。柠康酞也具有逆转赖氨酸残基电性的效果, 这对樱草灵的释放也起作用。
- 25

图 8a 及 8b 举例说明典型的 τ - τ 结合抑制剂, 其公开于 WO 96/30766。

图 9 显示了在阿尔新蓝(alcian blue)存在下结合 PHFs 的樱草灵产生的荧光。该图证实, 在 PHF 结构破坏物质阿尔新蓝的存在下, 其对结合的樱草灵在 460nm 处产生的特征荧光峰无影响。

- 30 图 10 显示不同的化合物(“MR”指化合物与 τ 的摩尔比)对 τ - τ 结合的影响效果, 其使用 WO96/30766 提供的方法制备 τ 蛋白, 此处称为“制备 1”。

图 11a 示意性显示 $[^{11}\text{C}]$ 标记的亚甲基蓝的合成。该反应以胺与 $[^{11}\text{C}]$ 碘甲烷进行 N-甲基化反应。HPLC 用于除去副产物以纯化需要产品。图 11b 显示基于劳氏紫、NaH 及 CH_3I 的反应。

图 12 示意性显示 $[^{11}\text{C}]$ 标记的天蓝 B(Azure B)的合成。该反应以胺与 $[^{11}\text{C}]$ 碘甲烷进行 N-甲基化反应。HPLC 用于除去副产物以纯化需要产品。

图 13 以示意性显示 $[^{18}\text{F}]$ 标记的图 4 中化合物 4a 衍生物的合成。该反应通过芳香的亲核取代反应进行，由此，前体化合物的硝基与 $[^{18}\text{F}]$ 的氟基团相交换。HPLC 用于除去副产物以纯化预期产品。

图 14 显示樱草灵、苯并噻唑类似物及噻嗪黄的结构。这些分子的大小基于晶体结构提供的 C-C 距离以及分子中指定的 A 和 B 予以确证。C-C 长度如下：

樱草灵 最小值 14.78AU

最大值 15.11AU

平均值 14.95AU

15 类似物 最小值 15.05AU

最大值 15.26AU

平均值 15.17AU

噻嗪黄 最小值 15.73AU

最大值 16.14AU

20 平均值 15.93AU

图 15 及 16 举例说明樱草灵结构'B'部分的晶体结构 (Soon-Beng Teo 等, 1995, Acta Crystallogr., Sect. C, 591).

图 17 及 18 举例说明化合物 N2A 的晶体结构结构 (Gilardi, R. D., 1972, Acta Chrystallogr., Sect. B, 107).

25 图 19 及 20 显示重氮氨基苯的晶体结构(Gladkova & Kondrashev, 1972, Kristallografiya (41) 17 33).

图 21 及 22 举例说明图 15 及 16 的分子如何在空间中结晶。

图 23 显示活性配体分子(樱草灵及其“类似物”)与噻嗪黄(无活性配体分子)大小的平均值、最大值、最小值的比较。空间单位为埃 (AU)。

30 图 24 显示基本苯并噻唑核 (即图 5 中的分子 1b 及 2) 与二氨基吩噻嗪的类似比较。其距离为碳碳间距离。

图 25 显示为 Braak 分期函数的细胞外缠结的概率。基于 E2/Trans 及 E4/HC 细胞外缠结的概率，2-4 期可清晰地与 1 期区分。

图 26 显示为 Braak 分期函数的细胞内缠结的概率。细胞内缠结为这些区域早期区分提供了较差的效果，但在大脑新皮质区可很好区分 4 及 5 期。

5 图 27 相应于图 25，其中病例选择于死亡前 12 个月，其 MMSE 评分大于 21。得到类似结果。

图 28 相应于图 26，其中病例选择于死亡前 12 月，其 MMSE 评分大于 21。得到类似结果。

10 图 29 显示为 Braak 分期函数的细胞外缠结的密度(计数/mm²)。图 25 得到类似结果。

图 30 显示为 Braak 分期函数的细胞外缠结的密度(计数/mm²)。

15 图 31a 显示以 0.001%硫磺素显色很淡的缠结(箭头)。在此 ifl 悬液中，缠结可经蓝色荧光观察，但其不能区分在制备过程中与污染物结合产生的干扰。底板部显示 0.001%硫磺素产生的蓝色缠结荧光为 0.001%樱草灵产生的黄色缠结荧光所替代。图 31b 显示经链霉蛋白酶消化的标记 PHFs 电子显微图像。(a)生物素修饰的苯并噻唑类似物的化学标记，其如图 4 中 4b 所示。PHFs 沉积于经链霉蛋白酶消化的敷碳载网，先以化合物 4b 简要孵育后，再以结合胶体金的抗生物素抗体制剂孵育。分离 PHFs 的修饰可确定化合物 4b 结合蛋白水解稳定的 PHF 结构。(b)经链霉蛋白酶消化后，以 mAb 423 免疫
20 标记分离的 PHFs，然后以偶联金的羊抗鼠二抗体孵育(Novak 等, 阿尔茨海默病的成对螺旋丝的最小抗蛋白酶 τ 单元的分子特征, EMBO J 12: 365-370)。如该文所述, mAb 423 标记源自细胞内缠结 PHFs 的效果很差(其维持了绒毛外层 N 端 τ 的免疫活性), 但可有效标记链霉蛋白酶消化的 PHFs。同样地, Mena 等 (1996) (Mena R, Edwards PC, Harrington CR,
25 Mukaetova-Ladinska EB, Wischik CM, 阿尔茨海默病的成对螺旋丝对截短的 τ 蛋白病理聚集物的分期, 神经病理学学报 91: 633-641) 显示, 细胞内缠结中的 mAb 423 的免疫活性可极大地被封闭, 但经甲酸预处理后可暴露。

图 32 显示后述实施例 7 中纯化 τ 蛋白的“制备 2”。

30 图 33 显示 dGA 制备性过程结果的图表。“纯化倍数”表述为每个组份的特异免疫反应活性(即免疫反应性/蛋白浓度)与 DE 流量的特异免疫活性的比。

图 34 显示纯化的 dGAE 的凝胶滤过色谱。不变性条件下的表观洗脱大小为：1~320 kD; 2~80 kD; 3~30 kD; 4~10 kD。约 64%的 mAb 7.51 洗脱分子量大于 15kD。

图 35 显示纯化的 T40 的凝胶滤过色谱。不变性条件下的表观洗脱大小为：1~450 kD; 2~160 kD; 3~55 kD。约 50%的 mAb 499 免疫反应活性洗脱分子量大于 60kD。

图 36 显示劳氏紫对制备 1 & 2 中 τ - τ 结合的活性。

图 37 显示托洛氯铵(tolonium chloride)对制备 1 & 2 中 τ - τ 结合的活性。

图 38 显示 DMMB 对制备 1 & 2 中对 τ - τ 结合的活性。

10 图 39a-c 显示全长的 τ 蛋白(hT40), 其按制备 2 的方案制备, 当与固相(b)上的 dGA 同用于水相时证实了最小的 τ - τ 结合活性。然而, 当 hT40 应用于固相(c)上, 其与 dGAE 的结合类似于 dGAE 与 dGA 在固相(a)上的结合。

图 40 显示, 樱草灵及噻嗪红对在制备 2 中的 τ - τ 结合无抑制活性, 然而其在高浓度又的确增强此结合。

15 图 41 显示递增浓度的樱草灵(a)及噻嗪红(b)阻断 5 μ M DMMB 对 τ - τ 结合的抑制效果, 所用浓度表述为相对于 DMMB “摩尔过量”。递增浓度的樱草灵(c)及噻嗪红(d)对 15 μ M DMMB 显示了同样的结果。

20 图 42 显示在递增摩尔过量的樱草灵存在下, DMMB 对 τ - τ 结合抑制的减弱与逆转。在各图中, 分别显示了在 0x、1x、5x、10x、100x DMMB 浓度的樱草灵存在下, 稳定浓度 DMMB 对的 τ - τ 的结合影响。在递增摩尔过量的樱草灵存在下, DMMB 产生的 τ - τ 结合逐渐地被减弱并逆转。

图 43 显示在所示的 25 μ M DMMB 及高摩尔过量的樱草灵存在下的 τ - τ 结合曲线。 τ - τ 结合可模拟如下:

$$\text{结合} = (\text{BMax} \times [\text{樱草灵}]) / (\text{Kd} + [\text{樱草灵}])$$

25 其中 BMax=1.67

$$\text{Kd} = 13.37$$

$$r = 0.977 (\text{观测值对预测值})$$

图 44 显示在所示的 5 μ M DMMB 及增加的樱草灵摩尔过量下的 τ - τ 结合曲线。 τ - τ 结合可模拟如下:

30 结合 = (BMax x [樱草灵]) / (Kd + [樱草灵])

其中 BMax=1.38

$$K_d=13.86$$

$$r=0.927(\text{观测值对预测值})$$

图 45 表明在所示的 5 μ M DMMB 及增加的噻嗪红摩尔过量下的 τ - τ 结合曲线。T-T 结合可模拟如下:

$$5 \quad \text{结合}=(B_{\text{Max}} \times [\text{噻嗪红}]) / (K_d + [\text{噻嗪红}])$$

$$\text{其中 } B_{\text{Max}}=1.64$$

$$K_d=17.45$$

$$r=0.915(\text{观测值对预测值})$$

10

实施例

方法与材料

PHF 结合化合物

除非另有说明, 此处使用的化合物由 ICI Pharmaceuticals 提供。硫磺素及噻嗪黄(thiazine yellow)购自 Fluka AG。

15

荧光的定量

系列 16 μ m 切片切自经过临床及神经病理学确证的 AD 患者的海马。这些切片以 0.01%、0.001%或 0.0001%的樱草灵水溶液染色 5-10 分钟, 然后以水冲洗再置于 Apathe's 水溶液中。在第二系列的试验中, 切片切自海马及 Meynert 基底核。这些切片以 0.01%、0.001%或 0.0001%的樱草灵水溶液染色 5-10 分钟, 然后以水冲洗再置于 Apathe's 水溶液中。

20

配有光电倍增管(Model MPV-2)的 Leitz 荧光显微镜用于定量荧光发射, 使用的三个 Leitz 滤件如下:

1. 滤件 H2, 代码 513 417

通过的激发光带宽: 390-490nm

25

光镜 RKP 510 (即传输 510 nm 以下)

抑制滤器 LP 515 (即反射 515 nm 以上)

3. 滤件 G, 代码 513 416

通过的激发光带宽: 350-460 nm

光镜 RKP 510 (即传输 510 nm 以下)

30

抑制滤器 LP 515 (即反射 515 nm 以上)

4. 滤件 A, 代码 513 410

通过的激发光带宽: 340-380 nm

光镜 RKP 400 (即传输 400 nm 以下)

抑制滤器 LP 430 (即反射 430 nm 以上)

ifI 及 *II* 的制备

- 5 *IfI* 材料按 Wischik 等 (1985) *J Cell Biol* 100: 1905-1912 所述的方法制备。
IfII 材料按 Wischik 等 (1995 *Neurobiol Aging* 16:409-431) 所述的方法制备。至于涉及使用非链霉蛋白酶消化的 *ifII* 试验, 可遵循上述资料, 但可省略链霉蛋白酶消化步骤。

IfII 荧光光谱测定法

- 10 所有的测定均在 Perkin-Elmer 荧光光谱仪(MPF-3 型)上测定。0.00001% 配体浓度常规用于所有测试。樱草灵的激发峰在 370 nm, 发射峰在 515 nm。因而所有测试均在标准的 370 nm 激发波长下测定, 狭缝的宽度恒为 3 mm。

竞争结合分析

- 15 *IfI* 材料在 PBS 中以 0.2ml 匀浆器中匀浆。向悬液中加入测试化合物至终浓度为 0.1%~0.00001%。孵育 5 分钟后加入相同和较低浓度的樱草灵。然后, 将悬液转移至载玻片上中并用包含一组荧光滤件的荧光显微镜检测, 所述滤件包括 380nm~570nm 的激发和发射波长。观测的终点为典型的樱草灵荧光自缠结片断上被置换。

配体的电子显微光谱测定

- 20 经链霉蛋白酶消化后, 取自 *ifI* 级分的 PHFs 沉积在敷碳载网上, 先以生物素化的樱草灵制剂简要孵育后, 再如 Slot 及 Gueze (1981) 方法以结合了胶体金的抗生物素抗体孵育。

IfII 的琥珀酰化及色谱分离

- 25 洗脱的组份溶解在 8 M 脲/50 mM 硼酸盐 (1ml, pH 9) 中并进行超声处理, 加入 1 ml 琥珀酸酐的丙酮溶液至 4 ml 终浓度为 250 mM 的琥珀酸酯中, 用氢氧化钠将 PH 维持在 8.5。溶液离心澄清后, 载于碳酸氢盐平衡的 Sephacryl S200 柱上。在 230 或 280 nm 处检测柱流份。

- 30 由于琥珀酰化组份不能被凝胶考马斯染色(Coomassie staining)和银染色显现, 以 Bolton-Hunter 试剂 (Amersham) 进行特异性化学标记后, 色带以放射自显影检测。

为进行 PHF 衍生肽的光亲和标记,将组份 iFI 或 iFII 与 I^{125} 标记的光敏衍生物预先孵育。

Kav 为 0.21 的光学标记组份经 Amicon YM2 (10ml)膜超滤富集后,在 50 mM 碳酸氢铵中以糜蛋白酶(0.01 mg/ml)消化。作序列分析的糜蛋白酶所致的
5 碎片如 Dr H. C. Thogersen 方法分离得到,用反相 C_{18} HPLC,经 0-100%乙腈及 0.1%三氟乙酸梯度洗脱。糜蛋白酶生成肽作序列分析。

在吩噻嗪存在下 PHFs 的形态学研究

为进行这些试验, iFII 级分按照上述用于电子显微镜检测的方法制备。该材料也可直接以终浓度为 0.0001%~0.1%的吩噻嗪制剂孵育,然后用于敷
10 碳载网上,再以 LiPTA 染色(1%)后直接测定。或者, iFII 沉积于敷碳载网上,部分干燥后,再以吩噻嗪溶液冲洗。这些制备也可直接以 LiPTA 染色或使用 6.423 作为主要抗体进一步处理用于免疫电子显微镜检测。电子显微镜检查满意的放大倍数为 25,000 ~45,000 倍。

细胞外空间聚集 τ 蛋白的计算,以 $\mu\text{g/g}$ 脑组织表示,为 Braak 分期的函
15 数

先前报道了 pmol/g (P) 级水平的 PHF- τ 以及在临床及神经病理学分期队列统计中的缠结计数/ mM^2 (T) (R. Y. K. Lai, 等, Neurobiol Aging 16, 433 (1995)), 用来估计每个受损锥体细胞(PC)的 PHF- τ 水平,其单位为 pg/细胞,采用同样的 ELISA 方法。缠结计数/ mM^2 提供了用于估计 1 mm x 1 mm x 0.1
20 mm (0.0001 cm^3) 空间内受损锥体细胞的数目,考虑到在 $7 \mu\text{m}$ 的切面计算的任何缠结轮廓可沿不同方向正交延伸至约 $45 \mu\text{m}$ (S. M. Blinkov, I. I. Glezer, 图表中的人类大脑,定量手册; Plenum Press, NY, 1968, 表 204)。由于 PHF 为核心 τ 片段为 10 kD, 核心 PHF- τ 水平为 $10 \times P$, 其单位为 pg/cm^3 (C. M. Wischik 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4506 (1988))。从这可知, $\text{PC} = (P \times 10) / (T/0.0001)$ 。在 Braak 4-6 期(H. Braak, E. Braak, Acta Neuropathol. 82, 239 (1991))中,灰质中不同部位的 PC 值为:额叶, $0.13 \pm 0.05 \text{ pg}/\text{细胞}$; 海马, $0.60 \pm 0.39 \text{ pg}/\text{细胞}$; 颞部皮质, $1.074 \pm 0.44 \text{ pg}/\text{细胞}$; 内嗅皮质, $1.56 \pm 0.63 \text{ pg}/\text{细胞}$ 。这些差异反映了解剖学差异,不同区域疾病的发展速度(C. Bancher, H. Braak, P. F 为 cher, K. Jellinger, Neurosci. Lett. 162, 179 (1993), 以及 Gertz
30 等, 神经病理学学报 95, 154 (1988)), 以及在病理后期缠结计数低估营养障碍性神经炎中累积的 PHFs (Lai 等, 1995, loc cit)。总体平均值给出了 AD

相关的 PHF/细胞水平的近似值。在 Braak 1-3 期病例中，其为 0.37 ± 0.08 pg/细胞；在 Braak 4-6 期中，其为 1.08 ± 0.28 pg/细胞。

为估计细胞外聚集 PHF- τ ，随后的表格及图 26、27、29 及 31 所示，若在用 mAb 423 孵育 1 小时之前，经 98% 甲酸处理玻璃放置切片 5 分钟，可以证实 mAb 423 的免疫反应活性，则可计作细胞外缠结计数。为避免疑问，该方法学与 Mena 等报道(1996)不同，在后者的方法中，自由漂浮 vibrotome 切片先经甲酸简要处理，再以 mAb 423 孵育过夜。如该报道所示，后者过夜自由漂浮切片方案达到细胞内缠结最大的 mAb 423 免疫反应活性，且表明了所有细胞内缠结包含 mAb 423 免疫反应活性，即使 PHF 的绒毛外层处于基本封闭状态(参见图 3)。本方案的目的是为确保图 3 所示的 3 期及 2 期缠结得到最大标记。一些标记程度较低的细胞内缠结不能被完全排除，因而试图通过主观辨别进行计数。然而，后者的估计与以 mAb AT8(图 28、30、32)标记缠结的密度及概率不一致，由于其仅涉及细胞内且与由 mAb 423 揭示的神经病理分期具有完全不同的特征。因而，为便于计算，mAb 423 免疫反应活性的缠结计数可基本上或完全视为图 3 所示的 2 期及 3 期细胞外缠结病理学的代表，而非图 3 所示的 1 期的代表。为避免疑问，图 3 中的分期不是 Braak 分期，而是包含缠结的单一神经元的变性期。

表 1 所示特征数据基于如下数据：

	Number	BST	ME1T4	PC	PT4	REG3B	SE1T4
20	1	1.0000	0.3982	1.5600	0.6212	1.0000	0.3982
	2	2.0000	6.7259	1.5600	10.4924	1.0000	2.7047
	3	3.0000	14.9646	1.5600	23.3448	1.0000	2.9836
	4	4.0000	33.6297	1.5600	52.4624	1.0000	10.9883
	5	5.0000	44.3102	1.5600	69.1240	1.0000	13.0298
25	6	1.0000	0.0	0.6000	0.0	2.0000	0.0
	7	2.0000	1.3865	0.6000	0.8319	2.0000	0.4531
	8	3.0000	3.7169	0.6000	2.2302	2.0000	0.8060
	9	4.0000	8.9384	0.6000	5.3630	2.0000	3.0048
	10	5.0000	23.9479	0.6000	14.3687	2.0000	4.0567
30	11	1.0000	0.0	0.6000	0.0	3.0000	0.0
	12	2.0000	0.0	0.6000	0.0	3.0000	0.0

13	3.0000	0.0	0.6000	0.0	3.0000	0.0
14	4.0000	0.1293	0.6000	0.0776	3.0000	0.1293
15	5.0000	2.2007	0.6000	1.3204	3.0000	1.0634

其中:

- 5 BST 为 Braak 分期
 ME1T4 为细胞外缠结计数
 PC 为每个细胞 PHF- τ 浓度的估计值 (如上计算)
 PT4 为有关细胞外缠结的 PHF 含量(PC xME1T4)
 REG3B 为如图 26 及 27 将脑区分为 3 组的聚类,
 10 SE1T4 为细胞外缠结计数的标准误。

实施例 1-Braak 分期的聚集 τ

- 基于免疫化学性质(见参考文献 26, 27, 30), 将细胞内缠结与细胞外缠结进行区分是可能的。在该范畴内, 缠结病例的频率(即概率)及其数量(即计数/ mm^2)两者皆于预期病例中测定, 并且按照 Braak 系统分成病理学进程中代表分期的区域。

如图 25 所示, 基于 E2/Trans 及 E4/Hc 的细胞外缠结的概率, 可将 2-4 期与 1 期明显地区分开来。描述 F/T/P 区域(大脑新皮质区的额叶、颞叶及顶叶)的图片也表明了这一点。

- 20 相反地, 细胞内缠结对这些区域的早期区分效果不佳, 但使用大脑新皮质区可很好区分 4 及 5 期。类似地, 选择于死亡前 12 月, MMSE 评分大于 21 的病例, 其可得类似结果。同样地, 当缠结密度被测定时, 可得类似结果。

- 25 如材料与方法中所述, 这些结果可转变为细胞外空间聚集 τ 蛋白数量的近似值, 以 $\mu\text{g/g}$ 脑组织表示。这些结果如表 1 所示, 其值偏低, 由于缠结计数低估了聚集 τ 蛋白的数量。

表 1: 不同区域及分期的 ECT 中的 PHF-T 含量的估计

区域	BST	PHF/T ($\mu\text{g/g}$)
30 E2/TRANS	1	0.62
	2	10.49

		3	23.34
		4	52.46
		5	69.12
5	HC/E4	1	0
		2	0.83
		3	2.23
		4	5.36
		5	14.36
10	F/T/P	1	0
		2	0
		3	0
		4	0.08
15		5	1.32

表 1 显示细胞外空间聚集 τ 蛋白的数量, 表示为 $\mu\text{g/g}$ 脑组织, 为 Braak 分期的函数。数据的计算如材料与方法所述。

20 总之, 这些结果证实在中颞叶的细胞外 PHF- τ 沉积, 为 AD 神经原纤维变性的经验分期提供了基础。若有合适的配体, 该分期仅可以用放射自显影的方法实现。

实施例 2-与 PHF 核心 τ 蛋白聚集重复域相结合的化合物的评价

25 获得的原型化合物作为购买的硫磺素-S 粗品的组份之一, 所述粗品经分析薄层色谱以及制备性色谱可分成约 20 种不同的成分。测试表明, 并非所有的这些组份可作为有效的缠结配体。具体说来, 发现纯净的樱草灵(图 5, 化合物 1a)可标记缠结, 但苯并噻唑硫黄素-T 效果较差, 尽管其优选标记淀粉样蛋白。

30 此外, 发现化合物 1a 能够替换缠结处的化合物 1b, 当后者以 10 倍过量加入至缠结粗提取物的时候。

差异的可能假定为位置 1 处(图 5, 化合物 2 [2-(4-氨基苯基)-6-甲基-1-磺化苯并噻唑])的磺化基团。然而, 发现樱草灵(化合物 1a)能够从缠结(认为没有淀粉样蛋白)替换该化合物。因此, 缠结标记不应仅仅限于磺化苯并噻唑结构, 表明需要较长的芳香结构。

5 发现相同浓度的噻嗪红(thiazin red)(图 5, 化合物 3a)能竞争樱草灵, 然而化合物 3b(噻嗪黄, 图 5)却不能。因此, 较长的芳香苯并噻唑结构本身并不能决定其与缠结的高结合力。

为了定义竞争结合的最小关键必需结构, 通过引入单个跨双氨基链的苯基来延长磺化苯并噻唑。该化合物(图 4, 化合物 4a)尽管没有荧光, 但发现其在相同浓度时可竞争噻嗪红及樱草灵。因而, 化合物 4a 定义了能与缠结高亲和结合的最小必需结构。

为了证明缠结上的结合位点就是 PHF 自身, 通过引入生物素基团(图 4, 化合物 4b)进一步延长化合物 4a。由于发现其仍能竞争樱草灵及噻嗪红, 化合物 4b 保持了与缠结的高亲和结合力。此外, 发现与免疫金偶联的抗生物素抗体可标记用化合物 4b 预孵育的分离 PHFs, 然而, 已证实没有预孵育或仅以生物素预孵育无法标记(图 31b)。最终, 当制备出光活化的偶联物后, 即有可能识别蛋白及测定标记蛋白的序列。已发现, 其具有与经 PHF 核心分离出的相同的核心 τ 片段, 其包含 τ 蛋白的重复区域。

20 总之, 这些结果清晰地表明了化合物 4a 及 4b 的结合位点在 PHF 核心 τ 蛋白的聚集重复域。此外, 其证实化合物 4a 可用作螯合剂, 引入官能团而不影响 PHF 核心与配体的活性。因此, 化合物 4a 可用作螯合剂, 可引入钆或其它显影基团以生成合适的配体, 用于如 AD 的细胞外缠结的检测。

实施例 3-确定配体分子的最佳空间

25 图 14 表明了上述的三个结构及其显示的大小。例如, 显示了樱草灵, 一种苯并噻唑类似物(称为“类似物”)以及噻嗪黄的 $C_{11}-C_1$ 及 $C_{10}-C_1$ 间距。

图 15 及 16 表明了樱草灵结构'B'部分的晶体结构(Soon-Beng Teo 等, 1995, Acta Crystallogr., Sect. C, 591。如图 16 中所见为分子的侧影, 其基本上是平面的, 尽管略有扭曲。自同一分子计算樱草灵的'A'部分。在此, 也可推出分子的 A+B 值, 其提供了本发明一个有效品种的实际长度。

为了计算图 14 表明的“类似物”的大小，使用图 15 中的数据测量 A，以及从 N2A 分子，图 17 及 18(Gilardi, R. D., 1972, Acta Crystallogr., Sect. B, 107)中确定测量 B。从图 18 中分子的侧影可见分子的该部分是完全平面的。对噻嗪红使用了同样的测量，其大小同“类似物”相同。

5 噻嗪黄(图 14 所示)的大小按如下确定。'A'部分源自图 15 的分子，其用于樱草灵，然而'B'部分源于图 19 及 20 的分子 (Gladkova 等, 1972, Kristallografiya41)。再次，分子的 B 部分完全是平面的，其与图 17 中所示的分子之间唯一的差别为芳香基团间的距离。

10 图 21 及 22 表明图 15 及 16 的分子如何在空间中结晶。可以看出，分子形成了交互的“鲑骨”图案，且不是堆积。通过比较，亚甲基蓝的晶体结构表明分子以 π 键间的堆积交互的水分子片形成堆积。

表 2 制表给出了樱草灵(“PRIM”)、类似物 (“ANAL”)，噻嗪黄及一个苯并噻唑单位(即图 5 所示的结构 1b 及 2)的空间最小值、最大值及平均值。相应的亚甲基蓝的空间给定为'MBCC'(碳碳间)以及'MBNN'(氮氮间):

	1	2	3	4	5	6
	PRIM	ANAL	THIAZY	BENZTHIA	MBCC	MBNN
最小值	14.7830	15.0500	15.7270	8.7700	7.0849	9.9600
最大值	15.1120	15.2610	16.1380	8.9550	7.4443	9.9600
平均值	14.9475	15.1680	15.9273	8.8625	7.3031	9.9600

15

图 23 表明活性配体分子(樱草灵及“类似物”)及噻嗪黄 (其为惰性配体)的平均值、最大值及最小值范围的比较。空间大小的单位为埃(AU)。在图 24 中，在基本的苯并噻唑核(即图 5 所示的分子 1b 及 2) 及二氨基吩噻嗪作了类似的比较。这些距离为碳碳间的距离。

20 上述结果表明此处所示的分子基本上都是平面的，然而，本发明配体及上述的其它分子间的活性有着根本的差异。如图所示，根据本发明，合适的配体包括大小在 14.783 ~15.261 AU 的长平面分子。另一方面，较长分子如噻嗪黄，其大小超出该范围(平均值 15.927 AU)而不能成为有效的配体，即使其是平面分子。然而，有些较短的平面分子优先与淀粉样蛋白结合。

25

实施例 4.使用配体分子或抑制剂的 PET

图 11-13 表明了典型的合成方法,其可将二氨基吩噻嗪或“类似物”转变为发射正电子的物质。

图 11b 具体表明了一种方法,其中先以 NaH 处理劳氏紫,然后以标记的碘甲烷处理生成亚甲基蓝。在以天蓝 A 及天蓝 B 合成亚甲基蓝时,可采用类似的合成方法。也可使用其它强碱。

其它可使用的方法包括 HCl 及标记的 MeOH ; 标记的磷酸三甲酯; 标记的二甲基亚砷及标记的甲酰胺。化学合成及一般方法学为本领域技术人员所熟知。这些给出的实施例并不包含任何对完善的方法学的限制。

10 实施例 5-阻断配体

诸如硫磺素-T 及-S 的化合物可对淀粉样沉积强烈地染色。然而,图 31 证实这些化合物可被樱草灵从缠结置换下来。因此,这些化合物可用作阻断试剂以饱和不感兴趣结合位点,同时不抑制配体对聚集 τ 的结合。

15 实施例 6-配体分子与抑制剂的比较

与 τ - τ 结合的有效抑制剂相比,有效配体的分子的活性似乎存在根本的差异。苯并噻唑分子并不裂断 PHFs,任一种配体也不产生裂断作用,然而,二氨基吩噻嗪构成了 PHF 裂断剂及 τ 聚集抑制剂。

使用樱草灵,对聚集依赖型 τ 配体及聚集 τ 抑制剂之间的关系进行进一步的探讨。溶液中的樱草灵的荧光峰在 520nm,当其与纯净的 PHFs(图 6)抑制剂结合时荧光峰移至 470nm。经柠檬酸酐处理 PHFs 后 470nm 荧光峰消失(图 7),柠檬酸酐裂断了 PHF 的结构并释放出游离的 τ (同时逆转了赖氨酸的电荷)。因此,此类化合物的结合依赖于 PHF 中发现的 τ 聚合状态,但游离的 τ 不存在聚合状态。

25 已经识别出裂断 PHF 结构及逆转 PHF 核的蛋白水解稳定性的化合物(参见 WO96/30766)。这类化合物的实例见图 8。本发明的发明人已经确证在特定结合位点,这些化合物在高亲和力的 τ - τ 结合域内与 τ 结合。然而,发现这些化合物并不能破坏樱草灵与聚集 τ 分子中的 τ 的结合,如在阿尔新蓝(alcian blue)(图 9)存在下,樱草灵在 470nm 保持荧光峰。

30 因而,尽管阿尔新蓝可抑制 τ - τ 的相互作用,或其作用的抑制位点或也许结合反应的级数,为 SB 配体留下了结合位点。因而,作为聚集 τ 配体的

化合物似乎与为 τ 聚集抑制剂的化合物不在相同位点结合, 尽管其仍影响这些抑制剂的抑制性质(参见随后的实施例 7)。

通过研究典型用作 τ 聚集抑制剂的聚集 τ 配体的效力, 进一步检视了该点。先前研究表明, 基于固相测定中 τ - τ 结合抑制(WO 96/30766), 可确认 τ 聚集抑制剂(如二氨基吩噻嗪)。当在同样的测定中测试时, 樱草灵及噻嗪红发现对 τ - τ 结合有弱的抑制活性(图 10)。因而, 尽管这些化合物是 PHF 核心 τ 的强力配体, 它们至多是 τ - τ 结合抑制位点的弱抑制剂。

在足够高浓度尤其是诸如亚甲基蓝化合物的存在下, 二氨基吩噻嗪类化合物与聚集状态的 τ 相结合的证实, 由 PHF 结构的裂断直接证实。因而, 为 τ - τ 结合抑制剂的二氨基吩噻嗪类化合物在低浓度时可用作聚集 τ 的配体。

总之, 本发明的发明人发现在核心 PHF τ 聚集体内可定义两类结合位点, 都有可能用于开发放射显影配体:

(i) 磺化苯并噻唑类位点: 此类化合物由于具有合适的大小及电荷, 其与合适的螯合物如铈结合, 可用作细胞外缠结的配体。

(ii) 二氨基吩噻嗪类位点: 此类化合物以发射正电子的官能团适当标记后, 可用作所有的 τ 聚集体的配体, 且可跨越血脑屏障(参考文献 36)并进入细胞。因而, 此类化合物及其衍生物可潜在用于标记细胞内缠结, 例如, 存在于 AD 患者脑部的缠结, 或其以低浓度时使用用于细胞内缠结。

20 实施例 7-基于对抑制的解除识别其它诊断性配体的实例分析

(i) 其中已经发生部分聚集的 τ 蛋白的制备

制备(“制备 2”)以图表示意性地显示于图 32, 其与较早描述的方法(如 WO96/30766-“制备 1”-如下(ii) 所示)不同。

重组 cDNA 质粒如 W096/30766 所述, 其内容此处引入作为参考。

25 简要说来, 使用标准方法(Sambrook, Fritsch & Maniat 为“分子克隆. 实验室手册 1” (1989)冷泉港实验室, N. Y.), 自阿尔茨海默病患者脑组织中分离 mRNA 生成 τ cDNA, 该组织于患者死亡 3 小时后获取。cDNA 库用合成的 17-mer 寡核苷酸探针筛选, 该探针为 PHF 核心蛋白部分的序列(Goedert 等 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 4051-4055)。全长的 cDNA 克隆被亚克隆入 M13mpl9 的 EcoRI 位点及用于在起始密码子邻近区定点诱变引入 NdeI 位点。用 NdeI 及 EcoRI 裂解后, 生成的 cDNA 片段经亚克隆到 T7 RNA

聚合酶启动子的下游并进入 NdeI/EcoRI 切割的表达质粒 pRK172 中 (McLeod 等 (1987)EMBO J., 6, 729-736)。PRK172 为 pBR322 的衍生物, 由于除去了 pBR322 拷贝数控制区, 其在 E. coli 大量繁殖。质粒携带了氨苄青霉素的抗性基因, 以进行重组的克隆选择。

5 编码截短 τ 的 cDNA 构建, 如 Novak 等((1993) EMBO J., 12, 365-370) 所述的方法自 mRNA 制备。使用特异的寡核苷酸引物, 用 mRNA 作模板进行聚合酶链反应 (PCR)。正义引物包含 NdeI 位点, 反义引物包含 EcoRI 位点。如上所述, 将 PCR 片段亚克隆入 pRK172。用于构建 dGAE 的引物如图 22 所示。所有用于表达的 DNA 片段的真实性以双链全长测序确定。

10 构建 h τ 40 (“T40”)cDNA 的细节如 Goedert 等 ((1989), 神经 3: 519-526) 所述。该序列是发现于 CNS 的最大形式的 τ , 其编码 τ 蛋白, 该蛋白包含 29 个氨基酸的 2N 端嵌入体及在微管蛋白结合域的额外的 31 个氨基酸重复片段。DNA 及其预期的氨基酸序列如图 21(SEQ ID NO: 4)所示。

15 使用重组质粒转化 E. coli BL21 (DE3), 后者为原核表达的菌株, 其携带在 lac UV5 启动子控制的噬菌体 T7 RNA 聚合酶基因的染色体拷贝 (Studier 及 Moffat (1986), 分子生物学杂志 189, 113-130)。培养物以 IPTG(异丙基硫代半乳糖苷)诱导指数生长 3 小时。

20 按照 Goedert 及 Jakes 所述(1990, EMBO J., 9, 4225-4230)的方法, 适当改进可大量(1L 细菌培养物)纯化 τ 片段。通过将细胞片状沉淀物在液氮下快速冷冻将细胞破碎, 然后将该片状物悬于包含 50 mM PIPES 及 1 mM 二硫苏糖醇 (DTT)的缓冲液(pH 6.8)中。上清热稳定蛋白以 PIPES/DTT 透析, 然后载于包含磷酸纤维素的以同样缓冲液平衡的柱上。以在上述缓冲液中的 NaCl (0-0.5M)梯度洗脱 τ 蛋白。组份以 SDS-PAGE、考马斯染色及免疫印迹法分析。收集含 τ 组份, 用 25mM MES、1 mM DTT (pH 6.25)透析后, 以约 25 5 mg/ml 浓度 -20°C 贮存。蛋白的浓度以 Lowry 方法测定(Harrington CR (1990), “Lowry protein assay containing sodium dodecyl sulphate in microtitre plates for protein determination on fractions from brain tissue”, Analytical Biochemistry 186:285-287)。

30 制备 2 不同于上述制备 1, 差异如下: (1)超声阶段的细胞浓度增加 5 倍。(2) 包含 DE52 对非 τ 蛋白的批吸收。(3)蛋白质不必以热处理。(4) 最后一步使用聚乙二醇浓缩。

大肠杆菌生长于 2xTY 培养基(Oxoid)中,在对数生长后期以氨苄青霉素 (50 μ ml)处理。离心收集 5L 培养物中的细胞,细胞片状沉淀物以液氮快速冷冻。将片状物以 50 mM PIPES (pH 6.8)溶解,其包含 1mM EDTA、1mM 二硫苏糖醇及 1mM 苯基甲基磺酰氟(PMSF),再在 4 $^{\circ}$ C 将细胞超声(2 x 3 分钟)裂解。混合物 10,000 rpm 离心 20 分钟,上清液在 4 $^{\circ}$ C 以 1 g Whatman DE52 旋转 3 小时。混合物上柱分离,不能结合于 DE52 的洗脱物在 4 $^{\circ}$ C 孵育 3 小时,再以 0.4 g Whatman P11(按照厂商推荐新鲜再生)旋转。柱以柱缓冲液(50 mM PIPES, pH 6.8, 包含 1mM EGTA、5mM EDTA、0.2mM MgCl₂、5mM β -巯基乙醇及 1mM PMSF)冲洗。 τ 蛋白以在柱缓冲液中的 0.1 ~1 M KCl 梯度逐步洗脱。收集所得包含 τ 组份(免疫测定法确定),用 80 mM PIPES 透析(pH 6.8),透析液包含 1mM EGTA、1mM MgCl₂ 及 5mM β -巯基乙醇,用分子量临界值为 1000 的透析管进行。透析液以聚乙二醇 8000 浓缩滤袋 2-3 小时。 τ 的终浓度 3~10 mg/ml 为。

在典型的大量制备过程中, τ 的特异性免疫反应活性从不能与 DE52 结合的材料纯化了 30-40 倍。约 60% 的 τ 自终产品中回收,有 10% 不能与 P11 结合,柱组份中的残留物忽略。

表 3 详细地表明了 dGA 的制备过程。“纯化倍数”为每个组份的特异性免疫反应活性(即免疫反应活性/蛋白浓度)与 DE 洗脱流份的特异性免疫反应活性的比。

	Vol (ml)	mg/ml	AU/ml	AU	AU/mg	Purifn (-fold)	Recovery (%AU)
Total cells	200	26	40000	8000000	1538		
DE flow thro'	240	20	40000	9600000	2000	1.00	100%
P11 flow thro'	220	19	5000	1100000	263		11%在 P11 洗脱液中
级分:							
(6ml each)	#1	1.48	5000	30000	3388	2	
	#2	0.98	20000	120000	20492	10	
	#3	1.60	80000	480000	50000	25	
	#4	2.69	200000	1200000	74294	37	
	#5	3.09	200000	1200000	64767	32	
	#6	3.31	200000	1200000	60459	30	62%在收集级分中
	#7	2.71	200000	1200000	73746	37	
	#8	2.70	125000	750000	46296	23	
	#9	2.20	100000	600000	45537	23	
	#10	1.83	80000	480000	43764	22	20%在丢弃级分中
纯 dGA	14.5	8.4	600000	8700000	71429	36	

图 33 是表 3 的数据图。

表 4 汇总了 τ 蛋白品种: dGA、dGAE 及 hT40 的制备过程的产出。

τ 制备	蛋白浓度(mg/ml), 基于		免疫反应性 (mAb 7/51; AU/ml)	蛋白产量 (每 10 升)
	280nm 处吸收	蛋白分析(BSA 参照)		
dGAE (711)	3.3	3.8	300,000	100 mg
dGA (1511)	8.1	8.4	600,000	122 mg
T40 (1311)	3.5	3.1	125,000	120 mg

	基于消光系数	280nm 处吸收
BSA(参照) 10mg/ml	10 mg/ml	6.6
τ 蛋白 10mg/ml	10 mg/ml	14.7

蛋白以 PBS 缓冲液平衡的 50 x 1cm 琼脂糖凝胶 CL-6B 硅胶滤过柱分离, 在室温操作。制作了 12,400~200,000 范围柱的分子量标准曲线。绘制了 \log_{10} 标准对数曲线, 其以 Kd 为单位的 M_r 对 V_e/V_o 作图, 其中, V_e 标准洗脱体积, V_o 为以葡聚糖蓝测定的柱空体积。

- 5 T40 或 dGAE 载于包含 5%甘油的 0.5ml 缓冲液中, 组份以 1ml 为单位收集。组份中的蛋白的存在用分光光度法测定 280nm 的吸收。采用 ELISA 方法分别以单克隆抗体 7/51 或 499 检测 dGAE 或 T40 的存在。ELISA 测定在 96 孔 PVC 板中进行, 其测定如下:

- 10 50 μ l 的各组份在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时, 以 0.05% tween-20 洗板, 然后以 200 μ l PBS+2%脱脂奶粉于 37 $^{\circ}$ C 阻断位点 1 小时。以 0.05% tween-20 洗板, 用 50 μ l 经 PBS+2%脱脂奶粉稀释至 1: 10 的第一抗体 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。再以 0.05% tween-20 洗板, 以 50 μ l 经 PBS+2%脱脂奶粉稀释至 1:10 的二级抗体(羊抗鼠 IgG:HRP 偶联物)37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。以 0.05% tween-20 洗板, 再以去离子水冲洗后加入 50 μ l 新制备的底物(TMB [四甲基联苯胺]的乙酸钠的缓冲液,
- 15 pH5.0, 含 H₂O₂, 新鲜制备), 并用 2 分钟在 OD 650 读入变化速率。

纯化的 dGAE 及 T40 的洗脱曲线如图 34(dGAE)即 35 (hT40)所示。尽管两者的片段典型地分别位于 12kD 及 55kD, 约 64%的 mAb 7.51 免疫反应活性 (dGAE)组份的分子量 > 15kD, 约 50%的 mAb 499 免疫反应活性(hT40)组份的分子量 > 60kD。因而, τ 蛋白存在, 至少部分地存在聚集形式。

- 20 (ii) 使用不同的 τ 蛋白制剂检测 τ 聚集抑制剂的效果

当蛋白 dGA 及 dGAE 如上制备时(“制备 2”), 相对于 W096/30766 (“制备 1”)所述制备方法获得的性质, τ - τ 结合测定的性质产生改变。

测定在 96 孔 PVC 板 (Falcon 目录号 353912)中进行, 其步骤如下:

1. 将 50 μ l dGA (-10 μ g/ml)的碳酸盐缓冲液 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时(碳酸盐缓冲液: 50 mM 碳酸盐-碳酸氢盐, pH 9.6 (Na₂CO₃ 1.59 g/l, NaHCO₃ 2.93 g/l))。
2. 以 0.05% Tween-20 洗板。
3. 200 μ l PBS+2% Marvel, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。
- 5 4. 以去离子水清洗板 2 次, 再以 0.05% Tween-20 洗涤。
5. 50 μ l dGAE (-10 μ g/ml) 与药物的 PBS+1%鱼皮胶+0.05% Tween-20 溶液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。
6. 以 0.05% Tween-20 洗板。
7. 50 μ l 抗体 423 (1: 10, 以 PBS+2% Marvel 稀释), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。
- 10 8. 以去离子水清洗板 2 次, 再以 0.05% Tween-20 洗涤。
9. 50 μ l HRP-抗-鼠(1: 1000, 以 PBS+0.05% Tween-20 稀释), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。
- 10.以 0.05% Tween-20 洗涤, 再以去离子水清洗板 2 次。
- 11.50 μ l 底物溶液,用 2 分钟以板读取器立即读取在 OD650 的起始速度。
- 15 (底物溶液: 50 mM 乙酸钠, pH 5.0 + TMB (1 ml/100 ml 的 10 mg/ml DMSO 溶液) + H₂O₂ (10 μ l/100 ml))

发现在制备 2 中, 化合物劳氏紫及托洛氯铵需要较制备 1 更高的浓度才能发挥抑制效果。如图 36 及 37 所示。此外, 发现二甲基亚甲基蓝(DMMB)在制备 2 中较在制备 1 中具有更高的抑制效力, 如图 38 所示。

- 20 在以制备 1 方法制备的 τ 蛋白中可观察到类似的差别, 但制备 1 允许其在体外超时聚集, 其效果解释如下。由于这两种效果必须达到, 因而诸如化合物劳氏紫及托洛氯铵需要较高浓度才能达到最大抑制 τ - τ 结合:

1. 破坏水相中预先存在的聚集物;
2. 抑制水相中的物质与固相的结合。

- 25 制备 2 中 DMMB 的较大效力可解释为, 在需要双重抑制效果的作用位点上, 其具有更大的结合亲和力。

- 30 全长的 τ 蛋白(hT40), 其按制备 2 的方案制备, 当与固相上的 dGA 用于水相时证实了最小的 τ - τ 结合活性。然而, 当 hT40 在固相上应用时, dGAE 的结合类似于固相中 dGAE 与 dGA 的结合(参见图 39a-c)。其可解释为, 在水相中形成的 hT40 聚集体中, 在或通过其需要与固相上 dGA 的结合作用的

结构已经形成 τ - τ 结合。当 hT40 首先固定(plate)于固相时,其与 PVC 的结合显露蛋白/聚集体,以使关键的 τ - τ 结合位点可资利用。

(iii) 使用不同的 τ 蛋白制剂检测 τ 聚集抑制剂的效果

按照在制备 2 的测定方法,以樱草灵及噻嗪红为代表的强活性配体对 τ - τ 结合无抑制活性,如图 40(cf. 图 10)所示。在该检测中,这些化合物在高于 100 μ m(即相对于 τ 蛋白 100 倍摩尔比)浓度时的确增强 τ - τ 结合。

较之无 DMMB 时,5 μ m 的 DMMB 一般可降低 τ - τ 结合(τ 的浓度一般为 1 μ M)23%,15 μ m 的 DMMB 降低 17%。

意外的是,此种抑制效果可在高浓度的高亲和配体,如樱草灵及噻嗪红共孵育时完全逆转,如图 41 所示。

因此,聚集 τ 配体的功能特征在于其自身并不抑制 τ - τ 结合,但可阻断 τ - τ 结合的强效抑制剂的抑制效果。

如图 42 所示,在增加樱草灵摩尔过量下,DMMB 产生的 τ - τ 结合抑制得到进行性减弱或逆转。噻嗪红可得到类似结果。这表明,DMMB 的最大抑制效果可被这些化合物降低,因而,其可用作 DMMB 的非竞争性抑制剂。一个可能的解释是,配体稳定了测定中使用的 τ 聚集体,例如,在 DMMB 活性所需的关键结合域的外部区域,因而,其阻止了 DMMB 对 τ - τ 结合的抑制效果。

图 43-45 表明任何既定浓度的 DMMB,在樱草灵(43,44)或噻嗪红(45)存在下, τ - τ 结合有定量的增强,其可经标准的 Michaelis-Menten 方程模拟。这表明,这些配体的 τ 聚集增强效果与占据的配体结合区域的分数成比例,据推测其在引入测定的水相的 τ 聚集体内。两种配体的平均 B_{max} 为约 1.6,即最大的配体效果是产生 1.6 倍的 τ - τ 结合信号,其可在无药物存在时观察到。这种效果的平均 K_d 是约 15x,即任何既定的大于 4 μ m 浓度的 DMMB,当配体相对于 DMMB 浓度有 15 倍的摩尔过量时,可观察到最大 50%的 τ - τ 结合增强。

实施例 8-基于此处提供的配体识别其它诊断配体的实例测定

定义了两类上述的用于标记 AD 的 PHFs 合适配体后,在筛选测定中可使用化合物/衍生物方法开发新的配体。模拟的方法可基于已存在的配体。

(i)在磺化苯并噻唑位点识别新的配体

使用合适标记的已知磺化苯并噻唑制剂,与聚集 τ 分子(例如在溶液中或与固相结合)的聚集 τ 或自 AD 患者脑中分离的高度富积的 PHFs,参见 W096/30766)的制剂孵育后,引入可能为合适配体的化合物,然后测定其竞争已知配体抑制 PHF 内的结合的能力。

5 (ii)在吩噻嗪位点识别新配体

如 WO 96/30766 所述的 τ - τ 结合测定,其可用作初步筛选以识别 τ - τ 结合位点处的潜在抑制剂。同样地,合适标记的已知二氨基吩噻嗪的制剂,与上述聚集 τ 孵育后,可用于筛选其它可能为 PHF 结合位点竞争者的化合物,并为潜在的合适 PHF 配体。

10 竞争测定的物理手段为本领域所熟知。其可包括荧光测定、放射性或任何其它合适的报告系统,其源于不与存在于溶液中的 PHFs 结合的磺化苯并噻唑类或二氨基吩噻嗪类化合物。

参考文献

1. DeToleda-Morrell, L. *et al.* (1997), *Neurobiology of Aging* 18, 5, 463-8;
2. De Leon *et al.* (1997), *Neurobiol. Of Aging*, 18, 1, 1-11;
- 5 3. Mori, E *et al.* (1997), *Am. J. Psychiatry* 154:1, p18;
4. Juottonen, K. (1998); *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 65, 322-327;
5. Bobinski, M. *et al.* (1999), *Lancet* 353, p.38;
6. Fox, N.C. (1999) *Neurol.* 52, 1687-9;
7. Jack, C.R. *et al.* (1997) *Neurol.* 49: 786-794;
- 10 8. Fox, N. *et al.* (1996), *Brain* 119, 2001-7;
9. Johnson, K.A. *et al.* (1998), *Neurol.* 50, 1563-1571;
10. Perez-Tur, J. *et al.* (1999), *Neurol.* 53, 411-3;
11. Lehtovirta, M. *et al.* (1998) *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 64, 742-6;
12. Nagy, Zs *et al.* (1999), *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 10, 109-114;
- 15 13. Ishii, K. *et al.* (1998), *Neurol.* 51, 125-130;
14. Imamura, T *et al.* (1997), *Neurosci. Lett.* 235, 49-52;
15. Minoshima, S. *et al.* (1997), *Ann. Aurol.* 42, 85-94;
16. Ibanez, V. *et al.* (1998), *Neurol.* 50, 1585-1593;
17. Wischik, C.W. *et al.* (2000) "Neurobiology of Alzheimer's Disease", Eds.
20 Dawbarn *et al.*, *The Molecular and Cellular Neurobiology Series*, Bios
Scientific Publishers, Oxford).
18. Carretero, M.T. *et al.* (1995), *Dementia* 6, 281-5;
19. Villareal, D.T. *et al.* (1998), *Alzheimer's Dis. Rev.* 3, 142-152;
20. Marin, D.B. *et al.* (1998), *Artherosclerosis* 140, 173-180;
- 25 21. Kuller, L.H. *et al.* (1998), *Stroke* 29, 388-398;
22. Vargha-Khadem, F. *et al.* (1997), *Science* 277, p376;
23. Willingham, D.B. (1997), *Neuron* 18, 5-8;
24. Lakmache, Y. *et al.* (1995), *PNAS USA* 95, 9042-6;
25. Hodges, J.R. *et al.* (1999), *PNAS USA* 96, 9444-8;
- 30 26. Mena, R. *et al.* (1995), *Acta Neuropathol.* 89, 50-6;
27. Mena, R. *et al.* (1996), *Acta Neuropathol.* 91, 633-641;

-
28. (deleted)
 29. Lai, R. *et al.* (1995) *Neurobiol. Aging* 16, 3, 433-445;
 30. Bondareff, W. *et al.* (1994) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53, 2, 158-164;
 31. Resch, J.F. *et al.* (1991) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1, 10, 519-522;
 - 5 32. Novak, M. *et al.* (1993), *EMBO J.* 12, 1, 365-370;
 33. Wischik, C.W. *et al.* (1996), *PNAS USA* 93, 11213-8;
 34. Wischik C.W. *et al.* (1989), *Curr. Opin. Cell Biol.* 1, 115-122;
 35. WO 96/30766;
 36. Muller, T. (1992), *Acta Anat.* 144, 39-44.

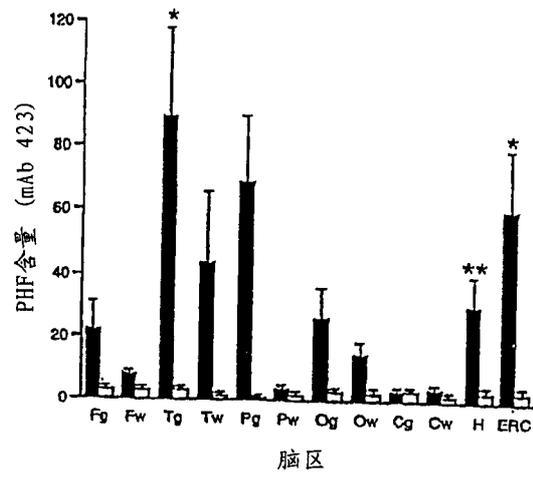


图 1a

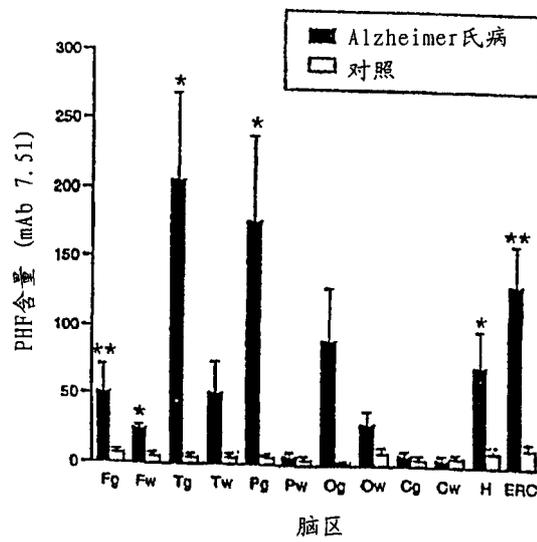
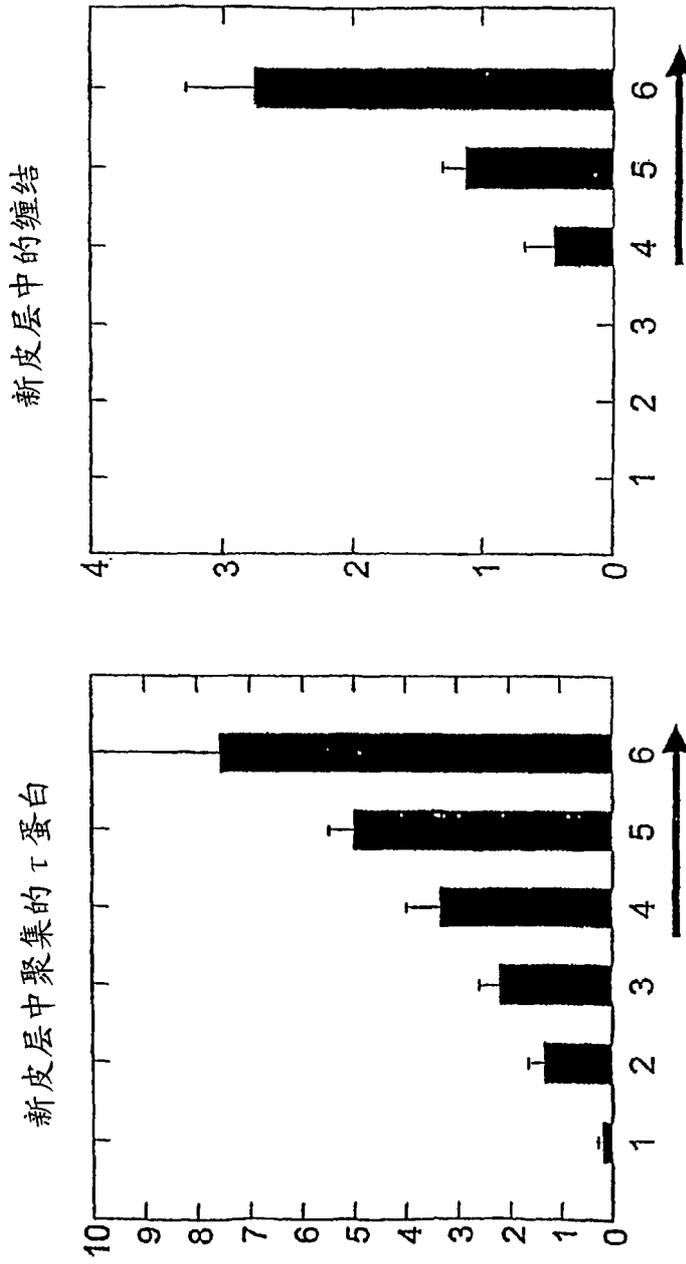


图 1b



Alzheimer氏病的病理分期
(箭头表示有临床痴呆出现)

图 2a

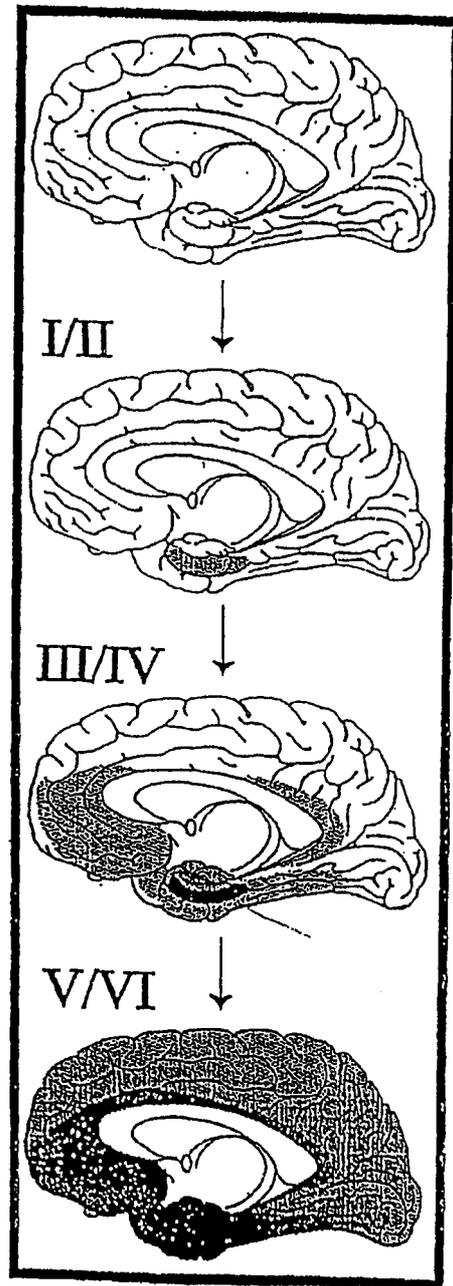


图 2b

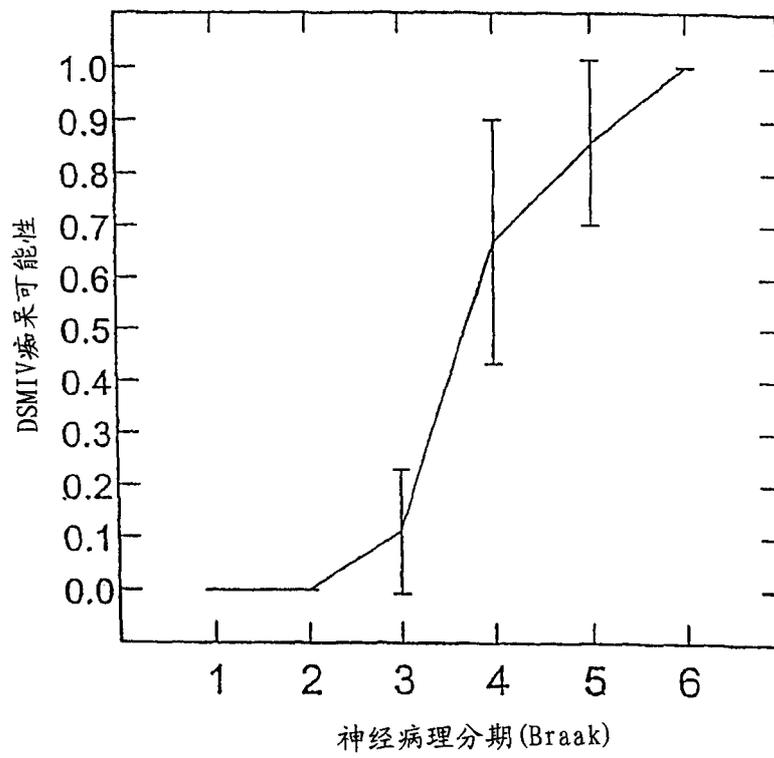


图 2c

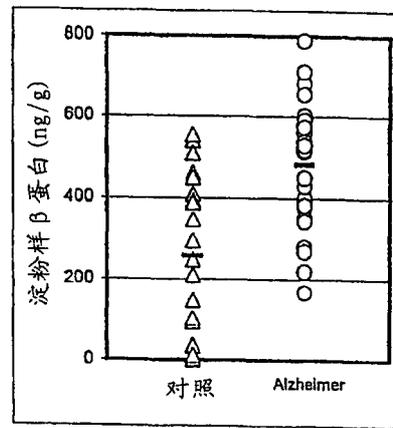


图 2d

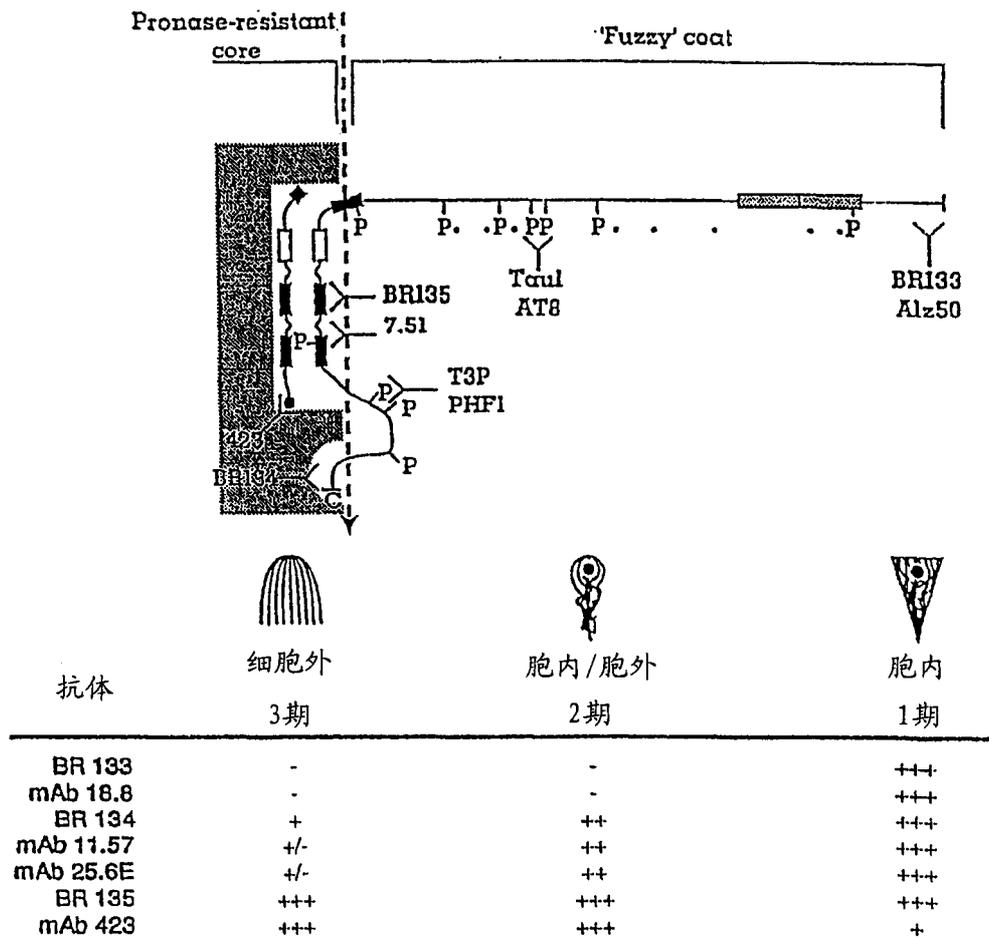


图 3

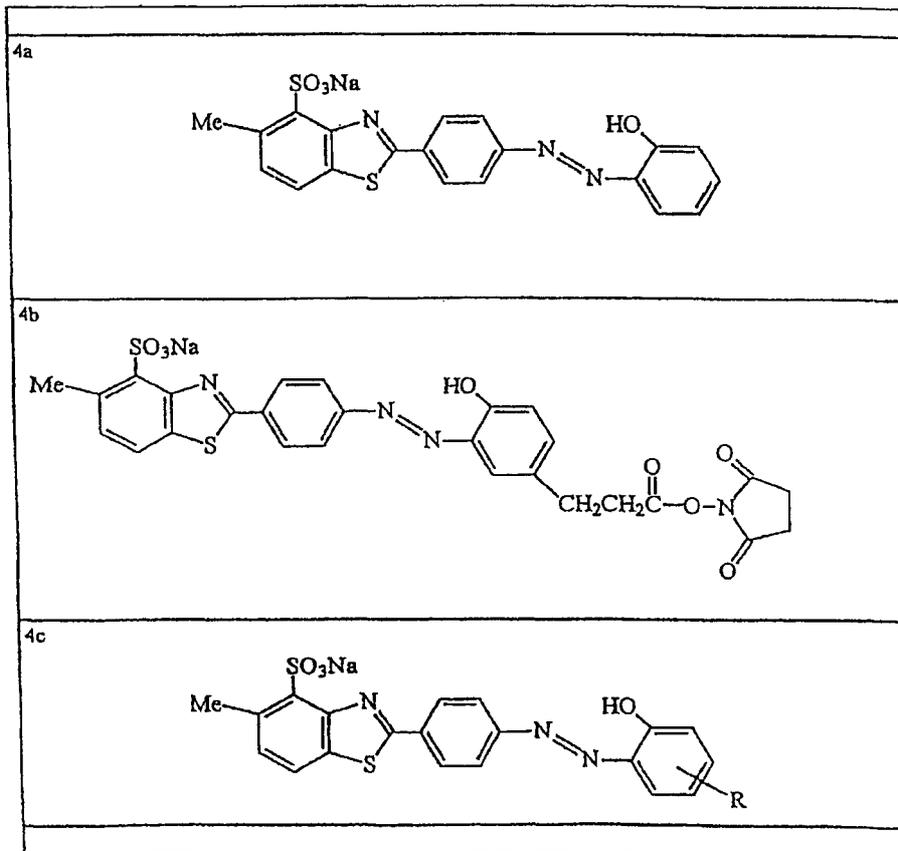


图 4

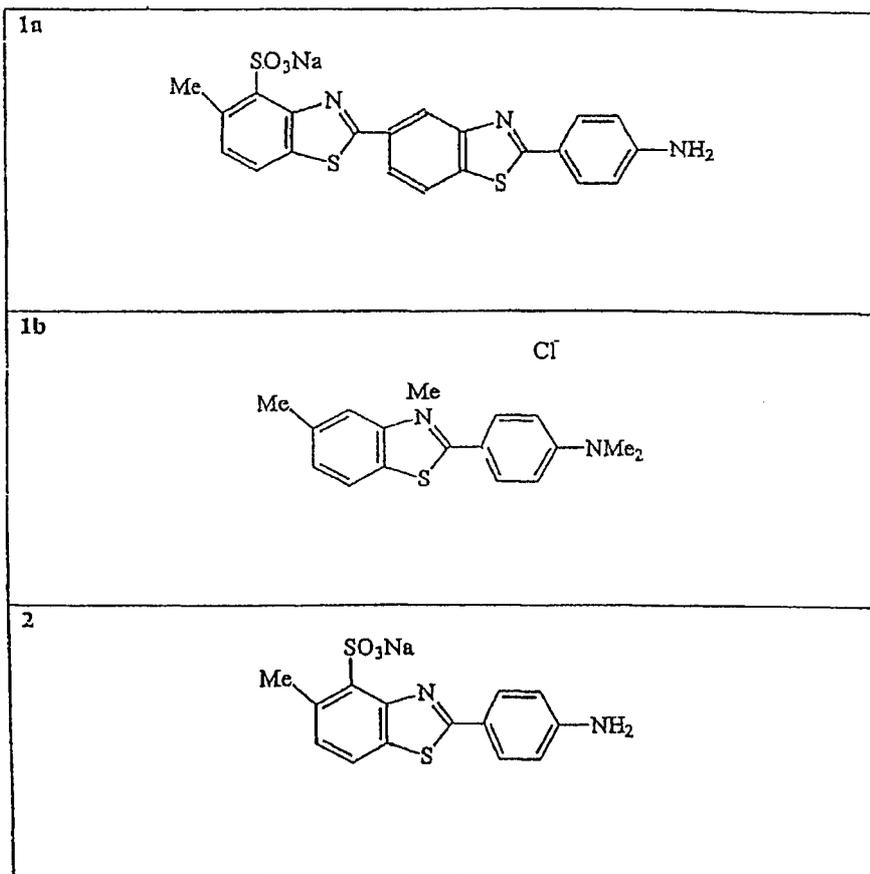


图 5

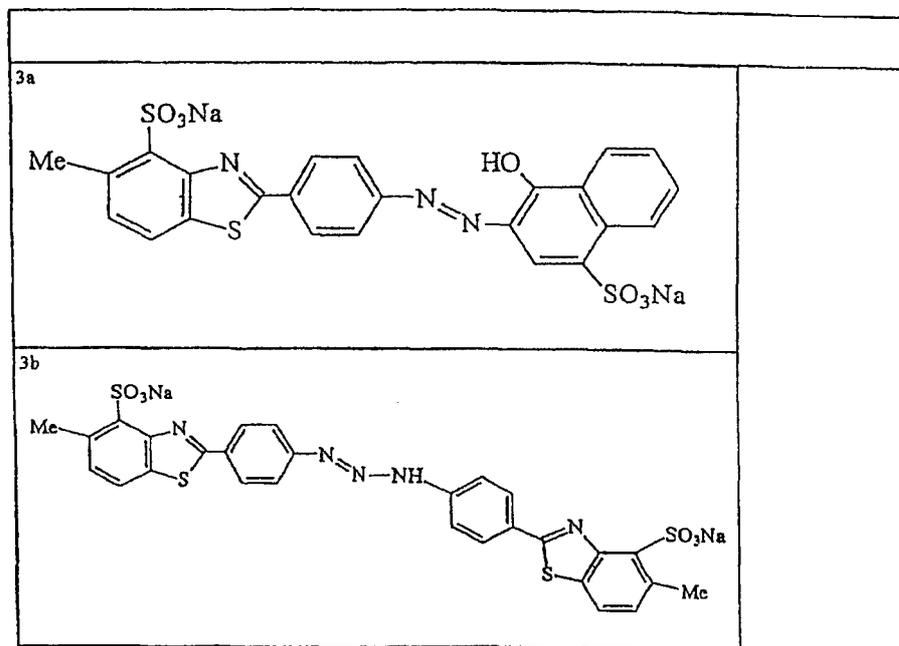


图 5 (续)

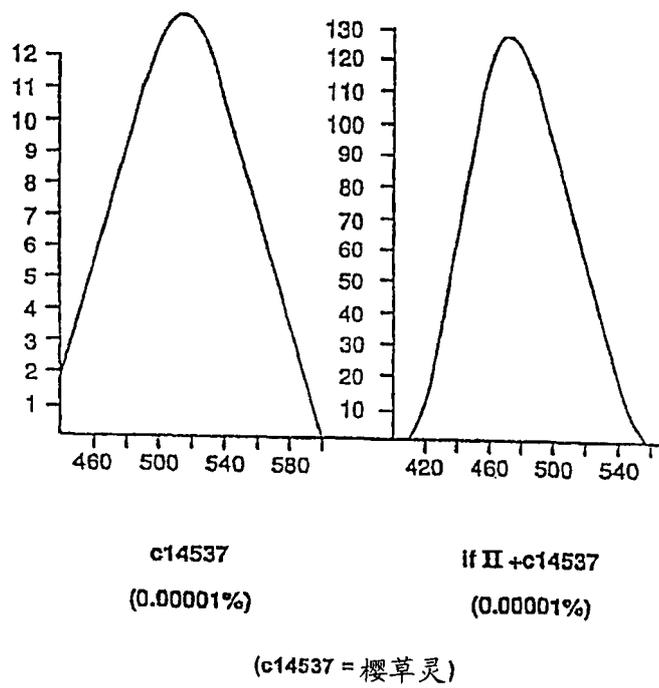


图 6

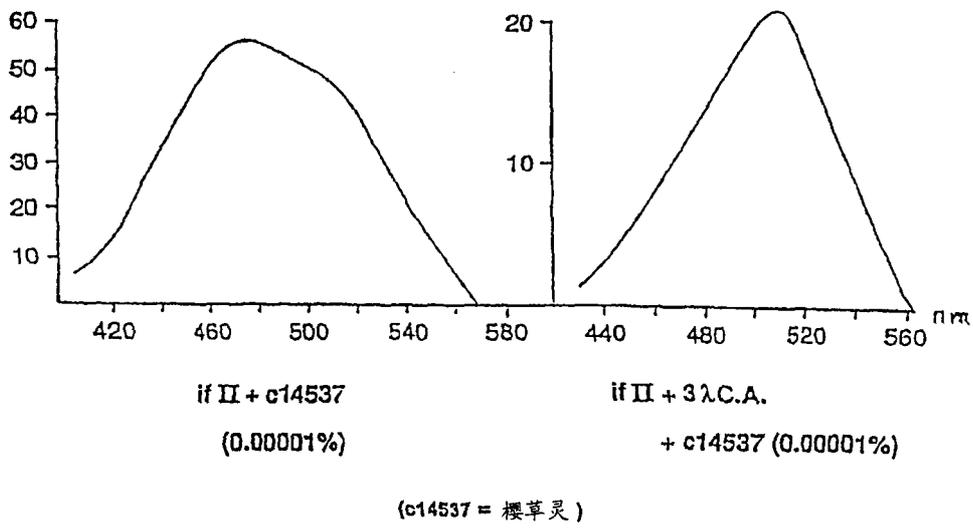


图 7

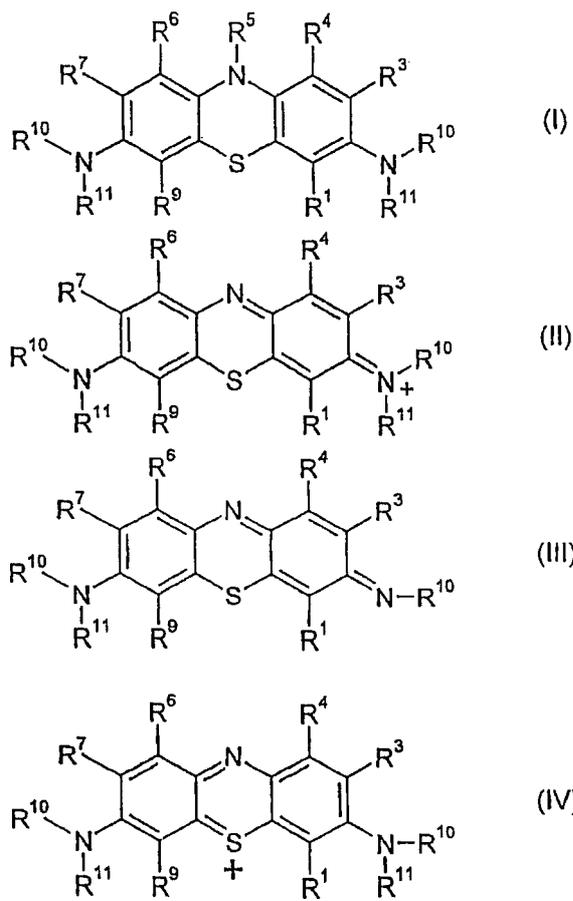


图 8a

带不同甲基的二氨基吩噻嗪

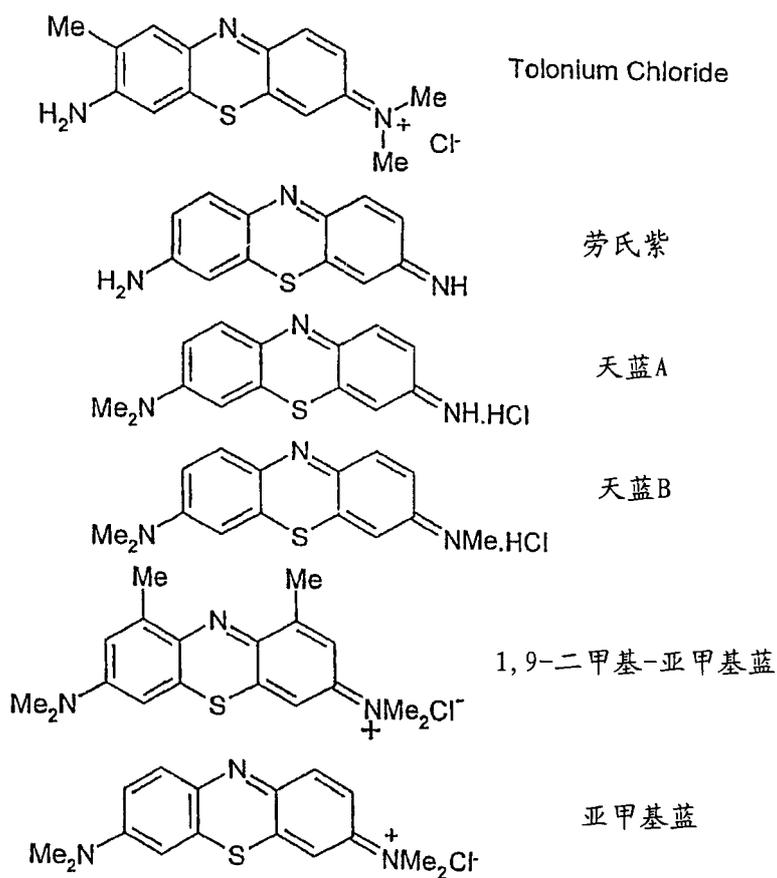
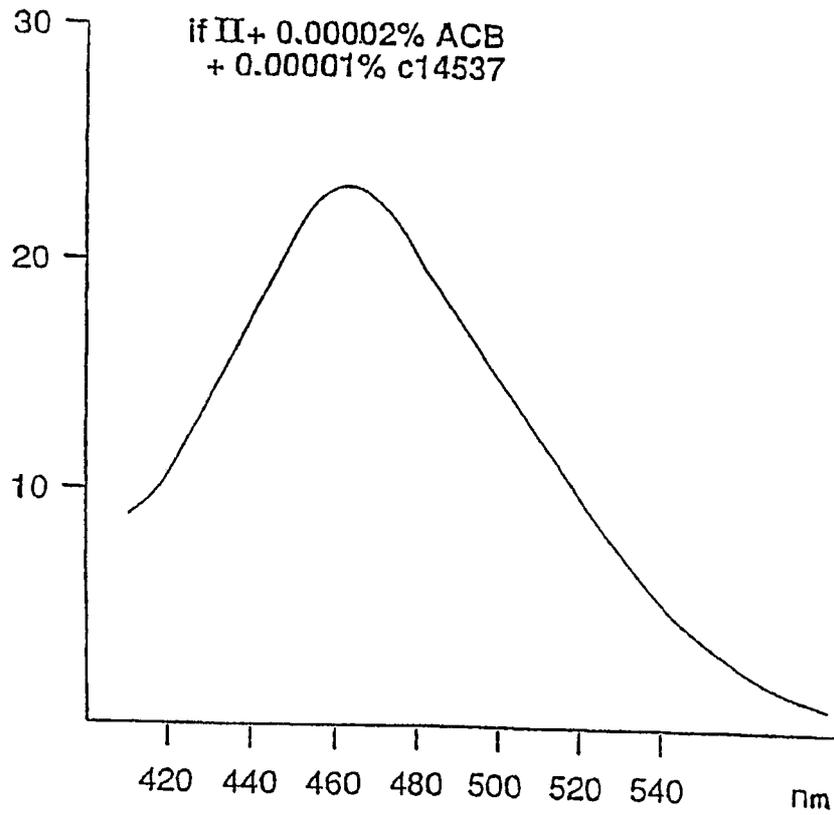


图 8b



(ACB = Alcian Blue, c14537 = 樱草灵)

图 9

τ-τ 结合对摩尔比 (化合物: τ)
劳氏紫 对 PHF-配体

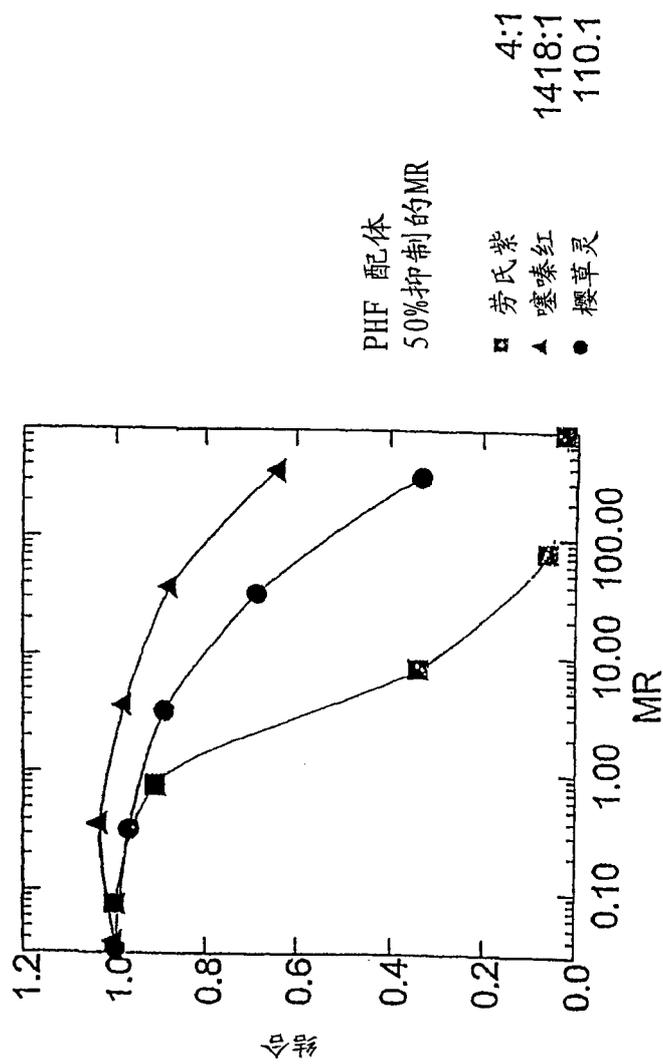


图 10

[¹¹C]标记亚甲基蓝的合成

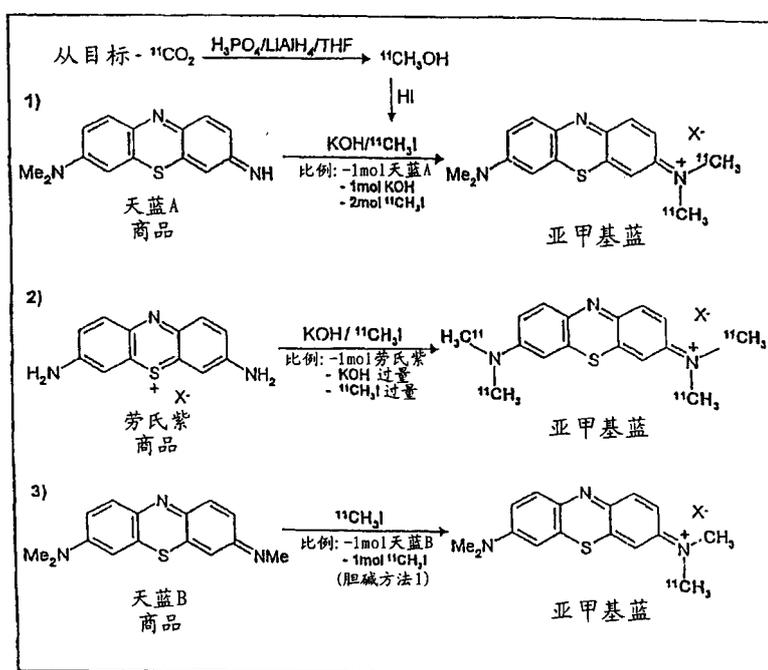


图 11a

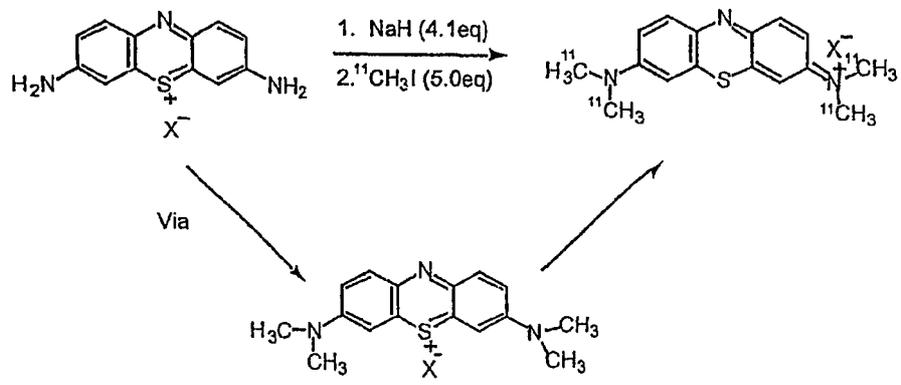


图 11b

[¹¹C]标记的天蓝B的合成

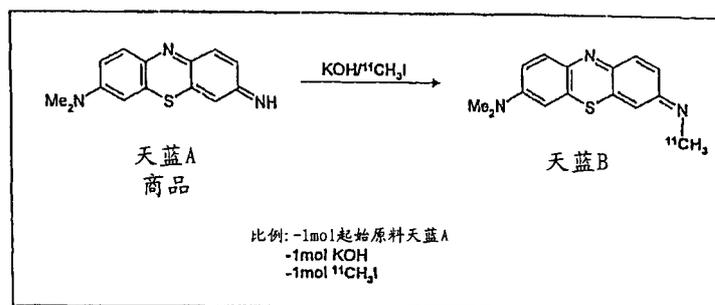


图 12

[¹⁸F]标记物的合成

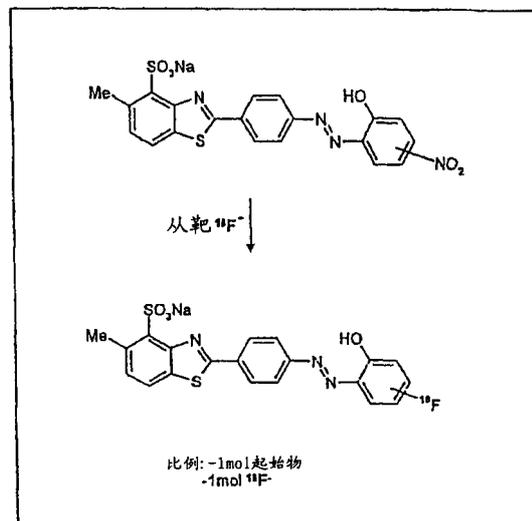
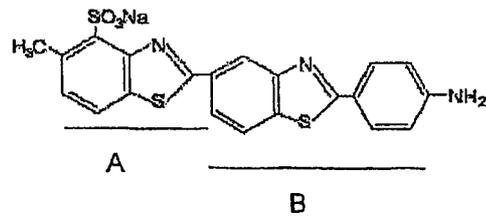
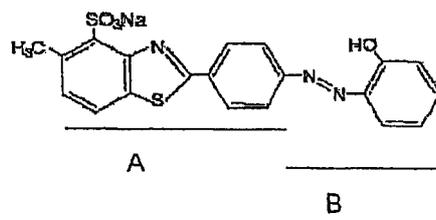


图 13

樱草灵



苯并噻唑类似物



塞嗪黄

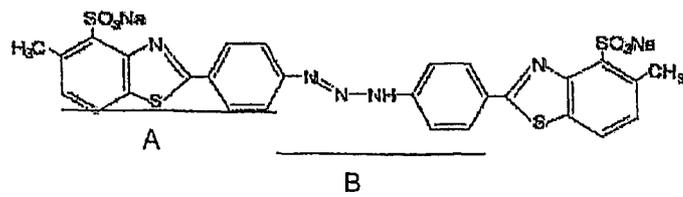


图 14

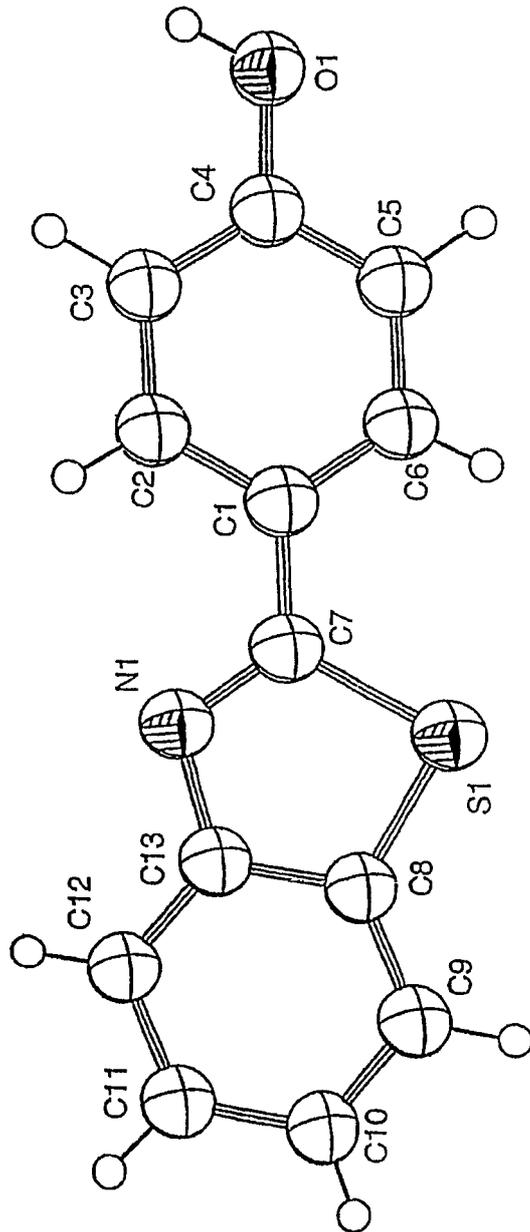


图 15

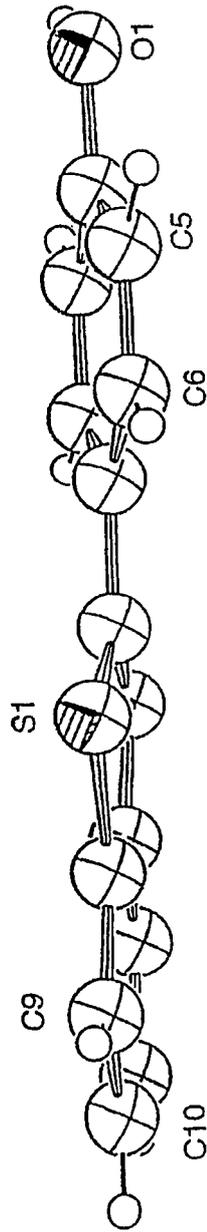


图 16

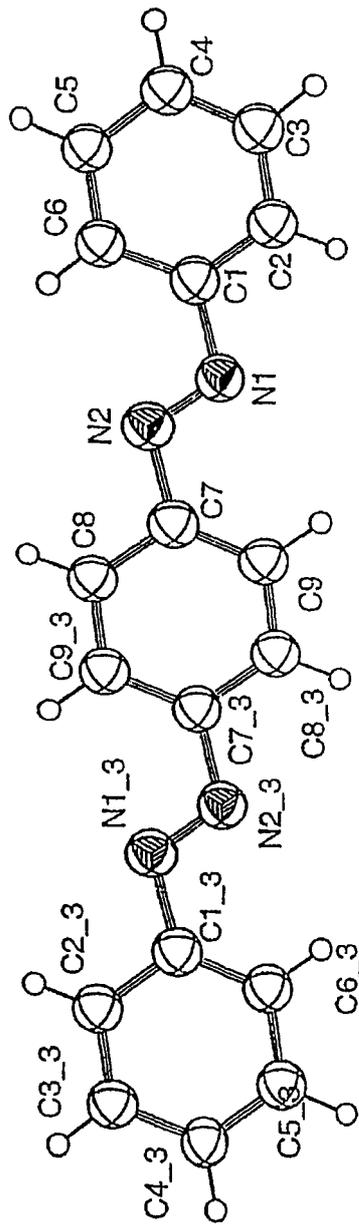


图 17

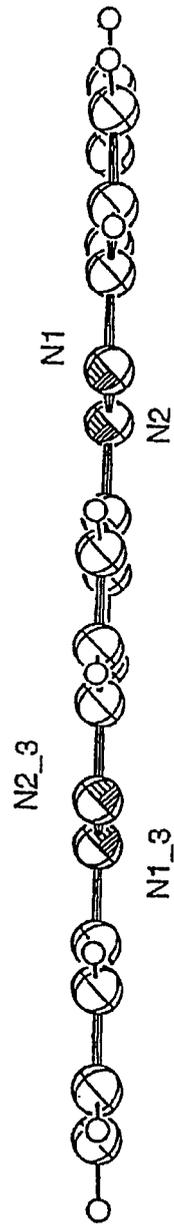


图 18

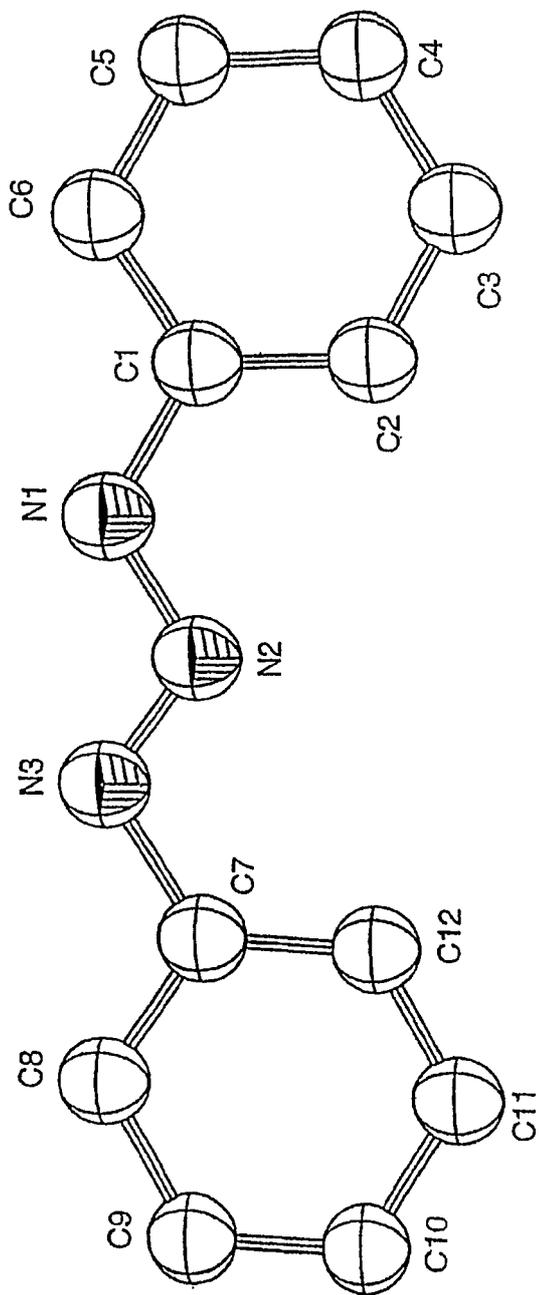


图 19

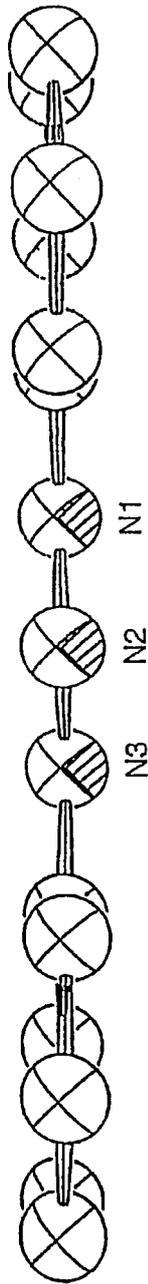


图 20

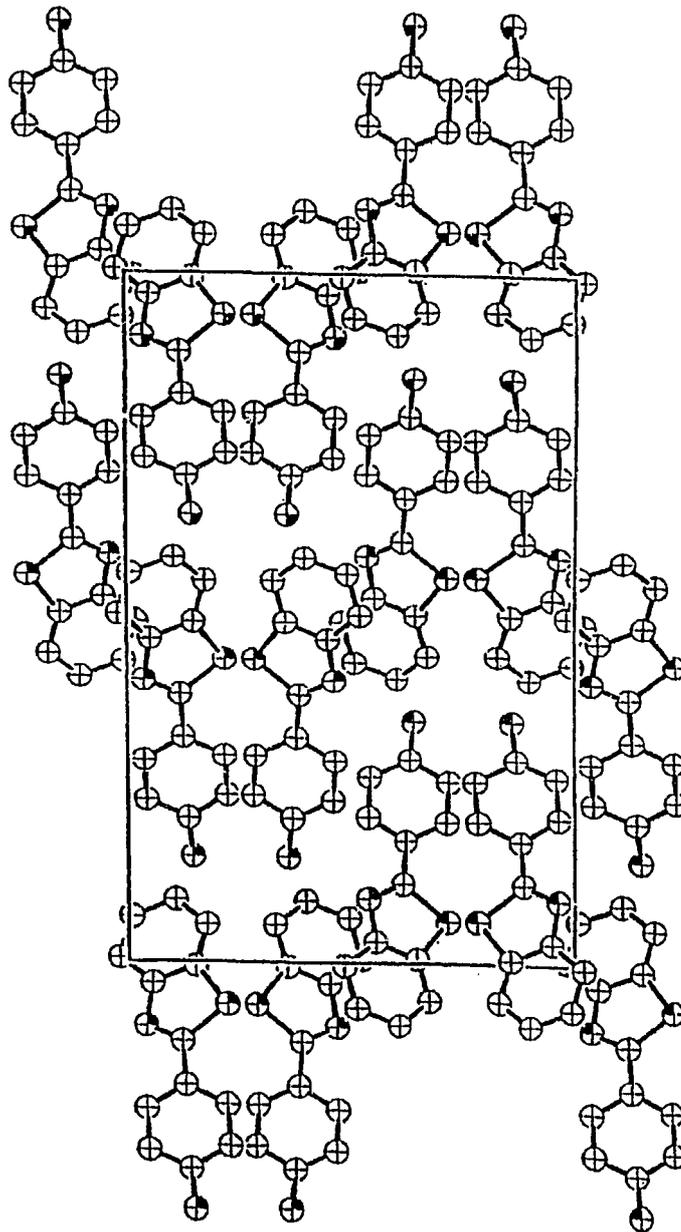


图 21

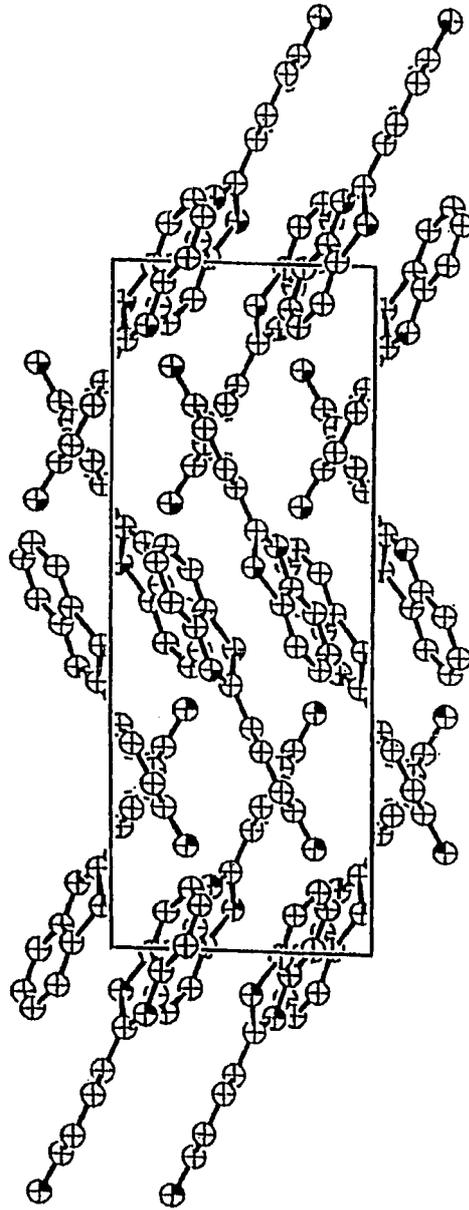


图 22

测试的活性及无活性分子大小比较
(最大值、平均值、最小值)

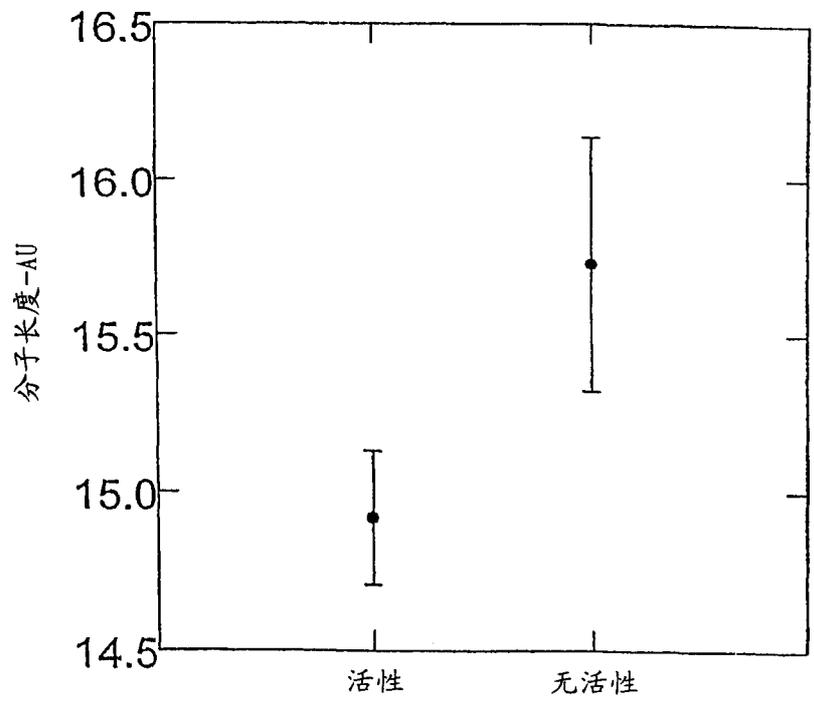


图 23

苯并噻唑和二氨基酚噻嗪分子大小比较
(最大值、平均值、最小值)

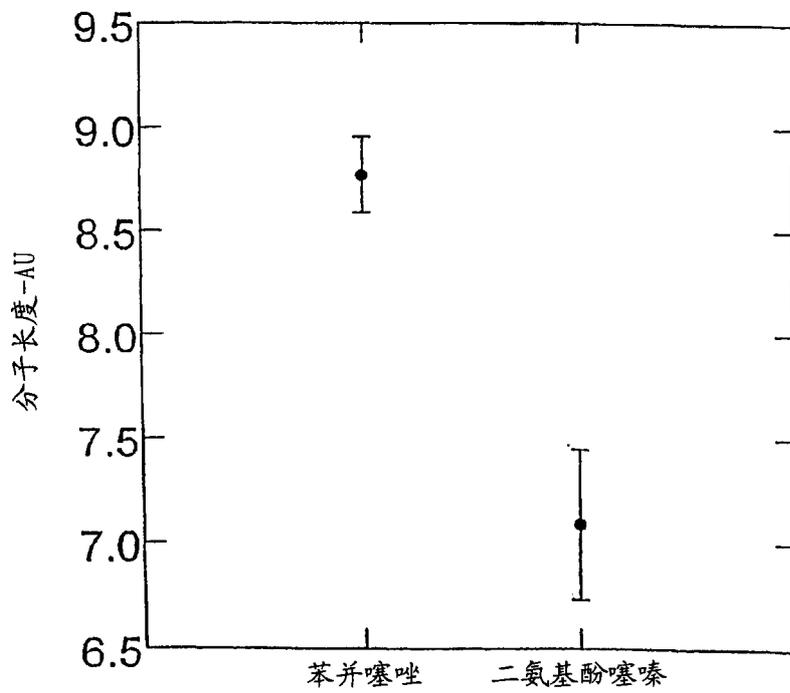


图 24

区域及分期阶段判断的423-T'S的可能性

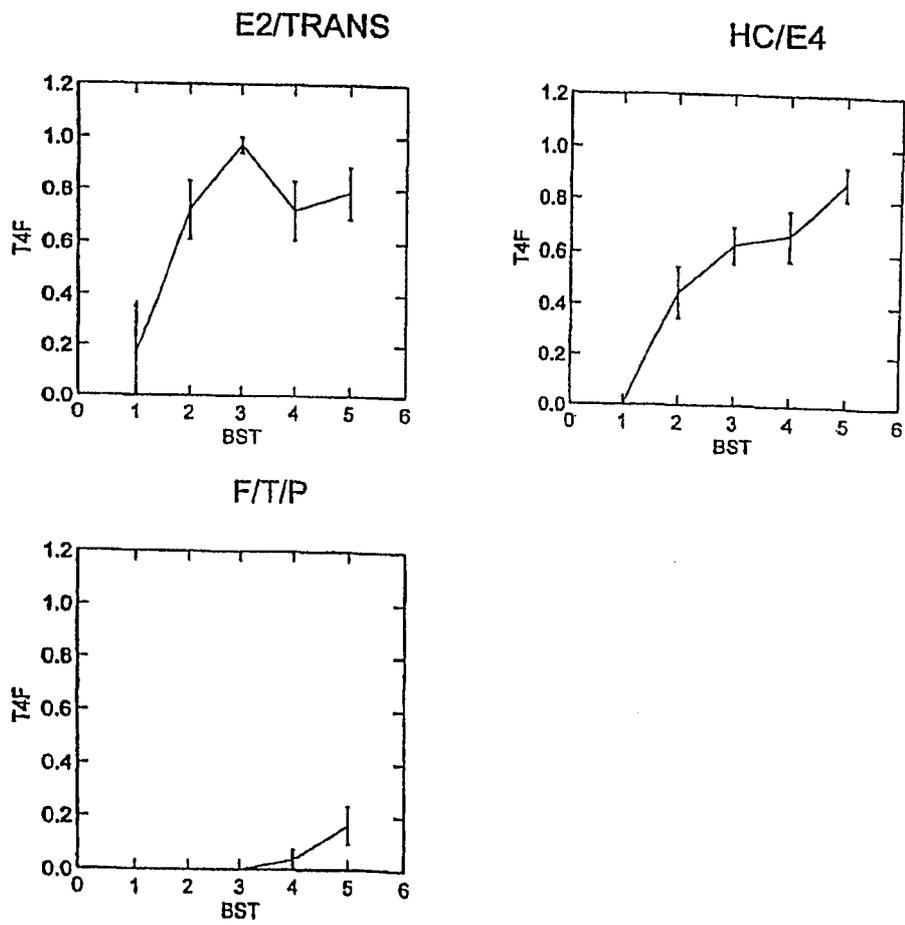


图 25

用脑区及分期判断AT8-T的概率

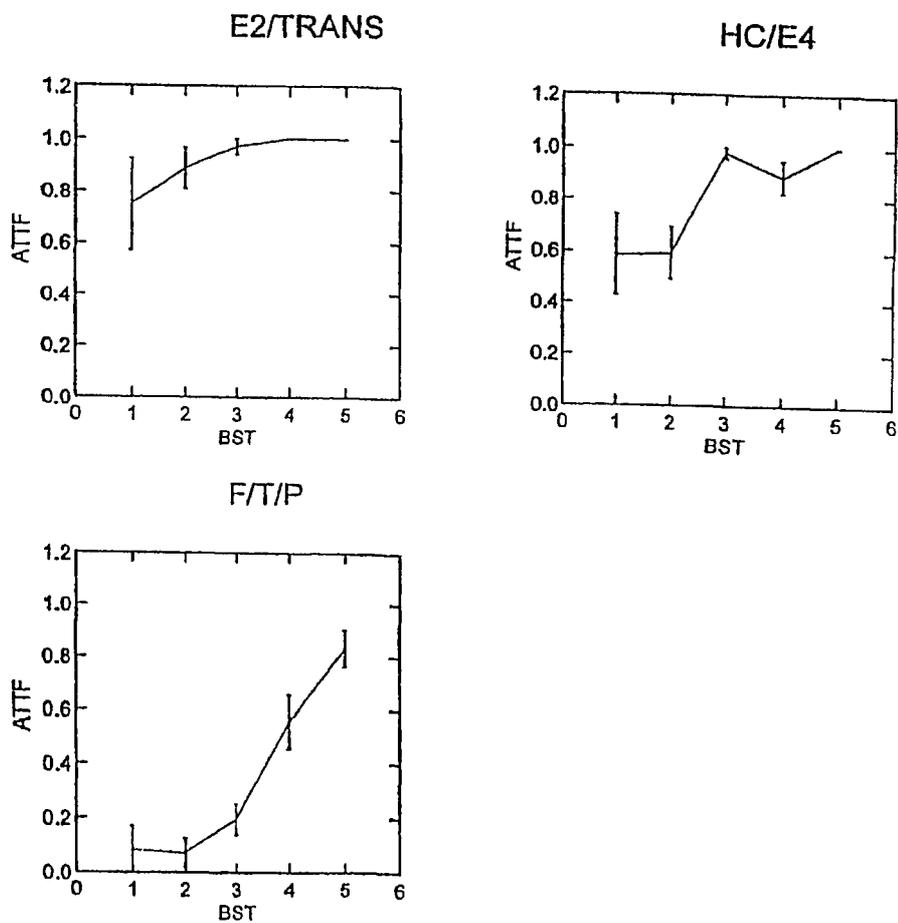


图 26

用脑区及分期判断423T的概率
MMSE > 21

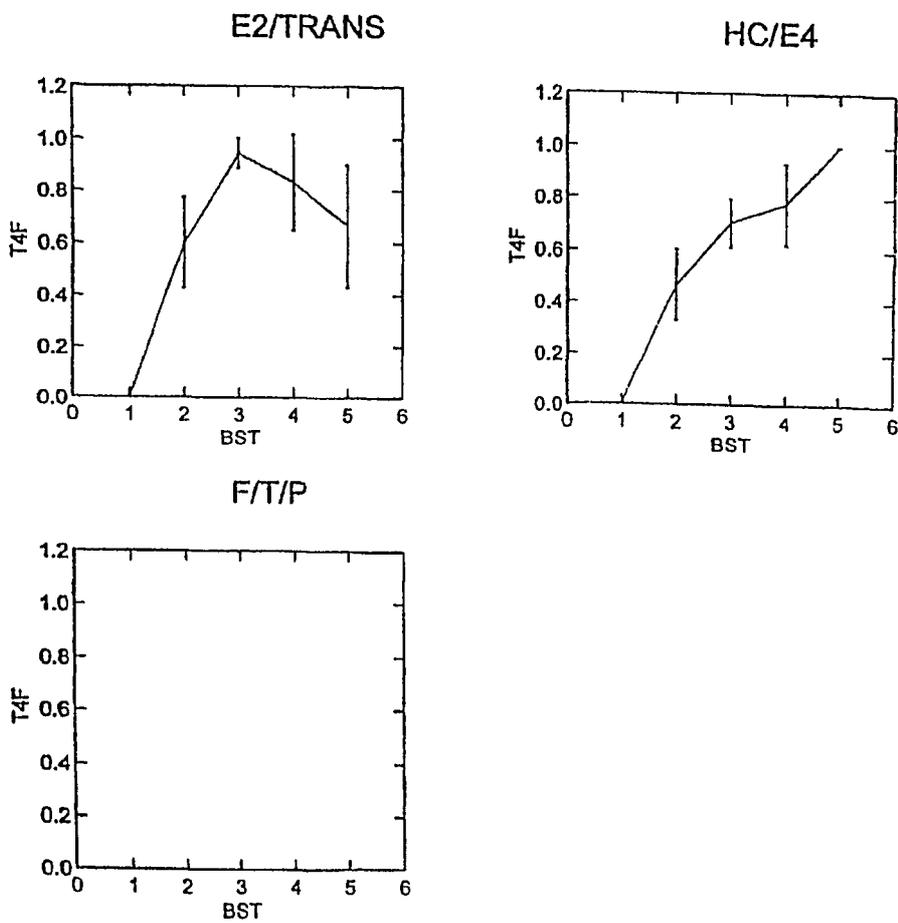


图 27

用脑区及分期判断AT8-T的概率
MMSE > 21

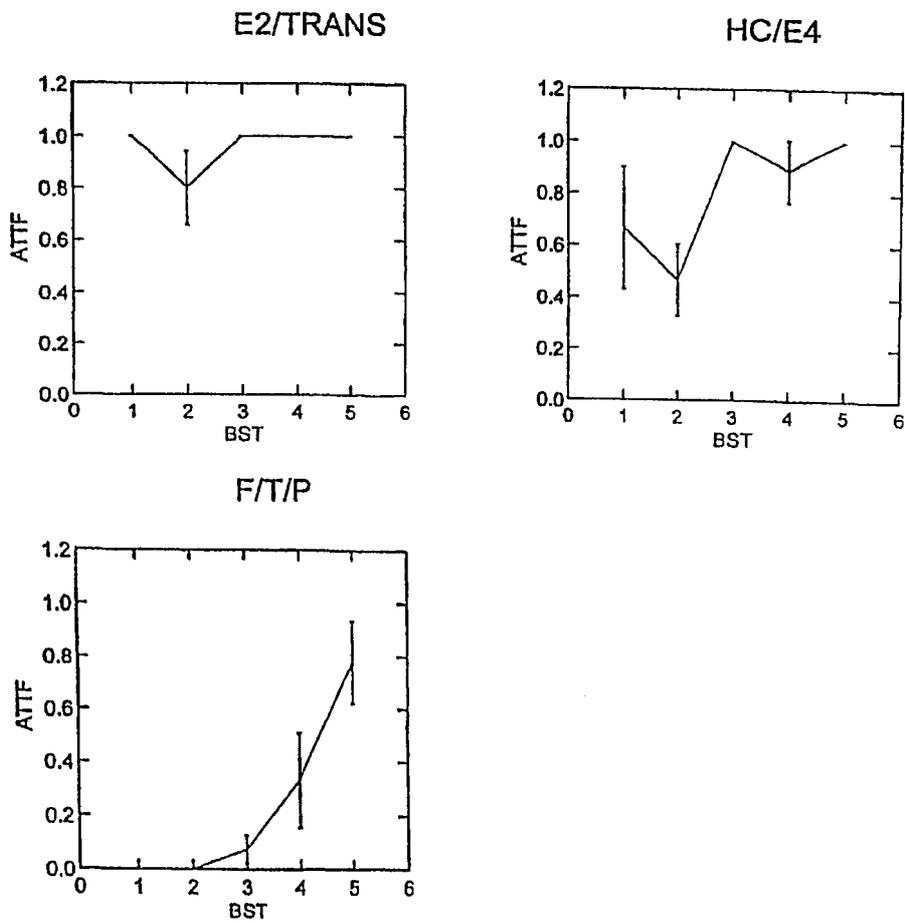


图 28

脑区和分期的423-T密度

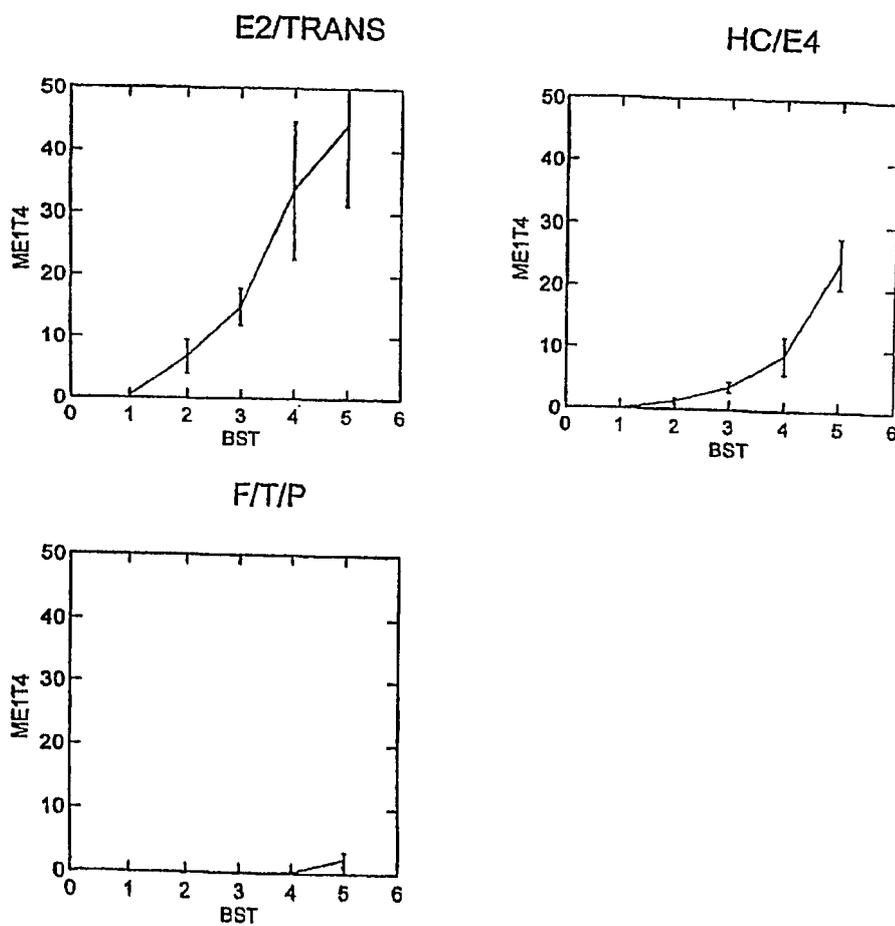


图 29

脑区及分期的AT8-T的密度

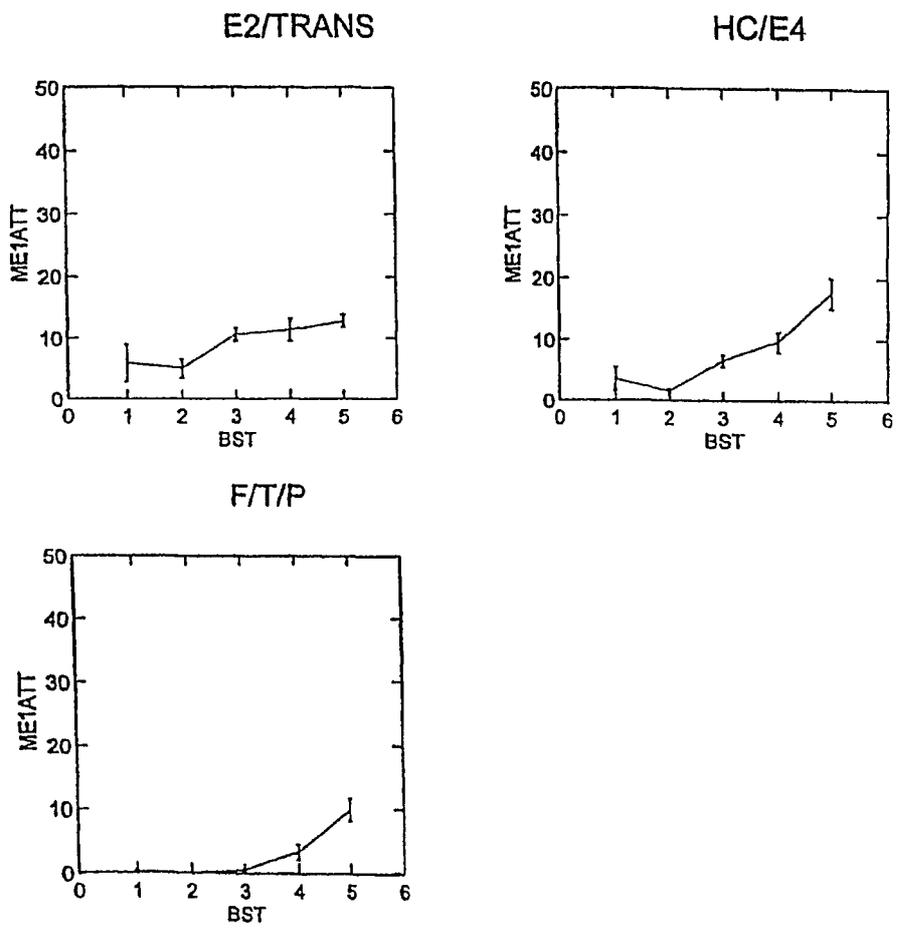


图 30

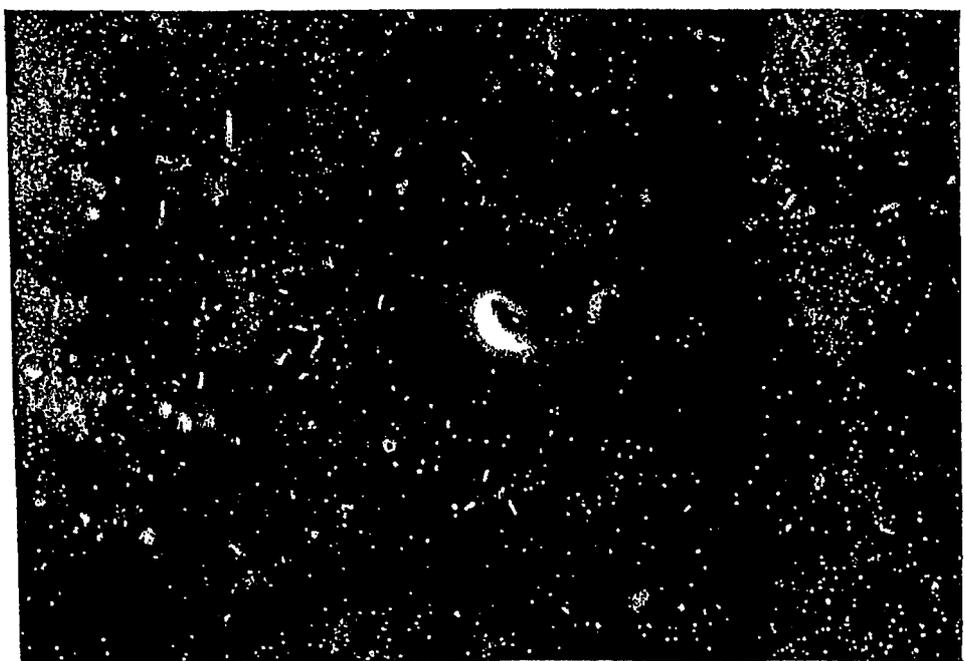
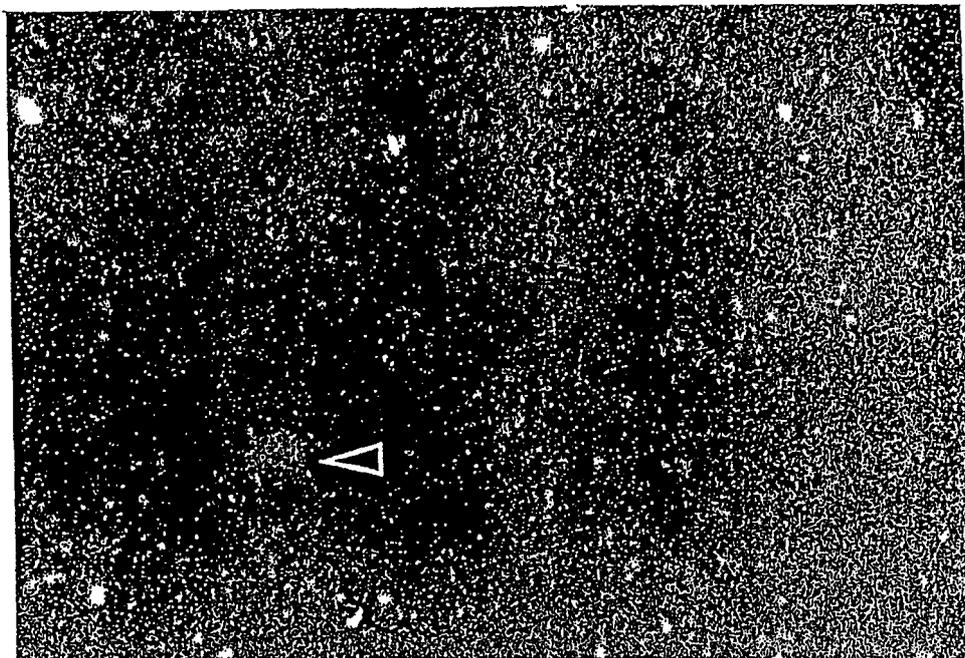


图 31a

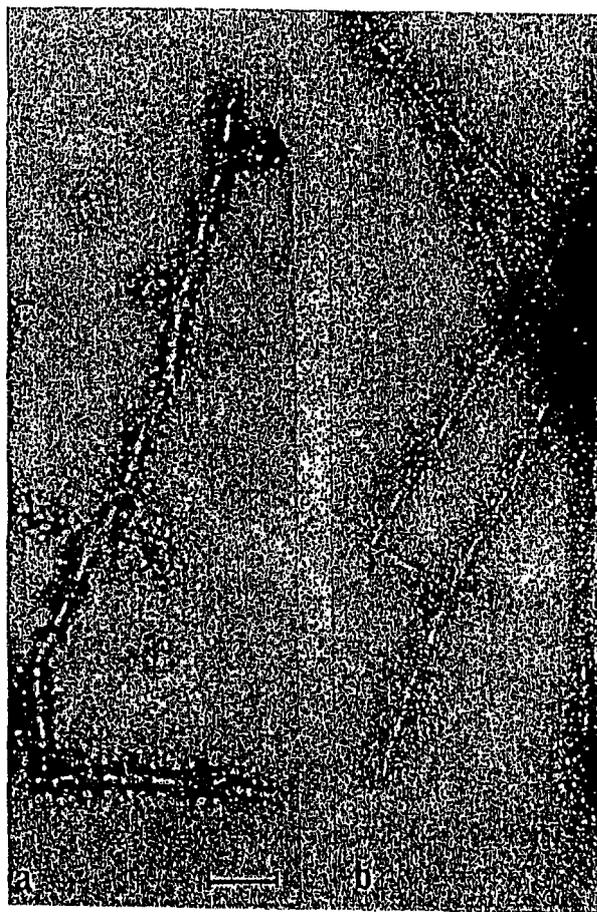


图 31b

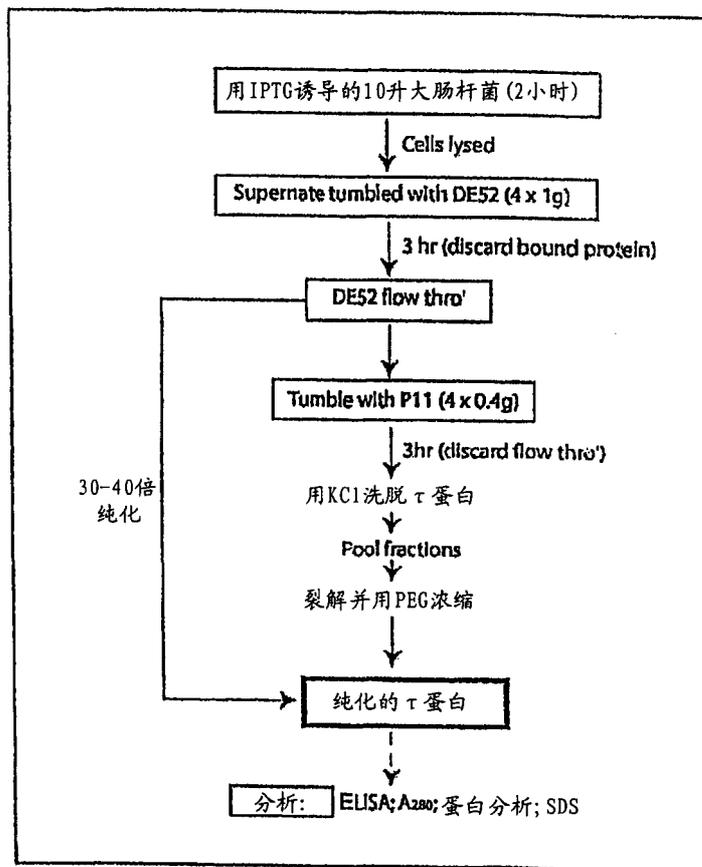


图 32

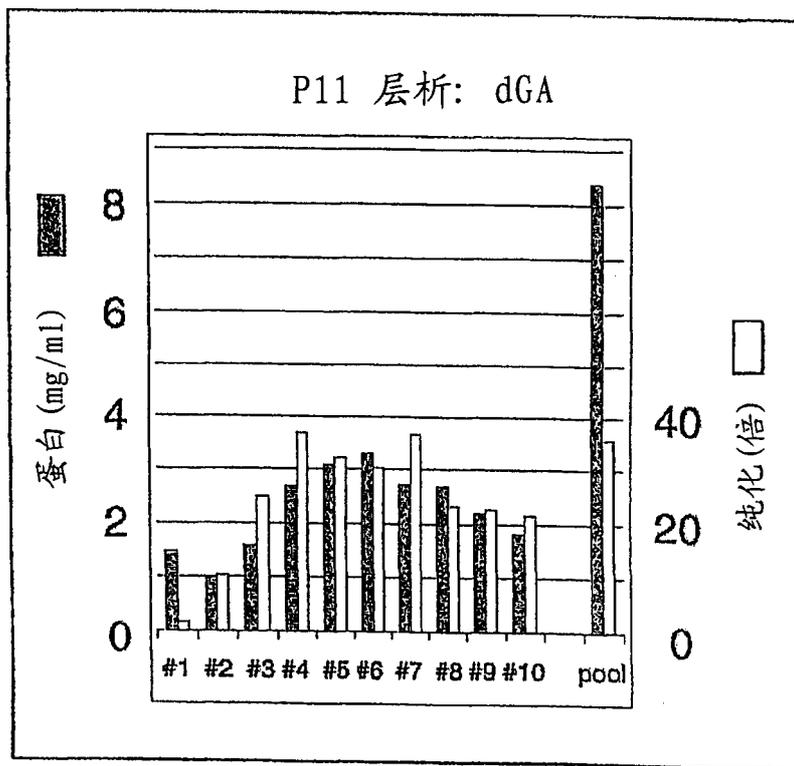


图 33

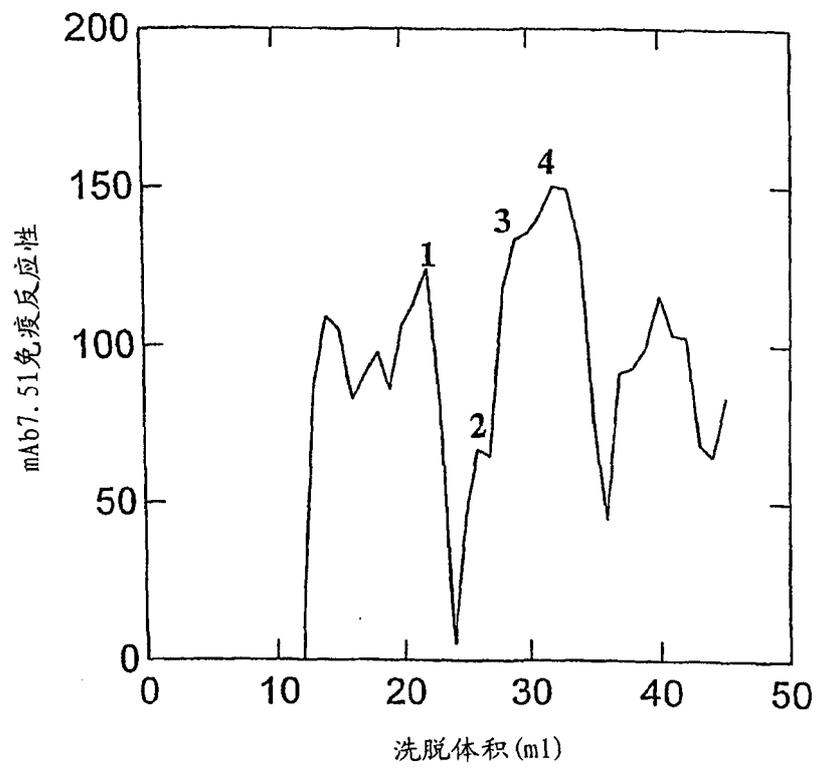


图 34

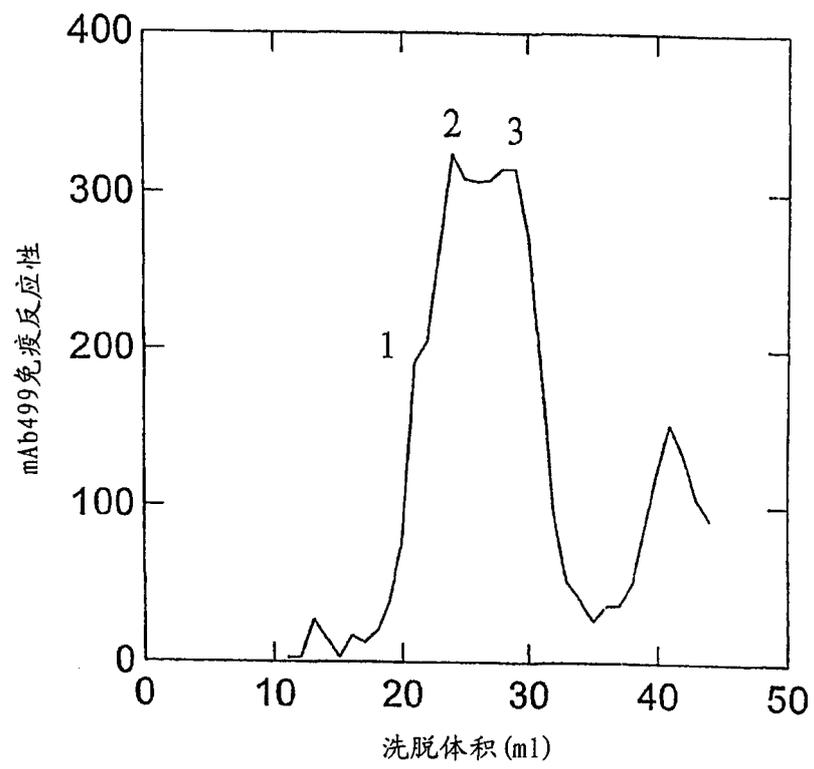


图 35

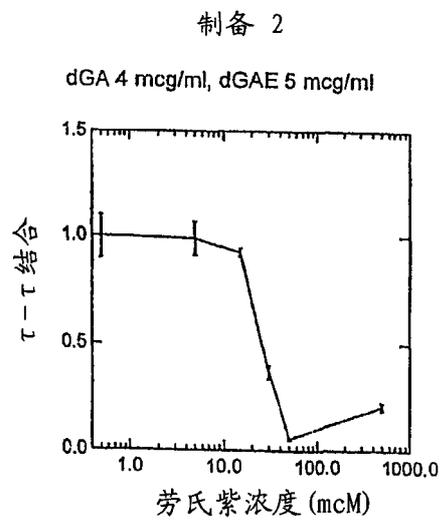
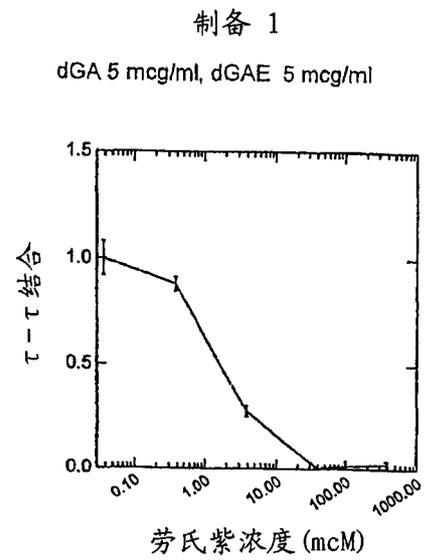


图 36

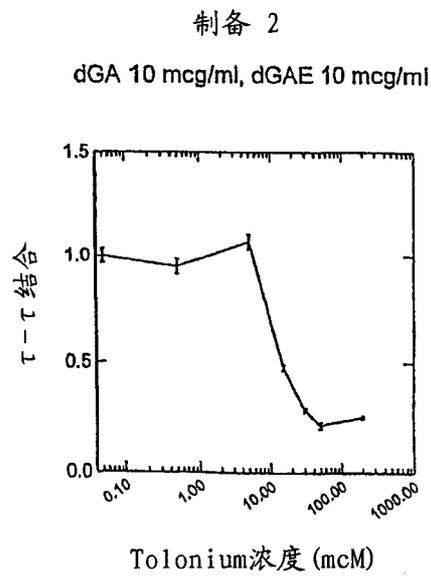
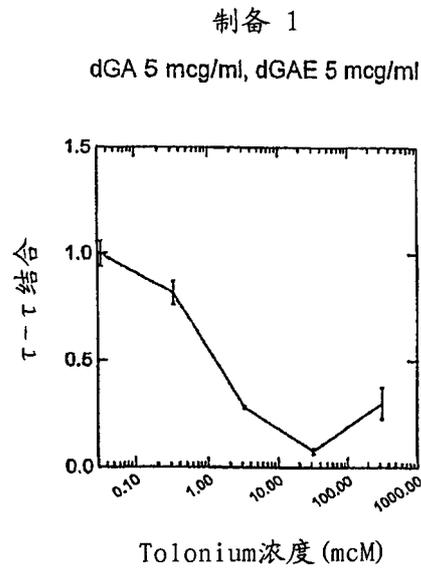


图 37

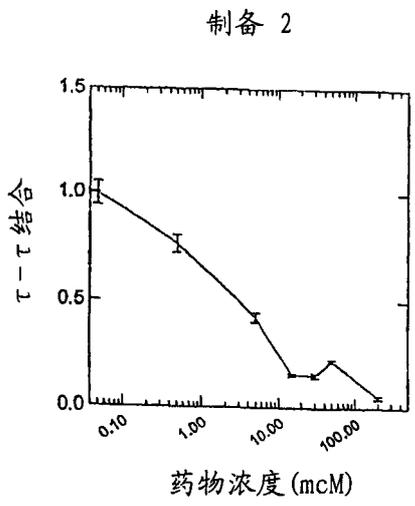
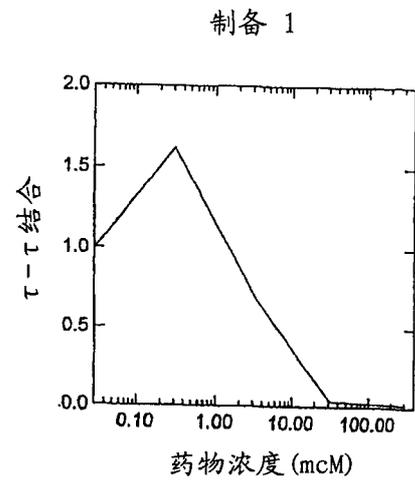


图 38

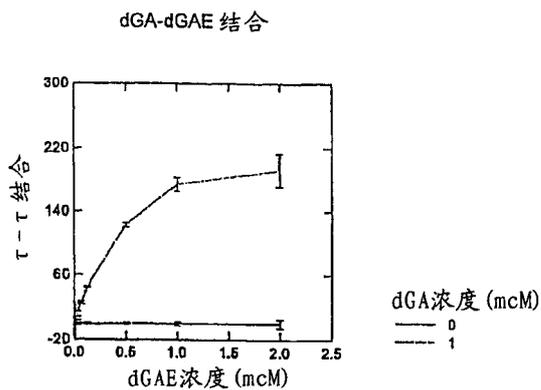


图 39a

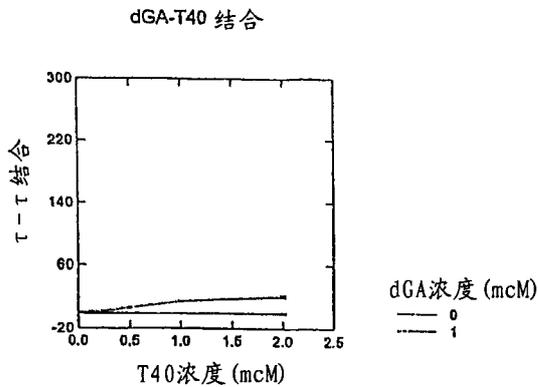


图 39b

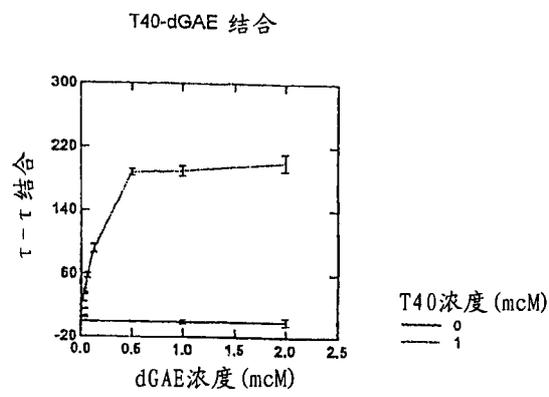


图 39c

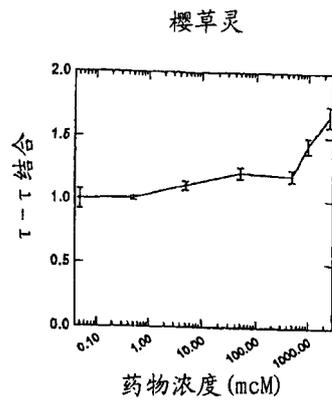


图 40a

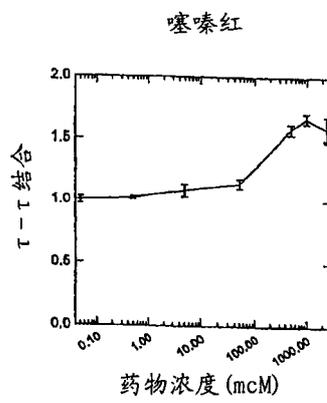


图 40b

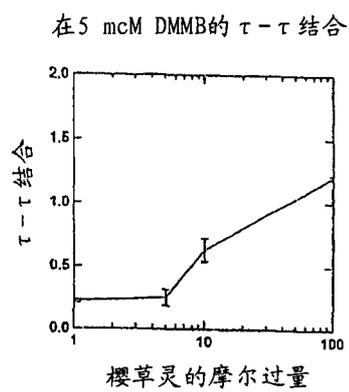


图 41a

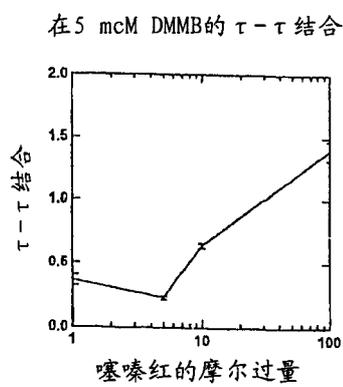


图 41b

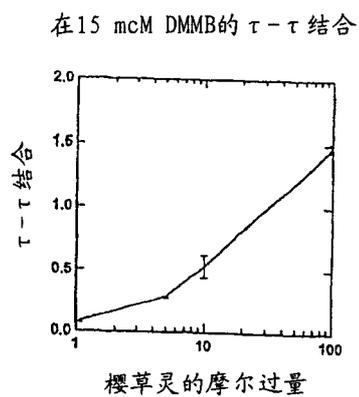


图 41c

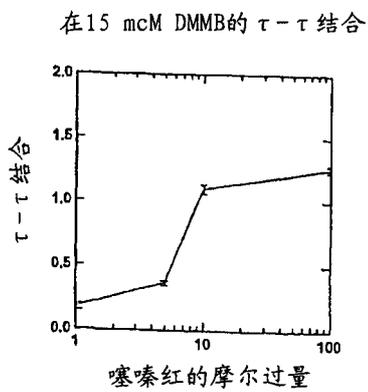


图 41d

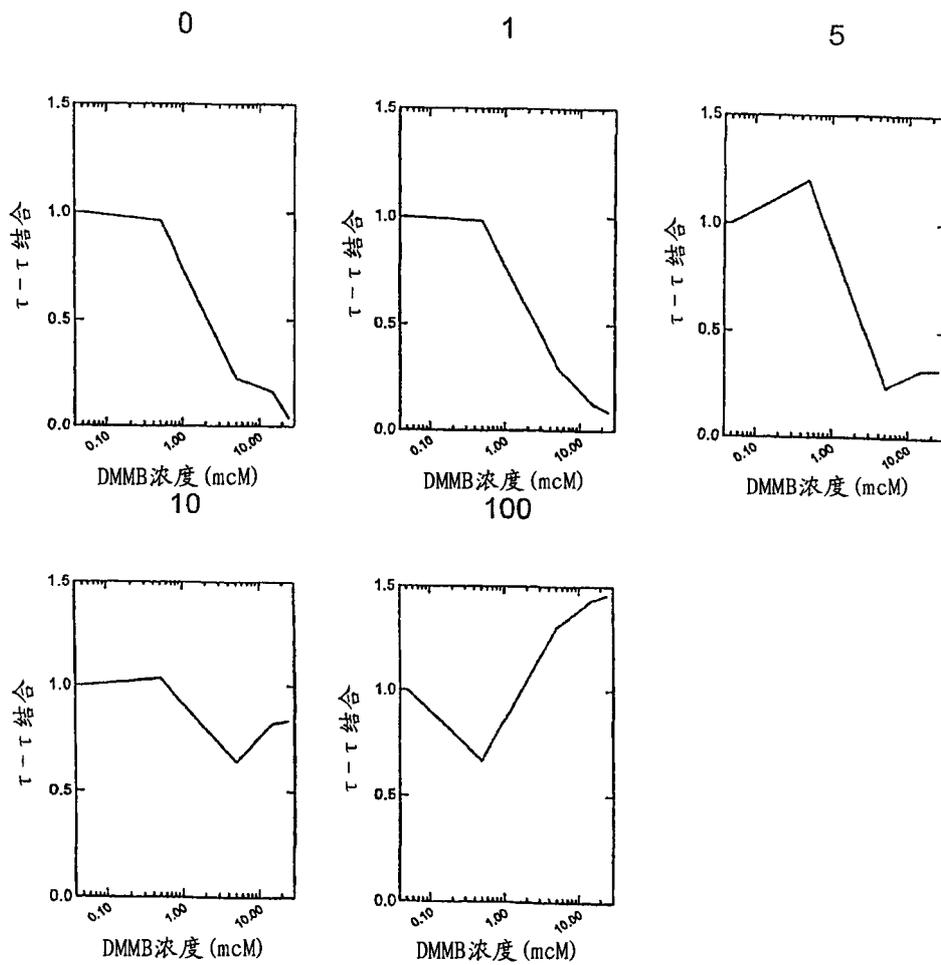


图 42

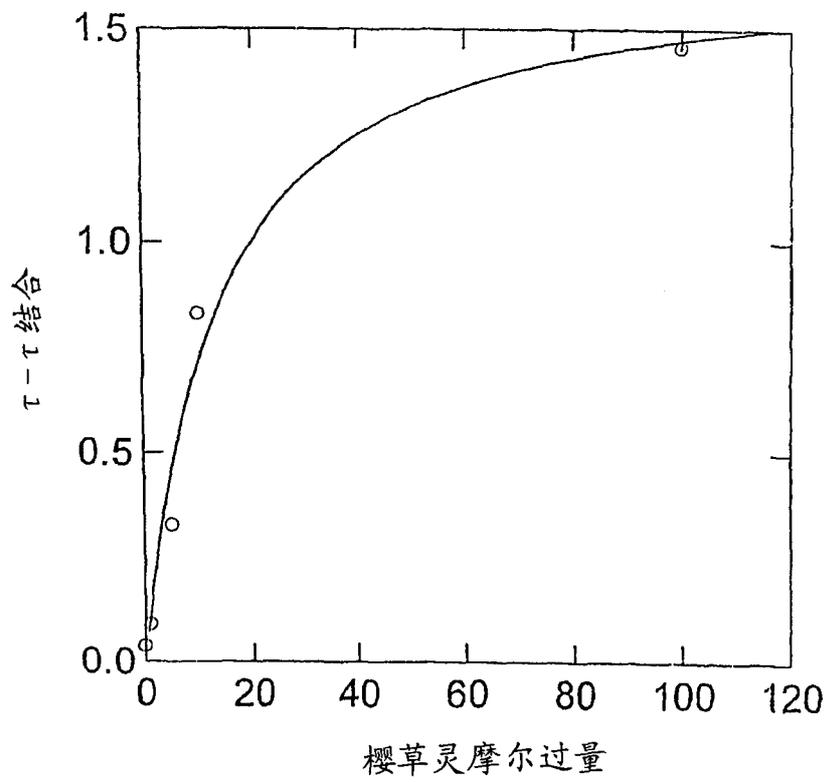


图 43

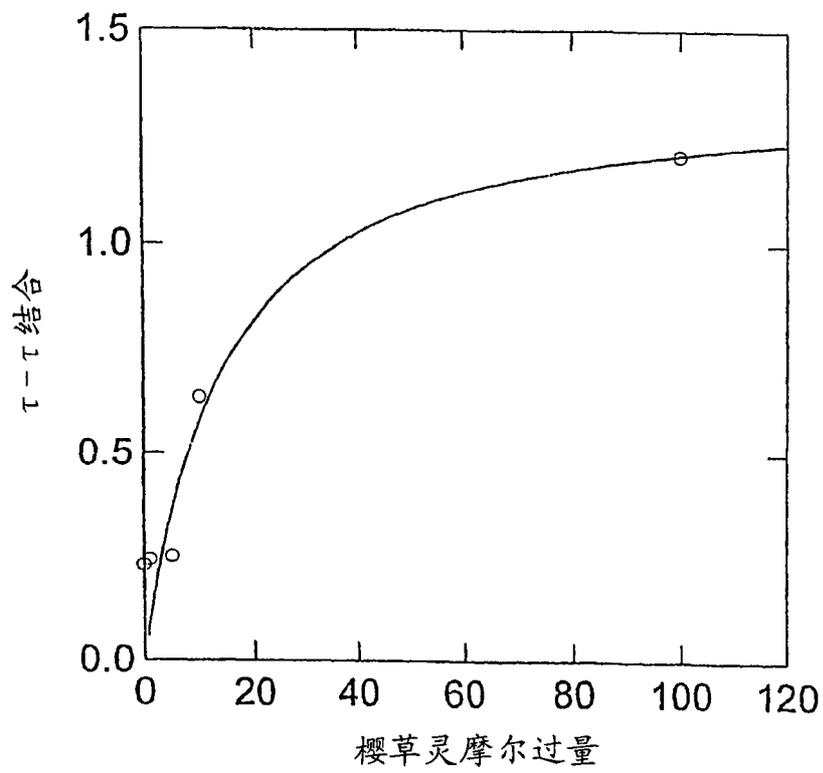


图 44

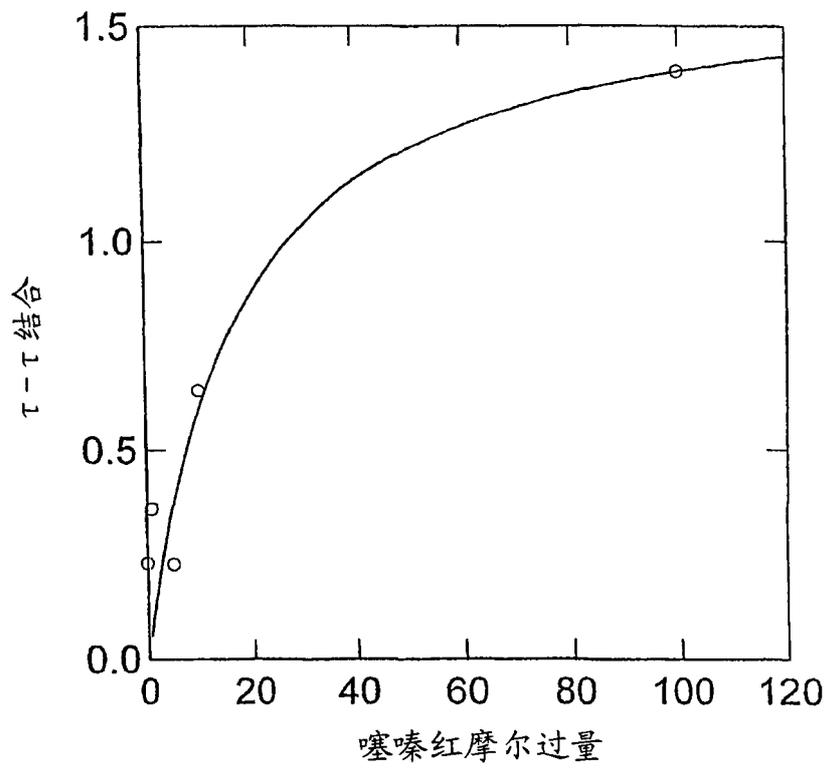


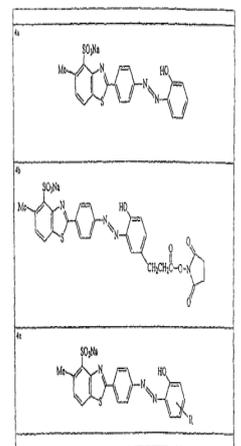
图 45

专利名称(译)	神经原纤维标记物		
公开(公告)号	CN1578910A	公开(公告)日	2005-02-09
申请号	CN02810291.6	申请日	2002-03-20
申请(专利权)人(译)	阿伯丁大学理事会		
当前申请(专利权)人(译)	阿伯丁大学理事会		
[标]发明人	克劳德M维希克 查尔斯R哈林顿 珍妮特E里卡德 戴维霍斯利		
发明人	克劳德·M·维希克 查尔斯·R·哈林顿 珍妮特·E·里卡德 戴维·霍斯利		
IPC分类号	A61K49/00 C07D277/66 C07D279/20 C07D417/12 G01N33/53 G01N33/58 G01N33/68 C07D277/62 C07D279/18		
CPC分类号	C07D277/66 C07D279/20 G01N33/583 C07D417/12 G01N33/6896		
优先权	2001006953 2001-03-20 GB		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了与τ蛋白疾病关联的神经原纤维变性分期的测定方法，其用于据信罹患疾病的患者，该方法包括如下步骤：(i)将能标记聚集成对螺旋丝(PHF)_τ蛋白的配体引入研究对象，(ii)测定研究对象脑中颞叶处与细胞外聚集PHF_τ相结合的配体的存在及/或其量，(iii)将(ii)中测定的结果与研究对象神经原纤维变性的程度进行关联。本方法可用于诸如阿尔茨海默病(AD)的前期诊断及分期。优选的配体包括磺化苯并噻唑类及二氨基吩噻嗪类化合物。也提供了新型配体(如磺化苯并噻唑类)。本方法也可包括使用“阻断配体”以阻断竞争位点。本发明的其它方面提供了能够识别可标记聚集PHF_τ蛋白配体的体外方法，其包括以下步骤：(i)提供第一种怀疑能够标记聚集PHF_τ蛋白的试剂，(ii)将(a)包含τ核心片段的τ蛋白或其衍生物，其与固相结合以显露其高亲和力的τ捕获位点，与(b)液相τ蛋白或其衍生物，其可与固相τ蛋白或其衍生物相结合，(c)所述已选择的第一种试剂以及(d)已知的第二种τ-τ结合抑制剂的试剂相接触，(iii)选择第一种试剂，其全面或部分地解除抑制剂(d)对(b)液相τ蛋白或其衍生物对(a)固相τ蛋白或其衍生物结合的抑制。配体可经测试以确定其不是自身抑制剂。

与研究对象神经原纤维变性的程度进行关联。本方法可用于诸如阿尔茨海默病(AD)的前期诊断及分期。优选的配体包括磺化苯并噻唑类及二氨基吩噻嗪类化合物。也提供了新型配体(如磺化苯并噻唑类)。本方法也可包括使用“阻断配体”以阻断竞争位点。本发明的其它方面提供了能够识别可标记聚集PHF_τ蛋白配体的体外方法，其包括以下步骤：(i)提供第一种怀疑能够标记聚集PHF_τ蛋白的试剂，(ii)将(a)包含τ核心片段的τ蛋白或其衍生物，其与固相结合以显露其高亲和力的τ



知识产权出版社出版