

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-537034
(P2004-537034A)

(43) 公表日 平成16年12月9日(2004.12.9)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68	GO 1 N 33/68	2 G O 4 5
A 6 1 K 49/00	A 6 1 K 49/00	4 C O 8 5
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/58	GO 1 N 33/58	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 254 頁)

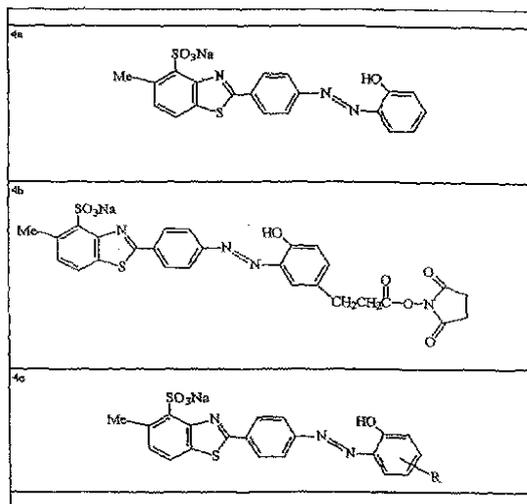
(21) 出願番号	特願2002-573679 (P2002-573679)	(71) 出願人	503241331 ザ・ユニバーシティ・コート・オブ・ザ・ ユニバーシティ・オブ・アバディーン THE UNIVERSITY COUR T OF THE UNIVERSITY OF ABERDEEN イギリス国、グランビアン エービー24 3エフエックス、アバディーン、リージ ェント・ウォーク
(86) (22) 出願日	平成14年3月20日 (2002. 3. 20)	(74) 代理人	100078662 弁理士 津国 肇
(85) 翻訳文提出日	平成15年9月22日 (2003. 9. 22)	(74) 代理人	100075225 弁理士 篠田 文雄
(86) 国際出願番号	PCT/GB2002/001318		
(87) 国際公開番号	W02002/075318		
(87) 国際公開日	平成14年9月26日 (2002. 9. 26)		
(31) 優先権主張番号	0106953.3		
(32) 優先日	平成13年3月20日 (2001. 3. 20)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経原線維標識

(57) 【要約】

開示されているのは、疾患に罹患していると考えられる対象におけるタウオパシーと関連する神経原線維変性の病期を決定する方法であって、(i) 対象に、凝集対螺旋フィラメント (PHF) タウタンパク質を標識可能なリガンドを導入するステップ、(ii) 対象の脳の内側頭葉中の細胞外凝集PHFタウに結合したリガンドの存在および/または量を測定するステップ、(iii) (ii)で行った測定の結果を、対象における神経原線維変性の程度と相関させるステップを含む、方法である。この方法は、アルツハイマー病などのタウオパシーの、死亡前診断および病期分類に使用することができる。好ましいリガンドとして、スルホン化ベンゾチアゾール様化合物およびジアミノフェノチアジンなどがあげられる。新規リガンド (例えば、スルホン化ベンゾチアゾール様化合物) も提供される。この方法は、競合結合部位をブロックするための「ブロッキングリガンド」の使用をも含む。他の態様において、本発明は、(i) 凝集PHF タウタンパク質を標識可能と考えられる第一作用物質を提供するステップ、(ii) (a) 高親和性タウ捕獲



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

疾患に罹患していると考えられる対象におけるタウオパシーに伴う神経原線維変性の病期を決定する方法であって、

(i) 対象に、凝集対螺旋フィラメント (P H F) タウタンパク質を標識可能なリガンドを導入するステップ、

(i i) 対象の脳の内側頭葉中の細胞外凝集 P H F タウに結合したリガンドの存在および/または量を測定するステップ、

(i i i) (i i) で行った測定の結果を、対象における神経原線維変性の程度と関連させるステップ

を含む方法。

10

【請求項 2】

ステップ (i i) における測定を用いて、リガンド結合の密度を確立する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

ステップ (i i i) における相関を、病歴データを参考することにより行う、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

タウオパシーがアルツハイマー病 (A D) である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項 5】

神経原線維変性の程度が、図 2 c に示す確定した階層システムによる A D 進行の神経病理学的病期分類に関連する、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

リガンドが、血液脳関門を通過可能な、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7】

リガンドが、検出可能な化学基と共役、キレートまたはさもなくば会合している、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8】

リガンドが、S P E C T 用に標識されており、細胞内に取り込まれ得ない、請求項 7 記載の方法。

30

【請求項 9】

リガンドが、テクネチウムキレート化基を含む、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

リガンドが、ポジトロン放出断層撮影 (P E T) 用に標識されている、請求項 7 記載の方法。

【請求項 11】

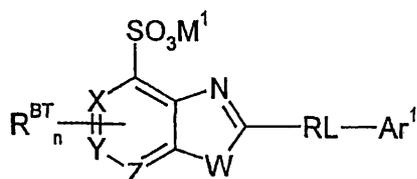
リガンドが、場合によりリガンドに存在するメチル基に取り込まれた、ポジトロン放出炭素を含む、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

リガンドが、式：

40

【化 1】



(式中：

W は、S、O、または NH であり；

50

X、Y、およびZの正確に1つはCHまたはNであり；
 その他のX、Y、およびZは、CHであり；
 M^1 は、Li、Na、K、またはCsから選択されるアルカリ金属カチオンであり、
 RLは、堅いリンカー基であり；
 Ar^1 は、 C_{5-20} アリール基であり；
 nは、0～3の整数であり；および、
 各 R^{BT} は独立して、コア置換基である）
 で示される化合物である、請求項1～11のいずれか一項記載の方法。

【請求項13】

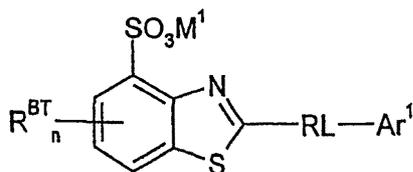
X、Y、およびZのそれぞれがCHである、請求項12記載の方法。

10

【請求項14】

リガンドが、式：

【化2】



(式中：

20

M^1 は、Li、Na、K、またはCsから選択される、アルカリ金属カチオンであり；
 RLは、堅いリンカー基であり；
 Ar^1 は、 C_{5-20} アリール基であり；
 nは0～3の整数であり；
 各 R^{BT} は、独立してベンゾチアゾール置換基である）
 で示される化合物である、請求項13記載の方法。

【請求項15】

堅いリンカー基RL、およびアリール基 Ar^1 のそれぞれが、事実上平面状である、請求項12～14のいずれか一項記載の方法。

【請求項16】

30

堅いリンカー基RL、およびアリール基 Ar^1 が、コア基とともに、事実上平面状である化合物を形成する、請求項12～15のいずれか一項記載の方法。

【請求項17】

ねじれが、図16の化合物のねじれ以下である、請求項12～16のいずれか一項記載の方法。

【請求項18】

化合物が、約14.7Å～約15.3Åの化合物長を有する、請求項12～17のいずれか一項記載の方法。

【請求項19】

各 R^{BT} が、独立して、 C_{1-4} アルキル、ヒドロキシ、 C_{1-4} アルコキシ、ニトロ、シアノ、ハロ、またはアミノである、請求項12～18のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項20】

各 R^{BT} が、独立して、-Me、-Et、-nPr、-iPr、-OH、-OMe、-OEt、-O(nPr)、-O(iPr)、-NO₂、-CN、-F、-Cl、-Br、-I、-NH₂、-NHMe、-NH₂、-NHMe、-NH₂、-NH(iPr)、-NH(nPr)、-NMe₂、-NEt₂、N(iPr)₂、または-N(nPr)₂である、請求項19記載の方法。

【請求項21】

各 R^{BT} が、独立して、 C_{1-4} アルキルである、請求項19記載の方法。

【請求項22】

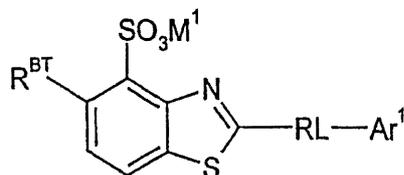
50

n が1であり、そして R^{BT} が、独立して $-Me$ 、 $-Et$ 、 $-nPr$ 、または $-iPr$ である、請求項19～21のいずれか一項記載の方法。

【請求項23】

リガンドが、下記式：

【化3】



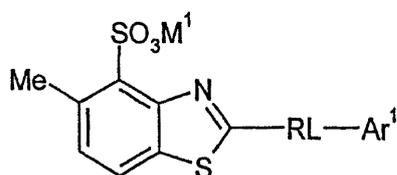
10

を有する、請求項12～22のいずれか一項記載の方法。

【請求項24】

リガンドが、下記式：

【化4】



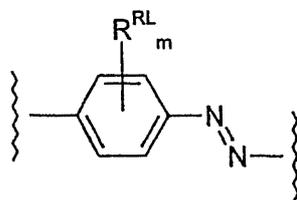
20

を有する、請求項23記載の方法。

【請求項25】

RL が、式：

【化5】

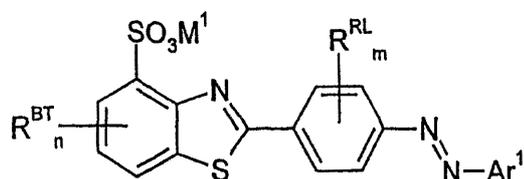


30

(式中：

m は0～4の整数であり、各 R^{RL} が、独立して、堅いリンカーアリアル置換基である)で示される基であり、リガンドが式：

【化6】



40

を有する、請求項12～24のいずれか一項記載の方法。

【請求項26】

各 R^{RL} が、独立して、 C_{1-4} アルキル、ヒドロキシ、 C_{1-4} アルコキシ、ニトロ、シアノ、ハロまたはアミノである、請求項25記載の方法。

【請求項27】

各 R^{RL} が、独立して、 $-Me$ 、 $-Et$ 、 $-nPr$ 、 $-iPr$ 、 $-OH$ 、 $-OMe$ 、 $-OEt$ 、 $-O(nPr)$ 、 $-O(iPr)$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHMe$ 、 $-NHEt$ 、 $-NH(iPr)$ 、 $-NH(nPr)$ 、 $-NMe_2$ 、 $-NEt_2$ 、 $N(iPr)_2$ 、または $N(nPr)_2$ である、請求項26記載

50

の方法。

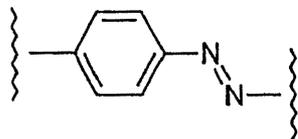
【請求項 28】

各 R^{RL} が、独立して、 C_{1-4} アルキルである、請求項 26 記載の方法。

【請求項 29】

R^{RL} が、式：

【化 7】



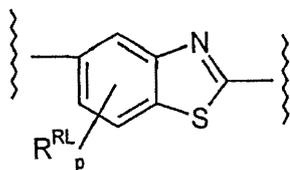
10

で示される基である、請求項 1 ~ 24 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 30】

R^{RL} が、式：

【化 8】



20

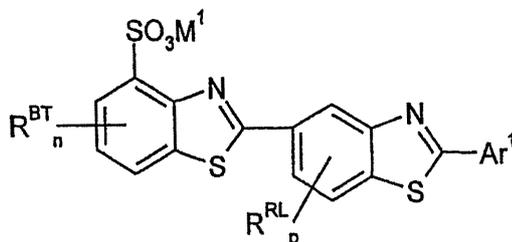
(式中、

p は 0 ~ 3 の整数であり、

各 R^{RL} が、独立して、堅いリンカーアリーール置換基である) で示される基であり、

化合物が、式：

【化 9】



30

を有する、請求項 1 ~ 24 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 31】

各 R^{RL} が、独立して、 C_{1-4} アルキル、ヒドロキシ、 C_{1-4} アルコキシ、ニトロ、シアノ、ハロ、またはアミノである、請求項 30 記載の方法。

【請求項 32】

各 R^{RL} が、独立して、- Me、- Et、- nPr、- 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、または - N(nPr)₂ である、請求項 31 記載の方法。

40

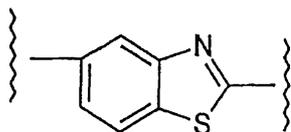
【請求項 33】

各 R^{RL} が、独立して、 C_{1-4} アルキルである、請求項 31 記載の方法。

【請求項 34】

R^{RL} が、式：

【化 1 0】



で示される基である、請求項 1 2 ~ 2 4 および 3 0 ~ 3 3 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 5】

Ar¹が、ベンゼン (C₆)、ナフタレン (C₁₀)、アントラセン (C₁₄)、フェナントレン (C₁₄)、ナフタセン (C₁₈)、およびピレン (C₁₆) に由来する基から選択される、

10

【請求項 3 6】

Ar¹が、

フラン (オキサゾール)、チオフェン (チオール)、ピロール (アゾール)、イミダゾール (1, 3 - ジアゾール)、ピラゾール (1, 2 - ジアゾール)、トリアゾール、オキサゾール、イソオキサゾール、チアゾール、イソチアゾール、オキサジアゾールおよびオキサトリアゾールに由来する C₅ ヘテロアリアル基；ならびに

イソオキサジン、ピリジン (アジン)、ピリダジン (1, 2 - ジアジン)、ピリミジン (1, 3 - ジアジン)、ピラジン (1, 4 - ジアジン)、トリアジン、テトラゾール、およびオキサジアゾール (フラザン) に由来する C₆ ヘテロアリアル基

20

から選択される、請求項 1 2 ~ 3 4 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 7】

Ar¹が、

ベンゾフラン、イソベンゾフラン、インドール、イソインドール、プリン、ベンゾイミダゾールに由来する C₉ 複素環基；

キノリン、イソキノリン、ベンゾジアジン、ピリドピリジン、キノキサリンに由来する C₁₀ 複素環基；

カルバゾールに由来する C₁₃ 複素環基；ならびに、

アクリジン、キサンテン、フェノキサチン、フェナジン、フェノキサジン、フェノチアジンに由来する C₁₄ 複素環基、

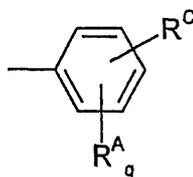
30

から選択される、請求項 1 2 ~ 3 4 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 8】

Ar¹が、フェニルコアを有するアリアル基であり、式：

【化 1 1】



40

(式中、

q は 0 ~ 5 の整数であり；

各 R^A は、独立して、アリアル置換基であり；

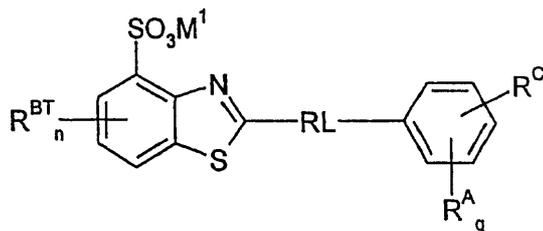
R^C は、存在するときは、反応性共役置換基、または

R^C は、検出可能な標識であるか、それを含有する)

を有し、

化合物が、式：

【化 1 2】



を有する、請求項 3 5 記載の方法。

【請求項 3 9】

10

R^Cが、存在し、反応性共役置換基であり、別の分子との化学反応によりコンジュゲートして、共有結合を形成するのに適した反応性官能基か、またはそれを含有する、請求項 3 8 記載の方法。

【請求項 4 0】

R^Cが、存在し、活性エステルであるか、またはそれを含有する、請求項 3 9 記載の方法。

【請求項 4 1】

R^Cが、存在し、スクシンイミジルエステルであるか、またはそれを含有する、請求項 4 0 記載の方法。

【請求項 4 2】

20

R^Cが、存在し、反応性共役置換基であるか、またはそれを含有する、強い非共有相互作用により他の分子に共役させるのに適した部分であるか、またはそれを含有する、請求項 3 9 記載の方法。

【請求項 4 3】

R^Cが、存在し、ビオチンであるか、またはそれを含有する、請求項 4 2 記載の方法。

【請求項 4 4】

R^Cが、存在し、反応性共役置換基であり、複合体またはキレート形成により別の分子と共役させるのに適した部分であるか、またはそれを含む、請求項 3 9 記載の方法。

【請求項 4 5】

R^Cが、存在し、テクネチウムキレート化基であるか、それを含有する、請求項 4 4 記載の方法。

30

【請求項 4 6】

R^Cが、存在し、ジエチレントリアミンペンタ酢酸であるか、それを含有する、請求項 4 5 記載の方法。

【請求項 4 7】

R^Cが、存在し、検出可能な標識であるか、またはそれを含む、請求項 3 8 記載の方法。

【請求項 4 8】

R^Cが、存在し、染料、蛍光マーカー、抗原基、安定もしくは不安定放射性同位元素、またはポジトロン放出炭素原子であるか、またはそれを含む請求項 4 7 記載の方法。

【請求項 4 9】

40

R^Cが、存在し、¹⁸Fであるか、またはそれを含有する、請求項 4 8 記載の方法。

【請求項 5 0】

R^Cが、存在し、ポジトロン放出炭素原子であるか、またはそれを含有する、請求項 4 8 記載の方法。

【請求項 5 1】

各 R^Aが、独立して、-OH、-NH₂、-NHR¹、-NR¹R²、-SO₃M²、および C₁₋₄アルキルから選択され；

ここで、

R¹および R²が、それぞれ C₁₋₄アルキルであり、

M²が、Li、Na、K、または Cs から選択されるアルカリ金属カチオンである、請求

50

項 38 ~ 50 のいずれか一項記載の方法。

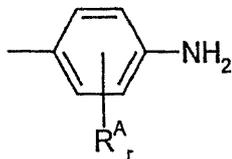
【請求項 52】

少なくとも 1 つの R^A が、 $-OH$ または $-NH_2$ である、請求項 51 記載の方法。

【請求項 53】

Ar^1 が、アミノ - 置換フェニルコアを有するアリール基であり、式：

【化 13】



10

(式中、
 r は、0 ~ 4 の整数であり、
 そして各 R^A は、独立して、アリール置換基である)
 を有する、請求項 52 記載の方法。

【請求項 54】

各 R^A が、独立して、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^1$ 、 $-NR^1R^2$ 、 $-SO_3M^2$ 、および C_{1-4} アルキルから選択され；

ここで、

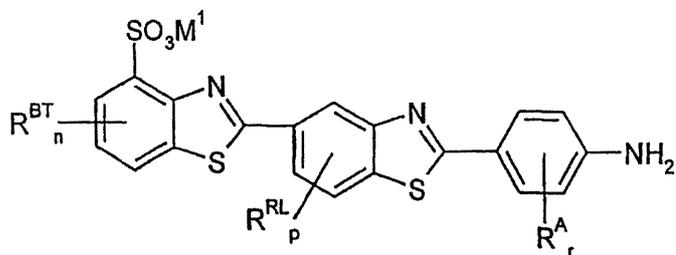
R^1 および R^2 は、それぞれ C_{1-4} アルキルであり、
 そして M^2 が、 Li 、 Na 、 K 、または Cs から選択されるアルカリ金属カチオンである、
 請求項 53 記載の方法。

20

【請求項 55】

リガンドが、式：

【化 14】



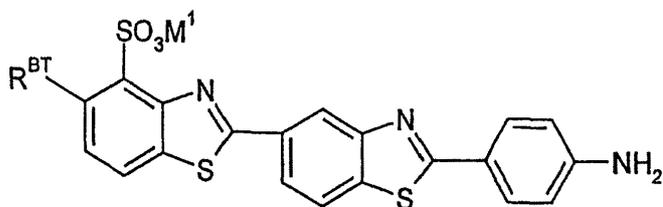
30

を有する、請求項 54 記載の方法。

【請求項 56】

リガンドが、式：

【化 15】



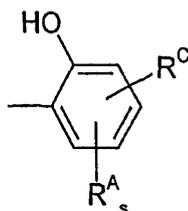
40

を有する、請求項 55 記載の方法。

【請求項 57】

Ar^1 が、ヒドロキシ置換フェニルコアを有するアリール基であり、式：

【化 1 6】



(式中、

s は 0 ~ 4 の整数であり、

各 R^A は独立してアリール置換基であり、R^c は、存在するときは、反応性共役化置換基であるか、またはR^c は、検出可能な標識であるか、またはそれを含有する)

を有する、請求項 5 2 記載の方法。

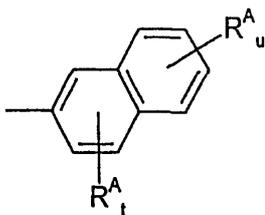
【請求項 5 8】

リガンドが、請求項 1 0 8 ~ 1 5 0 のいずれか一項に記載されたとおりである、請求項 5 7 記載の方法。

【請求項 5 9】

A r¹ が、ナフチルコアを有するアリール基であり、式：

【化 1 7】



(式中、

t は 0 ~ 3 の整数であり、

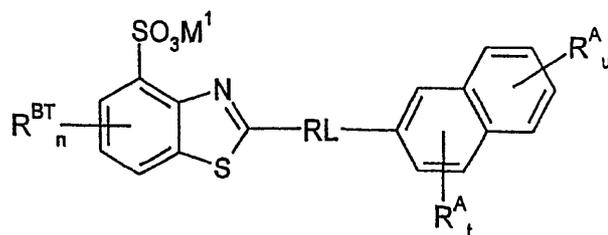
u は 0 ~ 4 の整数であり、

そして各 R^A は、独立して、アリール置換基である)

を有し、

化合物が、式：

【化 1 8】



を有する、請求項 3 5 記載の方法。

【請求項 6 0】

A r¹ が、ヒドロキシ置換ナフチルコアを有するアリール基であり、式：

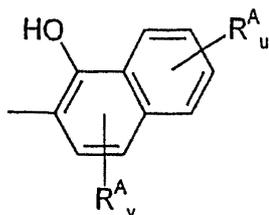
10

20

30

40

【化19】



(式中、

v は 0 ~ 2 の整数であり、

u は 0 ~ 4 の整数であり、そして

各 R^A は独立してアリール置換基である)

を有する、請求項 59 記載の方法。

【請求項 61】

各 R^A が、独立して、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^1$ 、 $-NR^1R^2$ 、 $-SO_3M^2$ および C_{1-4} アルキル

(ここで、

R^1 および R^2 は、それぞれ C_{1-4} アルキルであり、

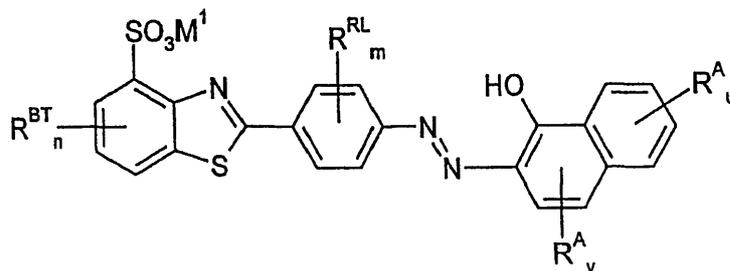
M^2 が、 Li 、 Na 、 K 、または Cs から選択されるアルカリ金属カチオンである)

から選択される、請求項 59 または 請求項 60 記載の方法。

【請求項 62】

リガンドが、式：

【化20】

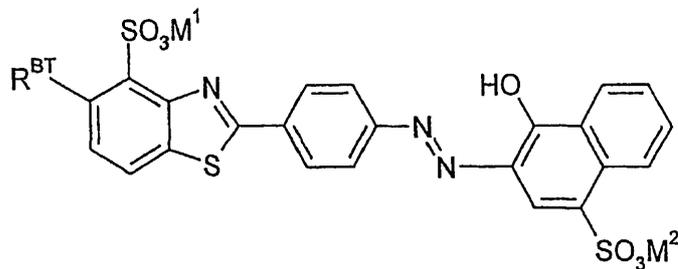


を有する、請求項 61 記載の方法。

【請求項 63】

リガンドが、式：

【化21】



を有する、請求項 62 記載の方法。

【請求項 64】

リガンドが、下記式：

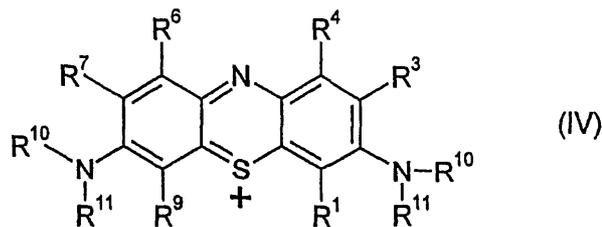
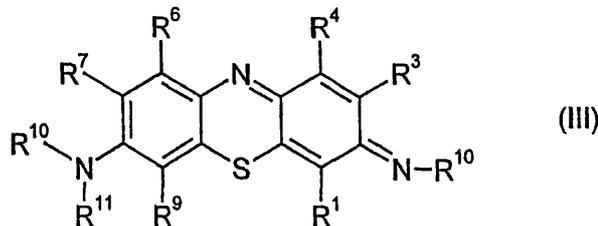
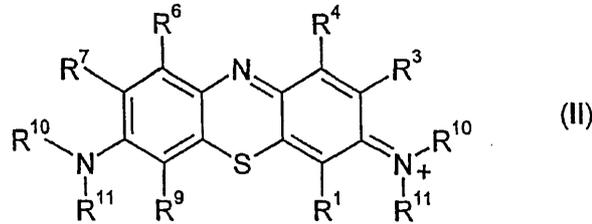
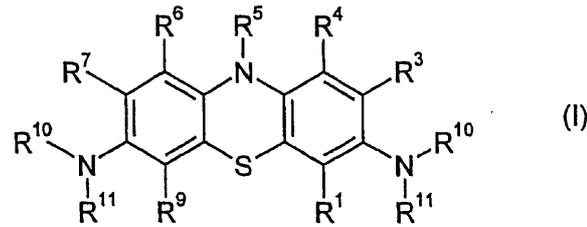
10

20

30

40

【化 2 2】



10

20

30

40

50

(式中：

R_1 、 R_3 、 R_4 、 R_6 、 R_7 および R_9 のそれぞれは、独立して、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、カルボキシ、置換もしくは非置換アルキル、ハロアルキル、またはアルコキシであり；

R_5 は、独立して、水素、ヒドロキシ、カルボキシ、置換もしくは非置換アルキル、ハロアルキル、またはアルコキシであり；

R_{10} および R_{11} は、独立して、水素、ヒドロキシ、カルボキシ、置換もしくは非置換アルキル、ハロアルキル、またはアルコキシから選択される)

の1つで示される化合物、あるいは薬学的に許容され得るその塩である、請求項1~11のいずれか一項記載の方法。

【請求項65】

R_1 、 R_3 、 R_4 、 R_6 、 R_7 および R_9 のそれぞれが、独立して、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、カルボキシ、置換もしくは非置換 C_{1-6} アルキル、 C_{1-4} ハロアルキルまたは C_{1-6} アルコキシであり；

R_5 が、独立して、水素、ヒドロキシ、カルボキシ、置換もしくは非置換 C_{1-6} アルキル、 C_{1-4} ハロアルキル、または C_{1-6} -アルコキシであり；

R_{10} および R_{11} が、独立して、水素、ヒドロキシ、カルボキシ、置換もしくは非置換 C_{1-6} アルキル、 C_{1-4} ハロアルキルまたは C_{1-6} アルコキシから選択される、請求項64記載の方法。

【請求項66】

前記 C_{1-6} アルキルが、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチ

ル、sec - ブチル、tert - ブチル、ペンチル、イソペンチル、tert - ペンチル、ヘキシル、およびイソヘキシルから選択される、請求項 65 記載の方法。

【請求項 67】

前記置換 C_{1-6} アルキルの置換基が、メルカプト、チオエーテル、ニトロ、アミノ、アリールオキシ、ハロゲン、ヒドロキシル、カルボニル、 C_{5-20} アリール、 C_{1-6} シクロアルキル、および非アリール C_{3-20} ヘテロシクリルから選択される、請求項 65 または請求項 66 記載の方法。

【請求項 68】

前記 C_{1-4} ハロアルキルが、クロロメチル、2 - ブロムエチル、1 - クロロイソプロピル、3 - フルオロプロピル、2, 3 - ジブロムブチル、3 - クロロイソブチル、ヨード - t - ブチル、およびトリフルオロメチルから選択される、請求項 65 ~ 67 のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項 69】

リガンドが、請求項 64 ~ 68 のいずれか一項記載の化合物と酸とで形成される酸付加塩である、請求項 64 ~ 68 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 70】

酸が、無機酸または有機酸である、請求項 69 記載の方法。

【請求項 71】

リガンドが、塩化物である、請求項 70 記載の方法。

【請求項 72】

前記有機酸が、酢酸、クエン酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、メタンスルホン酸、および p - トルエンスルホン酸から選択される、請求項 70 記載の方法。

20

【請求項 73】

R_1 、 R_3 、 R_4 、 R_6 、 R_7 および R_9 が、独立して、- H、- CH_3 、- C_2H_5 、または - C_3H_7 であり；

R_{10} および R_{11} が、独立して、- H、- CH_3 、- C_2H_5 、または C_3H_7 であり；

R_5 が、独立して - H、- CH_3 、- C_2H_5 、または C_3H_7 である、請求項 64 ~ 72 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 74】

リガンドが、図 8 b に示されるとおりである、請求項 73 記載の方法

30

【請求項 75】

リガンドが、ポジトロン放出炭素を含む、請求項 64 ~ 74 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 76】

(i i) 対象の脳の new皮質構造における細胞内凝集タウに結合するリガンドの存在および/または量を更に測定するステップを更に含む、請求項 1 ~ 75 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 77】

内側頭葉における細胞外凝集 P H F タウに結合させるために使用されるリガンド、および脳の new皮質構造の細胞内凝集 P H F タウに結合させるために使用されるリガンドを、区別して標識する、請求項 76 記載の方法。

40

【請求項 78】

細胞内凝集タウに結合させるために使用されるリガンドが、請求項 64 ~ 75 のいずれか一項記載のリガンドである、請求項 76 または 77 記載の方法。

【請求項 79】

リガンドが、脳の関連領域に存在する競合結合部位について、優先的に凝集 P H F タウに結合する、請求項 1 ~ 78 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 80】

方法のステップ (i) および/または (i i) を、凝集 P H F タウに結合させるために使用されるリガンドに優先的に、脳の関連領域に存在する競合結合部位を標識する更なるブロックリガンドを対象に導入する更なるステップとともに実施する、請求項 1 ~ 79

50

のいずれか一項記載の方法。

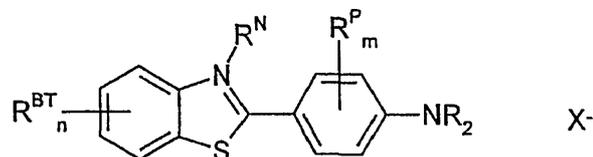
【請求項 8 1】

ブロッキングリガンドが $[^{18}\text{F}] \text{FDDNP}$ である、請求項 8 0 記載の方法。

【請求項 8 2】

ブロッキングリガンドが、式：

【化 2 3】



10

〔式中、

n は、0 ~ 4 の整数であり；

各 R^{BT} は、独立して、ブロッキングリガンドベンゾチアゾール置換基であり；

m は、0 ~ 4 の整数であり；

各 R^{P} は、独立して、フェニレン置換基であり；

各 R は、独立して、-H またはアミノ置換基であり；そして、

R^{N} および X^- が、ともに存在せず、会合（3級）窒素原子が中性であるか、または

R^{N} が、ベンゾチアゾリノ置換基であり、会合（4級）窒素原子が陽電荷を帯びており、 X^- が対イオンである〕

20

で示されるベンゾチアゾールである、請求項 8 0 記載の方法。

【請求項 8 3】

ブロッキングリガンドが、チオフラビン - T である、請求項 8 2 記載の方法。

【請求項 8 4】

各 R^{BT} が、独立して C_{1-4} アルキル、- SO_3H 、または - SO_3M^3 （ここで M^3 はカチオンである）である、請求項 8 2 記載の方法。

【請求項 8 5】

M^3 が、アルキル金属カチオン Li 、 Na 、 K 、または Cs から選択される、請求項 8 4 記載の方法。

【請求項 8 6】

30

n が 1 であり、 R^{BT} が、-Me、-Et、-nPr、または -iPr である、請求項 8 2 ~ 8 5 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8 7】

n が、1 であり、 R^{BT} が -Me である、請求項 8 6 記載の方法。

【請求項 8 8】

R^{BT} 基の一つが、- SO_3H または SO_3M^3 であり、別の R^{BT} 基が、 C_{1-4} アルキルである、請求項 8 4 記載の方法。

【請求項 8 9】

n が 2 であり、一つの R^{BT} が C_{1-4} アルキルであり、一つの R^{BT} が、- SO_3H または - SO_3M^3 である、請求項 8 2 ~ 8 5 のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項 9 0】

n が 2 であり、一つの R^{BT} が -Me であり、一つの R^{BT} が、- SO_3H または SO_3M^3 である、請求項 8 9 記載の方法。

【請求項 9 1】

R^{N} および X^- がともに存在せず、会合（3級）窒素原子が中性である、請求項 8 2 ~ 9 0 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9 2】

R^{N} が、ベンゾチアゾリノ置換基であり、会合（4級）窒素原子が陽電荷を帯びており、 X^- が対イオンである、請求項 8 2 ~ 9 0 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9 3】

50

R^N が C_{1-4} アルキルである、請求項82～90のいずれか一項記載の方法。

【請求項94】

R^N が、-Me、-Et、-nPr、または-iPrである、請求項93記載の方法。

【請求項95】

X^- が、 Cl^- 、 Br^- 、および I^- である、請求項82～90のいずれか一項記載の方法。

【請求項96】

R^P が C_{1-4} アルキルである、請求項82～95のいずれか一項記載の方法。

【請求項97】

各Rが-Hであり、アミノ基が-NH₂である、請求項82～96のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項98】

一つのRが-Hであり、一つのRがアミノ置換基である、請求項82～96のいずれか一項記載の方法。

【請求項99】

各Rがアミノ置換基である、請求項82～96のいずれか一項記載の方法。

【請求項100】

アミノ置換基のそれぞれが C_{1-4} アルキルである、請求項99記載の方法。

【請求項101】

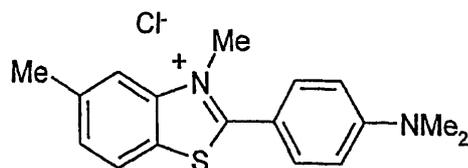
アミノ基-NR₂が、-NH₂、-NHMe、-NHEt、-NH(iPr)、-NH(nPr)、-NMe₂、-NEt₂、N(iPr)₂、または-N(nPr)₂である、請求項

20

【請求項102】

ブロッキングリガンドが、式：

【化24】



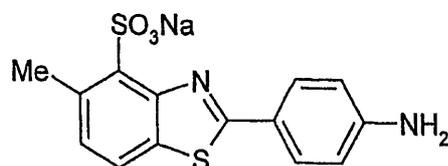
30

で示されるベンゾチアゾールである、請求項101記載の方法。

【請求項103】

ブロッキングリガンドが、式：

【化25】



40

で示されるベンゾチアゾールである、請求項101記載の方法。

【請求項104】

上記疾患に罹患していると考えられる対象におけるタウオパシーの診断または予後において使用するための、請求項1～103のいずれか一項記載の方法。

【請求項105】

タウオパシーがADである、請求項104記載の方法。

【請求項106】

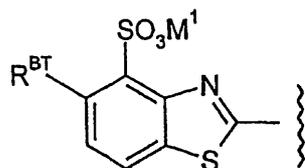
上記疾患に罹患していると考えられる対象におけるタウオパシーの診断または予後方法に使用するための、請求項1～79のいずれか一項記載のリガンドであって、前記方法が、請求項104または請求項105に記載されている方法であるリガンド。

50

【請求項 117】

ベンゾチアゾール基が、下記式：

【化 27】



を有する、請求項 108 ~ 116 のいずれか一項記載のリガンド。

10

【請求項 118】

リガンドが、下記式：

【化 28】



を有する、請求項 117 記載のリガンド。

20

【請求項 119】

各 R^{R L} が、独立して C₁₋₄ アルキル、ヒドロキシ、C₁₋₄ アルコキシ、ニトロ、シアノ、ハロ、またはアミノ、請求項 108 ~ 118 のいずれか一項記載のリガンド。

【請求項 120】

各 R^{R L} が、独立して、- Me、- Et、- n Pr、- i Pr、- OH、- OMe、- OEt、- O(n Pr)、- O(i Pr)、- NO₂、- CN、- F、- Cl、- Br、- I、- NH₂、- NHMe、- NHEt、- NH(i Pr)、- NH(n Pr)、- NMe₂、- NEt₂、N(i Pr)₂、または - N(n Pr)₂ である、請求項 119 記載のリガンド。

【請求項 121】

各 R^{R L} が、独立して、C₁₋₄ アルキルである、請求項 120 記載のリガンド。

30

【請求項 122】

各 R^A が、独立して、- OH、- NH₂、- NHR¹、- NR¹R²、- SO₃M²、および C₁₋₄ アルキルから選択され；

ここで、

R¹ および R² が、それぞれ C₁₋₄ アルキルであり、

M² が、アルカリ金属カチオンである、請求項 108 ~ 121 のいずれか一項記載のリガンド。

【請求項 123】

M² が、Li、Na、K、または Cs である、請求項 122 記載のリガンド。

40

【請求項 124】

R^C が、存在し、反応性共役置換基であり、別の分子との化学反応によってそれに共役させ、それと共有結合を形成するのに適した反応性官能基であるか、それを含有する、請求項 108 ~ 123 のいずれか一項記載のリガンド。

【請求項 125】

R^C が、存在し、活性エステルであるか、それを含有する、請求項 124 記載のリガンド。

【請求項 126】

R^C が存在し、スクシンイミジルエステルであるか、またはそれを含有する、請求項 125 記載のリガンド。

50

【請求項 1 2 7】

R^C が存在し、反応性共役置換基であり、強い非共有性相互作用により別の分子に共役させるのに適する部分であるか、またはそれを含有する、請求項 1 2 4 記載のリガンド。

【請求項 1 2 8】

R^C が存在し、ビオチンであるか、またはそれを含有する、請求項 1 2 7 記載のリガンド。

【請求項 1 2 9】

R^C が存在し、反応性共役置換基であり、複合体またはキレート形成による別の分子への共役に適した部分であるか、またはそれを含有する、請求項 1 2 4 記載のリガンド。

【請求項 1 3 0】

R^C が存在し、テクネチウムキレート化基であるか、またはそれを含有する、請求項 1 2 9 記載のリガンド。

10

【請求項 1 3 1】

R^C が存在し、ジエチレントリアミンペンタ酢酸であるか、またはそれを含有する、請求項 1 3 0 記載のリガンド。

【請求項 1 3 2】

R^C が存在し、検出可能なラベルであるか、またはそれを含有する、請求項 1 0 8 ~ 1 2 3 のいずれか一項記載のリガンド。

【請求項 1 3 3】

R^C が存在し、染料、蛍光マーカー、抗原基、安定または不安定放射性同位元素、または

20

【請求項 1 3 4】

R^C が存在し、 ^{18}F であるか、またはそれを含有する、請求項 1 3 3 記載のリガンド。

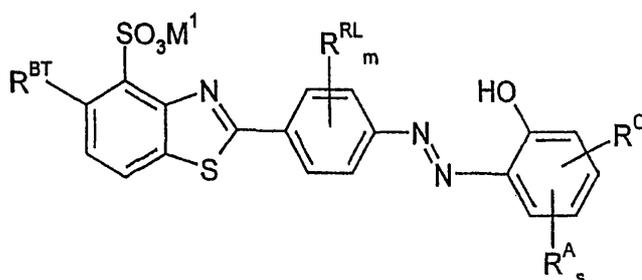
【請求項 1 3 5】

R^C が存在し、ポジトロン放出炭素原子であるか、またはそれを含有する、請求項 1 3 4 記載のリガンド。

【請求項 1 3 6】

リガンドが、式：

【化 2 9】



30

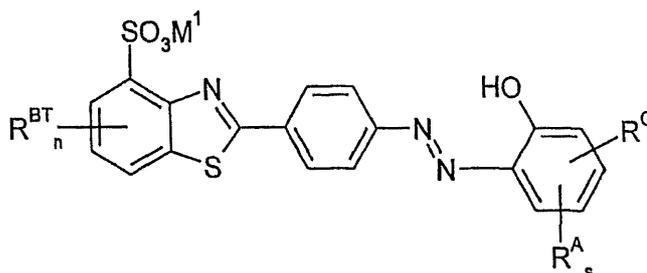
を有する、請求項 1 0 8 ~ 1 3 5 のいずれか一項記載のリガンド。

【請求項 1 3 7】

リガンドが、式：

40

【化 3 0】



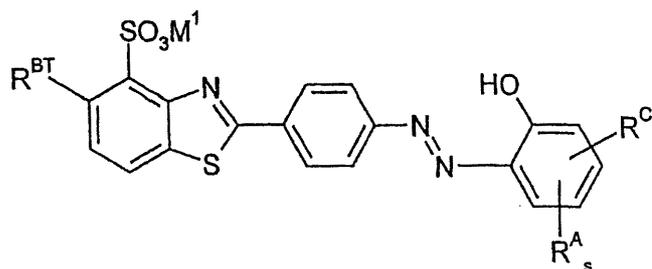
を有する、請求項 1 3 6 記載のリガンド。

50

【請求項 138】

リガンドが、式：

【化 3 1】



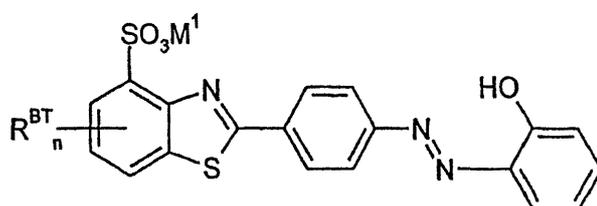
10

を有する、請求項 137 記載のリガンド。

【請求項 139】

リガンドが、式：

【化 3 2】



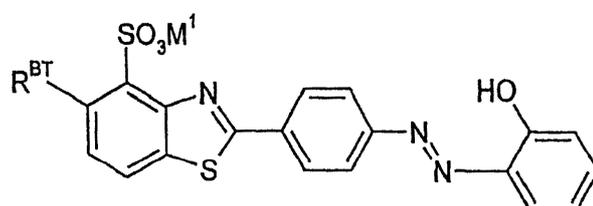
20

を有する、請求項 137 記載のリガンド。

【請求項 140】

リガンドが、式：

【化 3 3】



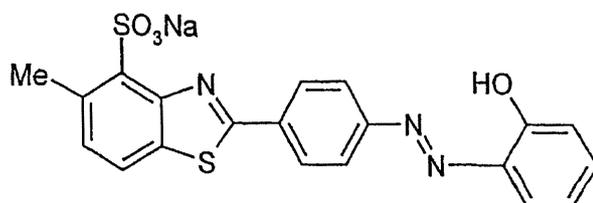
30

を有する、請求項 139 記載のリガンド。

【請求項 141】

リガンドが、式：

【化 3 4】



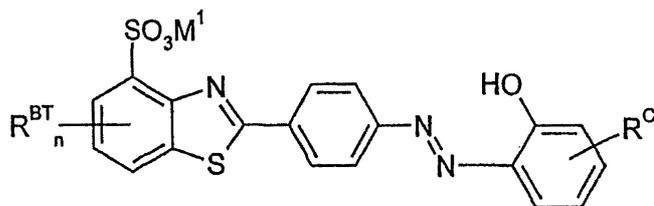
40

を有する、請求項 140 記載のリガンド。

【請求項 142】

リガンドが、式：

【化 3 5】



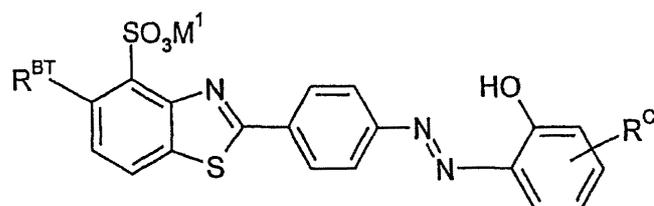
を有する、請求項 1 3 7 記載のリガンド。

【請求項 1 4 3】

10

リガンドが、式：

【化 3 6】



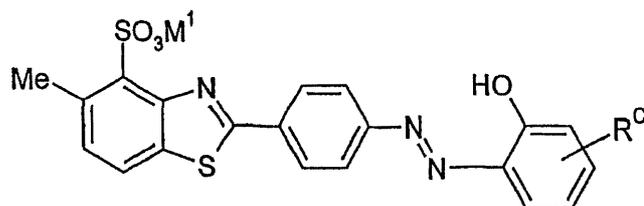
を有する、請求項 1 4 2 記載のリガンド。

20

【請求項 1 4 4】

リガンドが、式：

【化 3 7】



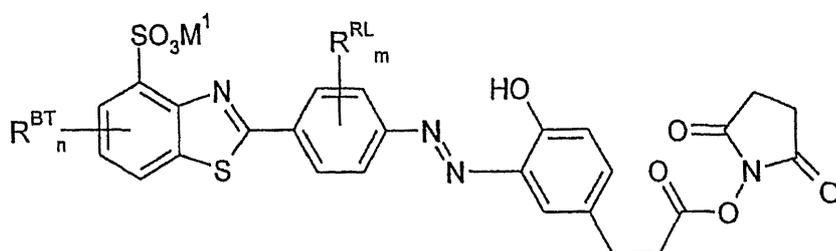
30

を有する、請求項 1 4 3 記載のリガンド。

【請求項 1 4 5】

リガンドが、式：

【化 3 8】



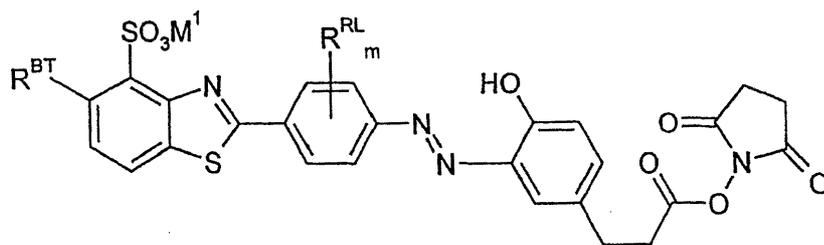
40

を有する、請求項 1 4 2 記載のリガンド。

【請求項 1 4 6】

リガンドが、式：

【化 3 9】



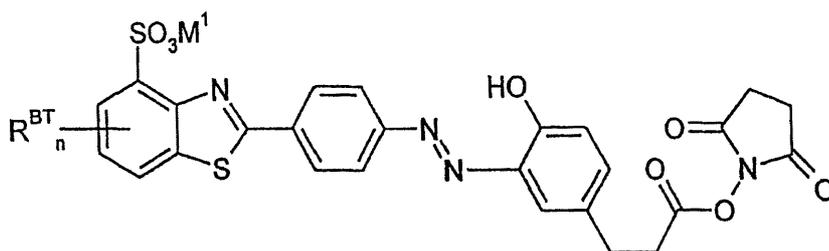
を有する、請求項 1 4 5 記載のリガンド。

10

【請求項 1 4 7】

リガンドが、式：

【化 4 0】



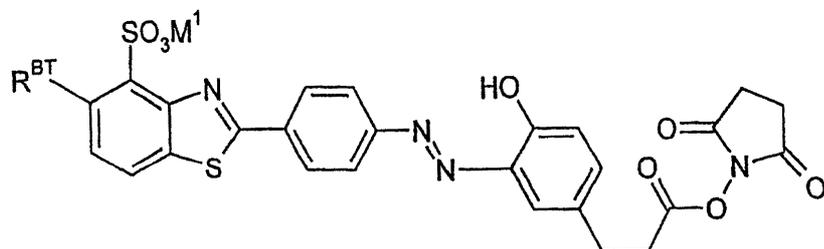
20

を有する、請求項 1 4 5 記載のリガンド。

【請求項 1 4 8】

リガンドが、式：

【化 4 1】



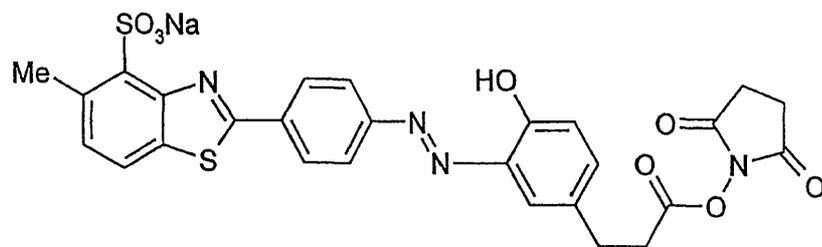
30

を有する、請求項 1 4 7 記載のリガンド。

【請求項 1 4 9】

リガンドが、式：

【化 4 2】



40

を有する、請求項 1 4 8 記載のリガンド。

【請求項 1 5 0】

検出可能な化学基と共役しているか、キレートしているか、さもなくばそれと会合している、請求項 1 3 6 ~ 1 4 9 のいずれか一項記載のリガンド。

【請求項 1 5 1】

50

活性成分として、少なくとも90%、95%または98%の請求項108～150のいずれか一項記載のリガンドを含む、診断組成物。

【請求項152】

担体物質または他の薬学的におよび生理学的に許容し得る賦形剤を更に含む、請求項151記載の診断組成物。

【請求項153】

請求項108～152のいずれか一項記載のリガンドまたは組成物と、凝集分子を接触させるステップを含む、凝集タウまたはタウ様分子の標識方法。

【請求項154】

疾患に罹患すると考えられる対象におけるタウオパシーの*in vitro*診断または予後方法であって、

(i) 対象から適切な組織検体を得るステップ；

(ii) 請求項108～152のいずれか一項記載のリガンドまたは組成物と、検体を接触させるステップ；

(iii) 検体に結合されたリガンドの量および/または局在個所を検出するステップ；および

(iv) (iii)の結果を、対象における疾患の病期または重症度と関連させるステップ

を含む、方法。

【請求項155】

タウオパシーがADである、請求項153記載の方法。

【請求項156】

タウオパシーについての、ヒトまたは動物の身体の診断、予後または治療的処置方法において使用するための、請求項108～150のいずれか一項記載のリガンド。

【請求項157】

タウオパシーがADである、請求項156記載のリガンド。

【請求項158】

凝集タウタンパク質に結合可能な化合物の同定方法であって、

(i) 請求項108～150のいずれか一項記載のリガンドが結合している、凝集タウタンパク質の検体を提供するステップ、

(ii) 推定タウ結合化合物と、検体を接触させるステップ、

(iii) 推定タウ結合化合物による凝集タウタンパク質からのリガンドの置き換えの程度を測定するステップ、

(vi) (iii)で行った測定の結果を、化合物の凝集タウタンパク質への結合能と関連させるステップ

を含む、方法。

【請求項159】

凝集タウタンパク質が、溶解しているか、または固相に結合している、請求項158記載の方法。

【請求項160】

凝集PHFタウタンパク質を標識可能なリガンドの*in vitro*同定法であって、

(i) 凝集PHFタウタンパク質を標識可能と考えられる第一作用物質を提供するステップ、

(ii) (a) 高親和性タウ捕獲部位を露出するように固相に結合させたタウコアフラグメントを含む、タウタンパク質またはその誘導体を、(b) 固相タウタンパク質または誘導体に結合可能な液相タウたんぱく質またはその誘導体、(c) 選択された第一作用物質、および(d) タウ-タウ結合阻害剤であることが知られている第二作用物質と接触させるステップ、

(iii) (b)の液相タウタンパク質または誘導体の、(a)の固相タウタンパク質または誘導体への結合の、阻害剤(d)による阻害を完全にまたは一部低減する第一作用物

10

20

30

40

50

質を選択するステップ、
を含む方法。

【請求項 161】

ステップ (i i) を、

(i の 2) (a) 高親和性タウ捕獲部位を露出するように固相に結合したタウコアフラグメントを含有するタウタンパク質またはその誘導体を、(b) 固相タウタンパク質または誘導体に結合可能な液相タウタンパク質またはその誘導体、および(c) 上記第一作用物質と接触させるステップ、

(i の 2 . 1) (b) の液相タウタンパク質または誘導体の、(a) の固相タウタンパク質または誘導体への結合の阻害により示される、タウ-タウ結合の阻害を検出するステップ、

(i の 2 . 2) タウ-タウ結合阻害剤として最小の活性しか有さないか、または全く活性を有さない、および/またはタウ-タウ結合を場合により増強する、第一作用物質を選択するステップ

とともに実施される、

請求項 160 記載の方法。

【請求項 162】

阻害剤が、請求項 64 ~ 74 のいずれか一項記載のジアミノフェナチオジンである、請求項 160 または 161 項記載の方法。

【請求項 163】

阻害剤が DMMB である、請求項 162 記載の方法。

【請求項 164】

液相タウタンパク質または誘導体が、固相への曝露の前に部分的凝集を経ている形態で調製される、請求項 160 ~ 163 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 165】

液相タウタンパク質または誘導体の上記調製が、

(i) 上記タウタンパク質または誘導体を音波処理するステップ、および/または

(i i) 上記タウタンパク質または誘導体を、半透膜を介して PEG に曝露するステップを含む、請求項 174 記載の方法。

【請求項 166】

上記作用物質および液相タウタンパク質または誘導体を、上記固相タウタンパク質または誘導体と接触させるステップを、pH 9 ~ 10 のアルカリ性バッファー中で行う、請求項 160 ~ 165 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 167】

上記作用物質および液相タウタンパク質または誘導体を、上記固相タウタンパク質または誘導体と接触させるステップを、生理学的緩衝液条件中で行う、請求項 160 ~ 165 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 168】

各作用物質および液相タウタンパク質または誘導体を、上記固相タウタンパク質または誘導体に接触させるステップを、50 ~ 400 mM 塩化ナトリウムまたは匹敵するイオン強度の塩または塩混合物中、および 4 ~ 10 の pH 範囲で実施する、請求項 160 ~ 165 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 169】

上記液相タウタンパク質または誘導体が標識されている、請求項 160 ~ 168 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 170】

上記液相タウタンパク質または誘導体が、上記固相タウタンパク質または誘導体から免疫学的に識別可能であり、結合を、抗体によって検出する、請求項 160 ~ 168 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 171】

10

20

30

40

50

コアフラグメントに対応し、Ala390 (dGA) で終結する切断タウタンパク質を、タウ - タウ会合に好ましくない緩衝液条件下で固相上に置く、請求項 160 ~ 170 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 172】

コアフラグメントに対応し、Glue-391 (dGAE) で終結する切断タウタンパク質、または完全長タンパク質を、各作用物質と一緒に、液相中で加える、請求項 160 ~ 171 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 173】

診断または予後試薬として作用物質を処方するステップを更に含む、請求項 158 ~ 172 のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項 174】

請求項 1 ~ 11 のいずれか一項記載の方法においてリガンドとして作用物質を用いるステップを更に含む、請求項 158 ~ 172 のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、概して、神経原線維のもつれの標識および検出に係る物質、方法およびモデルに関する。更に、神経病理学的病期分類に適するリガンドの同定および開発、並びにアルツハイマー病 (AD) などの疾患の診断、予後または治療におけるその使用に関する。

20

【背景技術】

【0002】

発明の背景

神経病理学的病期分類および AD

Braak (Braak, H et al. (1991), Acta. Neuropathol. 82, 239-259) により提唱された神経病理学的病期分類は、AD の診断に用いる、比較的純粋なアルツハイマー型の神経原線維変性の進行の、最良の利用可能な定義を与える (Wischik et al. (2000), "Neurobiology of Alzheimer's Disease", Eds. Dawbarn et al., The Molecular and Cellular Neurobiology Series, Bios Scientific Publishers, Oxford)。この病期分類を、脳の領域について模式的に図 2 B に示す。この病期分類は、神経原線維のもつれ (NFT) 分布の規則的な領域的階層に基づいている。リスト中の後期の症例に比べ、階層のより早期に現れる脳の領域は、より多くのもつれを有するとともに重症度の低い症例において冒されている。

30

【0003】

AD、臨床的痴呆と神経病理学的病期分類の関係

Braak 病期の効果的な死亡前評価を提供することは、AD の評価および治療において有用である。その鑑別には、レビー小体痴呆、パーキンソン病、様々な形態の前頭 - 側頭および皮質 基質変性、進行性核上麻痺および一連の希少な神経学的症候群を含む。

【0004】

Braak により提唱された元々のモデルは、本質的には、事実上定性的であり、臨床的痴呆および症状の発現の閾値に関するいかなる意味あいにも結びついていなかった。

40

【0005】

DSM - IV 基準による臨床的痴呆の出現については、これは、統計的には、Braak 病期 3 と 4 の間の移行期に対応する (図 2 c)。痴呆の定義のための DSM - IV 基準 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition, American Psychiatric Association, American Psychiatric Press, Washington DC (1994)) は、MMSE (Mini Mental State Examination) の約 18 のカットオフポイントと同等であり、65 歳を超える人口の約 5% の痴呆罹患率に相当する (65 歳以上は、総人口の約 17% を占める)。

50

【 0 0 0 6 】

Gertz et al. ((1996) Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. 246, 132-6) は、一般診療から検死までを追跡して症例を研究し、それを C A M D E X を用いて臨床レベルで厳密に特徴付けした (Roth et al, 1988, "The Cambridge Examination for Mental Disorders of the Elderly (CAMDEX) "Cambridge University Press)。Braakの基準により病期分類する検死を行ったが、検死でいかなる程度であれ血管病理が認められたすべての症例を除外した後、移行時点で症例の約 3 分の 1 において依然不明確であった。すなわち、A D と臨床診断された症例の約 3 分の 1 は、実際に早期 Braak 病期 (病期 1 ~ 3) にあり、血管病変を有し、同時に Lewy 体病変を有する。したがって、最良の診療研究環境においてさえ、高度の不明確さが存在する。A D のルーチンの臨床診断をするときに、実際に存在する優勢な神経病理学的基質は、更に不明確である。

10

【 0 0 0 7 】

最近、ある分子 (F D D N P、2 - (1 - { 6 - [(2 - [¹⁸F] フルオロエチル) (メチル) アミノ] - 2 - ナフチル } エチリデン) マロノニトリル) が、臨床的および神経放射学的にアルツハイマー病と診断された症例において、注射後、P E T イメージングにおいて、内側頭葉脳領域 (海馬、内側嗅領皮質および扁桃) における相対的保持時間 (RRT; relative retention time) が増大することが明らかにされた (Shoghi-Jadid et al., A m. J. Geriatr. Psychiatr. 2002, 10 : 24-35)。

【 0 0 0 8 】

N F T およびアミロイド斑への結合が検討されているが、N F T への結合は、明らかにされていない。ただし、化合物は、in vitro で合成 アミロイド原線維に高い親和性で結合する。

20

【 0 0 0 9 】

症例を、M M S E スコアによる対応する疾患重症度について、血管病理を除いた一連の神経病理学的症例とマッチさせた場合、Shoghi-Jadid et al. により報告された R R T 値は、アミロイド斑の数とは相関するが、以下に示すように、神経原線維のもつれの病理の測定値とは相関しないことが明らかにされた。

【 0 0 1 0 】

Spearman の順位相関係数 :

	MTL AP	全体AP	MTL NFT	全体NFT
R R T	0.665**	0.654**	0.244	0.189
p	<0.01	<0.01	>0.1	>0.1

30

【 0 0 1 1 】

Pearson 相関係数 :

	MTL AP	全体AP	MTL NFT	全体NFT
R R T	0.602*	0.596*	0.266	0.275
p	<0.05	<0.05	>0.3	>0.3

40

【 0 0 1 2 】

ここで、パラメータを以下のように定義する。

- MTL AP 内側頭葉アミロイド斑
- 全体 AP 脳の 1 2 領域における平均アミロイド斑負荷
- MTL NFT 内側頭葉神経原線維のもつれ
- 全体 NFT 脳の 1 2 領域における平均 N F T 負荷

【 0 0 1 3 】

しかし、アミロイド沈着は、正常な加齢とアルツハイマー病との差別化に乏しいことが知られており (本明細書、図 2 d を参照)、アミロイド病変は、神経病理学的な病期分

50

類の信頼のおける根拠を与えない(Braak and Braak, 1991)。したがって、F D D N P - R R T は、アルツハイマー病の *in vivo* 神経病理学的病期診断のための方法を与えない。

【0014】

より特異的な神経心理学的指標(例えば、分割注意課題(split attention tasks)、検体への遅延マッチング(delayed matching to sample)など)への具体的言及を伴う、臨床的方法の更なる改善は、臨床診断の正確さを向上させるかもしれないが、基本的な問題は、生存中に根底にある神経病理、具体的にはアルツハイマー型の神経原変性の程度を直接測定する方法を開発することである。

【0015】

神経原線維変性の進行およびタウ

10

上記のように、ADのタウに基づく病理は、表現型の主要な特徴である。それは、ニューロン破壊の程度に強く相関する(Wischik et al. (2000) loc cit中にて概観)。

【0016】

細胞レベルでは、タウからのNFTの形成は、以下のように進行すると考えられている。形成および蓄積の過程では、まず、対螺旋フィラメント(PHFs: paired helical filaments)が、おそらくPHFの集合の前および集合過程において切断された初期タウオリゴマーから、細胞質内でフィラメントとして集合する(参考文献26および27)。その後、従来の細胞内NFTを形成し続ける。この状態では、PHFは、切断されたタウのコアと、完全長タウを含有するファジーな外殻からなる(Wischik et al. (2000) loc. cit.)。集合プロセスは、対数的であり、正常な機能的タウの細胞内プールを消費しながら、新しいタウ合成を誘導して不足を補う(参考文献29)。最終的に、ニューロンの機能的障害が進行して細胞死にまでいたり、細胞外NFTを残す。細胞死は、細胞外NFTの数に強く相関する(Bondareff, W. et al. (1993) Arc. Gen. Psychiatry 50: 350-6)。外側ニューロン膜が損傷され、NFTが細胞外空間に出されるので、ニューロンのファジーな外殻が漸進的に喪失するとともにN末端タウの対応する免疫反応性が喪失するが、PHFコアを伴うタウ免疫反応性は保持される(図3; 参考文献30)。

20

【0017】

凝集のプロセスにおいて、タウタンパク質は、半反復相シフト(half-repeat phase-shift)(参考文献32、33)を伴う反復ドメインにおいて立体構造を変化させる。これにより、ADに特徴的な神経原線維のもつれを構成する対螺旋フィラメント(PHF)のコアに見出されるものと同じの、タンパク質分解的に安定なフラグメントが生じる。他のタンパク質凝集系と同様に、そのプロセスは、立体構造における α -ヘリックスから β 鎖への変化を含む可能性が高い(Wischik et al. (2000) loc. cit. 中にて概観)。

30

【0018】

したがって、一般的には、タウの凝集は、細胞内オリゴマー、細胞内フィラメント(図3の第1段階)、細胞外フィラメント(図3の第2および第3段階)の3段階であると考えることができる。

【0019】

しかし、これまでに、細胞レベルで起こり、おそらく脳内の異なる領域で異なる速度および確率で起こるこれらの段階と、比較的純粋な神経原線維変性の進行の最良の利用可能な定義である、先に検討したBraak and Braakの確定された階層システムによる病変の進行との間には、明確な相関性は確立されていない。

40

【0020】

AD評価のための浸襲的方法

腰椎穿刺CSF測定により、ADと対照、およびADと他の神経学的障害を鑑別することができるが、腰椎穿刺は、核医学に基づくアプローチに比べ、より侵襲的であり、高いリスクを伴う(参考文献17~21)。EEGによる神経学的診断も開発されているが(参考文献22~25)、この点で、臨床的接触のあった時点で使用し得る、安価な手段が依然必要とされている。

【0021】

50

脳萎縮を介する神経原線維変性 - SPECTおよびPET

数多くの研究が、脳全体の萎縮および特異的な内側頭葉の萎縮、特に海馬の萎縮は、根底にあるアルツハイマー型の神経原線維変性に密接に結びついており、ADの早期診断において価値がある(参考文献1~8)。

【0022】

しかし、脳全体の萎縮をモニターすることによるADの診断は、研究の場では実施する可能な方法論を象徴しているが、脳の特異的な領域において萎縮を確定し測定するうえで、そして同様に新皮質全体の萎縮を測定するうえでも困難がある。いかなる場合にも、検出可能な萎縮に基づく診断は、効果的な処置には遅きに失するかもしれない。

【0023】

SPECTスキャン(参考文献9~12; HMPAO SPECTにより検出される灌流欠損の特徴的パターン)、PETスキャン(参考文献13~15; グルコース代謝プロフィールにより検出される代謝欠損)、およびMRIスキャン(参考文献16; 脳全体の萎縮、葉萎縮の特異的パターン)における診断特性が確認されたことに続き、近年、診断方法が進歩している。これらの中でも、最も一般的に利用しやすいのが、MRIおよびSPECTである、というのも、PETは、現在のところ、地域に特化したサイクロトロン(local specialized cyclotron)、および半減期の短い注射可能な放射性リガンドを調製する放射化学の能力をもつセンターに限られているからである(Aberdeen, London, Cambridge in UK)。注目すべきは、AD患者においてHMPAO SPECTにより検出される特徴的な早期段階の側頭頭頂灌流欠損は、生化学的に検出され得るタウ病理のパターンに極めて密接に対応する(図1)。生化学的变化が、NFTの出現からわかるように、明らかな神経原線維変性に先立つ(図2; Mukaetova-Ladinska et al., 2000 Am. J. Pathol. Vol. 157, No. 2, 623-636)。

10

20

【0024】

しかし、MRIおよびSPECTスキャンは、ADに特徴的な灌流欠損の特異的パターンを検出するのに有用であるが、様々な神経病理学的病期の間での差別化、またはADと他の型の痴呆との差別化は困難である。

【0025】

例えば、SPECTは、ADに特徴的な両側側頭頭頂性灌流欠損の特異的なパターンの検出に有用で(参考文献9~11)、極めて早期段階の疾患でさえ有用であり得る。しかし、SPECTの変化は、神経病理学的病期をよく鑑別しない(参考文献12)。更に、ADとレヴィー小体痴呆との鑑別は困難である。ともに両側の側頭頭頂灌流欠損を有するが、後者においてのみ、後頭灌流欠損が存在する傾向にある。同じ欠損のパターンは、グルコース代謝のPET測定を用いて示すことができるが(参考文献13~15)、レヴィー小体痴呆を区別する問題は、この方法において根強く残る。

30

【0026】

したがって、参考文献12のデータから推論されるように、SPECT検出の成功の確率は、Braak病期1および2の症例では50%であり、病期3および4では60%である。症例の95%がSPECT陽性になるのは、病期5および6においてのみである。翻って、SPECT陽性として検出される症例は、病期1および2(20%)、3および4(20%)または5および6(60%)であり得る。したがって、SPECTでは、早期の診断および治療介入のための病期4より前の標的集団の40~50%を検出することができないであろう。更なる研究において(データを示さず)、SPECT診断と臨床診断との総体的な一致はほぼ50%であった。

40

【0027】

したがって、特異的にアルツハイマー型の神経原線維変性の予防を目的とする処置の開発において、疾患進行の確定した再現性ある定義に従って、処置のために患者を選択するのと並行して、処置に対する患者の応答をモニターする非侵襲的手段を開発することが強く要請されている。

【0028】

50

発明の開示

発明の簡単な要旨

本発明者は、免疫化学的性質（参考文献26、27、30）を使用して、細胞外のもつれから細胞内のもつれを区別してきた。これらのカテゴリーにおけるもつれを有する症例の頻度（すなわち、確率）およびその量（すなわちカウント/mm²）の両方を、前向き症例集積において決定し、Braak and Braakのシステムに従って、病理進行における病期を示すとして知られている脳の領域にグループ分けした。

【0029】

以下に更に詳細に記載するように、これらの抗体研究は、確定された脳の領域において、細胞外と細胞内の特異性を用いることにより、PHF-タウの沈着がADの神経原線維変性の経験的病気分類の根拠を提供することを初めて明らかにした。

10

【0030】

したがって、一つの態様では、本発明は、その疾患に罹患していると考えられる対象におけるタウオパシー（tauopathy）を伴う神経原線維変性（例えばAD）の病期の決定法を提供する。その方法は、

20

(i) 対象に、凝集PHFタウを標識可能なリガンドを導入するステップ、
 (ii) 対象の脳の内側頭葉中の細胞外凝集PHFタウに結合したリガンドの存在および/または量を測定するステップ、
 (iii) (ii)で行った測定の結果と、対象における神経原線維変性の程度を関連させるステップ
 を含む。

【0031】

緒言において記載したように、神経原線維変性の進行は、Braakにより提唱された神経病理学的病期分類において最も信頼できるもので、それが今度はAD進行の神経病理学的定義の最良の利用可能な定義となっている。したがって、本発明の方法を用いて、実際のBraak病期の結果を提供することができる。好ましい実施態様においては、これらの方法を使用して、早期Braak病期の患者（例えばBraak病期2）を、臨床症状が容易に認められる前にさえ、診断することが可能で、このような診断を用いて、時宜を得た治療と助言をすることができる。

30

【0032】

興味深いことに、NFTの免疫学的検出に基づいてはいるが、細胞外および細胞内のもつれを差別化していない、Gertz et al. (1996) loc citに記載の結果は、痴呆対象（一般にBraak病期4～6）と非痴呆対象（一般にBraak病期1～3）との間で、内側頭葉構造において検出される数の差がほとんどないことを示している（当該文献中、134ページの図1および表2を参照；重要な構造は、Pre alpha ent., CA1, Pri Ento.と標識されている）。したがって、本発明により示された相関性は、特に驚くべきものである。

【0033】

本発明は、更に、タウ凝集物を標識するのに使用するための新規リガンドを提供し、更にそのようなリガンドを見出すための新規スクリーニングを提供する。

40

【0034】

先に検討した本発明の態様のいくつかを、ここで更に詳細に論じる。

【0035】

対象の選択

本発明の方法に適した対象は、従来からの因子に基づき選択してよい。したがって、患者の初期選択は、経験豊富な臨床家による厳密な評価；補助的臨床検査および他の研究による非AD診断の可能な限りの除外；神経病理学的に実証されているバッテリーを用いた認知機能のレベルの客観的評価のいずれか1種またはそれ以上を含む。

【0036】

リガンド

リガンドは、上記で検討した構造の、凝集PHFタウを標識することができる。そのよう

50

なタウに特異的にまたは優先的に結合してもよい（脳の関連領域内に存在する結合部位の競合に関しては優先的）。適したリガンド（新規リガンドを含む）およびそれを同定する方法を、以下に検討する。

【0037】

より具体的には、Braak病期分類を、本明細書に記載の根拠に基づいて評価することができるの開示は、診断標識に使用するためのリガンドの選択および/または開発において重要な意味をもつ。免疫学的方法は、抗体が血液-脳関門を定量的な様式で容易に通過しないという欠点を有し、更に、この目的のために体内に抗体を注射することによって、有害反応が誘発されるかもしれないため、この方法は臨床的には適していないかもしれない。その結果、生存対象における免疫反応性の差別化パターンに基づくタウ凝集の様々な病期同士を区別することは困難である。

10

【0038】

本発明者らは、したがって、神経原線維のもつれに結合する化合物の不可欠な化学的性質を検討してきた。彼らは、本明細書において、特に、神経原線維のもつれのリガンドとしての化合物の開発および使用において意味を有する結合に求められる最小の化学構造を提供し、そのようなプロセス、使用および化合物が、本発明の更なる態様を形成する。

【0039】

新規リガンドを含む、好ましいリガンドが、以下に更に詳細に開示されているが、特に、スルホン化ベンゾチアゾール様化合物（例えば、図4a参照）およびジアミノフェノチアジン（例えば、図8参照）、ならびにこれらのいずれかと適切な最小化学構造を共有する他の模倣化合物を含んでもよい。本明細書に開示されているリガンドの組み合わせ（好ましくは、例えば標識などについて識別可能なリガンド）および/またはブロッキング物質（以下を参照）とリガンドの組み合わせを含む、またはそのような組み合わせからなる組成物は、本発明の様々な態様を形成する。

20

【0040】

細胞外タウへの結合

上記(i i)の測定は、細胞外凝集タウに基づき行われる。一般的な意味では、本発明の目的のために、これを細胞外のもつれから測定してもよい（例えば参考文献26、27ならびに実施例、方法および材料、表を参照）。

【0041】

組織学的研究から、凝集の経過中に、タウたんぱく質が、チアジンレッドおよびチオフラビン-Sなどの化合物の結合部位を獲得することが以前に明らかにされている（参考文献26、27）。結合部位が、もつれそれ自体の中に存在し、無関係なたんぱく質中には存在しないことを示し得る（参考文献34）。したがって、組織学的に判定されるように、細胞内および細胞外両方のもつれが、このようなりガンドで、ある程度標識される。

30

【0042】

一般的には、細胞外結合部位の確率または量（総結合部位または細胞内部位とは反対に）を、大きすぎて細胞内に容易に入ることができないリガンド、または細胞内で、細胞外作用が優先される所定の濃度（比較的低い）で作用し得るリガンドのいずれかを用いることにより測定してもよい。

40

【0043】

SPECTにより検出されやすいもののような、大きなキレート化リガンドが、適切な細胞外標的に、少なくとも到達し、結合すると予測することができる。PET用に直接標識した化合物は、潜在的に、細胞内または細胞外標的の両方を検出することができ、低濃度では後者が優先される。したがって、本発明者の研究は、適切なもつれ結合リガンドとともに用いられれば、これらの検出方法は両方ともBraak病期分類において可能性を有することを示す。それにもかかわらず、本開示に鑑み、NFT数によりBraak病期を都合よく評価するためには、血液脳関門を通過し、凝集タウの特定の細胞外または細胞内沈着を標識できるだけでなく、更なる化合物にコンジュゲートしたときに、好ましくはこの性質を保持することもできるリガンドを用いることが重要であろうことは理解されるであろう

50

。

【0044】

しかし、疑義を避けるため、適切な手段によりリガンドを可視化するか検出してもよく、当業者ならば、当分野で公知にされている任意の適切な検出手段を、これらの例に置き換えることが可能であることを理解するであろう。

【0045】

優先的タウ結合の増強

本発明の一実施態様において、本発明の方法のステップ(i)および/または(ii)は、第一リガンドに優先して、脳の関連領域内に存在する競合(すなわち、非凝集タウ)結合部位を標識する第二リガンドを対象に導入する更なるステップとともに(好ましくはこのステップの後に)、実施される。

【0046】

したがって、本発明の方法および本明細書中の実施態様は、

(iの2)凝集PHFタウを標識可能なリガンドに優先して、対象の脳内で非凝集タウ結合部位を標識するブロッキングリガンドを対象に導入するステップを含んでもよい。

【0047】

競合結合部位は、例えば、対象に存在するような、アミロイド斑により提供されるものであってよい。対象にそのような第二リガンドを導入することにより、凝集タウへの結合に供される第一リガンドの相対的または効果的濃度が高められる。適切な第二リガンド(または、本明細書に記載されているようなブロッキング化合物)を以下に記載するが、これらは、具体的には、図5に示される化合物1Bおよび2のようなベンゾチアゾールを含んでもよい。他の適切なブロッキングリガンドは、上記で検討したShoghi-Jadid et al., *A m. J. Geriatr. Psychiatr.* 2002, 10: 24-35のFDDNPであってもよい。

【0048】

脳の領域

脳の、内側頭葉、すなわちE2/トランス(内側嗅領皮質層2/遷移内側嗅領皮質(transitional entorhinal cortex))およびE4/HC(内側嗅領皮質層4および海馬)領域、ならびに新皮質構造(F/T/P領域-前頭、側頭、頭頂)の有意性を、図25、27および29に示す。

【0049】

一実施態様においては、本発明の方法は、内側頭葉における細胞外NFTに基づいたデータの解析のみを含む。

【0050】

更なる実施態様においては、この領域および新皮質構造の両方のデータを評価する。後者の場合は、細胞内PHF沈着を評価するのが好ましいかもしれない。

【0051】

したがって、本発明の方法および本明細書中の他の実施態様は、更なるステップ:

(iib)対象の脳の皮質構造内の細胞内凝集PHFタウに結合したリガンドの存在および/または量を更に測定するステップを含んでもよい。

【0052】

これには、

(iii)(ii)および場合により(iib)において測定した結果を、対象における神経原線維変性の程度、したがって対象のAD状態に相関させるステップが続いてもよい。

【0053】

細胞内標識に使用されるリガンドは、原則的には、細胞外標識に用いられるものと同じであってよいが、好ましくは、異なるもので、および/または差別的に標識されるものがよい(どのようなイメージングプロセスが使用されても区別することができるように)。

【 0 0 5 4 】

更なるステップは、Braak病期 2 ~ 6 の対象における神経原線維変性の評価または確認するうえで、特に好ましい。

【 0 0 5 5 】

神経原線維変性の測定

この測定は、所定の区域における結合の存在でもよい。そして、この測定は、何ら病理のない症例（すなわち、Braak病期 1 と推定される症例）の正常値の範囲、または連続する Braak病期について測定されている基準値の範囲を関連させて、所定の測定に対応する神経病理学的病期を決定することができる。相関は、例えば、密度（density）について、本明細書の実施例 1 における図および表 1 に対応するデータに基づき、参照用の表またはグラフを手段とすることで行ってもよい。あるいは、所与の決定を、参考文献と関連させて、ある症例が病期 1 よりも進行した病気である確率（例えば、確率について本明細書の図に対応するデータに基づく）、それによりアルツルハイマー病の診断に正確に寄与する確率を与えるのに、所定の閾値を関連させてもよい。

10

【 0 0 5 6 】

方法の使用

その測定は、診断方法または予後の方法の一貫であってもよい。処置のための患者の選択に用いてもよいし、または対象に与えられた処置または治療薬、例えば、タウ - タウ会合の阻害剤などの効果の評価のために用いてもよい。

【 0 0 5 7 】

したがって、本発明の実施態様は以下を含む：

神経原線維変性に罹患していると考えられる対象における A D の診断または予後方法において使用するための細胞外凝集 P H F タウを標識可能なリガンドであって、方法が、

20

(i) 対象に、凝集 P H F タウを標識可能なリガンドを導入するステップ、

(i i) 対象の脳の内側頭葉中の細胞外凝集 P H F タウに結合したリガンドの存在および/または量を測定するステップ、

(i i i) (i i) で行った測定の結果を、対象における神経原線維変性の程度、したがって対象の A D 状態を相関させるステップを含む。

30

【 0 0 5 8 】

神経原線維変性に罹患していると考えられる対象における A D に伴う神経原線維変性の病期を決定する方法において使用するのに適した診断または予後試薬を調製する方法における、細胞外凝集 P H F タウを標識可能なリガンドの使用であって、方法が、

(i) 対象に、凝集 P H F タウを標識可能なリガンドを導入するステップ、

(i i) 対象の脳の内側頭葉中の細胞外凝集 P H F タウに結合したリガンドの存在および/または量を測定するステップ、

(i i i) (i i) で行った測定の結果を、対象における神経原線維変性の程度を相関させるステップを含む使用。

40

【 0 0 5 9 】

更なる態様において、本発明は、上記使用および方法を実施するためのキットを提供し、そのキットは、本明細書に記載のあるように、凝集分子に結合可能な 1 つまたはそれ以上の、リガンドまたは誘導体を含む。キットは、例えば、テクネチウムキレート化基などの化合物の検出性を増大するための手段、および場合により、これをリガンドに共役させる手段、および場合によりテクネチウムを含んでもよい。このキットが、本明細書に開示されている化合物の誘導体を含む場合は、本記載の他の箇所を検討するように、例えば蛍光顕微鏡的に検出され得る。キットは、リガンドを検出または可視化する手段を含んでもよく、例えばリガンドが、組み込まれたビオチン基を有する場合には、抗ビオチン抗体を含

50

むのが好ましい。同様に、キットは、化合物固有の蛍光を検出する手段、光活性化可能な基、更に標識された抗体を検出する手段などを含んでもよい。

【0060】

本発明の方法および他の実施態様における使用のための種々の好ましいリガンドを、更に詳細に検討する。それぞれの場合において、当業者は、直接リガンドを投与する代わりに、同じ対象中に存在するか、または投与される活性化物質による活性形態への変換のため、前駆体の形態で投与し得ることを理解するであろう。

【0061】

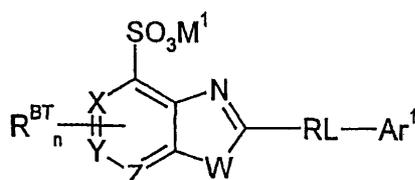
スルホン化ベンゾチアゾール様リガンド

本発明の本態様における使用に適切なりガンドは、式：

10

【0062】

【化43】



【0063】

(式中：

20

Wは、S、O、またはNHであり；

X、YおよびZの正確に一つは、CHまたはNであり；

その他のX、YおよびZは、CHであり；

M¹は、アルカリ金属カチオンであり；

RLは、堅いリンカー基であり；

Ar¹は、C₅₋₂₀アリール基であり；

nは、0～3の整数であり；

各R^{BT}は、コア置換基である)

で表される化合物である。

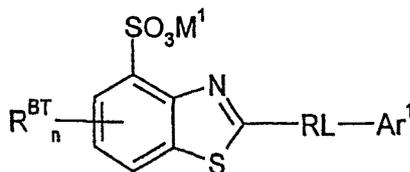
【0064】

30

一つの実施態様において、X、YおよびZのそれぞれがCHであり、化合物が、下記式：

【0065】

【化44】



【0066】

40

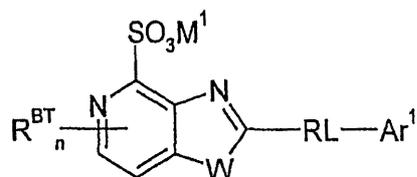
を有する。

【0067】

一つの実施態様において、XがNであり；YおよびZが、それぞれCHであり；化合物が下記式：

【0068】

【化45】



【 0 0 6 9 】

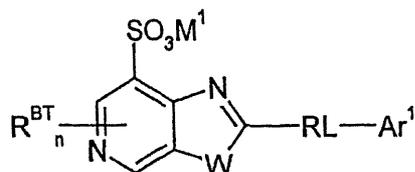
を有する。

【 0 0 7 0 】

一つの実施態様において、YがNであり；XおよびZが、それぞれCHであり；化合物が 10
下記式：

【 0 0 7 1 】

【 化 4 6 】



【 0 0 7 2 】

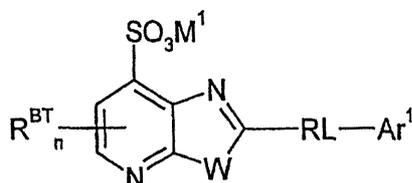
を有する。

【 0 0 7 3 】

一つの実施態様において、ZがNであり；XおよびYが、それぞれCHであり；化合物が
下記式：

【 0 0 7 4 】

【 化 4 7 】



20

30

【 0 0 7 5 】

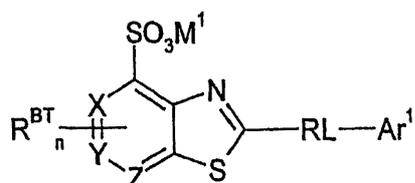
を有する。

【 0 0 7 6 】

一つの実施態様において、WがSであり、化合物が下記式：

【 0 0 7 7 】

【 化 4 8 】



40

【 0 0 7 8 】

を有する。

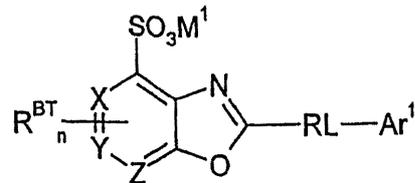
【 0 0 7 9 】

一つの実施態様において、WがOであり、化合物が下記式：

【 0 0 8 0 】

【 化 4 9 】

50



【0081】

を有する。

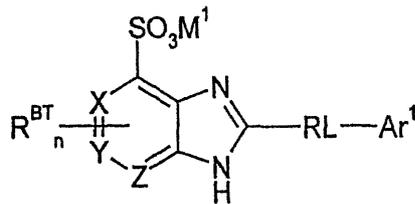
【0082】

一つの実施態様において、WがNHであり、化合物が下記式：

10

【0083】

【化50】



【0084】

を有する。

20

【0085】

一つの実施態様において、X、YおよびZのそれぞれが、CHであり、WがSである。

一つの実施態様において、X、YおよびZのそれぞれが、CHであり、WがOである。

一つの実施態様において、X、YおよびZのそれぞれが、CHであり、WがNHである。

【0086】

一つの実施態様において、XがNであり；YおよびZがそれぞれCHであり；WがSである。

一つの実施態様において、XがNであり；YおよびZがそれぞれCHであり；WがOである。

30

一つの実施態様において、XがNであり；YおよびZがそれぞれCHであり；WがNHである。

【0087】

一つの実施態様において、YがNであり；XおよびZがそれぞれCHであり；WがSである。

一つの実施態様において、YがNであり；XおよびZがそれぞれCHであり；WがOである。

一つの実施態様において、YがNであり；XおよびZがそれぞれCHであり；WがNHである。

【0088】

40

一つの実施態様において、ZがNであり；XおよびYがそれぞれCHであり；WがSである。

一つの実施態様において、ZがNであり；XおよびYがそれぞれCHであり；WがOである。

一つの実施態様において、ZがNであり；XおよびYがそれぞれCHであり；WがNHである。

【0089】

W、X、YおよびZを含む、二環式基を「コア基」と表示してもよい。X、YおよびZのそれぞれが、CHであり、WがSである場合、化合物をベンゾチアゾール化合物を言及してもよく、コア基として、ベンゾチアゾール基を有すると考えてもよい。そして、「コア

50

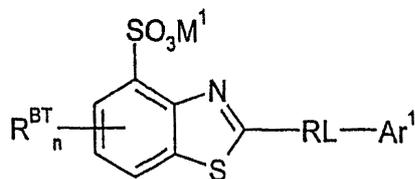
置換基」を「ベンゾチアゾール置換基」と言及してもよい。

【0090】

本発明のこの態様において使用するのに好ましいリガンドは、式(I)：

【0091】

【化51】



10

【0092】

(式中：

M¹は、アルカリ金属カチオンであり；

RLは、堅いリンカー基であり；

Ar¹は、C₅₋₂₀アリール基であり；

nは、0～3の整数であり；

各R^{BT}は、独立して、ベンゾチアゾール置換基である)

のリガンド化合物である。

【0093】

堅いリンカー基RLおよびアリール基Ar¹の両者が事実上平面状である。更に、堅いリンカー基RLおよびアリール基Ar¹は、コア基(例えば、ベンゾチアゾール基)とともに、事実上平面状である化合物を形成する。「事実上平面状」は、部分/化合物が、標準的化学モデルおよび仮定を用いて定量化するとき、例えばコンポーネント間のねじれが5、4、3、2または1°未満という、高度な平面性を有することを意味する。そのねじれが、図16の化合物のものねじれ以下であることが好ましい。

20

【0094】

一つの実施態様において、化合物は、約14.7ÅUから約15.3ÅUの化合物長を有する。

【0095】

本発明者らは、上記の特徴を有する化合物が、本発明の「Braak病期分類」に特に適し得ることを確認した。このような化合物は、当分野で公知であってもよく、以下に更に詳細に述べるように、新規であってもよい。

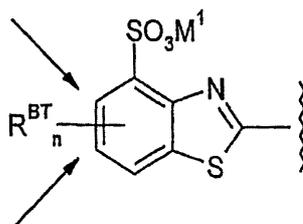
30

【0096】

「化合物長」は、2個の最も離れた芳香環原子(「基準原子」と表示する)の間の距離である。例えば、ベンゾチアゾール化合物については、分子のベンゾチアゾール「末端」において、基準原子は、2個の原子のうちの1個である。

【0097】

【化52】



40

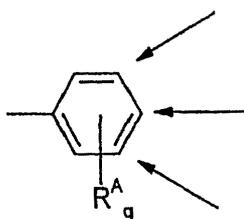
【0098】

その分子のアリール「末端」では、Ar¹がフェニルコア(下記参照)を有するアリール基の場合、基準原子は、3個の原子のうちの1個である。

50

【 0 0 9 9 】

【 化 5 3 】



【 0 1 0 0 】

10

本明細書で用いる距離は、Chemical structure search and retrieval softwareを用いて、Chemical Database Service, Daresbury, and the Cambridge Structure Databaseを用いて算出してもよい。このデータおよびソフトウェアは、公開のドメインで入手可能である。

【 0 1 0 1 】

一つの実施態様において、MはLi、Na、KまたはCsである。

一つの実施形態において、MはNaまたはKである。

【 0 1 0 2 】

一つの実施形態において、nは0である。一つの実施形態において、nは1である。

一つの実施形態において、nは2である。一つの実施形態において、nは3である。

20

【 0 1 0 3 】

一つの実施形態において、各R^{BT}は、C₁₋₄アルキル、ヒドロキシ、C₁₋₄アルコキシ、ニトロ、シアノ、ハロ、およびアミノより独立して選択される。

【 0 1 0 4 】

一つの実施態様において、各R^{BT}は、-Me、-Et、-nPr、-iPr、-OH、-OMe、-OEt、-O(nPr)、-O(iPr)、-NO₂、-CN、-F、-Cl、-Br、-I、-NH₂、-NHMe、-NH₂Et、-NH(iPr)、-NH(nPr)、-NMe₂、-NEt₂、N(iPr)₂、および-N(nPr)₂より独立して選択される。

【 0 1 0 5 】

30

一つの実施態様において、各R^{BT}は、C₁₋₄アルキルより独立して選択される。一つの実

施態様において、各R^{BT}は、-Me、-Et、-nPrおよび-iPrより選択される。

一つの実施態様において、各R^{BT}は、-Meである。

【 0 1 0 6 】

一つの実施態様において、nは1であり、R^{BT}は、-Me、-Et、-nPr、または-iPrである。

一つの実施態様において、nは1であり、R^{BT}は、-Meである。

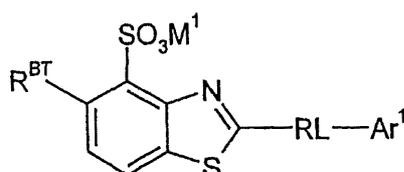
【 0 1 0 7 】

一つの実施態様において、化合物は、下記式：

【 0 1 0 8 】

40

【 化 5 4 】



【 0 1 0 9 】

を有する。

【 0 1 1 0 】

50

一つの実施態様において、化合物は下記式：

【0111】

【化55】



【0112】

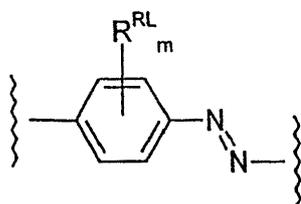
を有する。

【0113】

一つの実施態様において、RLは、式：

【0114】

【化56】



10

20

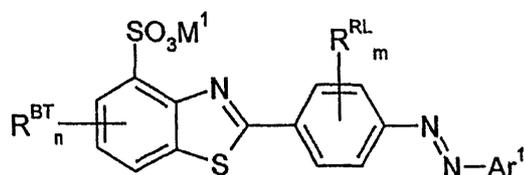
【0115】

(式中、

mは、0～4の整数であり、各R^{RL}は、独立して堅いリンカーアリーール置換基である)で示される基であり、そして化合物は、下記式：

【0116】

【化57】



30

【0117】

を有する。

【0118】

一つの実施態様において、mは0である。一つの実施態様において、mは1である。

一つの実施態様において、mは2である。一つの実施態様において、mは3である。

一つの実施態様において、mは4である。

【0119】

一つの実施態様において、各R^{RL}は、C₁₋₄アルキル、ヒドロキシ、C₁₋₄アルコキシ、ニトロ、シアノ、ハロ、およびアミノより独立して選択される。

40

【0120】

一つの実施態様において、各R^{RL}は、-Me、-Et、-nPr、-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、および-N(nPr)₂より独立して選択される。

【0121】

一つの実施態様において、各R^{RL}は、C₁₋₄アルキルより独立して選択される。

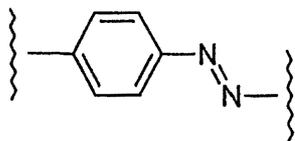
50

【0122】

一つの実施態様において、 R^L は式：

【0123】

【化58】



【0124】

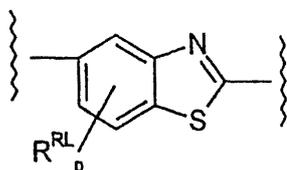
で示される基である。

【0125】

一つの実施態様において、 R^L は式：

【0126】

【化59】



10

20

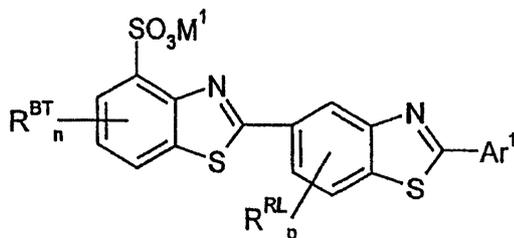
【0127】

(式中、

p は、0～3までの整数であり、各 R^{RL} は、独立して堅いリンカーアリアル置換基である)で示される基であり、そして化合物は、式：

【0128】

【化60】



30

【0129】

を有する。

【0130】

一つの実施態様において、 p は0である。一つの実施態様において、 p は1である。

一つの実施態様において、 p は2である。一つの実施態様において、 p は3である。

40

【0131】

一つの実施態様において、各 R^{RL} は、 C_{1-4} アルキル、ヒドロキシ、 C_{1-4} アルコキシ、ニトロ、シアノ、ハロ、およびアミノより独立して選択される。

【0132】

一つの実施態様において、各 R^{RL} は、 $-Me$ 、 $-Et$ 、 $-nPr$ 、 $-iPr$ 、 $-OH$ 、 $-OMe$ 、 $-OEt$ 、 $-O(nPr)$ 、 $-O(iPr)$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHMe$ 、 $-NHEt$ 、 $-NH(iPr)$ 、 $-NH(nPr)$ 、 $-NMe_2$ 、 $-NEt_2$ 、 $N(iPr)_2$ 、および $-N(nPr)_2$ より独立して選択される。

【0133】

50

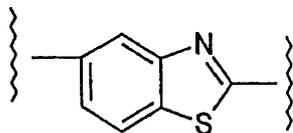
一つの実施態様において、各 R^L は、 C_{1-4} アルキルより独立して選択される。

【0134】

一つの実施態様において、 R^L は、式：

【0135】

【化61】



10

【0136】

で示される基である。

【0137】

アリール基 Ar^1 は、 C_{5-20} アリール基である。本明細書で用いる「 C_{5-20} アリール」は、 C_{5-20} 芳香族化合物の芳香環原子から水素原子を除去することにより得られる一価の部分に関するもので、そのような化合物は、1個の環、または2個もしくはそれ以上の環（例えば縮合環）を有し、5～20個の環原子を有し、その環の少なくとも1つが芳香環である。好ましくは、各環は5～7個の環原子を有する。「 C_{5-20} 」は、炭素原子であろうとヘテロ原子であろうと、環原子を指す。

【0138】

環ヘテロ原子を有しない C_{5-20} アリール基（すなわち、 C_{5-20} カルボアリール基）の例として、ベンゼン（すなわち、フェニル）（ C_6 ）、ナフタレン（ C_{10} ）、アントラセン（ C_{14} ）、フェナントレン（ C_{14} ）、ナフタセン（ C_{18} ）、およびピレン（ C_{16} ）に由来するものがあげられるが、これらに限定されない。

20

【0139】

C_{5-20} ヘテロアリール基の例として、フラン（オキソール）、チオフェン（チオール）、ピロール（アゾール）、イミダゾール（1,3-ジアゾール）、ピラゾール（1,2-ジアゾール）、トリアゾール、オキサゾール、イソオキサゾール、チアゾール、イソチアゾール、オキサジアゾールおよびオキサトリアゾールに由来する C_5 ヘテロアリール基；並びにイソオキサジン、ピリジン（アジン）、ピリダジン（1,2-ジアジン）、ピリミジン（1,3-ジアジン；例えば、シトシン、チミン、ウラシル）、ピラジン（1,4-ジアジン）、トリアジン、テトラゾール、およびオキサジアゾール（フラザン）に由来する C_6 ヘテロアリール基などがあげられるが、これらに限定されない。

30

【0140】

縮合環を含む C_{5-20} 複素環基（ C_{5-20} ヘテロアリール基を含む）は、ベンゾフラン、イソベンゾフラン、インドール、イソインドール、プリン（例えば、アデニン、グアニン）、ベンゾイミダゾールに由来する C_9 複素環基；キノリン、イソキノリン、ベンゾジアジン、ピリドピリジン、キノキサリンに由来する C_{10} 複素環基；カルバゾールに由来する C_{13} 複素環基；並びにアクリジン、キサントエン、フェノキサチン、フェナジン、フェノキサジン、フェノチアジンに由来する C_{14} 複素環基などがあげられるが、これらに限定されない。

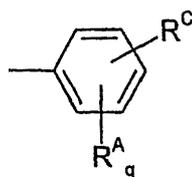
40

【0141】

一つの実施態様において、 Ar^1 は、フェニルコアを有するアリール基であり、式：

【0142】

【化62】



【0143】

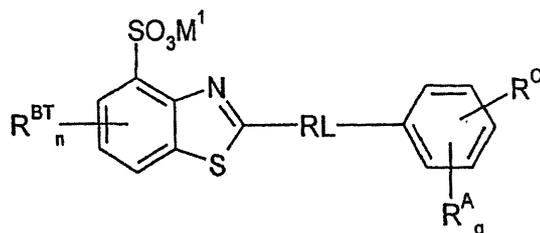
(式中、

q は、0 ~ 5 の整数であり；各 R^A は、独立してアリール置換基であり； R^C は、存在するとき、反応性共役置換基であり、または R^C が検出可能な標識であるか、もしくは検出可能な標識を含む) を有し、そして化合物が、式：

10

【0144】

【化63】



20

【0145】

を有する。

【0146】

一つの実施態様において、 R^C は、存在するとき、反応性共役置換基であり、そして、別の分子または化学種に共役させるのに適する基である。

【0147】

一つの実施態様において、 R^C は、存在するとき、反応性共役置換基であり、そして、別の分子との化学反応によりその分子に共役させてその間に共有結合を形成するのに適する反応性官能基であるか、それを含有する。適切な反応性官能性基の例は、活性エステル(例えば、スクシンイミジルエステル)があげられる。

30

【0148】

一つの実施態様においては、 R^C は、存在するとき、反応性共役置換基であり、強い非共有性相互作用により別の分子に共役させるのに適する部分であるか、それを含有する。このような基の例として、ビオチンがあげられる(アビジンまたはストレプトアビジンを有する分子との結合のため)。

【0149】

一つの実施態様においては、 R^C は、存在するとき、反応性共役置換基であり、錯体またはキレート形成による別の分子への共役に適する部分、例えばキレート化基であるか、またはそれを含有する。このような基の例として、テクネチウムイオンなどの金属イオンなどと錯体形成するまたはキレート化する基があげられる。そのような基の例として、ジエチレントリアミンペンタ酢酸があげられる。

40

【0150】

一つの実施態様において、 R^C は、存在するとき、検出可能な標識であるか、それを含有する。検出可能な標識の例は、例えば、染料、蛍光マーカー、抗原性基、安定および不安定放射性同位元素、およびポジトロン放出炭素原子などがあげられる。一つの実施態様において、 R^C は、存在するとき、安定な放射性同位元素を含む検出可能な標識であるか、それを含有する。一つの実施態様において、 R^C は、存在するとき、不安定な放射性同位元素を含む検出可能な標識であるか、それを含有する。一つの実施態様においては、 R^C は、存在するとき、 ^{18}F であるか、それを含有する。一つの実施態様においては、 R^C は、ポジトロン放射炭素原子を含む検出可能な標識であるか、それを含有する。

50

【0151】

更に、 R^C 置換基を以下に検討する。

【0152】

一つの実施態様において、 R^C が存在し、上記定義のとおりである。

【0153】

一つの実施態様において、 q は0である。一つの実施態様において、 q は1である。

一つの実施態様において、 q は2である。一つの実施態様において、 q は3である。

一つの実施態様において、 q は4である。一つの実施態様において、 q は5である。

【0154】

一つの実施態様においては、各 R^A は、上記定義のとおり、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^1$ 、 $-NR^1R^2$ 、 $-SO_3M^2$ 、 C_{1-4} アルキル（ここで、 R^1 および R^2 はそれぞれ C_{1-4} アルキルであり、 M^2 は、アルカリ金属カチオンである）より独立して選択される。

【0155】

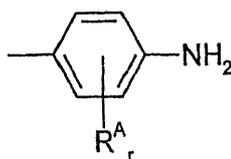
一つの実施態様において、少なくとも一つの R^A は、 $-OH$ または $-NH_2$ である。

【0156】

一つの実施態様においては、 Ar^1 は、アミノ基置換フェニルコアを有するアリール基であり、式：

【0157】

【化64】



【0158】

（式中、

r は、0～4の整数であり、各 R^A は独立して、上記定義のとおり、アリール置換基である）を有する。

【0159】

一つの実施態様において、 r は0である。一つの実施態様において、 r は1である。

一つの実施態様において、 r は2である。一つの実施態様において、 r は3である。

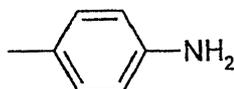
一つの実施態様において、 r は4である。

【0160】

一つの実施態様において、 r は1であり、 Ar^1 は、式：

【0161】

【化65】



【0162】

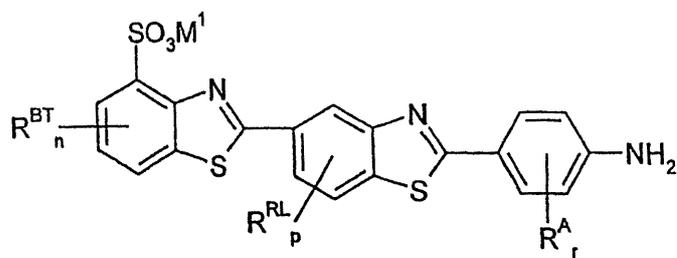
で示される基である。

【0163】

一つの実施態様においては、化合物は、式：

【0164】

【化66】



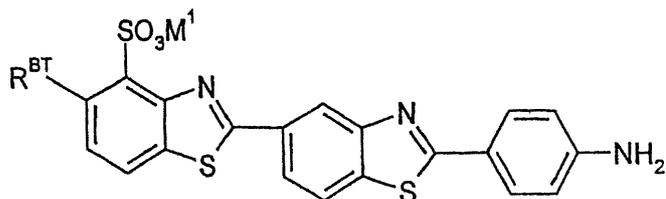
【0165】

を有する。

【0166】

一つの実施態様においては、化合物は、式：

【化67】



【0167】

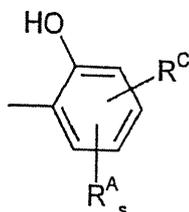
を有する。

【0168】

一つの実施態様においては、 Ar^1 は、ヒドロキシ置換フェニルコアを有するアリール基であり、式：

【0169】

【化68】



【0170】

(式中、

s は、 $0 \sim 4$ の整数であり、各 R^A は、独立して、上記定義のとおりのアリール置換基であり、 R^C は、存在するとき、反応性共役置換基であり、 R^C は、上記定義のとおりを検出可能な標識であるか、それを含有する)

を有する。

【0171】

一つの実施態様において、 s は0である。一つの実施態様において、 s は1である。一つの実施態様において、 s は2である。一つの実施態様において、 s は3である。一つの実施態様において、 s は4である。

【0172】

一つの実施態様において、 Ar^1 は、式：

【0173】

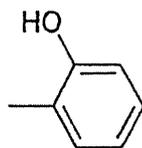
【化69】

10

20

30

40



【0174】

で示される基である。

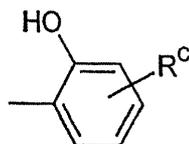
【0175】

一つの実施態様において、 Ar^1 は、式：

【0176】

10

【化70】



【0177】

で示される基である。

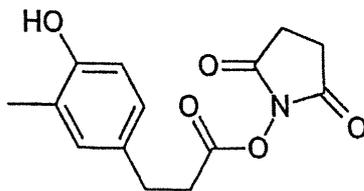
【0178】

20

一つの実施態様においては、 Ar^1 は、式：

【0179】

【化71】



【0180】

30

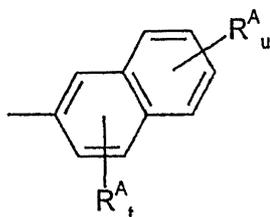
で示される基である。

【0181】

一つの実施態様においては、 Ar^1 は、ナフチルコアを有するアリール基であり、式：

【0182】

【化72】



40

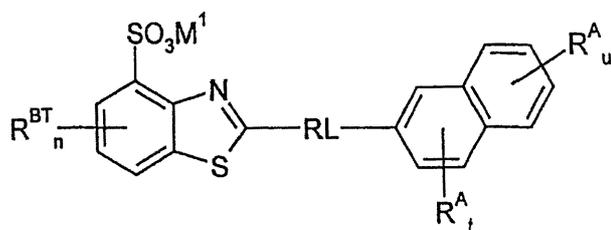
【0183】

(式中、

tは、0～3の整数であり、uは、0～4の整数であり、各 R^A は、独立して、上記定義のとおりのアリール置換基である)を有し、そして化合物は、式：

【0184】

【化73】



【0185】

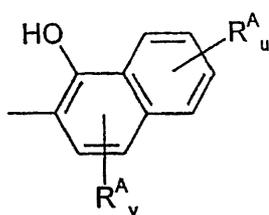
を有する。

【0186】

一つの実施態様において、 Ar^1 は、ヒドロキシ置換ナフチルコアを有するアリール基であり、式：

【0187】

【化74】



【0188】

(式中、

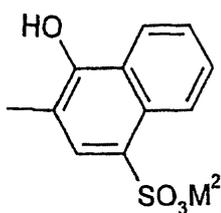
v は、0～2の整数であり、 u は、0～4の整数であり、各 R^A は、独立して、アリール置換基である)を有する。

【0189】

一つの実施態様においては、 Ar^1 は、式：

【0190】

【化75】



【0191】

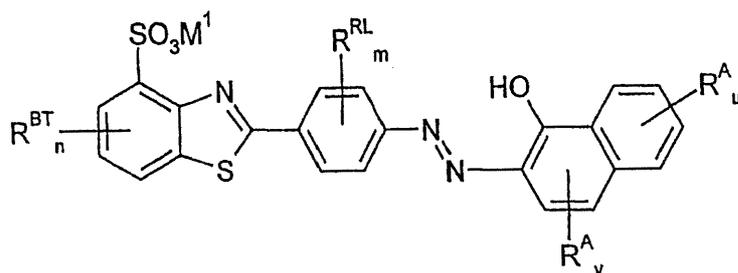
を有する。

【0192】

一つの実施態様において、化合物は、式：

【0193】

【化76】



50

【0194】

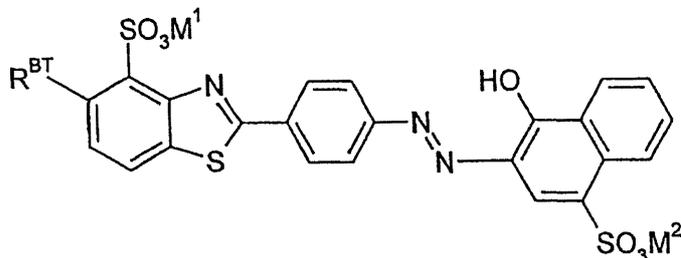
を有する。

【0195】

一つの実施態様において、化合物は、式：

【0196】

【化77】



10

【0197】

を有する。

【0198】

一つの実施態様において、リガンドは、以下に「好ましいスルホン化ベンゾチアゾール様リガンド」の項で記載するような化合物である。

【0199】

本発明の診断方法において使用するための、上記のタイプの、例えば式(I)の化合物は、慣用の手段によって製造してもよい(例えば、参考文献31参照)。

20

【0200】

適切な式、大きさ、平面性および活性を有する、本明細書記載の化合物(またはその誘導体)はすべて、以下、「スルホン化ベンゾチアゾール様化合物」または「SBリガンド」と総称してもよいが、ただし限定的ではない。このような化合物は、一般には、例えば、対螺旋フィラメントまたは神経原線維もつれに見られるものなどの、凝集タウ分子のリガンドである。

【0201】

本明細書に記載のリガンドは、本明細書開示の化合物のメチル基の一つにポジトロン放出炭素を取り込み、ポジトロン放出断層撮影(PET)を当分野で知られているように使用して化合物を検出することにより、適切に検出することができる。あるいは、または更に、テクネチウムを含有するキレート、細胞外変化の選択的検出が可能になるように、化合物に取り込ませることもできる(例えば、本明細書記載の化合物のR^C基中のように)。好ましいキレート化基は、R^C=ジエチレントリアミンペンタ酢酸である。

30

【0202】

リガンドは、他の化学基、染料、蛍光マーカー、抗原性基、治療的部分または予後、診断、または治療的応用において助けとなり得る他の任意の物質と、共役させてもよいし、キレート化させてもよいし、さもなければ会合させてもよい。例えば、リガンドが、染料または蛍光基に結合している場合、共役物を凝集タウまたはタウ様分子の標識として用いることができる。したがって、それを、ADに特徴的な細胞内または細胞外のもつれの標識に用いることができる。

40

【0203】

フェノチアジン

本発明者らは、そのメンバーがPHFの構造を分断し、PHFコアのタンパク分解に対する安定性を完全に変える、別のクラスの化合物を以前に同定してきた(WO 96/30766)。

【0204】

WO 96/30766に記載のジアミノフェノチアジン化合物を、図8aの構造で示す。図8aの式(IV)は、明確化のために含まれる様々な(II)の共鳴形態を示す。化合物(II)~(IV)は、すべて酸化形態であり、一方、(I)は、還元形態である。このような

50

化合物（以下「ジアミノフェノチアジン」または「フェノチアジン」と言及してもよい）は、例えば塩化トロニウムおよびメチレンブルーを含む。例を図 8 b に示す。これらのすべてを、酸化形態で示すが、チオニンは例外で安定化した塩の形態である（チオニンは、中性の酸化形態で示す）。

【0205】

本明細書記載の方法において用いることができる化合物は、図 8 a に示された式：式中、 R_1 、 R_3 、 R_4 、 R_6 、 R_7 および R_9 のそれぞれが、独立して、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、カルボキシ、置換もしくは非置換アルキル、ハロアルキルまたはアルコキシであり；

R_5 は、水素、ヒドロキシ、カルボキシ、置換もしくは非置換アルキル、ハロアルキルまたはアルコキシであり；

R_{10} および R_{11} は、独立して、水素、ヒドロキシ、カルボキシ、置換もしくは非置換アルキル、ハロアルキルまたはアルコキシ；

を有するあらゆるもの、および薬学的に許容され得るその塩であってよい。

【0206】

一つの実施態様においては、

R_1 、 R_3 、 R_4 、 R_6 、 R_7 および R_9 は、独立して、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、カルボキシ、置換もしくは非置換 C_{1-6} アルキル、 C_{1-4} ハロアルキルまたは C_{1-6} アルコキシであり；

R_5 は、独立して、水素、ヒドロキシ、カルボキシ、置換もしくは非置換 C_{1-6} アルキル、 C_{1-4} ハロアルキル、または C_{1-6} アルコキシであり；

R_{10} および R_{11} は、水素、ヒドロキシ、カルボキシ、置換もしくは非置換 C_{1-6} アルキル、 C_{1-4} ハロアルキル、または C_{1-6} アルコキシより独立して選択される。

【0207】

この点について使用する用語「アルキル」は、好ましくは1～8個、より好ましくは1～6個の炭素原子を有する直鎖または分岐鎖基を意味する。例えば、「アルキル」は、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、ペンチル、イソペンチル、*tert*-ペンチル、ヘキシル、イソヘキシルなどを意味し得る。本発明に使用する置換アルキル基に適切な置換基は、メルカプト、チオエーテル、ニトロ、アミノ、アリーロキシ、ハロゲン、ヒドロキシル、およびカルボニル基ならびにアリール、シクロアルキルおよび非アリールヘテロ環基などがあげられる。

【0208】

用語「アルコキシ」は、本明細書上記にアルキル基として定義するとおりの基を意味し、その場合に、そのアルキル基が、それと、結合する基質残基との間に介在する酸素原子をも有する、アルキル基である。

【0209】

用語「ハロアルキル」は、それに結合する1、2または3個のハロゲン原子を有する1～4個の炭素原子を有する直線または分岐アルキル鎖を示す。典型的なハロアルキル基として、クロロメチル、2-プロメチル、1-クロロイソプロピル、3-フルオロプロピル、2,3-ジブロムブチル、3-クロロイソブチル、ヨード-*t*-ブチル、トリフルオロメチルなどがあげられる。

【0210】

「ハロゲン」とは、フルオロ、クロロ、プロモまたはヨードを示す。

【0211】

これらのフェノチアジンのいくつかは、1個またはそれ以上の不斉置換炭素原子を有し、したがって、ラセミおよび光学的に活性な形態で存在する。本発明は、化合物のラセミ形態およびその任意の光学的活性形態を包含することを意図する。

【0212】

図 8 a または 8 b の塩基性化合物と、例えば、塩酸および臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン

酸などのハロゲン化水素酸などの無機酸、または例えば、酢酸、クエン酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸などの有機酸との間で、酸付加塩を形成させてもよい。

【0213】

特に好ましい実施態様において、本発明は、

R_1 、 R_3 、 R_4 、 R_6 、 R_7 および R_9 が、独立して、-H、-CH₃、-C₂H₅、または-C₃H₇であり；

R_{10} および R_{11} が、独立して、-H、-CH₃、-C₂H₅または-C₃H₇であり；

R_5 が、-H、-CH₃、-C₂H₅、または-C₃H₇

であるフェノチアジン

または薬学的に許容され得るその塩を用いる。

10

【0214】

本発明者らは、ここで、この種のフェノチアジン化合物が、その結合特性に基づき、上記のスルホン化ベンゾチアゾール様化合物が結合できる部位とは明らかに異なっているらしい、特異的部位でPHFに結合できることを本明細書中で教示している。この部位へのフェノチアジン化合物の結合は、タウ凝集の阻害をもたらすと考えられる。

【0215】

フェノチアジン化合物を、適宜標識を取り入れて、本発明の方法および上記の他の実施態様において用いてもよい。ポジトロン放出官能基で適切に標識された場合（PETにより検出可能、図11、11b、12および13を参照）、そのような化合物は、すべてのタウ凝集体に対してリガンドとして機能し、血液脳関門を通過し（参考文献36）、細胞に入ることができる。

20

【0216】

更なる実施態様においては、本明細書の開示に鑑み、タウ-タウ結合阻害剤による治療の効果、および特にその進捗度は、SBリガンドの使用によりモニターすることができる。

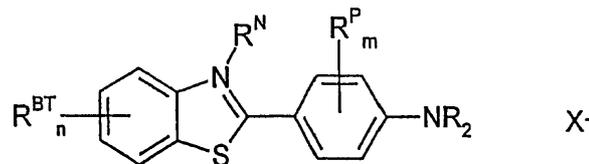
【0217】

ブロッキングリガンド

好ましくは、これらは、式：

【0218】

【化78】



30

【0219】

(式中、

n は、0~4の整数であり；

各 R^{BT} は、独立して、ブロッキングリガンドベンゾチアゾール置換基であり；

m は、0~4の整数であり、

各 R^P は、独立して、フェニレン置換基であり；

各 R は、独立して、-Hまたはアミノ置換基であり；

R^N および X^- はともに、不存在であり、会合(3級)窒素原子は中性であり；または

R^N はベンゾチアゾリノ置換基であり、会合(4級)窒素原子が陽電荷を有し、 X^- はカウンターイオンである)

で示されるベンゾチアゾールである。

40

【0220】

好ましいベンゾチアゾールは、チオフラビンTを含む。以下の実施例に示すように、そのような化合物(例えば、図5の1bまたは2)は、SB-リガンド(例えば、図5の1a)によりNFTから排除される。しかし、そのような化合物は、アミロイドに優先的に結

50

合する。

【0221】

一つの実施態様において、 n は0である。一つの実施態様において、 n は1である。
一つの実施態様において、 n は2である。一つの実施態様において、 n は3である。
一つの実施態様において、 n は4である。一つの実施態様において、 n は0、1または2
である。

【0222】

ブロッキングリガンドベンゾチアゾール置換基 R^{BT} の例として、 C_{1-4} アルキル基、 $-SO_3H$ および $-SO_3M^3$ 、ここで、 M^3 がカチオンである、があげられるが、これらに限定
されない。一つの実施態様において、 M^3 は、アルカリ金属カチオンである。一つの実施
態様において、 M^3 は、 Li 、 Na 、 K 、または Cs である。一つの実施態様において、
 M^3 は、 Na または K である。 C_{1-4} アルキル基の例として、 $-Me$ 、 $-Et$ 、 $-nPr$ 、
および iPr があげられるが、これらに限定されない。

10

【0223】

一つの実施態様において、各 R^{BT} は、独立して C_{1-4} アルキル基である。
一つの実施態様において、各 R^{BT} は、 $-Me$ 、 $-Et$ 、 $-nPr$ 、および $-iPr$ より選
択される。一つの実施態様において、各 R^{BT} は、 $-Me$ である。一つの実施態様において
は、 n は1であり、 R^{BT} は、 $-Me$ 、 $-Et$ 、 $-nPr$ 、または $-iPr$ である。一つ
の実施態様において、 n は1であり、 R^{BT} は、 $-Me$ である。

【0224】

一つの実施態様において、 R^{BT} 基の一つは、 $-SO_3H$ または $-SO_3M^3$ である。一つ
の実施態様においては、 R^{BT} 基の一つは、 $-SO_3H$ または $-SO_3M^3$ であり、別の R^{BT}
基の一つは、 C_{1-4} アルキル基である。一つの実施態様においては、 n は2であり、一つ
の R^{BT} は、 C_{1-4} アルキル基であり、 R^{BT} の一つは、 $-SO_3H$ または $-SO_3M^3$ である。一
つの実施態様において、 n は2であり、一つの R^{BT} が、 $-Me$ であり、一つの R^{BT} が、
 $-SO_3H$ または $-SO_3M^3$ である。

20

【0225】

一つの実施態様において、 R^N および X^- は、ともに存在せず、会合(3級)窒素原子が
中性である。

【0226】

一つの実施態様においては、 R^N は、ベンゾチアゾリノ置換基であり、会合(4級)窒素
原子は、陽電荷を有し、 X^- が、カウンターイオンである。ベンゾチアゾリノ置換基 R^N
の例として、 C_{1-4} アルキル基があげられるが、それらに限定されない。一つの実施態様
において、 R^N は、 $-Me$ 、 $-Et$ 、 $-nPr$ または $-iPr$ である。一つの実施態様
において、 R^N は $-Me$ である。カウンターイオンの例として、 Cl^- 、 Br^- 、および I^-
があげられるが、これらに限定されない。一つの実施態様において、 R^N は、 $-Me$ であ
り、 X^- は、 Cl^- である。

30

【0227】

一つの実施態様において、 m は0である。一つの実施態様において、 m は1である。
一つの実施態様において、 m は2である。一つの実施態様において、 m は3である。
一つの実施態様において、 m は4である。

40

【0228】

フェニレン置換基 R^P の例として、 C_{1-4} アルキル基があげられるが、これらに限定され
ない。

【0229】

一つの実施態様においては、各 R は $-H$ であり、アミノ基は $-NH_2$ である。一つの実施
態様においては、一つの R は $-H$ であり、一つの R はアミノ置換基である。一つの実施態
様においては、各 R はアミノ置換基である。アミノ置換基の例として、 C_{1-4} アルキル基
があげられるが、それらに限定されない。一つの実施態様において、アミノ基は、 $-NH$
 $_2$ 、 $-NHMe$ 、 $-NHEt$ 、 $-NH(iPr)$ 、 $NH(nPr)$ 、 $-NMe_2$ 、 $-NEt$

50

2、 $N(iPr)_2$ 、または $N(nPr)_2$ である。

【0230】

ブロッキングリガンドの好ましい実施態様を、図5に化合物1bおよび2として示す。

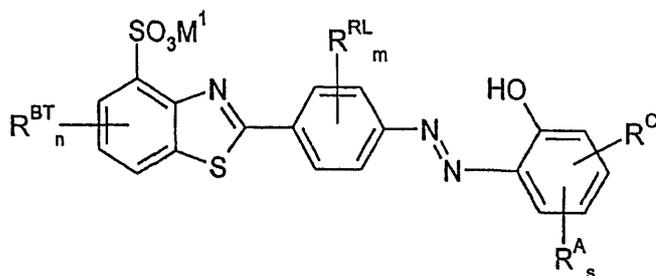
【0231】

好ましいスルホン化ベンゾチアゾール様リガンド

本発明の一つの態様において、凝集タウ、好ましくはNFT中に存在する細胞外凝集タウを標識するために用いたリガンドは、式(II)：

【0232】

【化79】



10

【0233】

(式中、

M^1 は、アルカリ金属カチオンであり；

20

n は、0～3の整数であり；

各 R^{BT} は、独立して、ベンゾチアゾール置換基であり；

m は、0～4の整数であり；

各 R^{RL} は、独立して、堅いリンカーアリーール置換基であり；

s は、0～4の整数であり；

各 R^A は、独立して、アリーール置換基であり；

R^C は、存在するとき、反応性共役置換基であり、または

R^C は、検出可能な標識であるか、またはそれを含有する。)

【0234】

様々な実施態様において、 M^1 、 n 、各 R^{BT} 、各 R^{RL} 、 s 、各 R^A および R^C は、本明細書に記載(例えば、上記「スルホン化ベンゾチアゾール様リガンド」の項)のとおりである。

30

【0235】

堅いリンカー基 R^L およびアリーール基 Ar^1 は、ベンゾチアゾール基とともに、事実上平面状、すなわち高度の平面性を有する化合物を形成する。

【0236】

本明細書に示すように、このような化合物は、検出を容易にするために嵩高い R^C 基を取り込むことを所望する場合に、特に効果的である。

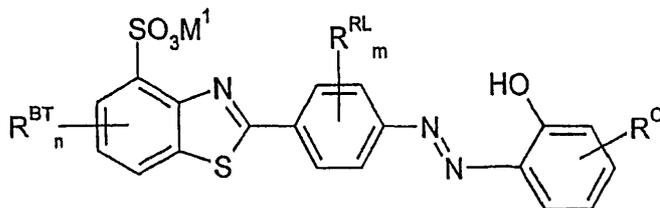
【0237】

一つの実施態様において、化合物は、式：

40

【0238】

【化80】



【0239】

50

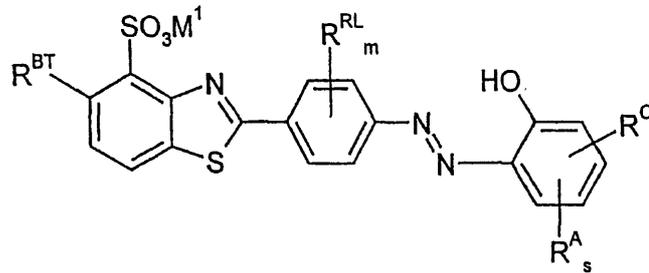
を有する。

【0240】

一つの実施態様において、化合物は、式：

【0241】

【化81】



10

【0242】

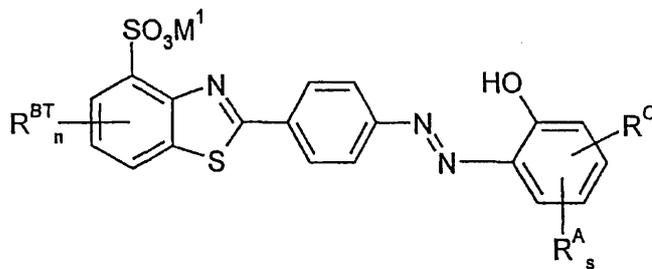
を有する。

【0243】

一つの実施態様において、化合物は、式：

【0244】

【化82】



20

【0245】

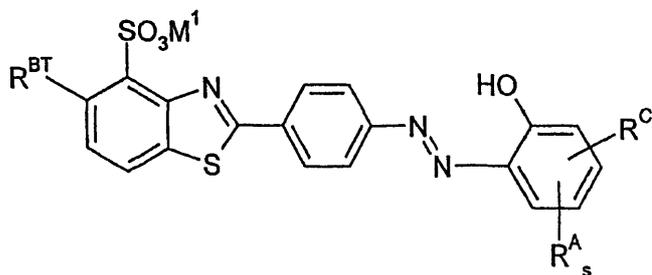
を有する。

【0246】

一つの実施態様において、化合物は、式：

【0247】

【化83】



40

【0248】

を有する。

【0249】

様々な実施態様において、sは、上記検討のとおりであり得る。

【0250】

一つの実施態様において、各R^Aは、独立して、式(I)との関係において上記の置換基より選択される。

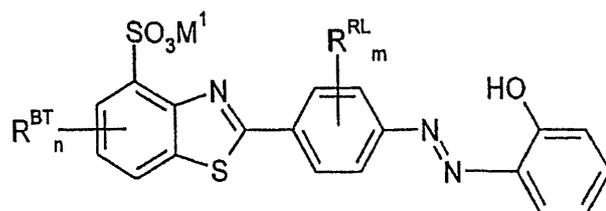
【0251】

一つの実施態様において、化合物は、式：

50

【 0 2 5 2 】

【 化 8 4 】



【 0 2 5 3 】

を有する。

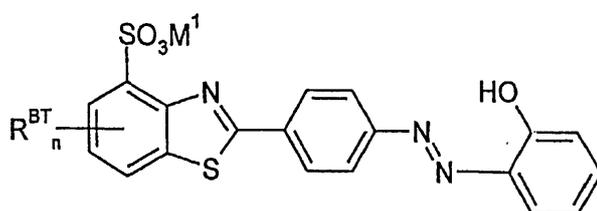
10

【 0 2 5 4 】

一つの実施態様において、化合物は、式：

【 0 2 5 5 】

【 化 8 5 】



20

【 0 2 5 6 】

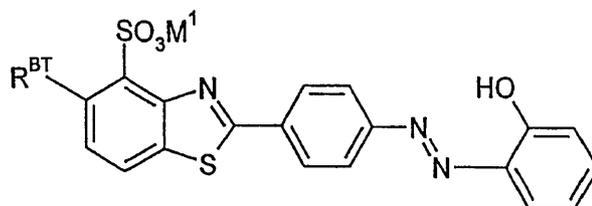
を有する。

【 0 2 5 7 】

一つの実施態様において、化合物は、式：

【 0 2 5 8 】

【 化 8 6 】



30

【 0 2 5 9 】

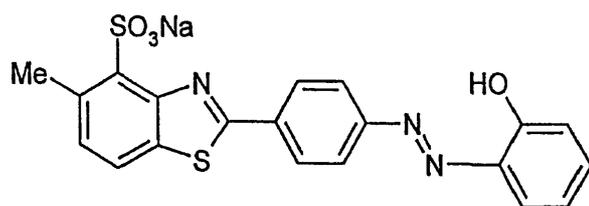
を有する。

【 0 2 6 0 】

一つの実施態様において、化合物は、式：

【 0 2 6 1 】

【 化 8 7 】



40

【 0 2 6 2 】

を有する。

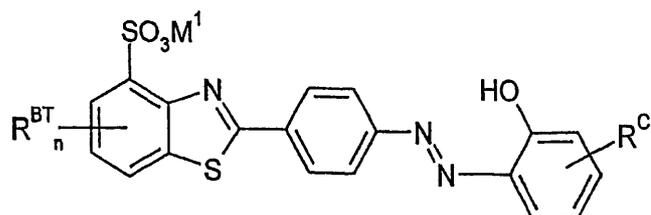
50

【0263】

一つの実施態様において、化合物は、式：

【0264】

【化88】



10

【0265】

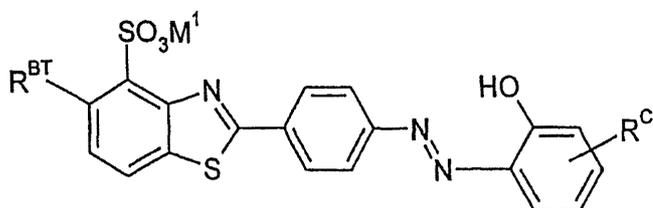
を有する。

【0266】

一つの実施態様において、化合物は、式：

【0267】

【化89】



20

【0268】

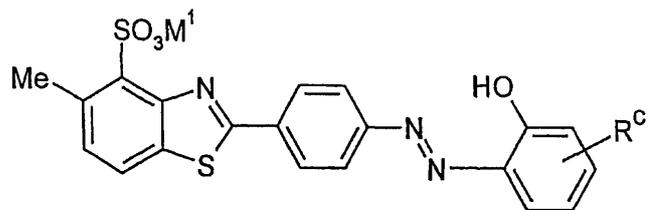
を有する。

【0269】

一つの実施態様において、化合物は、式：

【0270】

【化90】



30

【0271】

を有する。

【0272】

様々な R^C 置換基が、本明細書の他の箇所で検討されている。

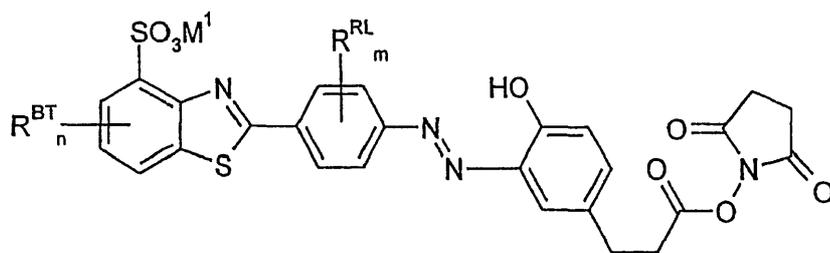
【0273】

一つの実施態様において、化合物は、式：

【0274】

【化91】

40



【0275】

を有する。

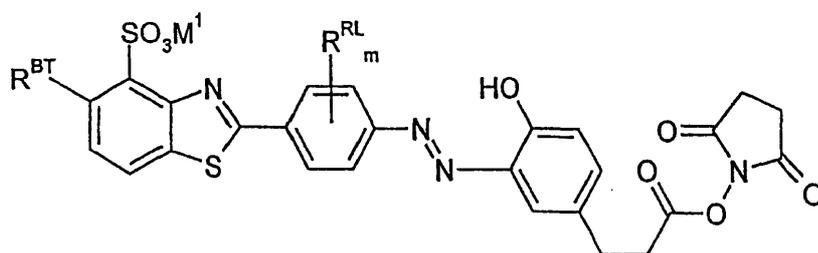
【0276】

一つの実施態様において、化合物は、式：

【0277】

【化92】

10



20

【0278】

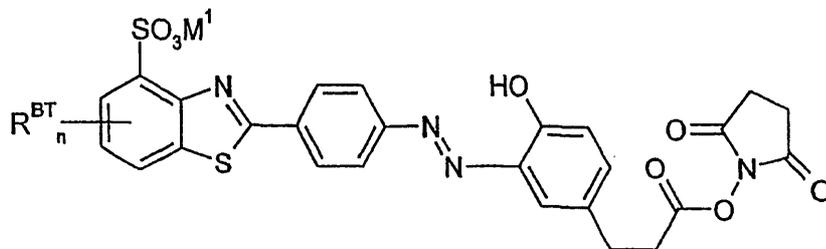
を有する。

【0279】

一つの実施態様において、化合物は、式：

【0280】

【化93】



30

【0281】

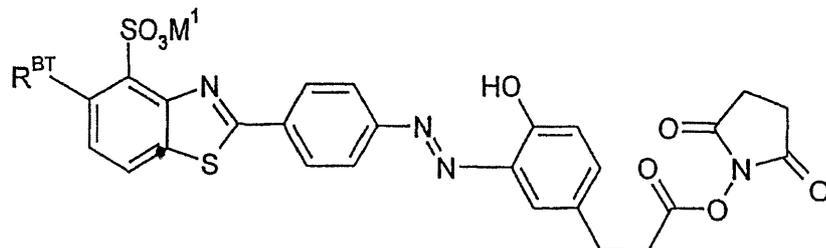
を有する。

【0282】

一つの実施態様において、化合物は、式：

【0283】

【化94】



50

【0284】

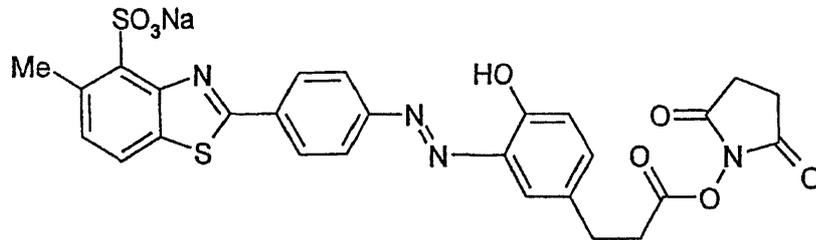
を有する。

【0285】

一つの実施態様において、化合物は、式：

【0286】

【化95】



10

【0287】

を有する。

【0288】

これらの好ましい化合物のいくつか、およびその誘導体を、図4a-cに示す。

【0289】

したがって、一つの態様によれば、本発明は、図4aに示す式により示される化合物、または例えば、R^cが上記のように共役基である、その誘導体を提供する。以下の実施例に示すように、そのような誘導体（例えば化合物4b）は、適切な結合活性を保持する。

20

【0290】

本明細書に開示された新規化合物（例えば式(II)のもの）は、ADに特徴的なものなどの神経原線維のもつれの合成リガンドとして特に有用である。したがって、これらのもつれに対する結合に要求される最小限界構造の発見は、もつれを標的とするのに使用することができ、したがって、ADなどの疾患の診断、予後または治療において使用することができる高親和性リガンドの設計の可能性を与える。

【0291】

そのような化合物は、以下好ましいSBリガンドと称する。

30

【0292】

好ましいSBリガンドの模倣物

一般に、所与の標的性（この場合には、好ましいSBタウ-タウ凝集リガンド）を有する化合物から模倣物を設計する上で広く取られるいくつかのステップがあり、その中でもっとも重要なのは、標的性を決定するうえで不可欠でありおよび/または重要である化合物の特定の部分が、決められていることである。本発明者らによって凝集タウ分子に高親和性結合するために要求される最小限界構造が得られたことにより、本ステップが回避されている。

【0293】

化合物4aの最小限界構造を、分光学的技術、X線回折データおよびNMRなどの様々な源からのデータを用いて、例えば、立体化学、結合、サイズおよび/または電荷などのその物理的性質に基づいて、モデル化することができる。コンピューターを利用した解析、相同性マッピング（原子間の結合よりもむしろリガンドの電荷および/または容積をモデル化する）および他の技術を、このモデル化プロセスに使用することができる。

40

【0294】

このアプローチの変法において、好ましいSBリガンドおよびその結合パートナーの三次元構造をモデル化する。これは、リガンドおよび/または結合パートナーが結合においてコンフォーメーションを変化させるときに特に有用であり、モデルに、模倣物の設計においてこれを考慮に入れることを可能にする。次いで、最小限界構造を模倣する化学基をそれに移植することができる鑄型分子を選択する。模倣物が容易に合成され、薬学的に許容

50

可能であり、そして *in vivo* で分解せず、必要な生物学的活性を保持しているように、鑄型分子およびそれに移植された化学基を便宜的に選択する。このアプローチにより見出される模倣物をその後スクリーニングし、標的性を有するか否か、またはその標的性をどの程度示すかを見ることができる。更に、最適化または修飾を行い、例えば *in vivo* または臨床試験などの更なる試験または最適化において1つまたはそれ以上の最終模倣物に到達することができる。最適化は、上記のような模倣物を選択するステップ（例えば、溶液中で予め凝集させたタウ、固相に結合させたもの、または P H F から単離されたもの W O 96/30766 および以下に記載のアッセイを参照）、凝集タウ分子の調製物とそれを接触させるステップ、および試験物質による凝集タウ分子に結合および/または分子からの化合物 4 a の排除の程度を測定するステップを含んでもよい。

10

【0295】

凝集タウを標識する方法

一つの態様において、したがって、本発明は、凝集タウ分子を、本明細書記載のように（例えば式（I I）のもの）好ましい S B - リガンド化合物またはその誘導体と接触させるステップ、およびその化合物または誘導体の存在を検出するステップを含む、凝集タウまたはタウ様分子を標識する方法を提供する。使用の方法は、例えば参考文献 26 ~ 34 に記載されたりガンドの使用に類似の方法により、実施してもよい。

【0296】

本明細書に使用する用語「タウタンパク質」は、タウタンパク質ファミリーの任意のタンパク質の総称である。タウたんぱく質の特徴は、重合および脱重合のサイクルを繰り返す間に微小管と共精製する、数多くのタンパク質ファミリーの中の一つであり (Shelanski et al. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70., 765-768)、微小管結合タンパク質 (M A P) として公知である。タウファミリーのメンバーは、特徴的な N 末端セグメント、N 末端セグメントに挿入されている約 50 個のアミノ酸の配列（これは、脳内で発達上制御される）、31 ~ 32 個のアミノ酸の 3 または 4 回の直列繰り返しからなる特徴的な直列繰り返し領域、および C 末端尾部を有するという共通の特徴を有する。

20

【0297】

「タウ様」分子として、例えば、細胞体樹状突起コンパートメント中に優勢な微小管結合タンパク質である M A P 2 があげられる (Matus, A., in "Microtubules" [Hyams and Lloyd, eds.] pp 155-166, John Wiley and Sons, NY)。M A P 2 のイソフォームは、直列反復領域において、タウタンパク質とほぼ同一であるが、N 末端ドメインの配列および広がり両方が事実上異なる (Kindler and Garner (1994) Mol. Brain Res. 26, 218-224)。それにもかかわらず、直列反復領域における凝集は、タウの反復ドメインに選択的ではない。したがって、本明細書におけるタウタンパク質またはタウ - タウ凝集に関するあらゆる検討は、タウ - M A P 2 凝集、M A P 2 - M A P 2 凝集などにも関するものとして捉えるべきであることが理解されるであろう。

30

【0298】

更なる基、または診断、予後もしくは治療目的もしくは作用を有するもの、例えば、リガンドが結合する神経原繊維のもつれの可視化を可能にする蛍光基に、好ましい S B リガンドを、コンジュゲートさせてもよいし、キレートさせてもよいし、あるいはさもなくば会合させてもよい。

40

【0299】

診断用組成物および使用

一般に、本発明による好ましい S B リガンド（例えば、式（I I）のもの）は、単離および/または精製された形態、すなわち実質的に純粋で提供され得る。これは、組成物中において、少なくとも活性成分の約 90%、より好ましくは少なくとも約 95%、より好ましくは少なくとも約 98% を現す。しかし、そのような組成物は、不活性な担体物質または薬学および生理学的に許容し得る他の賦形剤を含んでもよい。本発明の組成物は、本明細書に開示されているような好ましい S B リガンドに加えて、診断、予後または治療の使用の1つまたはそれ以上の他の分子を含んでもよい。

50

【0300】

本発明による好ましいS Bリガンド物質、またはそのようなりガンドを含む組成物を、ヒトまたは動物の身体の診断、予後または処置の方法において、特に以下に記載するようにA Dなどの状態との関係において、使用するために提供してもよい。

【0301】

更なる態様においては、本発明は、診断または予後方法を提供するものであって、その方法は、哺乳類に、診断的または予後的に効果的な量の1またはそれ以上の、本明細書記載のような好ましいS Bリガンドを投与するステップを含む。この態様は、診断または予後方法において使用するための、そのような化合物を包含する。In vitroおよびin vivoの両使用は、この態様によって包含される。In vitroの方法は、(i)対象からの適切な組織検体を得ること；(ii)検体を好ましいS Bリガンドに接触させること；(iii)検体に結合する好ましいS Bリガンドの量および/または局在個所を検出すること；(iv)(v)の結果を対象の疾患の病期または重症度と関連させることにより、実施してもよい。

10

【0302】

更なる態様において、本発明は、上記記載の疾患の診断、予後または治療のための組成物の製造における、本明細書記載のような好ましいS Bリガンドまたは誘導体の使用を提供する。

【0303】

疾患または状態は、例えばA DもしくはA D様状態、または凝集タンパク質分子が関わる任意の他の状態であってもよい。

20

【0304】

特に、タウタンパク質（およびその異常な機能またはプロセッシング）が役割を果たすのはアルツハイマー病のみではない。Pick病および進行性核上麻痺（P S P）などの神経原線維障害の病因は、それぞれ歯状回（dentate gyrus）および新皮質の星状錐体細胞（stellate pyramidal cells）中の、異常な切断されたタウ凝集物の蓄積と関連するようである。他の痴呆として、前頭側頭痴呆（F T D）；第17染色体にリンクしたパーキンソン病（F T D P - 17）；脱抑制 - 痴呆 - パーキンソン病 - 筋萎縮（D D P A C）；淡蒼球 - 橋 - 黒質変性（P P N D）；Guam - A L S症候群；淡蒼球 - 黒質 - ルイス変性（P N L D）；皮質 - 基底変性（C B D）など（Wischik et al. 2000, loc. cit、詳細な検討には特に表5.1を参照）などがあげられる。主としてまたは部分的に異常なタウ凝集を特徴とする、これらすべての疾患を、本明細書において「タウオパシー」と称する。

30

【0305】

診断用組成物は、上記S Bリガンド誘導体の一つに加えて、診断的に許容し得る賦形剤、担体、緩衝液、安定化剤、または当業者に周知の他の物質を含んでもよい。そのような物質は、無毒性であるべきであり、物質の凝集タウへの結合活性、あるいはその物質に連結されたまたはさもなくばその物質と会合している任意の生物活性基の効力に干渉すべきではない。担体または他の物質の明確な性質は、投与経路、例えば経口、静脈内、皮内、皮下、鼻腔、筋肉内、腹腔内投与などにより決まる。

【0306】

経口投与用診断用組成物は、錠剤、カプセル、粉末または液体の形態であってよい。錠剤は、ゼラチンまたはアジュバントなどの固体担体を含んでもよい。液体診断用組成物は、一般に、水、石油系、動物または植物油、鉱物油または合成油などの液体担体を含んでもよい。生理食塩液、デキストロース、または他の糖溶液、またはエチレングリコール、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールなどのグリコールを含んでもよい。

40

【0307】

静脈内、皮内もしくは皮下注射、または病変部位での注射では、リガンドは、発熱物質を含まず、適切なp H、等張力および安定性を有し、非経口的に許容し得る水溶液の形態である。当業者は、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、乳酸リンゲル注射液などの、例えば等張性ブーケルを用いて適切な溶液を調製することも十分できる。保存剤、安定化

50

剤、緩衝液、抗酸化剤および/または他の添加剤を、必要に応じて含んでもよい。

【0308】

処置すべき状態により、上記のような組成物を、単独で、または他の処置と組み合わせて、同時にまたは逐次的に、投与してもよい。

【0309】

リガンドの同定

凝集タウのためのリガンドを同定する更なる方法は、必要な活性を有する化合物を同定するために、ケミカルライブラリーのハイスループットスクリーニングを可能にする形式で用いることができるスクリーニングアッセイを要する。これまでは、そのような方法は、容易には利用できなかった。標識化プロセスが化学探索能力を厳しく限定するため、好ましい方法は、前標識された化合物を必要としない。

10

【0310】

本発明の更なる態様において、ハイスループットスクリーニングアッセイとして使用し得る方法が提供されており、その方法は、前標識された試験物質を有する必要性によって限定されない。好ましい実施態様においては、その方法は、以下のステップを使用する。

1. 製造の過程において部分的に凝集を経た形態でタウタンパク質を生成させる高い能力；

2. W096/30766で提供されたタウ-タウ結合アッセイにおいて、推定リガンドを試験するためにこの方法で調製されたタウタンパク質を使用して、タウ凝集阻害剤として最小の活性しかないか、全く活性のない物質、または高濃度でタウ-タウ結合を増強する物質を同定する。

20

3. 阻害的濃度のDMMBなどの、例示的な強力なタウ凝集阻害剤の存在下で、推定リガンドを試験すること；

4. 反復ドメインを介するタウ-タウ結合のブロック能が欠如しているが、強力なタウ凝集阻害剤の阻害活性をブロックする性質により、推定リガンドを同定することができる。

【0311】

したがって、本発明は、凝集PHFタウタンパク質を標識可能なリガンドのin vitro同定方法を提供し、その方法は、

(i) 凝集PHFタウタンパク質を標識可能と疑われる第一作用物質を提供するステップ、

30

(ii) (a) 高親和性タウ捕獲部位を露出するように固相に結合させたタウコアフラグメントを含む、タウタンパク質またはその誘導体(例えば、コアフラグメントに相当し、Ala390-dGAで終結する、切断タウタンパク質)を、(b) 固相タウタンパク質または誘導体(例えば、Glu-391で終結するdGAE)に結合可能な液相タウタンパク質またはその誘導体、ならびに(c) 選択された第一作用物質および(d) タウ-タウ結合阻害剤であることが公知の第二作用物質と接触させるステップ、

(iii) (b) の液相タウタンパク質または誘導体の、(a) の固相タウタンパク質または誘導体への結合の阻害剤(d) による阻害を完全にまたは部分的に軽減する第一作用物質を選択するステップを含む。

【0312】

40

(iii) を満たす作用物質を、リガンドとして提供し得る。

【0313】

方法を、以下のステップ(前、その間、後)とともに実施するのが好ましい：

(iの2) (a) 高親和性タウ捕獲部位を露出させるように固相に結合させたタウコアフラグメントを含有するタウタンパク質またはその誘導体、(b) 固相タウタンパク質または誘導体に結合可能な液相タウタンパク質またはその誘導体を、(c) 上記第一作用物質と接触させるステップ、および

(iの2.1) (b) の液相タウタンパク質または誘導体の(a) の固相タウタンパク質または誘導体への結合の阻害により示されるタウ-タウ結合の阻害を検出するステップ、

(iの2.2) タウ-タウ結合阻害剤として最小の活性しかないか、全く活性のない、お

50

よび/またはタウ-タウ結合を増強する第一作用物質を選択するステップ。

【0314】

(iii)および(iの2.2)を満たす作用物質をリガンドとして提供し得る。

【0315】

阻害剤は、好ましくは上記のとおりジアミノフェナチオジン(もっとも好ましくはDMMB)である。スクリーニングのために選択された化合物は、SBリガンドなど、いかなる化合物であり得る。

【0316】

好ましい形態において、液相タウタンパク質または誘導体は、固相への曝露の前に部分的凝集を経た形態で調製される。それに加えて、アッセイを、W096/30766に記載されるように、そして更に詳細に以下の実施例にまとめられているように、広く実施してもよい。好ましくは、結合ステップには、アルカリ性または生理学的条件(例えばPBS)を使用し、結果を免疫学的に検出する。

10

【0317】

本発明のこれらおよび他の態様は、本発明の実施態様を例のみとして記載する、次の非限定的な実施例を読むにつれより明らかになるであろう。添付の図面には以下のように言及する。

【実施例】

【0318】

方法および材料

20

PHF結合化合物

本明細書で用いた化合物は、別途記載のない限り、ICI Pharmaceuticalsから供給された。チオフラビンTおよびチアジンイエローは、Fluka AGから購入した。

【0319】

蛍光の定量

臨床的および神経病理学的に確認されたADによる死亡症例の海馬から16 μ mの連続切片を切り取った。これらの切片を、濃度0.01%、0.001%、または0.0001%のチオフラビンS水溶液を用いて5~10分間染色し、次いで水中で洗浄、Apathe水性溶媒中で標本にした。2組目の実験では、海馬、およびマイネルト基底核から切片を切り取った。これらの切片を、濃度0.1%、0.01%、0.001%、または0.00001%のプリムリン水溶液を用いて5~10分間染色し、水中で洗浄、Apathe水性溶媒中で標本にした。

30

【0320】

光電子増倍管(モデルMPV-2)を備えたLeitz蛍光顕微鏡を用いて、蛍光発光を定量した。以下のとおり、3種のLeitzフィルターブロックを用いた。

1. フィルターブロック H2、コード513 417

励起範囲バンドパス390~490nm

ミラー RKP510(すなわち、透過510nm未満)

抑制フィルター LP515(すなわち、反射515nm超)

40

3. フィルターブロック G、コード513 416

励起範囲バンドパス350~460nm

ミラー RKP510(すなわち、透過510nm未満)

抑制フィルター LP515(すなわち、反射515nm超)

4. フィルターブロック A、コード513 410

励起範囲UVバンドパス340~380nm

ミラー RKP400(すなわち、透過400nm未満)

抑制フィルター LP430(すなわち、反射430nm超)

【0321】

ifIおよびIIの調製

50

材料 i f I を、Wischnik et al (1985) J Cell Biol 100: 1905-1912に記載のとおり調製した。

【0322】

材料 i f I I を、Wischnik et al (1995) Neurobiol Aging 16, 409-431に記載のとおり調製した。非プロナーゼ消化 i f I I を含む実験の場合、プロナーゼ消化ステップを省き、同一のプロトコルに従った。

【0323】

i f I I の分光蛍光分析

これらの測定は、Perkin-Elmer分光蛍光計(モデル M P F - 3)で行った。すべての測定に関してリガンド濃度 0.00001%をルーチンに用いた。プリムリンは、370nmに励起ピーク、515nmに発光ピークを有することが見出された。したがって、すべての測定は、標準的な励起波長370nm、固定スリット幅3nmで行った。

【0324】

競合結合アッセイ

材料 i f I を、PBS中、0.2mlのガラスホモジナイザーでホモジナイズした。この懸濁液に、最終濃度0.1~0.00001%の範囲で試験化合物を添加した。それを5分間インキュベートし、同等または低い濃度でプリムリンを添加した。懸濁液をスライドガラスに移し、380~570nmの間の励起波長および発光波長を含めて、蛍光フィルターブロックの範囲に亘って蛍光顕微鏡法によって検査した。これらの観察で求められた終点は、もつれフラグメントからの典型的なプリムリンの蛍光の移動であった。

【0325】

リガンド電子顕微鏡検査

i f I 画分から得られたPHFを、プロナーゼ消化後、炭素被覆グリッドに沈着させ、ピオチン化プリムリンの調製物とともに短時間インキュベートし、その後、Slot and Gueze (1981)の方法によって金コロイドと共役させた抗ピオチン抗体とともにインキュベートした。

【0326】

i f I I のスクシニル化およびクロマトグラフィー

洗浄した i f I I 画分を、8M尿素/50mMホウ酸塩(1ml、pH9)に溶解し、超音波破碎し、1mlの無水コハク酸アセトン溶液を、最終濃度4ml中コハク酸塩250mMになるように添加し、水酸化ナトリウムを用いてpH8.5に維持した。その溶液を遠心分離によって清澄にし、重炭酸塩で平衡化したSephacryl S200カラムに添加した。カラム溶出液を230または280nmでモニターした。

【0327】

スクシニル化画分は、ゲルのクマシー染色または銀染色によって視覚化できなかったので、Bolton-Hunter試薬(Amersham)を用いて i f I I 画分を特異化学標識した後、オートラジオグラフィーによってバンドを検出した。

【0328】

PHF由来ペプチドの光親和性標識化のために、i f I または i f I I 画分を I¹²⁵-標識光不安定性誘導体とプレインキュベートした。

【0329】

Kav0.21で流れる光標識画分を、Amicon YM2膜を通して限外濾過により濃縮し(10ml)、50mM重炭酸アンモニウム中キモトリプシン(0.01mg/ml)で消化した。配列解析用のキモトリプシンフラグメントは、C18カラム、0~100%アセチルニトリル勾配、0.1%トリフルオロ酢酸を用いる逆相HPLCによって、Dr H. C. Thogersenにより単離された。キモトリプシンペプチドを配列決定した。

【0330】

フェノチアジン存在下PHFの形態学的研究

これらの実験のために、電子顕微鏡検査に関して上記のとおり i f I I 画分を調製した。この材料を、最終濃度0.1~0.00001%の範囲のフェノチアジン調製物と直接イ

ンキュベートし、その後、炭素被覆グリッドに適用し、L i P T A 染色後 (1 %) に直接検査した。あるいは、i f I I 懸濁液を炭素被覆グリッドに沈着させ、部分的に乾燥させ、フェノチアジン溶液で洗浄した。そのような調製物をL i P T A でそのまま染色するか、1次抗体として6 . 4 2 3を用いて免疫電子顕微鏡法のために更に処理した。2 5 , 0 0 0 ~ 4 5 , 0 0 0 の公称倍率で電子顕微鏡写真を記録した。

【 0 3 3 1 】

脳組織 g 当たり μ g で表される、Braak病期分類の関数としての細胞外間隙内の凝集タウタンパク質の算出

前に報告された臨床的および神経病理学的に病期分類されたコホートにおけるP H F タウレベル pmol/g (P) およびもつれのカウント / mm^2 (T) (R. Y. K. Lai et al., Neurobiol Aging 16, 433 (1995)) を用いて、ヒト脳において同じE L I S A を用い、罹患錐体細胞 (P C) 当たりP H F タウレベル pg/細胞 の推定値を導き出した。もつれのカウント / mm^2 は、容積 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm}$ (0.0001 cm^3) 内の罹患錐体細胞数の推定値を提供し、公称 $7 \mu\text{m}$ 切片においてカウントされた任意のもつれのプロファイルを、その切片に直交する $\sim 45 \mu\text{m}$ にどちらかの方向に拡大することを可能にする (S. M. Blinkov, I. I. Glezer, The human brain in figures and tables a quantitative handbook; Plenum Press, NY, 1968, Table 204) 。 P H F コアタウフラグメントは 10 kD であるので (C. M. Wischik, et al., Proc. Natl. Acad. Scie. USA 85, 4506 (1988)) 、コアP H F タウレベル pg/cm^3 は $10 \times P$ である。このことから、 $PC = (P \times 10) / (T / 0.0001)$ である。B r a a k 病期 4 ~ 6 において (H. Braak, E. Braak, Acta Neuropathol. 82, 239 (1991)) 、灰白質の領域P C 値は以下のとおりであった。前頭皮質 $0.13 \pm 0.05 \text{ pg/細胞}$ 、海馬 $0.60 \pm 0.39 \text{ pg/細胞}$ 、側頭皮質 $1.074 \pm 0.44 \text{ pg/細胞}$ 、嗅内皮質 $1.56 \pm 0.63 \text{ pg/細胞}$ 。これらの相違は、解剖学的相違、異なる疾患進行領域の割合 (C. Bancher, H. Braak, P. Fischer, K. Jellinger, Neurosci. Lett. 162, 179 (1993), also Gertz et al., Acta Neuropathol. 95, 154 (1988)) 、もつれのカウントが病理学上のより進行した病期においてジストロフィー性神経炎で蓄積されるP H F を過小評価する程度 (Lai et al., 1995, loc cit) を反映する。全平均は、A D に関連するであろう細胞当たりP H F レベルの近似値を提供する。その値は、B r a a k 病期 1 ~ 3 の症例で $0.37 \pm 0.08 \text{ pg/細胞}$ 、Braak病期 4 ~ 6 の症例で $1.08 \pm 0.28 \text{ pg/細胞}$ である。

【 0 3 3 2 】

下記の表、ならびに図 2 6、2 7、2 9、および 3 1 に示した細胞外凝集P H F タウを推定するために、ガラス上の切片を、5分間98%のギ酸で処理し、m A b 4 2 3 と1時間インキュベートした後に、m A b 4 2 3 の免疫反応性が示される場合、もつれを細胞外としてカウントした。疑いを排除するために述べると、この方法論は、浮遊ピプラトーム切片をギ酸と共に短時間インキュベートし、その後、m A b 4 2 3 と共に一晩インキュベートするMena et al. (1996) に報告されている方法とは異なる。その報告に示されているとおり、後者の一晩浮遊切片プロトコルは、細胞内のもつれにおいて最大m A b 4 2 3 免疫反応性を得て、P H F のファジーな外殻によって実質的に閉鎖されている状態にもかかわらず、すべての細胞内のもつれがm A b 4 2 3 免疫反応性を含有することを示した (図 3 を参照のこと) 。本発明のプロトコルの目的は、図 3 に示した病期 3 および病期 2 のもつれが最大限に標識化されることを確保することであった。わずかな細胞内のもつれの標識化を完全に除外することはできず、カウントも試みられ、そこで主観的識別が試みられた。しかしながら、後者の推定値は、細胞内のみであるm A b A T 8 によるもつれの標識化密度または確率 (図 2 8、3 0、3 2) と一致せず、神経病理学的病期に関してm A b 4 2 3 を用いて示されたものと完全に異なるプロファイルを示す。したがって、本発明の算出の場合、m A b 4 2 3 免疫反応性のもつれのカウントは、図 3 に示した病期 2 および 3 における細胞外のもつれの病理学を実質的または完全に代表するものであって、図 3 の病期 1 を実質的に代表するものではないとみなされた。疑いを排除するために述べると、図 3 に示した病期はBraak病期ではなく、もつれを含有する単一ニューロン変性による病

期である。

【0333】

表1に示した特定データは以下に基づいた。

【0334】

【表1】

番号	BST	ME1T4	PC	PT4	REG3B	SE1T4	
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	10
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	
6	1.0000	0.0	0.6000	0.0	2.0000	0.0	20
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	
11	1.0000	0.0	0.6000	0.0	3.0000	0.0	30
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	40

【0335】

上記において、

BSTは、Braak病期

ME1T4は、細胞外のもつれカウント

PCは、細胞当たりPHFタウ濃度の推定値(上記のとおり算出)

PT4は、細胞外のもつれに起因するPHF含量($PC \times MEIT4$)

REG3Bは、図26および27のとおり脳部位を3グループに分けた分類で、SE1T4は、細胞外のもつれカウントの標準誤差である。

【0336】

実施例 1 - Braak 病期分類における凝集タウ

免疫化学的性質（参考文献 26、27、30）に基づいて、細胞内のもつれを細胞外のもつれと識別することが可能である。それらの分類におけるもつれを伴う症例の頻度（すなわち、確率）および量（すなわち、カウント / mm^2 ）の両方を、前向き症例集積において求め、Braak and Braak のシステムに従って、病理進行において病期を示すとして知られている領域にグループ分けした。

【0337】

図 25 に示したように、E2 / Trans および E4 / HC における細胞外のもつれの確率に基づいて、病期 2 ~ 4 を病期 1 と明確に区別することができる。更に、F / T / P 部位（新皮質領 - 前頭部、側頭部、頭頂部）に関する図も示される。

10

【0338】

逆に、細胞内のもつれは、これらの領域における初期の識別の根拠には不十分であるが、新皮質部位を用いる病期 4 および 5 の識別では良好な根拠を提供する。同様に、死亡の 12 カ月前に MMSE スコアが 21 を超える症例を選択したとき、類似の結果が得られた。更に、もつれの密度を求めたとき、類似の結果が得られた。

これらの結果は、上述の材料および方法に記載のとおり、脳組織 g 当たり μg で表される、細胞外間隙の凝集タウタンパク質の量の近似値に換算できる。これらの結果を表 1 に示す。もつれのカウントは凝集タウタンパク質の量を過小評価するので、これらは過小評価値である。

【0339】

20

【表 2】

表 1：領域および病期による細胞外のもつれの推定 PHF タウ含量

領域	BST	PHF/タウ ($\mu\text{g}/\text{g}$)
E2/TRANS	1	0.62
	2	10.49
	3	23.34
	4	52.46
	5	69.12
HC/E4	1	0
	2	0.83
	3	2.23
	4	5.36
	5	14.36
F/T/P	1	0
	2	0
	3	0
	4	0.08
	5	1.32

30

40

【0340】

表 1 は、脳 g 当たり μg で表される、Braak 病期分類の関数としての細胞外間隙内の凝集タウタンパク質量を示す。データは、材料および方法に記載のとおり算出した。

50

【0341】

要約すると、これらの結果は、内側頭部構造におけるPHFタウの細胞外沈着物が、ADの神経原線維変性の実験的病期分類の根拠を提供することを示す。そのような病期分類は、適切なリガンドが生成できた場合に、放射性画像化法によってのみ達成することができた。

【0342】

実施例2 - PHFコアタウタンパク質の凝集反復ドメイン内に結合する化合物の評価
分析薄層クロマトグラフィー、および分取クロマトグラフィーによって約20種の成分に分離したチオフラビンSの市販の粗製品の一成分として、プロトタイプ化合物を得た。試験は、これらのすべての成分が、有効なもつれのリガンドとして作用できるのではないことを示した。具体的には、純粋なプリムリン(図5、化合物1a)がもつれを標識することが判明したが、ベンゾチアゾールチオフラビンT(図5、化合物1b)はアミロイドを優先的に標識するものの、有効性ははるかに低かった。

10

【0343】

更に、化合物1aが、化合物1bがもつれの粗抽出物に10倍過剰で導入されたとき、もつれにおいて化合物1bを置き換えることが見出された。

【0344】

考えられる相違は、1位のスルホネート基であると仮定された(図5、化合物2[2-(4-アミノフェニル)-6-メチル-1-スルホネートベンゾチアゾール])。しかしながら、プリムリン(化合物1a)は、もつれから(アミロイドではないが)これを置き換えることが見出された。したがって、もつれの標識化は単にスルホン化ベンゾチアゾール構造のみによるものでなく、より長い芳香族構造を必要とすることが示唆される。

20

【0345】

精製チアジンレッド(図5、化合物3a)は、等濃度でプリムリンと競合することが判明したが、化合物3b(チアジンイエロー、図5)は競合しなかった。したがって、伸長芳香族ベンゾチアゾール構造は、それ自体では、もつれ内での高い結合親和性を決定しない。

【0346】

競合結合の最小限界要件を定義するために、ジアミノ結合を亘って単一フェニル基を添加することによってスルホン化ベンゾチアゾールを伸長した。この化合物(図4、化合物4a)は、蛍光性ではないが、等濃度でチアジンレッド、およびプリムリン蛍光と競合することが判明した。したがって、化合物4aは、もつれ内の高親和性結合に必要な最小限界構造を定義する。

30

【0347】

もつれ内の結合部位が実際はPHF自体であることを証明するために、ビオチン基を添加して化合物4aを更に伸長した(図4、化合物4b)。この化合物は依然としてプリムリンおよびチアジンレッドと競合することが判明したので、化合物4bは、もつれ内の高親和性結合を維持した。更に、免疫金コンジュゲート抗ビオチン抗体は、化合物4bとプレインキュベートされた単離PHFを標識することが見出され、プレインキュベートなし、またはビオチン単独(図31b)でのプレインキュベートでは標識化が示されなかった。最後に、化合物の光活性化コンジュゲートが調製されたとき、その標識タンパク質を同定し、配列決定することが可能であった。これはタウタンパク質の反復領域を含むPHFのコアから単離されたものと同じコアタウフラグメントであることが判明した。

40

【0348】

要約すると、これらの結果は、化合物4aおよび4bの結合部位が、PHFコアのタウタンパク質の凝集反復ドメイン内であることを明らかに示す。更に、これらの結果は、PHFコア内のリガンド活性を妨げることなく、官能基を添加するためのキレートとして化合物4aを用いることができることを示す。したがって、化合物4aは、テクネチウムまたは他の画像化成分を添加して、例えばADにおける細胞外のもつれを検出するのに適切なリガンドを生成するためのキレートとして用いることができた。

50

【0349】

実施例3 - リガンド分子の最適寸法の決定

図14は、それらの寸法と共に、上記記載の3つの構造を示している。例えば、プリムリン、ベンゾチアゾール類似体（「類似体」と示す）、および「チアジンイエロー」に関して、C11 - C1距離、およびC10 - C1距離を示す。

【0350】

図15および16は、プリムリン構造の「B」部分の結晶構造を示す（Soon-Beng Teo et al., 1995, Acta Crystallogr., Sect. C, 591）。側面図である図16からわかるように、この分子はわずかなねじれを有するが、本質的に平らである。プリムリンの「A」部分は、同じ分子から算出できる。その結果から、A + Bの寸法を導き出すことができ、これが本発明による活性種の1種の、実際の長さの指標となる。

10

【0351】

図14に示した「類似体」の大きさを算出するために、図15のデータから測定値Aを用い、図17および18に示したN2Aと表す分子から測定値Bを決定した（Gilardi, R. D., 1972, Acta Crystallogr., Sect. B, 107）。図18の側面図からわかるように、分子のこの部分は完全に平らである。その寸法が「類似体」と同じであるチアジンレッドにも同一の測定値を適用した。

【0352】

チアジンイエロー（図14に示した）の大きさは、以下のように求めた。「A」部分は、プリムリンに関して用いた図15の分子に由来し、「B」部分は、図19および20に示した分子に由来する（Gladkova et al., 1972, Kristallografiya 41）。再び、この分子のB部分は完全に平らであり、図17に示した分子に関して唯一の相違は、芳香族基間の距離である。

20

【0353】

図21および22は、図15の分子が空間でどのように結晶しているのかを例示している。図からわかるように、この分子は交互の「ヘリンボン」パターンを形成し、積み重なっていない。対照的に、メチレンブルーの結晶構造は、この分子が結合の重なりの中に交互の水分子のシートを有する重なりを形成することを示している。

【0354】

表2は、プリムリン（「PRIM」）、類似体（「ANAL」）、チアジンイエロー、およびベンゾチアゾール単位単独（すなわち、図5に示した構造1bおよび2）の最小、最大、および平均寸法を表にしている。対応するメチレンブルーの寸法を、「MBCC」（炭素から炭素）、および「MBNN」（窒素から窒素）として示す。

30

【表3】

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

40

【0355】

図23は、活性リガンドである分子（プリムリン、および「類似体」）、およびチアジンイエロー（リガンドとして不活性である）の平均、最大、および最小値の広がり比較を示す。寸法はオングストローム単位（Å）で示す。図24において、基本的なベンゾチアゾール核（すなわち、図5の分子1bおよび2）、およびジアミノフェノチアジンの同様の比較を行う。これらの距離は、炭素から炭素の距離である。

【0356】

上記結果は、本明細書に記載の分子が本質的に平らであることを例示している。しかしな

50

がら、本発明によるリガンドと先に検討した他の分子との間には活性に根本的な相違がある。図に示したように、本発明による適切なリガンドは、14.783から15.261 AUの間の寸法の長く平らな分子を含む。他方、その寸法を超える(平均15.927 AU)チアジンイエローなどの長い分子は、平らであっても有効なリガンドとして役立たない。しかしながら、ある種の短く平らな分子は、アミロイドに優先的に結合する。

【0357】

実施例4 - リガンド分子および阻害剤を用いるPET

図11~13は、ジアミノフェノチアジンまたは「類似体」をポジトロン放出種に転換するために用いることのできる典型的な合成方法を示す。

【0358】

図11bは特に、チオニンをNaHで処理し、次いで標識ヨウ化メチルで処理してメチレンブルーを得る方法を示している。アズールAおよびアズールBから開始するメチレンブルーの合成に、同様の手順を用いることができる。他の強塩基も用いることができる。

【0359】

用いることのできる他の方法は、HClおよび標識MeOH、標識リン酸トリメチル、標識ジメチルスルホキシドおよび標識ホルムアルデヒドなどを含んでもよい。これらの合成の化学および一般的方法論はすべて当分野の技術者によく知られている。これらの例は、根本的な方法に言外の制限を加えることなく提供される。

【0360】

実施例5 - ブロッキングリガンド

チオフラビンTおよびチオフラビンSなどの化合物は、アミロイド沈着物を強力に染色する。しかしながら、図31は、そのような化合物がプリムリンによってもつれから置き換えられ得ることを示している。したがって、これらの化合物は、リガンドの凝集タウへの結合を阻害することなく、対象でない結合部位を飽和するブロッキング試薬として用いることができる。

【0361】

実施例6 - リガンド分子および阻害剤の比較

有効なリガンドである分子の活性には、タウ-タウ結合の有効な阻害剤である分子と比較して、根本的な相違があるようである。ベンゾチアゾール分子はPHFを乱さず、更にはいずれのリガンドも乱さないが、一連のジアミノフェノチアジンはPHF解離物質およびタウ凝集阻害剤である。

【0362】

更に凝集依存タウリガンドとタウ凝集阻害剤との関係の研究をプリムリンを用いて行った。溶液中のプリムリンは520nmに蛍光ピークを有する。これは、プリムリンがPHFの純粋調製物内で結合しているとき、470nmにシフトする(図6)。PHFの構造を解離し、遊離タウを放出する(ならびに、リシンの電荷を逆転する)ことが既に知られている無水シトラコン酸によるPHFの処理は、470nmの蛍光ピークを消滅させることがわかった(図7)。したがって、そのような化合物による結合はPHFに見出されるタウの重合状態に依存するが、遊離タウには存在しない。

【0363】

PHFの構造を乱し、PHFコアのタンパク分解安定性を覆す化合物が同定されている(WO 96/30766参照)。そのような化合物の例を添付の図8に示す。本発明者等は、これらの化合物が、高親和性タウ-タウ結合ドメイン内の特定の結合部位でタウに結合することをここに確認した。しかしながら、そのような化合物は、アルシアンプルーの存在下で470nmのプリムリンの蛍光ピークが保持されていることによって示されているように(図9)、凝集タウ分子においてプリムリンのタウへの結合を乱さない可能性のあることが明らかにされている。

【0364】

したがって、アルシアンプルーは、タウ-タウ相互作用を阻害できるが、阻害の部位、またはおそらくそれが作用する結合相互作用の順序のいずれかは、SBリガンドの結合部位

10

20

30

40

50

をそのまま残しておくようなものであると考えられる。したがって、凝集タウのリガンドとして作用する化合物は、タウ凝集阻害剤である化合物と同じ部位で結合しないが、それらの阻害剤の阻害性に影響を及ぼす可能性があると考えられる（下記の実施例7を参照）。

【0365】

この点に関しては、タウ凝集阻害剤としての典型的な凝集タウリガンドの効力を研究することによって更に調査した。タウ凝集阻害剤（例えば、ジアミノフェノチアジン）が固相アッセイにおいてタウ-タウ結合の阻害に基づいて同定され得ることが以前に示されている（W096/30766）。同じアッセイで試験を行ったとき、プリムリンおよびチアジンレッドはタウ-タウ結合の弱い阻害剤であることが判明した（図10）。したがって、これらの化合物は、PHFコア内のタウの有効なリガンドであるが、タウ-タウ結合の阻害が必要とされる部位ではよく見ても弱い阻害剤である。

10

【0366】

ジアミノフェノチアジン様クラスの化合物が凝集状態においてタウに結合することは、十分に高濃度の、特にメチレンブルーなどの化合物の存在下での、PHF構造の解離を、直接実証することによって示される。したがって、タウ-タウ結合の阻害剤であるジアミノフェノチアジン様クラスの化合物は、低濃度で凝集タウリガンドとして機能することができる。

【0367】

要約すると、本発明者等は、コアPHFタウ凝集内に2種類の結合部位を定義できることを見出した。両者ともに放射線画像化リガンドの開発に潜在的に有用である。

20

【0368】

(i) スルホン化ベンゾチアゾール様部位：テクネチウムなどの適切なキレートに結合するこのタイプの化合物は、その大きさおよび電荷によって、細胞外のもつれのリガンドとして役立つ可能性がある。

【0369】

(ii) ジアミノフェノチアジン様部位：そのような化合物は、ポジトロン放出官能基で適切に標識されたとき、すべてのタウ凝集のリガンドとして役立ち、また血液脳関門を通過し（参考文献36）、細胞に入ることができるであろう。したがって、これらの化合物およびその誘導体は、細胞内のもつれ、例えばAD患者の脳に存在するもつれの標識化、または低濃度で用いられるときの細胞内のもつれの標識化に使用が見込まれる。

30

【0370】

実施例7 - 阻害の軽減に基づいて更なる診断用リガンドを同定するアッセイ例

(i) 部分凝集が発生しているタウタンパク質の調製

この調製（「調製2」）は図32に図式的に示すが、以前に記載された方法（例えば、以下の(ii)に示すW096/30766に記載の方法「調製1」）とは異なる。

【0371】

組換えcDNAプラスミドは、その開示を参照により本明細書の一部とするW096/30766に記載のものである。

【0372】

簡潔に述べると、標準的なプロトコル（Sambrook, Fritsch & Maniatis “Molecular cloning. A Laboratory Manual” (1989) Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y.）を用いて、死亡3時間後にその組織を得たアルツハイマー患者の脳組織から単離したmRNAから、タウcDNAを作製した。このcDNAライブラリーを、PHFコアタンパク質の一部の配列に由来する合成17merオリゴヌクレオチドプローブでスクリーニングした（Goedert et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 4051-4055）。完全長cDNAクローンを、M13mp19のEcoRI部位にサブクローニングし、部位特異的突然変異を用いて開始コドンに関連したNdeI部位を導入した。NdeIおよびEcoRIによる切断後、結果として生じたcDNAフラグメントを、NdeI/EcoRI切断発現プラスミドpRK172のT7RNAポリメラーゼプロモーターの下流にサブクローニ

40

50

ングした (Mcleod et al. (1987) EMBO J., 6, 729-736)。p R K 1 7 2 は、p B R 3 2 2 コピー数制御領域の除去により、大腸菌で非常に多いコピー数で増殖する p B R 3 2 2 の誘導体である。このプラスミドは、組換えクローンを選択するためのアンピシリン耐性遺伝子を持つ。

【0373】

タウの短縮型をコードする c D N A 構築物は、Novak et al. (1993) EMBO J., 12, 365-370 に記載のとおり m R N A から調製した。この m R N A を、特定のオリゴヌクレオチドプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) の鋳型として用いた。センスプライマーは N d e I 部位を含有し、アンチセンスは E c o R I 部位を含有した。P C R フラグメントを、上記のとおり p R K 1 7 2 にサブクローニングした。dGAE の構築に用いたプライマーを図 2 2 に示す。発現に用いたすべての D N A フラグメントの确实性は、両鎖の完全長配列決定によって確認した。

10

【0374】

h タウ 4 0 (「T 4 0」) c D N A の構築に関する詳細は、(Goedert et al. (1989), Neuron 3: 519-526) に記載されている。この配列は、C N S において見出されたタウの最長型であり、2 つの N 末端にそれぞれ 2 9 のアミノ酸挿入およびチューブリン結合ドメインに余分の 3 1 のアミノ酸繰り返しを含有するタウタンパク質をコードする。D N A 配列およびその予想されるアミノ酸配列を図 2 1 に示す (配列番号 4)。

【0375】

組換えプラスミドを用いて、E . c o l i B L 2 1 (D E 3) 株を形質転換したが、この株は l a c U V 5 プロモーターの制御下にあるバクテリオファージ T 7 R N A ポリメラーゼ遺伝子の染色体コピーを有し、原核生物の発現に用いられる (Studier and Moffat (1986), J. Mol. Biol. 189, 113-130)。I P T G (イソプロピルチオガラクトダイス) によって指数増殖培養を 3 時間誘導した。

20

【0376】

タウフラグメントの大量精製 (1 リットル細菌培養) を、若干の変更を加え、Goedert and Jakes (1990, EMBO J., 9, 4225-4230) に記載のとおり行った。液体窒素中で細胞ペレットを急速に凍結することによって、細胞を破壊した。その後、ペレットを 5 0 m M の P I P E S、1 m M のジチオトレイトール (D T T) を含有するバッファー (p H 6 . 8) に懸濁した。上清中の熱安定性タンパク質を P I P E S / D T T に対して透析し、次いで、同じバッファーで平衡化したホスホセルロースを含有するカラムに添加した。上記のバッファー中 N a C l (0 ~ 0 . 5 M) 勾配を用いて、タウタンパク質を溶出した。画分を、S D S - P A G E、ならびにクマシー染色および免疫ブロット法の両方によって分析した。タウを含有するそれらの画分をプールし、2 5 m M の M E S、1 m M の D T T (p H 6 . 2 5) に対して透析し、約 5 m g / m l、- 2 0 で保存した。タンパク質濃度は、ローリー法によって測定した (Hrrington CR (1990), "Lowry protein assay containing sodium dodecyl sulphate in microtitre plates for protein determinations on fractions from brain tissue", Analytical Biochemistry 186: 285-287)。

30

【0377】

調製 2 は以下の点で調製 1 と異なる。(1) 超音波破碎段階の細胞濃度を 5 倍増加する。(2) 非タウタンパク質の D E 5 2 へのバッチ式吸収を含む。(3) タンパク質は熱処理に供しない。(4) 最終ステップはポリエチレングリコールを用いる濃縮を含む。

40

【0378】

Escherichia coli を、アンピシリン (5 0 μ g / m l) を添加した 2 x T Y 培地 (O x o i d) で対数期後期に増殖させた。5 L の培養から遠心分離によって細胞を集め、細胞ペレットを液体窒素で急速に凍結した。ペレットを、1 m M の E D T A、1 m M のジチオトレイトール、および 1 m M のフッ化フェニルメチルスルホニル (P M S F) を含有する 5 0 m M の P I P E S (p H 6 . 8) に溶解し、4 で超音波破碎 (2 x 3 分) によって細菌溶解した。混合物を 1 0 0 0 0 r p m で 2 0 分間遠心分離した。上清を 1 g の W h a t m a n D E 5 2 と 4 で 3 時間回転した。混合物をカラムで分離し、D E 5 2 に結合しない

50

フロースルー材料を、回転させながら、0.4gのWhatman P11 (製造者の推奨に従って新しく再生)と共に4で3時間インキュベートする。カラムをカラム緩衝液 (1mMのEGTA、5mMのEDTA、0.2mMのMgCl₂、5mMのβ-メルカトエタノール、および1mMのPMSFを含有する50mMのPIPES、pH6.8)で洗浄した。タウタンパク質を、カラムバッファー中KClの0.1から1M勾配で段階的に溶出した。タウ含有画分 (免疫検定によって判定) をプールし、阻止分子量1000の透析チューブを用いて、1mMのEGTA、1mMのMgCl₂、および5mMのβ-メルカトエタノールを含有する80mMのPIPES (pH6.8) に対して透析した。袋の外側にポリエチレングリコール8000を2~3時間適用することによって、透析物を濃縮した。タウの最終濃度は、3から10mg/mlであった。

10

【0379】

典型的な大量分取実験において、DE52に結合しない材料からタウの特定の免疫反応性はおおよそ30から40倍に精製される。最終生成物にタウの約60%が回収され、P11に結合しない材料に10%が回収され、残りはカラムを通過した画分に回収される。

【0380】

表3は、dGAの分取実験の詳細を示す。「精製倍数」は、各画分の特定の免疫反応性 (すなわち、免疫反応性/タンパク質濃度) の、DEフロースルー中の特定の免疫反応性に対する比として表す。

【0381】

【表4】

20

	Vol (ml)	mg/ml	AU/ml	AU	AU/mg	精製 (倍)	回収率 (%AU)
全細胞	200	26	40000	8000000	1538		
DEフロースルー	240	20	40000	9600000	2000	1.00	100%
P11フロースルー	220	19	5000	1100000	263		P11フロースルーに11%
画分 (各6ml)	#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	プール画分に62%
	#7	2.71	200000	1200000	73746	37	
	#8	2.70	125000	750000	46296	23	
	#9	2.20	100000	600000	45537	23	廃棄画分に20%
	#10	1.83	80000	480000	43764	22	
純粋dGA	14.5	8.4	600000	8700000	71429	36	

30

【0382】

図33は、表3のデータをグラフにプロットしたものである。

【0383】

【表5】

表4は、タウタンパク質種、dGA、dGAE、およびhT40の典型的な分取実験からの収量を要約するものである。

タウ調製	各項目に基づくタンパク質濃度 (mg/ml) :		免疫反応性 (mAb 7/51; AU/ml)	タンパク質収量 (10 litres当り)
	280 nm の吸収	タンパク質アッセイ (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

吸光係数に基づく		280 nmの吸収
BSA (参照)	10 mg/ml	6.6
タウタンパク質	10 mg/ml	14.7

10

【0384】

タンパク質は、室温で、PBSバッファーで平衡化した50×1cmセファロースCL-6Bゲル濾過カラムに流すことによって分離した。12,400から200,000の範囲の分子量マーカーをカラムに流して、そのカラムの分子量標準曲線を作成した。標準曲線は、各タンパク質標準について V_e/V_o に対する分子量 kD の \log_{10} をプロットして作成したが、ここで V_e は、標準の溶出量であり、 V_o はブルーデキストランで求めたカラムの排除容量である。

20

【0385】

5%グリセロールを含有するバッファー0.5mlにT40またはdGAEを負荷し、1mlの分画で採取した。画分におけるタンパク質の存在は、分光測光法で280nmの吸収によって判定した。dGAEまたはT40の存在は、それぞれモノクローナル抗体7/51または499を用いてELISAによって検出した。ELISAアッセイは、以下のとおり96ウェルPVCプレートで行った。

【0386】

各画分のサンプル50 μ lを、37で1時間インキュベートし、プレートを0.05% Tween 20で洗浄、次いで、結合部位を、PBS 200 μ l + 2%無脂肪乳粉末によって37で1時間ブロックした。プレートを、0.05% Tween 20で洗浄し、PBS + 2%無脂肪乳粉末に1:10で希釈した1次抗体50 μ lと、37で1時間インキュベートした。プレートを、0.05% Tween 20で洗浄し、PBS + 2%無脂肪乳粉末に希釈した2次抗体(ヤギ抗マウスIgG:HRPコンジュゲート)50 μ lと、37で1時間インキュベートした。プレートを、0.05% Tween 20で洗浄し、次いで、脱イオン水で洗い流し、新しく調製した基質(H_2O_2 を含む酢酸ナトリウムバッファーpH 5.0中TMB[テトラメチルベンジジン]、新しく調製)50 μ lを加え、2分間に亘ってOD 650の変化率を読み取った。

30

【0387】

精製dGAEおよび精製T40の溶出プロファイルを、図34(dGAE)および35(hT40)に示す。これらのフラグメントは、典型的にそれぞれ約12kDおよび55kDに流出するが、約64%のmAb 7.51免疫反応性(dGAE)が15kDを超えるサイズの種に対応する画分に溶出し、約50%のmAb 499免疫反応性(hT40)が60kDを超えるサイズの種に対応する画分に溶出した。したがって、タウタンパク質は、少なくとも一部は、あらかじめ凝集した形態で存在する。

40

【0388】

(ii) タウタンパク質の異なる調製を用いて測定されたタウ凝集阻害剤の効果
タンパク質dGAおよびdGAEを上を示したとおりに調製した場合(「調製2」)、タウ-タウ結合アッセイの特性は、W096/30766に記載の調製方法(「調製1」)を用いて得られた特性と比べて変化していた。

50

【0389】

このアッセイは、96ウェルPVCプレート(Falco catalog番号353912を用いた)を用い、および以下のステップによって行う。

1. 炭酸塩バッファー中のdGA($\sim 10 \mu\text{g}/\text{ml}$) $50 \mu\text{l}$ 、37 で1時間インキュベートする。

(炭酸塩バッファー: 50mM の炭酸塩/重炭酸塩、 $\text{pH} 9.6$ (Na_2CO_3 $1.59 \text{g}/\text{l}$ 、 NaHCO_3 $2.93 \text{g}/\text{l}$))

2. プレートを0.05% Tween 20で洗浄する。

3. $200 \mu\text{l}$ PBS + 2% Marvelを、37 で1時間インキュベートする。

4. プレートを脱イオン水で2回で洗い流し、次いで、0.05% Tween 20で洗浄する。 10

5. PBS + 1% 魚皮ゼラチン + 0.05% Tween 20中dGAE($\sim 10 \mu\text{g}/\text{ml}$)および薬物の $50 \mu\text{l}$ 、37 で1時間インキュベートする。

6. プレートを0.05% Tween 20で洗浄する。

7. $50 \mu\text{l}$ の抗体423(PBS + 2% Marvelに1:10で希釈)、37 で1時間インキュベートする。

8. プレートを脱イオン水で2回ですすぎ、次いで、0.05% Tween 20で洗浄する。

9. $50 \mu\text{l}$ のHRP抗マウス(PBS + 0.05% Tween 20に1:1000で希釈)、37 で1時間インキュベートする。 20

10. プレートを0.05% Tween 20で洗浄し、次いで、脱イオン水で1回ですすぎ。

11. 基質溶液 $50 \mu\text{l}$ 、プレートリーダにおいてOD650で直ちに2分間に亘って最初の率を読み取る。

【0390】

(基質溶液: 50mM 酢酸ナトリウム、 $\text{pH} 5.0$ + TMB(DMSO中 $10 \text{mg}/\text{ml}$ 溶液 100ml 中に 1ml) + H_2O_2 ($10 \mu\text{l}/100 \text{ml}$))

【0391】

化合物チオニンおよび塩化トロニウムは、阻害効果を及ぼすには調製1に比べて調製2において高い濃度を要することが見出された。これは図36および37に示す。更に、化合物ジメチルメチレンブルー(DMMB)は、調製1に比べて調製2において高い阻害効力を有することが見出された。これを、図38に示す。 30

【0392】

調製1の方法によって調製されたタウタンパク質においても同様の相違が認められたが、これは経時的に*in vitro*で凝集させたものであり、この作用に関しては以下のように解釈される。タウ-タウ結合の最大の阻害を得るためには2つの効果が達成されなければならないので、チオニンおよび塩化トロニウムなどの化合物のより高い濃度が必要とされる。

1. 水相においてあらかじめ存在する凝集の解離、

2. 水相種の固相との結合の阻害である。 40

【0393】

調製2のアッセイにおけるDMMBの高い効力は、両方の阻害効果に必要とされる作用部位での高い結合親和性によって説明できる。

【0394】

調製2のプロトコルに従って調製された完全長タウタンパク質(hT40)は、固相中のdGAと共に水相中で用いられたとき、最小のタウ-タウ結合活性を示した。しかしながら、hT40が固相で用いられたとき、dGAEの結合は、固相のdGAとのdGAEの結合に関して得られたものと類似していた(図39a~cを参照のこと)。これは、水相で形成されたhT40凝集において、固相のdGAとの結合相互作用に必要とされるドメイン内、またはドメインを貫いて既にタウ-タウ結合が生じているためであると解釈される。hT 50

40が固相において最初にプレートされるとき、PVCとの結合は、必要なタウ-タウ結合部位が利用できるようなやり方でタンパク質/凝集を開く。

【0395】

(iii) タウタンパク質の異なる調製を用いて測定されたタウ凝集阻害剤の効果調製2のアッセイ形式において、プリムリンおよびチアジンレッドに代表される類の有効なリガンドは、タウ-タウ結合に阻害活性を示さない。これを図40に示す(図10を参照)。更にはこのアッセイにおいて、これらの化合物は100 μ Mを超える濃度で(すなわち、タウタンパク質に関して100倍のモル比)タウ-タウ結合を増強する。

【0396】

DMMBは典型的に、DMMBの不在下で認められるタウ-タウ結合に比べて、DMMB 5 μ Mで23%、DMMB 15 μ Mで17%のタウ-タウ結合(タウは典型的に1 μ Mで存在)まで低下させる。

【0397】

予期せぬことに、この阻害効果は、増加濃度のプリムリンおよびチアジンレッドに代表される高親和性リガンドの存在下で共インキュベートすることによって完全に覆され得る。これを図41に示す。

【0398】

したがって、凝集タウリガンドは機能上、それ自体ではタウ-タウ結合を阻害しないが、タウ-タウ結合の有効な阻害剤の阻害効果をブロックする化合物として特徴づけることができる。

20

【0399】

図42からわかるように、DMMBによって生じるタウ-タウ結合の阻害は、増加する過剰モルのプリムリン存在下で、漸進的に減衰および逆転する。チアジンレッドに関しても同様の効果が示される。これは、DMMBの最大阻害効果はこれらの化合物によって低減され、したがってこれらの化合物はDMMBの非競合的阻害剤として作用していることを示唆している。これらのリガンドが、例えばDMMB活性に必要な臨界結合ドメインの外側の領域においてこのアッセイに用いたタウ凝集を安定させ、したがってDMMBのタウ-タウ結合への阻害効果を妨げるとというのが、1つの考え得る説明であるかもしれない。

【0400】

図43~45は、DMMBの任意の所与の濃度に関して、プリムリン(43、44)またはチアジンレッド(45)の存在下で、タウ-タウ結合に、標準的なミカエリス-メンテン式によってモデル化することのできる量的増加があることを示している。このことは、これらのリガンドのタウ凝集増強効果が、おそらくはアッセイの水相に導入されたタウ凝集内の、占領されたリガンド結合部位の割合に比例することを示唆している。両方のリガンドの平均B_{max}値は約1.6である。すなわち、最大リガンド効果は、薬物不在下で認められるタウ-タウ結合シグナルの1.6倍となる。この効果の平均K_d値は約15倍である。すなわち、DMMBの>4 μ Mの任意の所与の濃度に関して、リガンドのモル過剰がDMMB濃度に比べて15倍であるとき、最大増加の50%のタウ-タウ結合を認めることができる。

30

【0401】

実施例8 - 本発明で提供されるリガンドに基づく更なる診断用リガンドを同定するためのアッセイ例

上記のようにADのPHFを標識するのに適した2種のリガンドが、既に定義されているので、スクリーニングアッセイでこれらの化合物/誘導体を用いて更なるリガンドを開発することができる。更に、モデル化の方法は、既に提示されたリガンドに基づくことができる。

40

【0402】

(i) スルホン化ベンゾチアゾール部位の新規リガンドの同定

凝集タウ分子(例えば、溶液中のあらかじめ凝集したタウ、固相との結合、またはADの脳から単離された高密度PHF、W096/30766を参照)の調製物とインキュベートした公知

50

のスルホン化ベンゾチアゾールの適切に標識された調製物を用いて、適切なリガンドであると思われる化合物を導入することができ、PHF内の結合を妨げるような方法で既知のリガンドと競合するそれらの化合物の能力を試験することができる。

(ii) フェノチアジン部位の新規リガンドの同定

タウ-タウ結合部位における潜在的阻害剤を同定するために、1次スクリーニングとして、W096/30766に記載のタウ-タウ結合アッセイを用いることができる。同様に、上記の凝集タウと共にインキュベートした公知のジアミノフェノチアジンの適切に標識された調製物を用いて、このPHF結合部位の競合物であり、したがって潜在的に適切なPHFリガンドであると思われる他の物質をスクリーニングすることができる。

【0403】

競合アッセイの物理的手段は当分野においてよく知られている。そのなかには、PHFに結合していないスルホン化ベンゾチアゾール様化合物またはジアミノフェノチアジン様化合物、すなわち溶液に残存している化合物に由来する蛍光、放射能、または他の任意の適切なレポートシステムの測定を含むことができる。

【0404】

【表6】

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;
- 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; 10
- 6 Fox, N.C. (1999) *Neurol.* 52, 1687-9;
- 7 Jack, C.R. et al. (1997) *Neurol.* 49: 786-794;
- 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; 20
- 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. 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; 30
- 20 Marin, D.B. et al. (1998), *Artherosclerosis* 140, 173-180;
- 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;
- 26 Mena, R. et al. (1995), *Acta Neuropathol.* 89, 50-6;
- 27 Mena, R. et al. (1996), *Acta Neuropathol.* 91, 633-641; 40

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;

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.

10

【図面の簡単な説明】

【0405】

【図1】図1は、ADの18症例に関して、抗体mAb423(A)、またはPHF画分のギ酸処理後mAb7.51(B)を用いて測定したPHFタウの部位分布を示す図である。Mukaetova-Ladinska et al., (1993), *Am. J. Pathol.* 143, 565-578から引用。

20

【図2a】図2(a)は、(Mukaetova-Ladinska, E. B. et al., (2000), *Am. J. Pathol.* Vol.157, No. 2, 623-636)から引用した、ADの病理学的病期におけるタウ分子の凝集および神経原線維のもつれの出現を示す図である。

【図2b】図2(b)は、Braakによって提示された神経病理学的病期分類を示す図である。

【図2c】図2(c)は、DSM-IV判定基準による臨床痴呆の出現が病期IIIから病期IVの移行に統計的に一致すると考えられることを示す図である。

【図2d】図2(d)は、Harrington et al., (*Am J Pathol* 1994; 145: 1472-1484)に報告されている、対照症例およびアルツハイマー病を有する症例から単離されたSDS不溶性ベータアミロイドタンパク質のレベルを示す図である。ADの平均レベルは対照より

30

【図3】図3は、神経原線維のもつれの概略図(上)、および疾患進行中に観察される免疫反応性変化(下)を示す図である。Bondareff et al., (1994), *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53, 2, 158-164から引用。

【図4】図4は、凝集タウ分子に高親和性で結合できる最小限界構造(化合物4a)、化合物4aのピオチン化型(化合物4b)、およびRが任意の適切な置換基である化合物4aのR置換誘導体(化合物4c)の化学構造を示す図である。

【図5】図5は、プリムリン(化合物1a)、チオフラビンT(化合物1b)、2-(4-アミノフェニル)-6-メチル-1-スルホネートベンゾチアゾール(化合物2)、チアジンレッド(化合物3a)、およびチアジンイエロー(化合物3b)の化学構造を示す図である。

40

【図6】図6は、溶液中プリムリン(左)、およびPHFの純粋調製物中結合時(右)の蛍光ピークを示す図である。

【図7】図7は、無水シトラコン酸の不在下(左)および存在下(右)でPHFに結合したプリムリンの蛍光ピークを示す図である。示されているように、無水シトラコン酸は、PHFの規則正しい構造を乱し、遊離タウおよび遊離非結合プリムリンを放出する作用を有する。無水シトラコン酸はまた、リシン残基の電荷を逆転する作用を有し、これもプリムリンの放出において役割を果たし得る。

【図8a】図8aは、WO 96/30766に開示されている、例示的タウ-タウ結合阻害剤を示

50

す図である。

【図 8 b】図 8 b は、WO 96/30766に開示されている、例示的タウ - タウ結合阻害剤を示す図である。

【図 9】図 9 は、アルシアンブルーの存在下で P H F に結合したプリムリンの蛍光を示す図である。この図は、P H F 構造の攪乱物質である（参考文献 3 3）アルシアンブルーの存在下、4 6 0 n m の特徴的な結合プリムリン蛍光ピークに乱れのないことを示している。

【図 1 0】図 1 0 は、WO 96/30766に記載され、本明細書において「調製 1」と称する方法に従って調製されたタウタンパク質を用いる、タウ - タウ結合への種々の化合物（「M R」、化合物：タウのモル比）の効果を示す図である。

【図 1 1 a】図 1 1 a は、 $[^{11}\text{C}]$ 標識メチレンブルーの合成を概略的に示す図である。この反応は、 $[^{11}\text{C}]$ ヨードメタンによるアミンの N - メチル化を経て進行する。H P L C を用いて、任意の副生成物から所望の生成物を精製することができる。

【図 1 1 b】図 1 1 b は、チオニン、Na H、および $\text{C H}_3\text{I}$ に基づく更なる合成を示す図である。

【図 1 2】図 1 2 は、 $[^{11}\text{C}]$ 標識アズール B の合成を概略的に示す図である。この反応は、 $[^{11}\text{C}]$ ヨードメタンによるアミンの N - メチル化を経て進行する。H P L C を用いて、任意の副生成物から所望の生成物を精製することができる。

【図 1 3】図 1 3 は、図 4 の化合物 4 a の $[^{18}\text{F}]$ 標識誘導体の合成を概略的に示す図である。この反応は、前駆体化合物のニトロ基を $[^{18}\text{F}]$ フルオロ基に置き換える求核芳香族置換を経て進行する。H P L C を用いて、任意の副生成物から所望の生成物を精製することができる。

【図 1 4】図 1 4 は、プリムリン、ベンゾチアゾール類似体、およびチアジンイエローの構造を示す図である。これらの分子の大きさは、各分子について A および B と示した、結晶構造からわかる C - C 距離に基づいて決定された。C - C 距離は以下のとおりである。

プリムリン	最小値	1 4 . 7 8 A U	類似体	最小値	1 5 . 1 1 A U
	平均値	1 4 . 9 5 A U		平均値	1 5 . 0 5 A U
	最大値	1 5 . 2 6 A U		最大値	1 5 . 1 7 A U
チアジンイエロー	最小値	1 5 . 7 3 A U		最大値	1 6 . 1 4 A U
	平均値	1 5 . 9 3 A U			

【図 1 5】図 1 5 は、プリムリン構造の「B」部分の結晶構造を示す図である（Soon-Ben g Teo et al., 1995, Acta Crystallogr., Sect. C, 591）。

【図 1 6】図 1 6 は、プリムリン構造の「B」部分の結晶構造を示す図である（Soon-Ben g Teo et al., 1995, Acta Crystallogr., Sect. C, 591）。

【図 1 7】図 1 7 は、N 2 A と示す化合物の結晶構造を示す図である（Gilardi, R.D., 19 72, Acta Chrystallogr. Sect. B, 107）。

【図 1 8】図 1 8 は、N 2 A と示す化合物の結晶構造を示す図である（Gilardi, R.D., 19 72, Acta Chrystallogr. Sect. B, 107）。

【図 1 9】図 1 9 は、ジアゾアミノベンゼンの結晶構造を示す図である（Gldkova & Kond rashev, 1972, Kristallografiya (41) 17 33）。

【図 2 0】図 2 0 は、ジアゾアミノベンゼンの結晶構造を示す図である（Gldkova & Kond rashev, 1972, Kristallografiya (41) 17 33）。

【図 2 1】図 2 1 は、図 1 5 および 1 6 の分子が空間でどのように結晶化するのかを例示する図である。

【図 2 2】図 2 2 は、図 1 5 および 1 6 の分子が空間でどのように結晶化するのかを例示する図である。

【図 2 3】図 2 3 は、活性リガンドである分子（プリムリン、および「類似体」）、およびチアジンイエロー（リガンドとして不活性である）の平均、最大、および最小値の広がり示す図である。寸法はオングストローム単位（A U）で示す。

【図 2 4】図 2 4 は、基本的なベンゾチアゾール核（すなわち、図 5 の分子 1 b および 2

10

20

30

40

50

）、およびジアミノフェノチアジンの同様の比較を示す図である。これらの距離は、炭素から炭素の距離である。

【図25】図25は、Braakの病期分類の関数として、細胞外のもつれの可能性を示す図である。E2/TransおよびE4/HCにおける細胞外のもつれの確率に基づいて、病期2～4は病期1と明確に区別することができる。

【図26】図26は、Braakの病期分類の関数として、細胞内のもつれの可能性を示す図である。細胞内のもつれは、これらの領域における初期の識別の根拠には不十分であるが、新皮質領域を用いる病期4および5の識別では良好な根拠を提供する。

【図27】図27は、図25に対応する図であるが、ここでは死亡の12カ月前にMMSEスコアが21を超える症例が選択された。類似の結果が得られる。

【図28】図28は、図26に対応する図であるが、死亡の12カ月前にMMSEスコアが21を超える症例の使用が選択された。類似の結果が得られる。

【図29】図29は、Braakの病期分類の関数として、細胞外のもつれの密度(mm^2 当たりのカウント)を示す図である。図25に示したものと類似の結果が得られる。

【図30】図30は、Braakの病期分類の関数として、細胞内のもつれの密度(mm^2 当たりのカウント)を示す図である。

【図31a】図31aは、0.001%のチオフラビンTによって視覚化した、かすかに認められるもつれを示す図である(矢印)。このようなifI懸濁液において、もつれは青色蛍光により見ることができ、これは調製物内の不純物の結合に関連するものと区別されない。下のパネルは、0.001%のチオフラビンTにより生じた青色のもつれの蛍光が、0.001%のプリムリンにより生じた黄色のもつれの蛍光に置き換わっていることを示している。

【図31b】図31bは、プロナーゼ消化後、標識されたPHFの電子顕微鏡検査を示す図である。(a)図4に4bとして示したビオチン化ベンゾチアゾール類似体による化学標識。PHFを、プロナーゼ消化後、炭素被覆グリッドに沈着させ、化合物4bと共に短時間インキュベートし、その後、金コロイドと共役させた抗ビオチン抗体調製物と共にインキュベートした。単離PHFのラベル(decoration)は、化合物4bのタンパク質分解的に安定なPHF構造への結合を確認する。(b)Novak et al. 1993(Novak M, Kabat J, Wischick CM (1993) "Molecular characterization of the minimal protease-resistant tau unit of the Alzheimers' disease paired helical filament", EMBO J 12: 365-370)に記載の、プロナーゼ消化後単離PHFのmAb 423免疫標識、それに続く、金共役ヤギ抗マウス2次抗体とのインキュベート。本明細書に示すように、mAb 423は、細胞内のもつれ(ファジーな外殻内でN末端タウ免疫反応性を保護する)由来のPHFを不十分に標識するが、プロナーゼ消化PHFを強く標識する。同様に、Mena et al. (1996)(Mena R, Edwards PC, Harrington CR, Mukaetova-Ladinska EB, Wischick CM, "Staging the pathological assembly of truncated tau protein into paired helical filaments in Alzheimer's disease", Acta Neuropathol 91: 633-641)は、細胞内のもつれにおいて、mAb 423の免疫反応性は大幅に閉鎖されるが、切片のギ酸前処理によって露出され得ることを示している。

【図32】図32は、下の実施例7に記載する、精製タウタンパク質の「調製2」を示す図である。

【図33】図33は、dGAEの調製実験の結果をグラフにプロットした図である。「精製倍数」は、各画分の特定の免疫反応性(すなわち、免疫反応性/タンパク質濃度)の、DEフローズルー中の特定の免疫反応性に対する比として表す。

【図34】図34は、精製dGAEのゲル濾過クロマトグラフィーを示す図である。非変性条件での外見上溶出サイズ: 1~約320kD、2~約80kD、3~約30kD、4~約10kD。mAb 7.51免疫反応性の約64%が、サイズ>15kDの種に対応する画分に溶出する。

【図35】図35は、精製T40のゲル濾過クロマトグラフィーを示す図である。非変性条件における外見上溶出サイズ: 1~約450kD、2~約160kD、3~約55kD

10

20

30

40

50

。m A b 4 9 9 免疫反応性の約 5 0 % が、サイズ > 6 0 k D の種に対応する画分に溶出する。

【図 3 6】図 3 6 は、調製 1 および 2 におけるタウ - タウ結合に対するチオニン活性を示す図である。

【図 3 7】図 3 7 は、調製 1 および 2 におけるタウ - タウ結合に対する塩化トロニウム活性を示す図である。

【図 3 8】図 3 8 は、調製 1 および 2 におけるタウ - タウ結合に対する D M M B 活性を示す図である。

【図 3 9 a】図 3 9 a ~ c は、調製 2 プロトコルに従って調製された完全長タウタンパク質 (h T 4 0) が、固相 (b) 中の d G A とともに水相で用いられた場合、最小のタウ - タウ結合活性を示したことを示す図である。しかしながら、h T 4 0 が固相 (c) で用いられた場合、dGAE の結合は、固相 (a) 中の d G A への dGAE の結合に関して得られたものと類似していた。

10

【図 3 9 b】図 3 9 a ~ c は、調製 2 プロトコルに従って調製された完全長タウタンパク質 (h T 4 0) が、固相 (b) 中の d G A とともに水相で用いられた場合、最小のタウ - タウ結合活性を示したことを示す図である。しかしながら、h T 4 0 が固相 (c) で用いられた場合、dGAE の結合は、固相 (a) 中の d G A への dGAE の結合に関して得られたものと類似していた。

【図 3 9 c】図 3 9 a ~ c は、調製 2 プロトコルに従って調製された完全長タウタンパク質 (h T 4 0) が、固相 (b) 中の d G A とともに水相で用いられた場合、最小のタウ - タウ結合活性を示したことを示す図である。しかしながら、h T 4 0 が固相 (c) で用いられた場合、dGAE の結合は、固相 (a) 中の d G A への dGAE の結合に関して得られたものと類似していた。

20

【図 4 0】図 4 0 は、プリムリン、およびチアジンレッドが、調製 2 においてタウ - タウ結合に対して阻害活性を持たず、更には高濃度でそのような結合を増強することを示す図である。

【図 4 1 a】図 4 1 a は、D M M B に対する「モル過剰」と表した増加濃度のプリムリン (a) の存在下での、タウ - タウ結合に対する 5 μ M の D M M B の阻害作用のブロッキングを示す図である。

【図 4 1 b】図 4 1 b は、D M M B に対する「モル過剰」と表した増加濃度のチアジンレッド (b) の存在下での、タウ - タウ結合に対する 5 μ M の D M M B の阻害作用のブロッキングを示す図である。

30

【図 4 1 c】図 4 1 c は、D M M B に対する「モル過剰」と表した増加濃度のプリムリン (c) の存在下、1 5 μ M D M M B の阻害作用のブロッキングを示す図である。1 5 μ M D M M B に対しても類似の結果が示される。

【図 4 1 d】図 4 1 d は、D M M B に対する「モル過剰」と表した増加濃度のチアジンレッド (d) の存在下、1 5 μ M の D M M B の阻害作用のブロッキングを示す図である。1 5 μ M D M M B に対しても類似の結果が示される。

【図 4 2】図 4 2 は、増加する過剰モルのプリムリン存在下での、D M M B によるタウ - タウ結合の阻害の減衰および逆転を示す図である。各グラフに関して、示した D M M B 濃度の 0 x、1 x、5 x、1 0 x、1 0 0 x のプリムリンと共にインキュベートされた一定濃度の D M M B の存在下でのタウ - タウ結合が示される。D M M B によって生じたタウ - タウ結合の阻害は、増加する過剰モルのプリムリンの存在下、漸進的に減衰および逆転する。

40

【図 4 3】図 4 3 は、2 5 μ M の D M M B、および示したとおりの増加する過剰モルのプリムリンの存在下でのタウ - タウ結合曲線を示す図である。タウ - タウ結合は以下のようにモデル化できる。結合 = (B M a x x [P r i m]) / (K d + [P r i m]) ここで、B M a x = 1 . 6 7 K d = 1 3 . 3 7 r = 0 . 9 7 7 (実測値対予測値)

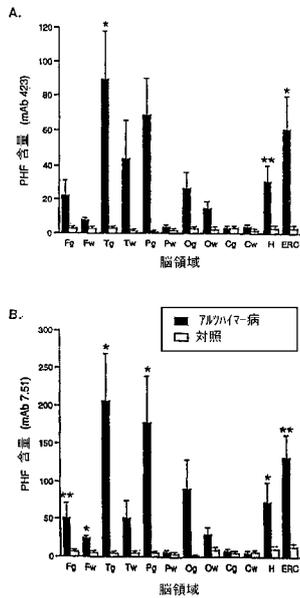
【図 4 4】図 4 4 は、5 μ M の D M M B、および示したとおりの増加する過剰モルのプリ

50

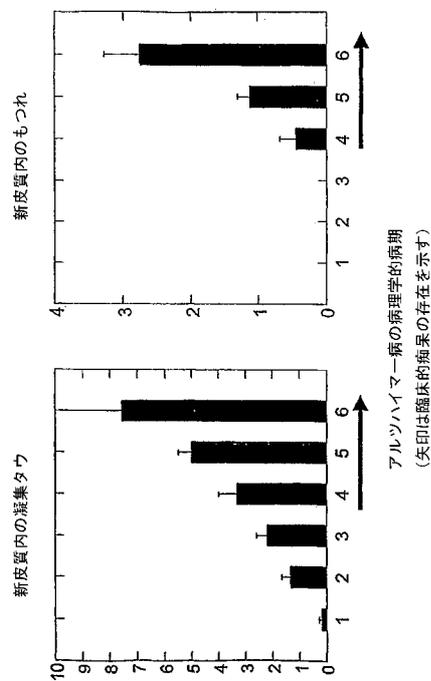
ムリンの存在下でのタウ - タウ結合曲線を示す図である。タウ - タウ結合は以下のようにモデル化できる。 $結合 = (B_{Max} \times [Prim]) / (Kd + [Prim])$ ここで、 $B_{Max} = 1.38$ $Kd = 13.86$ $r = 0.927$ (実測値対予測値)

【図45】図45は、5 μ MのDMMB、および示したとおりの増加する過剰モルのチアジンレッドの存在下でのタウ - タウ結合曲線を示す図である。タウ - タウ結合は以下のようにモデル化することができる。 $結合 = (B_{Max} \times [TR]) / (Kd + [TR])$ ここで、 $B_{Max} = 1.64$ $Kd = 17.45$ $r = 0.915$ (実測値対予測値)

【図1】

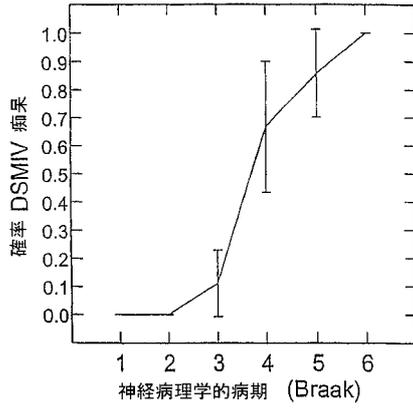


【図2a】

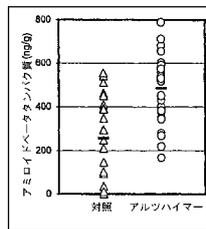


アルツハイマー病の病理学的病期
(矢印は臨床的病期の存在を示す)

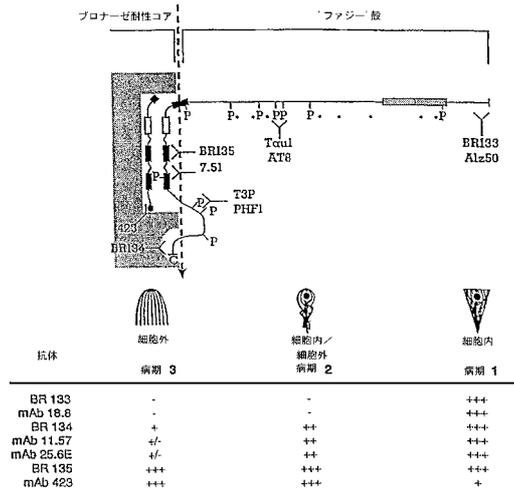
【図 2 c】



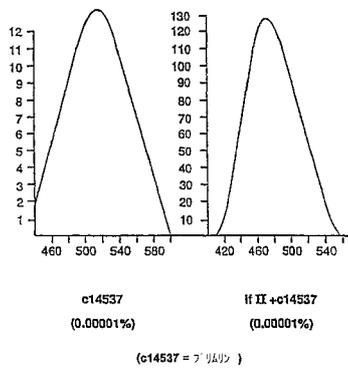
【図 2 d】



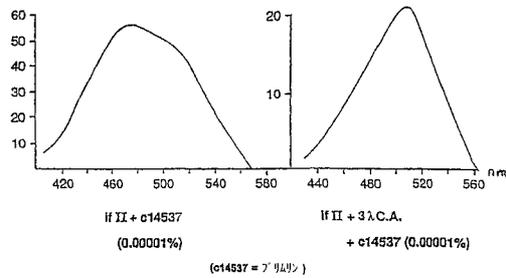
【図 3】



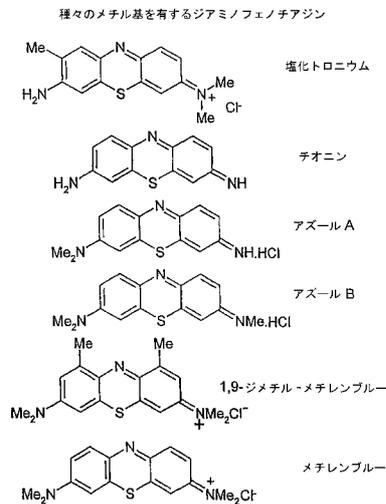
【図 6】



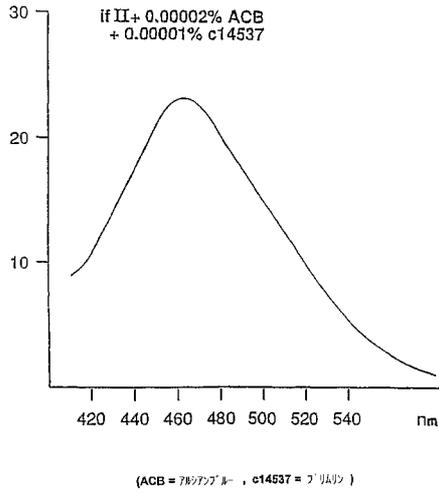
【図 7】



【図 8 b】

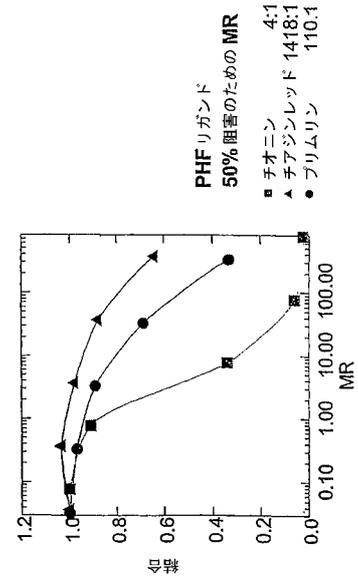


【 図 9 】



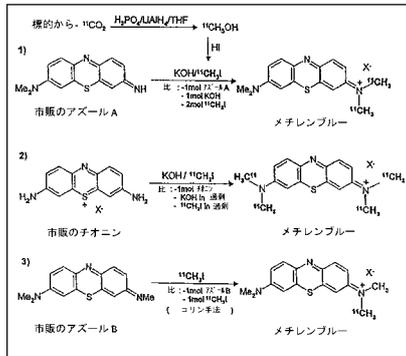
【 図 10 】

タウータウ結合とモル比 (化合物: タウ)
チオニンとPHF-リガンド



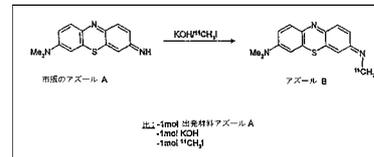
【 図 11 a 】

¹¹C 標識メチレンブルーの合成

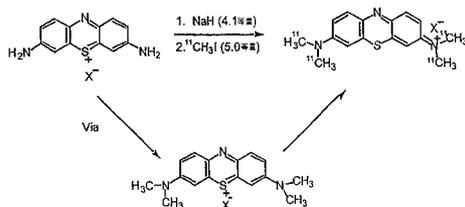


【 図 12 】

¹¹C 標識アズール B の合成

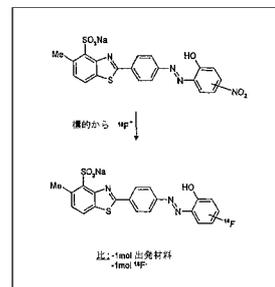


【 図 11 b 】

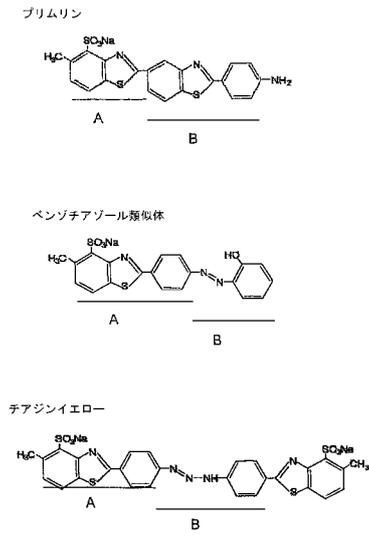


【 図 13 】

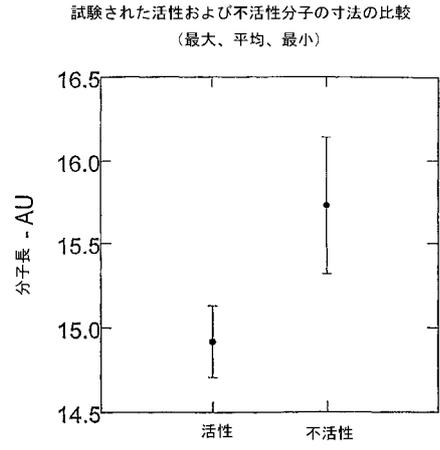
¹⁸F 標識の合成



【 図 1 4 】

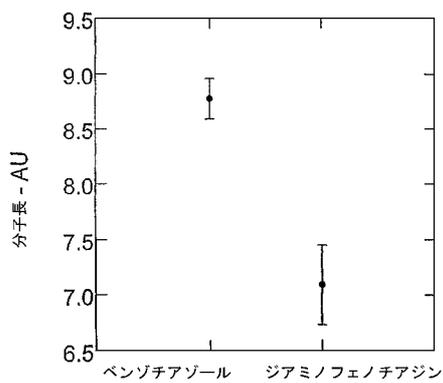


【 図 2 3 】



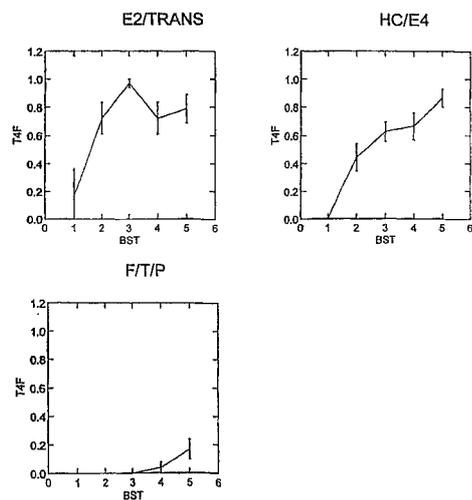
【 図 2 4 】

ベンゾチアゾールとジアミノフェンチアジン分子の寸法の比較
(最大、平均、最小)



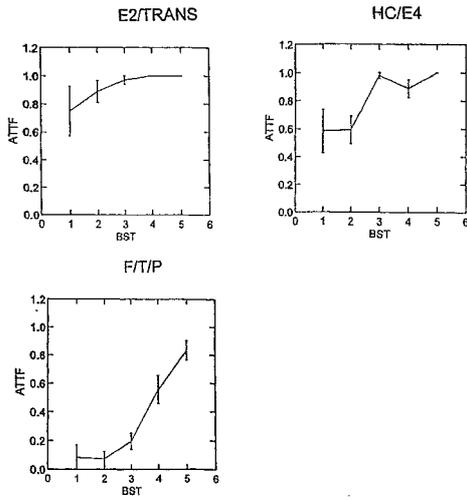
【 図 2 5 】

領域および病期による423-Tの確率



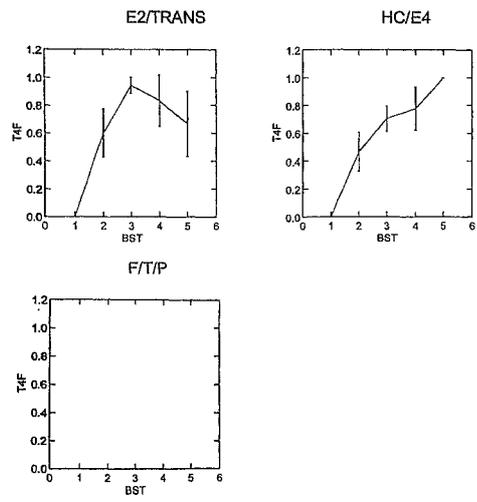
【 図 2 6 】

領域および病期によるAT8-Tの確率



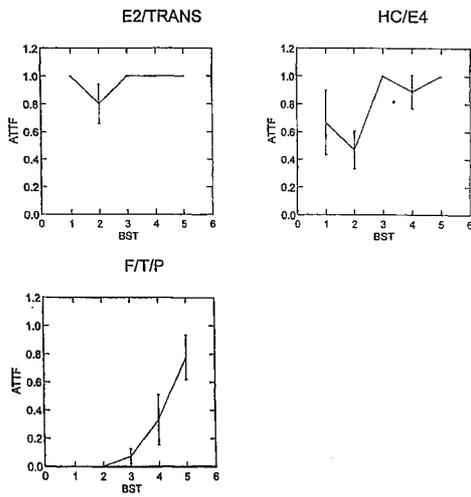
【 図 2 7 】

領域および病期による423-Tの確率
MMSE > 21



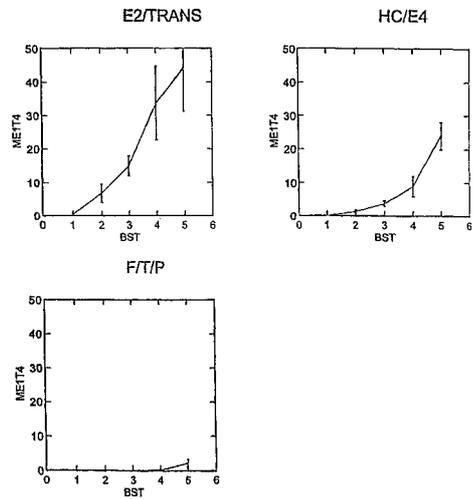
【 図 2 8 】

領域および病期によるAT8-Tの確率
MMSE > 21

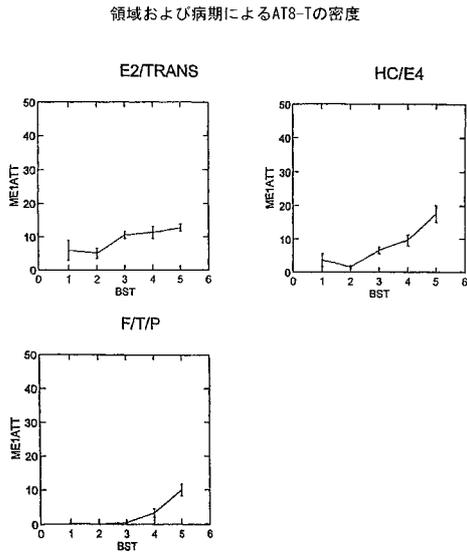


【 図 2 9 】

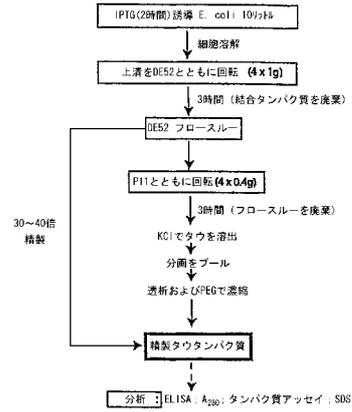
領域および病期による423-Tの密度



【 図 3 0 】

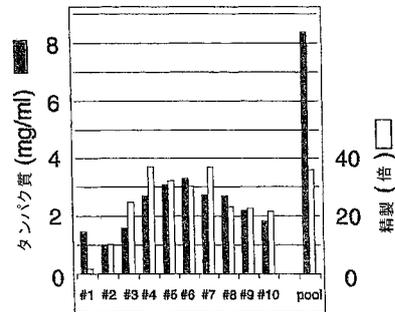


【 図 3 2 】

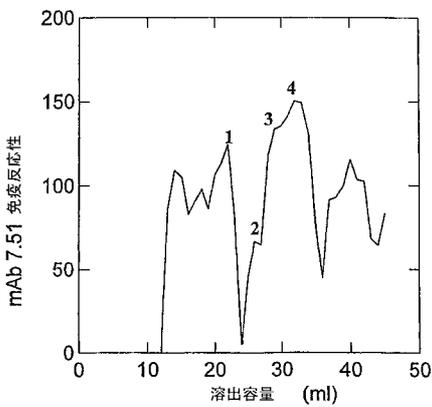


【 図 3 3 】

P11クロマトグラフィー: dGA

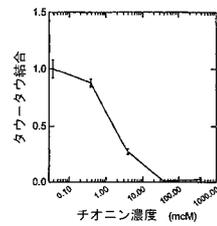


【 図 3 4 】

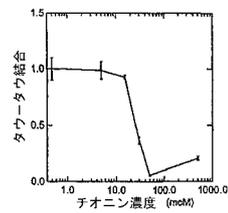


【 図 3 6 】

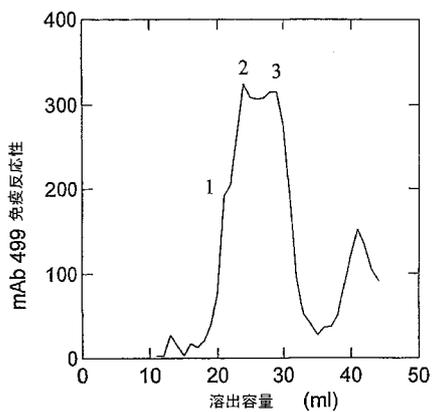
調製 1
dGA 5 mcg/ml, dGAE 5 mcg/ml



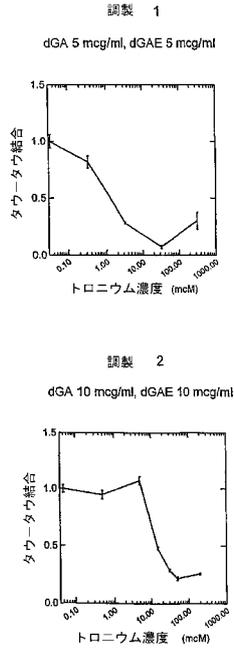
調製 2
dGA 4 mcg/ml, dGAE 5 mcg/ml



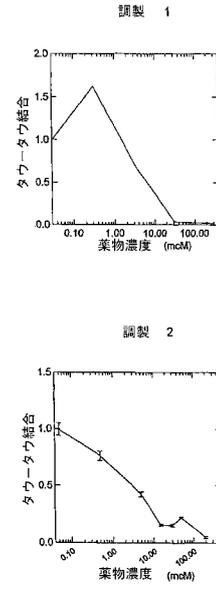
【 図 3 5 】



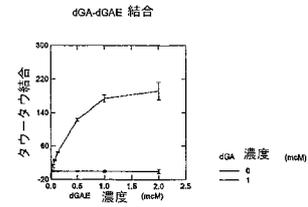
【 図 3 7 】



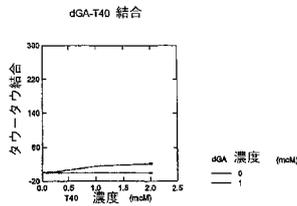
【 図 3 8 】



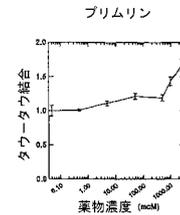
【 図 3 9 a 】



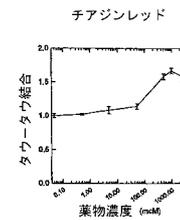
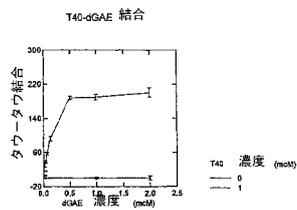
【 図 3 9 b 】



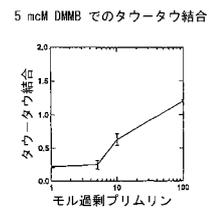
【 図 4 0 】



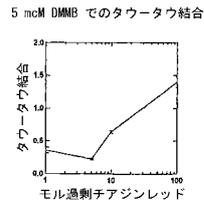
【 図 3 9 c 】



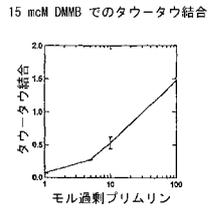
【 図 4 1 a 】



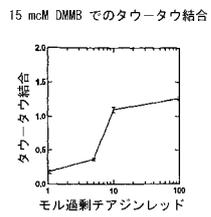
【 図 4 1 b 】



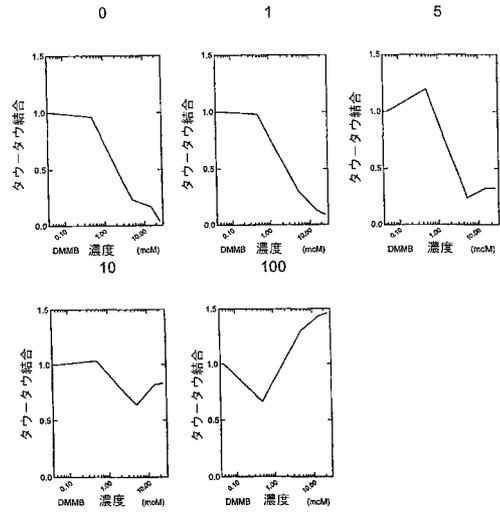
【 図 4 1 c 】



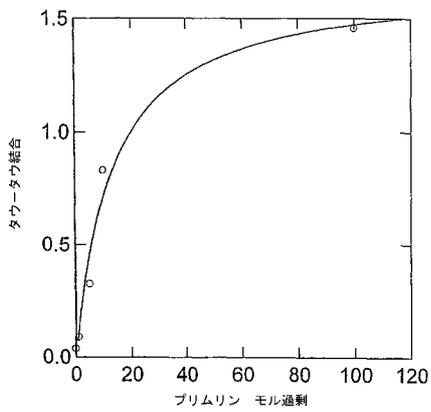
【 図 4 1 d 】



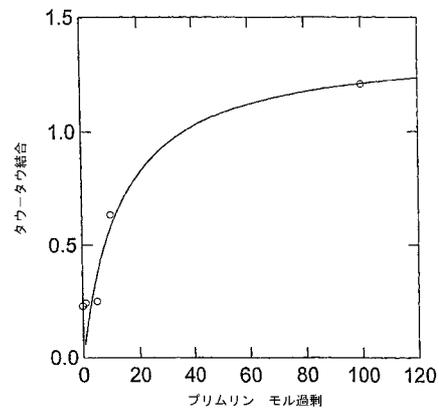
【 図 4 2 】



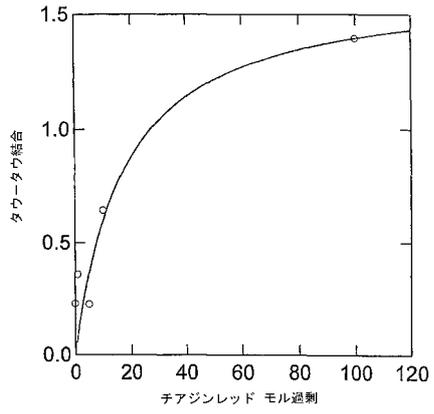
【 図 4 3 】



【 図 4 4 】



【 図 4 5 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
26 September 2002 (26.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/075318 A2(51) International Patent Classification: G01N 33/68,
C07D 277/62, G01N 33/58, C07D 279/18of Aberdeen, University Medical Buildings, Foresterhill,
Aberdeenshire AB25 2ZD (GB).

(21) International Application Number: PCT/GB02/01318

(74) Agents: KREMER, Simon, M. et al.; Mewburn Ellis,
York House, 23 Kingsway, London, Greater London
WC2B 6LP (GB).

(22) International Filing Date: 20 March 2002 (20.03.2002)

(25) Filing Language: English

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR,
GM, HR, HU, ID, IT, IN, IS, JP, KR, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 0106953.3 20 March 2001 (20.03.2001) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): THE
UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY OF
ABERDEEN [GB/GB]; Regent Walk, Aberdeen, Ab-
erdeenshire AB24 3FX (GB).(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KH, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
Eurasian patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BI, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NI, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): WISCHIK, Claude,
Michel [FR/GB]; Department of Mental Health, University
of Aberdeen, University Medical Buildings, Foresterhill,
Aberdeenshire AB25 2ZD (GB). HARRINGTON,
Charles, Robert [GB/GB]; Department of Mental Health,
University of Aberdeen, University Medical Buildings,
Foresterhill, Aberdeenshire AB25 2ZD (GB). RICKARD,
Janet, Elizabeth [GB/GB]; Department of Mental Health,
University of Aberdeen, University Medical Buildings,
Foresterhill, Aberdeenshire AB25 2ZD (GB). HORSLEY,
David [GB/GB]; Department of Mental Health, University

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that reportFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: NEUROFIBRILLARY LABELS

(57) Abstract: Disclosed are methods for determining the stage of neurofibrillary degeneration associated with a tauopathy in a subject believed to suffer from the disease, which methods comprise the steps of: (i) introducing into the subject a ligand capable of labelling aggregated paired helical filament (PHF) tau protein, (ii) determining the presence and/or amount of ligand bound to extracellular aggregated PHF tau in the medial temporal lobe of the brain of the subject, (iii) correlating the result of the determination made in (ii) with the extent of neurofibrillary degeneration in the subject. The methods can be used for pre-mortem diagnosis and staging of tauopathies such as Alzheimer's Disease. Preferred ligands include sulphonated-benzothiazole-like compounds and diaminothienopyridazines. Novel ligands (e.g. sulphonated-benzothiazole-like compounds) are also provided. The method may also include the use of "blocking ligands" to block competing binding sites. In other aspects the invention provides *in vitro* methods for identifying ligands capable of labelling aggregated PHF tau protein, the methods comprising the steps of: (i) providing a first agent suspected of being capable of labelling aggregated PHF tau protein, (ii) contacting (a) a tau protein or a derivative thereof containing the tau core fragment bound to a solid phase so as to expose a high affinity tau capture site, with (b) a liquid phase tau protein or derivative thereof capable of binding to the solid phase tau protein or derivative, and (c) said selected first agent and (d) a second agent known to be tau-tau binding inhibitor, (iii) selecting first agent which fully or partially relieves the inhibition of binding of the liquid phase tau protein or derivative of (b) to the solid phase tau protein or derivative of (a) by the inhibitor (d). Ligands may also be tested to confirm that they are not themselves inhibitors.

WO 02/075318 A2

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

Neurofibrillary labelsField of the invention

5
The present invention concerns materials, methods and models relating generally to the labelling and detection of neurofibrillary tangles. In addition, it concerns the identification and development of ligands suitable for
10 neuropathological staging and their use in the diagnosis, prognosis or treatment of diseases such as Alzheimer's Disease (AD).

Background to the invention

15 *Neuropathological staging and AD*

The neuropathological staging proposed by Braak (Braak, H et al. (1991), *Acta. Neuropathol.* 82, 239-259) provides the best available definition of progression of relatively pure neurofibrillary degeneration of the Alzheimer-type which is diagnostic of AD
20 (Wischik et al. (2000), "Neurobiology of Alzheimer's Disease", Eds. Dawbarn et al., *The Molecular and Cellular Neurobiology Series*, Bios Scientific Publishers, Oxford). This staging is shown schematically in terms of brain region in Fig 2B, and is based on a
25 regular regional hierarchy of neurofibrillary tangle (NFT) distribution. Regions of the brain which appear earlier in the hierarchy have both more tangles and are affected in less severe cases than those later in the list.

30 *Relationship between AD, clinical dementia and neuropathological staging*

The provision of an effective pre-mortem assessment of Braak Stage would be of use in the assessment and treatment of AD, for which
35 the differential includes Lewy Body dementia, Parkinson's disease, various forms of fronto-temporal and cortico-basal degeneration, progressive supranuclear palsy and a range of rare neurological syndromes.

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

2

The original model proposed by Braak was essentially qualitative in nature, and was not linked to any implications about the threshold for development of clinical dementia and symptoms.

5
10
15
In terms of the appearance of clinical dementia by DSM-IV criteria, this corresponds statistically to the transition between Braak stages 3 and 4 (Fig 2c). The DSM-IV criteria (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition, American Psychiatric Association, American Psychiatric Press, Washington DC (1994)) for the definition of dementia equate to an MMSE (Mini-Mental State Examination) cut-off point of about 18, and corresponds to a dementia prevalence of about 5% of the population over-65 years old (over-65's represent about 17% of the total population).

20
25
30
Gertz *et al.* ((1996) *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 246, 132-6) studied cases followed from general practice to post-mortem, which were rigorously characterised at the clinical level using CAMDEX (Roth *et al.*, 1988, "The Cambridge Examination for Mental Disorders of the Elderly (CAMDEX)" Cambridge University Press). These were staged post-mortem by the criteria of Braak and, after excluding all cases with any degree of vascular pathology found post-mortem, there remained uncertainty in about one third of cases at the point of transition. That is, about one third of cases with a clinical diagnosis of AD are actually at early Braak stages (stages 1-3), have vascular pathology, or have concomitant Lewy body pathology. Thus there exists a high degree of uncertainty, even in the best practice research setting. The predominant neuropathological substrate that is actually present when a routine clinical diagnosis of AD is made is even more uncertain.

35
It has recently been reported that a molecule (FDDNP, 2-(1-{6-[(2-[¹⁸F]fluoroethyl)(methylamino)-2-naphthyl]ethylidene)malononitrile) demonstrates increased relative retention time (RRP) in medial temporal lobe brain regions (hippocampus, entorhinal cortex and amygdala) following injection and PET imaging in cases with a

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

3

clinical and neuroradiological diagnosis of Alzheimer's disease
(Shoghi-Jadid et al., Am. J. Geriatr. Psychiatr. 2002, 10:24-35).

Although binding to NFTs and amyloid plaques is discussed, no
5 binding to NFTs is shown, although the compound does bind with high
affinity to synthetic beta-amyloid fibrils in vitro.

When cases were matched for corresponding disease severity by MMSE
score with a neuropathological case series in which vascular
10 pathology was excluded, the RRT values reported by Shoghi-Jadid et
al. were found to correlate with beta-amyloid plaque counts but not
with measures of neurofibrillary tangle pathology, as shown below.

Spearman rank correlation coefficients:

15

	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

20 Pearson correlation coefficients:

	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

25

Where the parameters are defined as follows:

MTL AP	medial temporal lobe amyloid plaques
Global AP	average amyloid plaque load in 12 brain regions
30 MTLNFT	medial temporal lobe neurofibrillary tangles
Global NFT	average NFT load in 12 brain regions

However, beta-amyloid deposition is known to discriminate poorly
between normal aging and Alzheimer's disease (see Figure 2d
35 herein), and beta-amyloid pathology does not provide a sound basis
for neuropathological staging (Braak and Braak, 1991). Therefore,
FDDNP-RRT does not provide a method for *in vivo* neuropathological
staging of Alzheimer's disease.

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

4

Although it is possible that further refinement in clinical methods with particular reference to more specific neuropsychological indicators (e.g. split attention tasks, delayed matching to sample, etc.) may improve the accuracy of clinical diagnosis, an essential problem is to develop methods for the direct measurement of underlying neuropathology during life, in particular the extent of neurofibrillary degeneration of the Alzheimer-type.

10 *Progression of neurofibrillary degeneration and tau*

As described above, the tau-based pathology of AD is a major feature of the phenotype. It is highly correlated with extent of neuronal destruction (reviewed in Wischik et al. (2000) *loc cit*).

15 On a cellular basis, the formation of NFTs from Tau is believed to proceed as follows. In the course of their formation and accumulation, paired helical filaments (PHFs) first assemble as filaments within the cytoplasm, probably from early tau oligomers which become truncated prior to, and in the course of, PHF assembly (Refs 26,27). They then go on to form classical intracellular NFTs. In this state, PHFs consist of a core of truncated tau and a fuzzy outer coat containing full-length tau (Wischik et al. (2000) *loc. cit.*). The assembly process is exponential, consuming the cellular pool of normal functional tau and inducing new tau synthesis to make up the deficit (Ref 29). Eventually functional impairment of the neurone progresses to the point of cell death, leaving behind an extracellular NFT. Cell death is highly correlated with the number of extracellular NFTs (Bondareff, W. et al. (1993) *Arc. Gen. Psychiatry* 50: 350-6). As the outer neuronal membrane is damaged and NFTs are extruded into the extracellular space, there is progressive loss of the fuzzy outer coat of the neurone with corresponding loss of N-terminal tau immunoreactivity, but preservation of tau immunoreactivity associated with the PHF core (Figure 3; Ref 30).

In the process of aggregation, tau protein undergoes a conformational change in the repeat domain associated with a half-

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

5

repeat phase-shift (Refs 32,33). This creates a proteolytically-stable fragment which is identical to that found in the core of the paired helical filaments (PHFs) which constitute the neurofibrillary tangles characteristic of AD. By analogy with other
5 protein aggregation systems, the process most likely involves an alpha-helix to beta-strand change in conformation (reviewed in Wischik et al. (2000) loc. cit.).

Generally speaking therefore, the aggregation of tau can be
10 considered in 3 stages: intracellular oligomers; intracellular filaments (stage 1 of Fig 3); extracellular filaments (stages 2 & 3 of Fig 3).

However, to date, no definitive correlation has been established
15 between these stages, which occur at the cellular level, and possibly at different rates and probabilities in different regions in the brain, and the progression of pathology according to the defined hierarchical system of Braak and Braak which, as discussed above, is the best available definition of progression of
20 relatively pure neurofibrillary degeneration.

Invasive methods for assessing AD

Lumbar-puncture CSF measurements enable discrimination between AD
25 and controls, and between AD and other neurological disorders, but lumbar-puncture is more invasive than nuclear medicine-based approaches, and carries a higher risk (Refs. 17 to 21). EEG-neurological diagnosis has also been developed (Refs 22-25), but in this regard there remains a need for cheap instrumentation which
30 can be used at the point of clinician contact.

Neurofibrillary degeneration via brain atrophy - SPECT and PET

Numerous studies have shown that global brain atrophy and specific
35 medial temporal lobe atrophy, particularly of the hippocampus, are closely linked to underlying neurofibrillary degeneration of the Alzheimer-type, and are valuable in the early diagnosis of AD (Refs 1-8).

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

6

However, although the diagnosis of AD by monitoring global brain atrophy represents a methodology which can be made to work in a research setting, there are difficulties in defining and measuring atrophy in specific brain regions, and likewise in the measurement of global neocortical atrophy. In any case, a diagnosis based on detectable atrophy may come too late for effective treatment.

There have been advances in diagnostic methodology in recent years, following the identification of diagnostic features in SPECT scans (Refs 9-12; characteristic patterns of perfusion defect detected by HMPAO SPECT), PET scans (Refs 13-15; metabolic defect detected by glucose metabolism profile) and MRI scans (Ref 16; global brain atrophy, specific patterns of lobar atrophy). Of these, the most generally accessible are MRI and SPECT, since PET is for the present time limited to centres which have local specialised cyclotron and radiochemistry capability for the preparation of short half-life injectable radioligands (Aberdeen, London, Cambridge in UK). Notably, the characteristic early stage temporo-parietal perfusion defect detected by HMPAO SPECT in patients with AD corresponds very closely to the pattern of tau pathology which can be detected biochemically (Figure 1). The biochemical changes precede overt neurofibrillary degeneration as seen by the appearance of NFTs (Figure 2; Mukaetova-Ladinska et al., 2000 Am. J. Pathol. Vol. 157, No. 2, 623-636).

However, although MRI and SPECT scans are useful for detecting specific patterns of perfusion defects characteristic of AD, discrimination between different neuropathological stages, or between AD and other types of dementia, is difficult.

For instance, SPECT is useful for detection of a specific pattern of bilateral temporo-parietal perfusion defect that is characteristic of AD (Refs 9 - 11), which can be useful even at very early stage disease. However, SPECT changes discriminate neuropathological stages poorly (Ref 12). Furthermore, discrimination between AD and Lewy Body dementia is difficult. Both have a bilateral temporo-parietal perfusion defect, but only in the

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

7

latter does an occipital perfusion defect tend to be present. The same patterns of defect can be demonstrated using PET measurement of glucose metabolism (Refs 13 - 15), but the problem of distinguishing Lewy Body dementia persists in this modality.

5
10
15
Thus, as can be inferred from data in Ref 12, the probability of successful SPECT detection of cases at Braak stages 1&2 is 50%, and at stages 3&4 is 60%. It is only at stages 5&6 that 95% of cases become SPECT-positive. Conversely, cases detected as SPECT-positive could be at stages 1&2 (20%), 3&4 (20%), or 5&6 (60%). SPECT will therefore fail to detect 40 - 50% of the pre-stage 4 target population for early diagnosis and therapeutic intervention. In a further study (data not shown) it was shown that overall agreement between SPECT diagnosis and clinical diagnosis was of the order of 50%.

20
Thus, in developing a treatment aimed specifically at preventing neurofibrillary degeneration of the Alzheimer-type, there is a critical need to develop, in parallel, non-invasive means of selecting patients for treatment, and monitoring their response to the treatment, according to a defined and reproducible definition of disease progression.

Disclosure of the invention

25
Brief summary of the invention

30
35
The present inventors have used immunochemical properties (Refs 26, 27, 30) to distinguish intracellular tangles from extracellular tangles. Both the frequency of cases with tangles in these categories (i.e. probability) and their quantity (i.e. counts per mm²) were determined in a prospective case series and grouped into the regions of the brain known to represent stages in the progression of pathology according to the system of Braak and Braak.

As described in more detail below, these antibody studies demonstrate for the first time that by employing extracellular vs.

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

8

intracellular specificity, in defined brain regions, deposits of PHF-tau provide a basis for empirical staging of the neurofibrillary degeneration of AD.

- 5 Thus in one aspect, the present invention provides a method for determining the stage of neurofibrillary degeneration associated with tauopathy (e.g. AD) in a subject believed to suffer from the disease, which method comprises the steps of:
- 10 (i) introducing into the subject a ligand capable of labelling aggregated PHF tau,
- (ii) determining the presence and/or amount of ligand bound to extracellular aggregated PHF tau in the medial temporal lobe of the brain of the subject,
- 15 (iii) correlating the result of the determination made in (ii) with the extent of neurofibrillary degeneration in the subject.

- As described in the introduction, progression of neurofibrillary degeneration is definitive of the neuropathological staging proposed by Braak, which in turn is the best available
- 20 neuropathological definition of progression of AD. The methods of the present invention can thus be used to provide an actual Braak stage result. In preferred embodiments they can be used to diagnose patients at early Braak stages (e.g. Braak stage 2) even before clinical symptoms may be readily apparent - such diagnosis
- 25 can be used to direct timely treatment and advice.

- Interestingly, results shown in Gertz *et al.* (1996) *loc cit*, based on immunological detection of NFTs, but which did not distinguish extracellular and intracellular tangles, showed little difference
- 30 between the numbers detected in demented (generally Braak stage 4-6) and non-demented (generally Braak stage 1-3) subjects in medial temporal lobe structures (see Figure 1 and Table 2, page 134 therein; the relevant structures are labelled Pre alpha ent., CA1, Pri Ento.). Thus the correlation demonstrated by the present
- 35 invention is particularly surprising.

The invention further provides novel ligands for use in labelling tau aggregates, plus also novel screens for discovering such

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

9

ligands.

Some of the aspects of the invention discussed above will now be dealt with in more detail.

5

Choice of subject

Suitable subjects for the method may be selected on the basis of conventional factors. Thus the initial selection of a patient may involve any one or more of: rigorous evaluation by experienced clinician; exclusion of non-AD diagnosis as far as possible by supplementary laboratory and other investigations; objective evaluation of level of cognitive function using neuropathologically validated battery.

10
15

Ligands

The ligand is capable of labelling aggregated PHF tau, the formation of which is discussed above. It may specifically or preferentially bind such tau (preferentially with respect to competing binding sites present in the relevant region of the brain). Suitable ligands (including novel ligands) and methods of identifying them are discussed below.

20

More specifically, the disclosure that Braak staging can be assessed on the basis described herein has significant implications for the choice and/or development of ligands for use in diagnostic labelling. Immunological methods suffer from the drawback that antibodies do not readily cross the blood-brain barrier in a quantitative manner, and furthermore, the method may be clinically unsuitable since adverse reactions may be triggered by the injection of antibodies into the body for this purpose. It is consequently difficult to discriminate between different stages of tau aggregation on the basis of differential patterns of immunoreactivity in living subjects.

25
30
35

The present inventors have therefore investigated the critical chemical characteristics of compounds which bind to neurofibrillary

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

10

tangles. They provide herein a minimal chemical structure required for binding which has implications, *inter alia*, in the development and use of compounds as ligands of neurofibrillary tangles and such processes, uses and compounds form further aspects of the invention.

Preferred ligands, including novel ligands, are disclosed in more detail hereinafter, but may include in particular sulphonated-benzothiazole-like compounds (see e.g. Figure 4a) and diaminophenothiazines (see e.g. Figure 8) as well as other mimetic compounds sharing an appropriate minimal chemical structure with either of these. Compositions comprising, or consisting of, combinations of the ligands disclosed herein (preferably distinguishable ligands e.g. in terms of labelling) and/or combinations of ligands with blocking agents (see below) form various aspects of the invention.

Binding to extracellular tau

The determination of (ii) above is made based on extracellular aggregated tau. In general terms, for the purposes of the present invention, this may be determined from extracellular tangles (see e.g. Refs 26, 27 and Examples, Methods and Materials, Table).

It has previously been shown from histological studies that, during the course of aggregation, tau protein acquires binding sites for compounds such as thiazin red and thioflavin-S (Refs 26, 27). The binding site can be shown to exist within the tangle itself, and not in extraneous proteins (Ref 34). Thus both intracellular and extracellular tangles are labelled to some extent by such ligands, as judged histologically.

In general terms, the probability or amount of extracellular binding sites (as opposed to total binding sites, or intracellular sites) may be determined either by using ligands which are too large to gain ready intracellular access, or ligands which can act intracellularly, but at a defined (relatively lower) concentration at which extracellular action is favoured.

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

11

Large chelated ligands, such as those susceptible to detection by SPECT, could be expected to at least reach and bind appropriate extracellular targets. Compounds labelled directly for PET could potentially detect both intracellular or extracellular targets, with the latter being favoured at low concentration. Thus the work of the present inventors shows that both of these detection methods have potential in Braak staging, when used with an appropriate tangle-binding ligand. Nevertheless, in the light of the present disclosure, it will be appreciated that in order to conveniently assess Braak stage via NFT numbers it may be important to employ ligands which are not only capable of crossing the blood brain barrier and labelling specified extracellular or intracellular deposits of aggregated tau, but preferably can also retain this property when conjugated to further compounds.

However, for the avoidance of doubt, ligands may be visualised or detected by any suitable means, and the skilled person will appreciate that any suitable detection means as is known in the art could be substituted for these examples.

Enhancement of preferential tau binding

In one embodiment of the invention, steps (i) and/or (ii) of the method are performed in conjunction with (preferably preceded by) the further step of introducing into the subject a second ligand which labels competing (i.e. non-aggregated tau) binding sites present in the relevant region of the brain preferentially to the first ligand.

Thus the methods and other embodiments herein may include a step:

(i**bis**) introducing into the subject a blocking ligand which labels non-aggregated tau binding sites in the brain of the subject preferentially to the ligand capable of labelling aggregated PHF tau.

A competing binding site may be one which is provided by e.g.

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

12

amyloid plaques, such as may be present in the subject. By introducing such second ligands into the subject, the relative or effective concentration of first ligand available to bind to aggregated tau may be enhanced. Suitable second ligands (or blocking compounds as they may be described herein) are described below, but they may in particular include benzthiazoles such as are shown in Figure 5, compounds 1B and 2. Another suitable blocking ligand may be FDDNP of Shoghi-Jadid et al., *Am. J. Geriatr. Psychiatr.* 2002, 10:24-35, discussed above.

10

Brain regions

The significance of the medial temporal lobe i.e. E2/Trans (Entorhinal cortex layer 2/transitional entorhinal cortex) and E4/EC (Entorhinal cortex layer 4 and hippocampus) regions, and also neocortical structures (F/T/P regions - frontal, temporal, parietal) of the brain are demonstrated in Figures 25, 27, and 29.

In one embodiment, the method comprises only analysing the data based on extracellular NFTs in the medial temporal lobe.

20

If a further embodiment, both this region and the neocortical structure data is assessed. In the latter case it may be preferable to assess intracellular PHF deposits.

25

Thus the methods and other embodiments herein may include a further step:

(iib) additionally determining the presence and/or amount of ligand bound to intracellular aggregated PHF tau in a neocortical structure of the brain of the subject,

30

This may be followed by:

(iii) correlating the result of the determination made in (ii) and optionally (iib) with the extent of neurofibrillary degeneration in the subject, and hence the AD state of the subject.

35

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

13

The ligand used for intracellular labelling may in principle be the same as that used for extracellular labelling, but preferably will be different and/or labelled distinctively (such that it can be distinguished by whatever imaging process is being used).

5

The additional steps may be particularly preferred for assessing or confirming neurofibrillary degeneration in subjects at Braak stage 2-6.

10 *Determination of neurofibrillary degeneration*

The determination may be of the presence of binding in a given area. This determination can then be related to a normal range of values for cases without any pathology (i.e. cases putatively at Braak Stage 1), or ranges of reference values which have been determined for successive Braak stages to determine the neuropathological stage corresponding to the given determination. The correlation may be done by means of a look-up table or graph, e.g. based on data corresponding to the Figures and Table 1 in Example 1 herein for density. Alternatively, a given determination may be related with reference to a given threshold value to a probability of a case being at a Stage more advanced than Stage 1 (e.g. based on data corresponding to the Figures herein for probability), and thereby giving a probability of correctly attributing a diagnosis of Alzheimer's disease.

20

25 *Uses of the method*

The determination may be as part of a method of diagnosis or prognosis. It may be used to select a patient for treatment, or to assess the effectiveness of a treatment or a therapeutic e.g. an inhibitor of tau-tau association administered to the subject.

30

Thus embodiments of the invention include:

35

A ligand which is capable of labelling extracellular aggregated PHF tau for use in a method of diagnosis or prognosis of AD in a subject believed to suffer from the disease, which method comprises

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

14

the steps of:

- (i) introducing into the subject a ligand capable of labelling aggregated PHF tau,
- (ii) determining the presence and/or amount of ligand bound to extracellular aggregated PHF tau in the of the medial temporal lobe of the brain of the subject,
- (iii) correlating the result of the determination made in (ii) with the extent of neurofibrillary degeneration in the subject, and hence the AD state of the subject.

10

Use of a ligand which is capable of labelling extracellular aggregated PHF tau in a method for preparing a diagnostic or prognostic reagent suitable for use in a method of determining the stage of neurofibrillary degeneration associated with AD in a subject believed to suffer from the disease, which method comprises the steps of:

- (i) introducing into the subject said reagent which is capable of labelling aggregated PHF tau,
- (ii) determining the presence and/or amount of the reagent bound to extracellular aggregated PHF tau in the medial temporal lobe of the brain of the subject,
- (iii) correlating the result of the determination made in (ii) with the extent of neurofibrillary degeneration in the subject.

25

In a still further aspect, the invention provides a kit for performing the uses and methods described above, the kit comprising one or more ligands or derivatives as provided herein, which are capable of binding to the aggregated molecules. It may include means for increasing the detectability of such compounds e.g. a technetium chelating group, plus optionally means to conjugate this to the ligand, plus optionally technetium. Where the kit comprises a derivative of a compound as disclosed herein, this may be e.g. fluoroscopically detectable, as discussed elsewhere in this description. The kit may also include means for detecting or visualising the ligand, e.g. where the ligand has an incorporated biotin group, the kit preferably includes an antibiotin antibody. Similarly, the kit may include means for detecting the inherent fluorescence of a compound, means for detecting photoactivatable

30

35

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

15

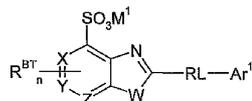
groups, further labelled antibodies, etc.

Various preferred ligands for use in the methods and other
embodiments of the present invention will now be discussed in more
5 detail. In each case, those skilled in the art will appreciate that
instead of administering ligands directly, they could be
administered in a precursor form, for conversion to the active form
by an activating agent present in, or administered to, the same
subject.

10

Sulphonated-benzothiazole-like ligands

Suitable ligands for use in this aspect of the present invention
are compounds of the formula:



15

wherein:

W is S, O, or NH;

exactly one of X, Y, and Z is CH or N;

the others of X, Y, and Z are CH;

20

M¹ is an alkali metal cation;

RL is a rigid linker group;

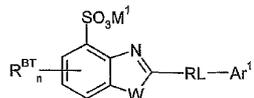
Ar¹ is an C₆-20 aryl group;

n is an integer from 0 to 3; and,

each R^{BT} is a core substituent.

25

In one embodiment, each of X, Y, and Z is CH, and the compounds
have the following formula:

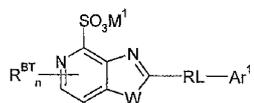


WO 02/075318

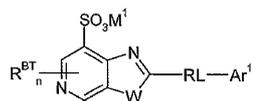
PCT/GB02/01318

16

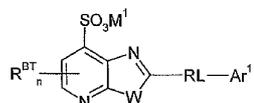
In one embodiment, X is N; Y and Z are each CH; and the compounds have the following formula:



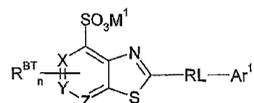
5 In one embodiment, Y is N; X and Z are each CH; and the compounds have the following formula:



10 In one embodiment, Z is N; X and Y are each CH; and the compounds have the following formula:

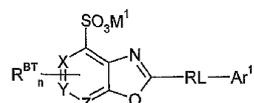


In one embodiment, W is S, and the compounds have the following formula:



15

In one embodiment, W is O, and the compounds have the following formula:

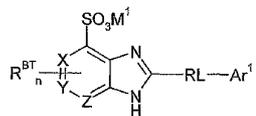


WO 02/075318

PCT/GB02/01318

17

In one embodiment, W is NH, and the compounds have the following formula:



5

In one embodiment, each of X, Y, and Z is CH; and W is S.
 In one embodiment, each of X, Y, and Z is CH; and W is O.
 In one embodiment, each of X, Y, and Z is CH; and W is NH.

10 In one embodiment, X is N; Y and Z are each CH; and W is S.
 In one embodiment, X is N; Y and Z are each CH; and W is O.
 In one embodiment, X is N; Y and Z are each CH; and W is NH.

In one embodiment, Y is N; X and Z are each CH; and W is S.
 15 In one embodiment, Y is N; X and Z are each CH; and W is O.
 In one embodiment, Y is N; X and Z are each CH; and W is NH.

In one embodiment, Z is N; X and Y are each CH; and W is S.
 In one embodiment, Z is N; X and Y are each CH; and W is O.
 20 In one embodiment, Z is N; X and Y are each CH; and W is NH.

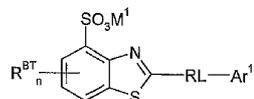
The bicyclic group, comprising W, X, Y, and Z, may be denoted the
 "core group." When each of X, Y, and Z is CH, and W is S, the
 compound may be referred to as a benzothiazole compound, and may be
 25 considered to have, as a core group, a benzothiazole group. The
 "core substituents" may be then be referred to as "benzothiazole
 substituents."

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

18

A preferred ligand for use in this aspect of the present invention is a ligand compound of the formula (I):



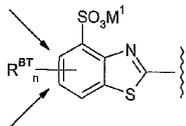
wherein:

- 5 M^1 is an alkali metal cation;
 RL is a rigid linker group;
 Ar¹ is an C₃₋₂₀aryl group;
 n is an integer from 0 to 3; and,
 each R^{BT} is a independently benzothiazole substituent.
- 10 Both the rigid linker group, RL, and the aryl group, Ar¹, are substantially planar. In addition, the rigid linker group, RL, and the aryl group, Ar¹, together with the core group (e.g., benzothiazole group), form a compound which is substantially
- 15 planar. By "substantially planar," it is meant that the moiety/compound has a high degree of planarity e.g. less than 5, 4, 3, 2 or 1° twist between the components, as quantified using standard chemical models and assumptions. Preferably the twist will be no greater than that of the compound of Figure 16.
- 20 In one embodiment, the compound has a compound length which is from about 14.7 AU to about 15.3 AU.
- 25 The present inventors have determined that compounds having the characteristics described above may be particularly suitable for the 'Braak staging' methods of the invention. Such compounds may be known in the art, or may be novel as described in more detail below.
- 30 The "compound length" is the distance between the two most distant aromatic ring atoms (denoted "reference atoms"). For example, for benzothiazole compounds, at the benzothiazole "end" of the molecule, the reference atom will be one of two atoms:

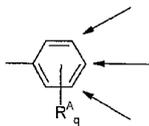
WO 02/075318

PCT/GB02/01318

19



At the aryl "end" of the molecule, when Ar¹ is an aryl group having a phenyl core (see below), the reference atom will be one of three atoms:



Distances used herein may be computed using 'Chemical Database Service', Daresbury, and the Cambridge Structure Database, using 'Chemical structure search and retrieval software'. This data and software are available in the public domain.

In one embodiment, M is Li, Na, K, or Cs.

In one embodiment, M is Na or K.

15

In one embodiment, n is 0. In one embodiment, n is 1.

In one embodiment, n is 2. In one embodiment, n is 3.

In one embodiment, each R^{BT} is independently selected from:

C₁-alkyl, hydroxy, C₁-alkoxy, nitro, cyano, halo, and amino.

In one embodiment, each R^{BT} is independently selected from: -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, and -N(nPr)₂.

In one embodiment, each R^{BT} is independently selected from: C₁-alkyl. In one embodiment, each R^{BT} is selected from: -Me, -Et, -nPr, and -iPr. In one embodiment, each R^{BT} is -Me.

25

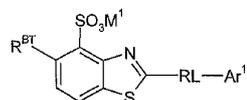
WO 02/075318

PCT/GB02/01318

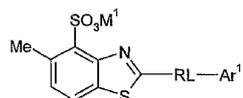
20

In one embodiment, n is 1 and R^{BT} is -Me, -Et, -*n*Pr, or -*i*Pr.
 In one embodiment, n is 1 and R^{BT} is -Me.

5 In one embodiment, the compound has the following formula:

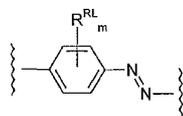


In one embodiment, the compound has the following formula:

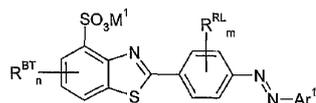


10

In one embodiment, RL is a group of the formula:



wherein m is an integer from 0 to 4, and each R^{RL} is independently a rigid linker aryl substituent, and the compounds have the formula:



15

In one embodiment, m is 0. In one embodiment, m is 1.

In one embodiment, m is 2. In one embodiment, m is 3.

In one embodiment, m is 4.

20

In one embodiment, each R^{RL} is independently selected from:
 C_{1-4} alkyl, hydroxy, C_{1-4} alkoxy, nitro, cyano, halo, and amino.

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

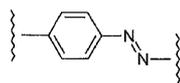
21

In one embodiment, each R^{RL} is independently selected from: -Me, -Et, -nPr, -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, and -N(nPr)₂.

5

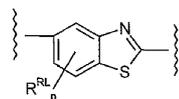
In one embodiment, each R^{RL} is independently selected from: C₁₋₄alkyl.

In one embodiment, RL is a group of the formula:



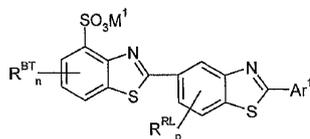
10

In one embodiment, RL is a group of the formula:



15

wherein p is an integer from 0 to 3, and each R^{RL} is independently a rigid linker aryl substituent, and the compounds have the formula:



In one embodiment, p is 0. In one embodiment, p is 1.

In one embodiment, p is 2. In one embodiment, p is 3.

20

In one embodiment, each R^{RL} is independently selected from: C₁₋₄alkyl, hydroxy, C₁₋₄alkoxy, nitro, cyano, halo, and amino.

25

In one embodiment, each R^{RL} is independently selected from: -Me, -Et, -nPr, -iPr, -OH, -OMe, -OEt, -O(nPr), -O(iPr), -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -NH₂, -NHMe, -NHET, -NH(iPr), -NH(nPr), -NMe₂, -

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

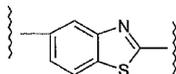
22

NET₂, N(iPr)₂, and -N(nPr)₂.

In one embodiment, each R^{RL} is independently selected from: C₁₋₄alkyl.

5

In one embodiment, RL is a group of the formula:



The aryl group, Ar¹, is a C₅₋₂₀aryl group. The term "C₅₋₂₀aryl," as used herein, pertains to a monovalent moiety obtained by removing a hydrogen atom from an aromatic ring atom of a C₅₋₂₀aromatic compound, said compound having one ring, or two or more rings (e.g., fused), and having from 5 to 20 ring atoms, and wherein at least one of said ring(s) is an aromatic ring. Preferably, each ring has from 5 to 7 ring atoms. "C₅₋₂₀" denotes ring atoms, whether carbon atoms or heteroatoms.

Examples of C₅₋₂₀aryl groups which do not have ring heteroatoms (i.e., C₅₋₂₀carboaryl groups) include, but are not limited to, those derived from benzene (i.e., phenyl (C₆), naphthalene (C₁₀), anthracene (C₁₄), phenanthrene (C₁₄), naphthacene (C₁₈), and pyrene (C₁₆).

Examples of C₅₋₂₀heteroaryl groups include, but are not limited to, C₅heteroaryl groups derived from furan (oxole), thiophene (thiole), pyrrole (azole), imidazole (1,3-diazole), pyrazole (1,2-diazole), triazole, oxazole, isoxazole, thiazole, isothiazole, oxadiazole, and oxatriazole; and C₆heteroaryl groups derived from isoxazine, pyridine (azine), pyridazine (1,2-diazine), pyrimidine (1,3-diazine; e.g., cytosine, thymine, uracil), pyrazine (1,4-diazine), triazine, tetrazole, and oxadiazole (furan).

Examples of C₅₋₂₀heterocyclic groups (including C₅₋₂₀heteroaryl groups) which comprise fused rings, include, but are not limited to, C₆heterocyclic groups derived from benzofuran, isobenzofuran,

35

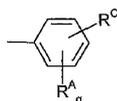
WO 02/075318

PCT/GB02/01318

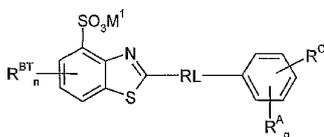
23

indole, isoindole, purine (e.g., adenine, guanine), benzimidazole;
 C_{10} heterocyclic groups derived from quinoline, isoquinoline,
 benzodiazine, pyridopyridine, quinoxaline; C_{13} heterocyclic groups
 derived from carbazole; C_{14} heterocyclic groups derived from
 5 acridine, xanthen, phenoxathiin, phenazine, phenoxazine,
 phenothiazine.

In one embodiment, Ar^1 is an aryl group having a phenyl core, and
 has the formula:



10 wherein q is an integer from 0 to 5; and each R^A is independently
 an aryl substituent; R^C , if present, is a reactive conjugating
 substituent, or R^C is, or contains, a detectable label; and the
 compound has the formula:



15 In one embodiment, R^C , if present, is a reactive conjugating
 substituent, and is a group which is suitable for conjugation to
 another molecule or chemical species.

20 In one embodiment, R^C , if present, is a reactive conjugating
 substituent, and is, or contains, a reactive functional group
 suitable for conjugation to another molecule by chemical reaction
 therewith, to form a covalent linkage therebetween. Examples of
 suitable reactive functional groups include active esters (e.g.,
 25 succinimidyl esters).

In one embodiment, R^C , if present, is a reactive conjugating
 substituent, and is, or contains, a moiety suitable for conjugation
 to another molecule by a strong non-covalent interaction. Examples

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

24

of such groups include biotin (for binding with molecules bearing avidin or streptavidin).

5 In one embodiment, R^c , if present, is a reactive conjugating substituent, and is, or contains, a moiety suitable for conjugation to another molecule by complex or chelate formation, e.g., a chelating group. Examples of such groups include groups which complex with or chelate, e.g., metal ions, e.g., technetium ions. Examples of such groups include diethylenetriaminepentaacetic acid.

10 In one embodiment, R^c , if present, is, or contains, a detectable label. Examples of detectable labels include, e.g., dyes, fluorescent markers, antigenic groups, stable and unstable isotopes, and positron-emitting carbon atoms. In one embodiment, R^c , if present, is, or contains, a detectable label comprising a stable isotope. In one embodiment, R^c , if present, is, or contains, a detectable label comprising an unstable isotope. In one embodiment, R^c , if present, is, or contains, ^{18}F . In one embodiment, R^c , if present, is, or contains, a detectable label comprising a positron-emitting carbon atom.

Further R^c substituents are discussed below.

25 In one embodiment, R^c is present, and is as defined above.

In one embodiment, q is 0. In one embodiment, q is 1.

In one embodiment, q is 2. In one embodiment, q is 3.

In one embodiment, q is 4. In one embodiment, q is 5.

30 In one embodiment, each R^a is independently selected from: $-OH$, $-NH_2$, $-NHR^1$, $-NR^1R^2$, $-SO_3M^2$, $C_{1-4}alkyl$, wherein R^1 and R^2 are each $C_{1-4}alkyl$, and M^2 is an alkali metal cation, as defined above.

In one embodiment, at least one R^a is $-OH$ or $-NH_2$.

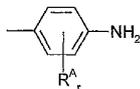
35

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

25

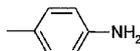
In one embodiment, Ar¹ is an aryl group having an amino-substituted phenyl core, and has the formula:



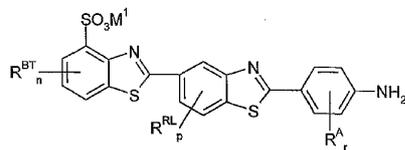
wherein r is an integer from 0 to 4, and each R^A is independently an aryl substituent, as defined above.

In one embodiment, r is 0. In one embodiment, r is 1.
 In one embodiment, r is 2. In one embodiment, r is 3.
 In one embodiment, r is 4.

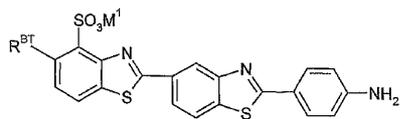
10 In one embodiment, r is 1 and Ar¹ is a group of the formula:



In one embodiment, the compound has the formula:



15 In one embodiment, the compound has the formula:

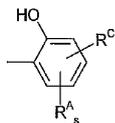


WO 02/075318

PCT/GB02/01318

26

In one embodiment, Ar¹ is an aryl group having a hydroxy-substituted phenyl core, and has the formula:



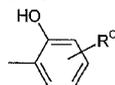
- wherein *s* is an integer from 0 to 4, and each R^A is independently an aryl substituent, as defined above, and R^C, is present, is a reactive conjugating substituent, or R^C is, or contains, a detectable label, as defined above.

- In one embodiment, *s* is 0. In one embodiment, *s* is 1.
 10 In one embodiment, *s* is 2. In one embodiment, *s* is 3.
 In one embodiment, *s* is 4.

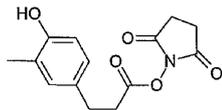
In one embodiment, Ar¹ is a group of the formula:



- 15 In one embodiment, Ar¹ is a group of the formula:



In one embodiment, Ar¹ is a group of the formula:

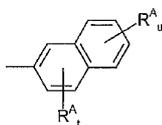


WO 02/075318

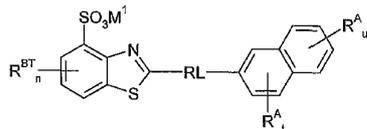
PCT/GB02/01318

27

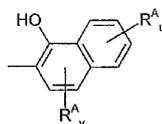
In one embodiment, Ar¹ is an aryl group having a naphthyl core, and has the formula:



wherein t is an integer from 0 to 3, u is an integer from 0 to 4, and each R^A is independently an aryl substituent, as defined above, and the compound has the formula:

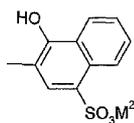


In one embodiment, Ar¹ is an aryl group having a hydroxy-substituted naphthyl core, and has the formula:



wherein v is an integer from 0 to 2, u is an integer from 0 to 4, and each R^A is independently an aryl substituent.

15 In one embodiment, Ar³ has the formula:

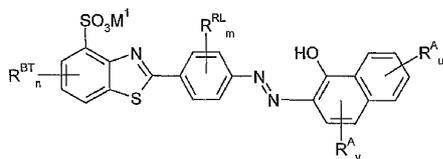


WO 02/075318

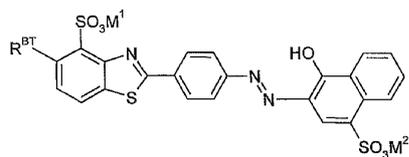
PCT/GB02/01318

28

In one embodiment, the compound has the formula:



In one embodiment, the compound has the formula:



5

In one embodiment, the ligand is a compound as described below under the heading "*Preferred sulphonated-benzothiazole-like ligands.*"

10 Compounds of the type described above, e.g. of formula (I), for use in the diagnostic methods of the present invention, may be prepared by conventional means - see e.g. Reference 31.

15 All such compounds described herein (or derivatives thereof) having the appropriate formula, size, planarity, and activity may be referred to generally, but not limitatively, hereinafter as 'sulphonated benzothiazole-like compounds' or 'SB ligands'. Such compounds will generally be ligands of aggregated tau molecules, e.g. those found in paired helical filaments or neurofibrillary
20 tangles.

The ligands described herein can suitably be detected by incorporating a positron-emitting carbon into one of the methyl groups of the compound as disclosed herein, and detecting the
25 compound by use of positron emission tomography (PET) as is known in the art. Alternatively, or in addition, a technetium-containing

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

29

chelate can be incorporated into the compound (e.g. as in the R^c group of the compounds described herein), so that selective detection of extracellular tangles could be achieved. A preferred chelating group is R^c = diethylenetriaminepentaacetic acid.

5 The ligands may be conjugated, chelated, or otherwise associated, with other chemical groups, dyes, fluorescent markers, antigenic groups, therapeutic moieties, or any other entity which may aid in a prognostic, diagnostic or therapeutic application. For instance,
10 where the ligand is attached to a dye or fluorescent group, the conjugate can be used as a label of aggregated tau or tau-like molecules. It can thus be used to label intracellular or extracellular tangles characteristic of AD.

15 *Phenothiazines*

The present inventors have previously identified another class of compounds, members of which disrupt the structure of PHFs, and reverse the proteolytic stability of the PHF core (WO 96/30766).

20 Diaminophenothiazine compounds described in WO 96/30766 are shown by the structures of Figure 8a. Formula (IV) in Figure 8a represents different resonance form of (II) included for clarity. Compounds (II)-(IV) are all oxidised forms while (I) is a reduced
25 form. Such compounds (which may be referred to hereinafter as 'diaminophenothiazines' or 'phenothiazines') include, e.g. tolonium chloride and methylene blue. Examples are shown in Figure 8b. All of these are shown in the oxidised form, with all except thionine being in the form stabilised salts (thionine is shown as a neutral
30 oxidised form).

Compounds which may be used in the methods described herein may be any having a formula shown in Figure 8a, wherein:

35 each of R₁, R₃, R₄, R₆, R₇ and R₉ is independently hydrogen, halogen, hydroxy, carboxy, substituted or unsubstituted alkyl, haloalkyl or alkoxy;

R₅ is hydrogen, hydroxy, carboxy, substituted or unsubstituted alkyl, haloalkyl or alkoxy; and,

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

30

R₁₀ and R₁₁ are independently hydrogen, hydroxy, carboxy, substituted or unsubstituted alkyl, haloalkyl or alkoxy; and pharmaceutically acceptable salts thereof.

- 5 In one embodiment:
each of R₁, R₃, R₄, R₆, R₇ and R₉ is independently hydrogen, halogen, hydroxy, carboxy, substituted or unsubstituted C₁₋₆alkyl, C₁₋₆haloalkyl, or C₁₋₆alkoxy;
- R₅ is independently hydrogen, hydroxy, carboxy, substituted or unsubstituted C₁₋₆alkyl, C₁₋₆haloalkyl, or C₁₋₆alkoxy;
- 10 R₁₀ and R₁₁ are independently selected from hydrogen, hydroxy, carboxy, substituted or unsubstituted C₁₋₆alkyl, C₁₋₆haloalkyl, or C₁₋₆alkoxy.
- 15 The term "alkyl" as used in this respect refers to straight or branched chain groups, preferably having one to eight, more preferably one to six, carbon atoms. For example, "alkyl" may refer to methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, isopentyl, tert-pentyl, hexyl, isohexyl, and the like. Suitable substituents for the substituted alkyl groups used in the invention include the mercapto, thioether, nitro, amino, aryloxy, halogen, hydroxyl, and carbonyl groups as well as aryl, cycloalkyl and non-aryl heterocyclic groups.
- 20
- 25 The terms "alkoxy" refers to groups as defined herein above as alkyl groups, as the case may be, which also carry an oxygen atom interposed between them and the substrate residue to which they are attached.
- 30 The term "haloalkyl" represents a straight or branched alkyl chain having from one to four carbon atoms with 1, 2 or 3 halogen atoms attached to it. Typical haloalkyl groups include chloromethyl, 2-bromomethyl, 1-chloroisopropyl, 3-fluoropropyl, 2,3-dibrombutyl, 3-chloroisobutyl, iodo-t-butyl, trifluoromethyl and the like.
- 35 The "halogen" represents fluoro, chloro, bromo or iodo.
- Some of these phenothiazines possess one or more asymmetrically

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

31

substituted carbon atoms and therefore exist in racemic and optically active forms. The invention is intended to encompass the racemic forms of the compounds as well as any of the optically active forms thereof.

5

Acid addition salts may be formed between basic compounds of Figure 8a or 8b and inorganic acids, e.g. hydrohalic acids such as hydrochloric acid and hydrobromic acid, sulphuric acid, nitric acid, phosphoric acid etc., or organic acid, e.g. acetic acid, citric acid, maleic acid, fumaric acid, tartaric acid, methanesulphonic acid, p-toluenesulphonic acid etc.

10

In a particular preferred embodiment the present invention employs a phenothiazine wherein:

15

R₁, R₃, R₄, R₆, R₇ and R₉ are independently -H, -CH₃, -C₂H₅, or -C₃H₇;
R₁₀ and R₁₁ are independently -H, -CH₃, -C₂H₅ or -C₃H₇;
R₅ is -H, -CH₃, -C₂H₅, or -C₃H₇;
or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

20

The present inventors now teach herein that such phenothiazine compounds of this sort can bind to the PHFs at a specific site which appears, on the basis of its binding characteristics, to be distinct from that at which the sulphonated benzothiazole-like compounds, described above, can bind. The binding of the

25

phenothiazine compounds to this site is thought to effect the inhibition of tau aggregation.

Phenothiazine compounds may be used in the methods and other embodiments described above, incorporating labels as appropriate.

30

When suitably labeled with a positron-emitting functional group (detectable by PET - see Figures 11, 11b, 12, 13) such compounds would serve as ligands for all tau aggregates, and would be capable of crossing the blood-brain-barrier (Ref 36) and entering cells.

35

In a further embodiment, in the light of the disclosure herein, it will be appreciated that the effect of, and particularly the progress of, therapy based on tau-tau binding inhibitors may be monitorable by use of SB ligands.

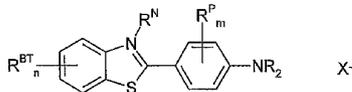
WO 02/075318

PCT/GB02/01318

32

Blocking ligands

Preferably these are benzthiazoles of the formula:



5

wherein:

n is an integer from 0 to 4;

each R^{BT} is independently a blocking ligand benzothiazole substituent;

10 m is an integer from 0 to 4;

each R^P is independently a phenylene substituent;

each R is independently -H or an amino substituent; and,

either:

15 R^N and X^- are both absent and the associated (tertiary) nitrogen atom is neutral;

or:

R^N is a benzothiazolino substituent and the associated (quaternary) nitrogen atom bears a positive charge, and X^- is a counter ion.

20 Preferred benzthiazoles include thioflavin T. As shown in the Examples below, such compounds (e.g. 1b or 2 in Figure 5) are displaced from NFTs by SB-ligands (e.g. 1a in Figure 5). However such compounds do bind preferentially to amyloid.

25 In one embodiment, n is 0. In one embodiment, n is 1.

In one embodiment, n is 2. In one embodiment, n is 3.

In one embodiment, n is 4. In one embodiment, n is 0, 1, or 2.

30 Examples of blocking ligand benzothiazole substituents, R^{BT} , include, but are not limited to, C_{1-4} alkyl groups, $-SO_3H$, and $-SO_3M^3$, wherein M^3 is a cation. In one embodiment, M^3 is an alkali metal cation. In one embodiment, M^3 is Li, Na, K, or Cs. In one embodiment, M^3 is Na or K. Examples of C_{1-4} alkyl groups include, but are not limited to, -Me, -Et, -nPr, and -iPr.

35

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

33

In one embodiment, each R^{BT} is independently a C_{1-4} alkyl group.
In one embodiment, each R^{BT} is selected from: -Me, -Et, -nPr, and -iPr. In one embodiment, each R^{BT} is -Me. In one embodiment, n is 1 and R^{BT} is -Me, -Et, -nPr, or -iPr. In one embodiment, n is 1 and
5 R^{BT} is -Me.

In one embodiment, one of the R^{BT} groups is $-SO_2H$ or $-SO_2M^3$. In one embodiment, one of the R^{BT} groups is $-SO_2H$ or $-SO_2M^3$, and another of the R^{BT} groups is a C_{1-4} alkyl group. In one embodiment, n is 2 and
10 one R^{BT} is a C_{1-4} alkyl group and one R^{BT} is $-SO_2H$ or $-SO_2M^3$. In one embodiment, n is 2 and one R^{BT} is -Me and one R^{BT} is $-SO_2H$ or $-SO_2M^3$.

In one embodiment, R^N and X^- are both absent and the associated (tertiary) nitrogen atom is neutral.

15 In one embodiment, R^N is a benzothiazolino substituent and the associated (quaternary) nitrogen atom bears a positive charge, and X^- is a counter ion. Examples of benzothiazolino substituents, R^N , include, but are not limited to, C_{1-4} alkyl groups. In one
20 embodiment, R^N is -Me, -Et, -nPr, or -iPr. In one embodiment, R^N is -Me. Examples of counter ions include, but are not limited to, Cl^- , Br^- , and I^- . In one embodiment, R^N is -Me and X^- is Cl^- .

In one embodiment, m is 0. In one embodiment, m is 1.
25 In one embodiment, m is 2. In one embodiment, m is 3.
In one embodiment, m is 4.

Examples of phenylene substituents, R^P , include, but are not limited to, C_{1-4} alkyl groups.

30 In one embodiment, each R is -H, and the amino group is $-NH_2$. In one embodiment, one R is -H and one R is an amino substituent. In one embodiment, each R is an amino substituent. Examples of amino substituents include, but are not limited to, C_{1-4} alkyl groups. In
35 one embodiment, the amino group is $-NH_2$, -NHMe, -NHET, -NH(iPr), -NH(nPr), -NMe₂, -NEt₂, N(iPr)₂, or -N(nPr)₂.

Preferred embodiments of blocking ligands are shown in Figure 5 as

WO 02/075318

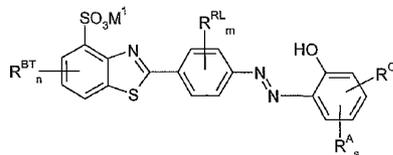
PCT/GB02/01318

34

compounds 1b and 2.

Preferred sulphonated-benzothiazole-like ligands

- 5 In one aspect of the present invention, the ligands used to label the aggregated tau, preferable extracellular aggregated tau present in NFTs, are compounds having the formula (II):



wherein:

- 10 M^1 is an alkali metal cation;
 n is an integer from 0 to 3;
 each R^{BT} is a independently benzothiazole substituent;
 m is an integer from 0 to 4;
 each R^{RL} is independently a rigid linker aryl substituent;
 15 s is an integer from 0 to 4;
 each R^A is independently an aryl substituent; and,
 R^C , if present, is a reactive conjugating substituent, or
 R^C is, or contains, a detectable label.
- 20 In various embodiments, M^1 , n , each R^{BT} , each R^{RL} , s , each R^A , and R^C are as described herein (e.g., under the heading "Sulphonated-benzothiazole-like ligands," above).

- 25 The rigid linker group, RL , and the aryl group, Ar^1 , together with the benzothiazole group, form a compound which is substantially planar, that is, has a high degree of planarity.

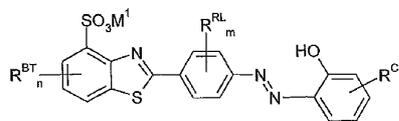
- As shown herein, such compounds may be particularly effective when it is desired to incorporate a bulky R^C group in order to facilitate
 30 detection.

WO 02/075318

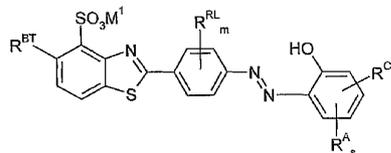
PCT/GB02/01318

35

In one embodiment, the compound has the formula:

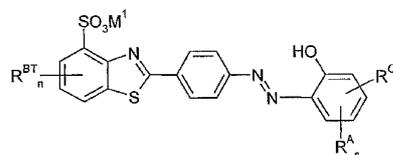


In one embodiment, the compound has the formula:

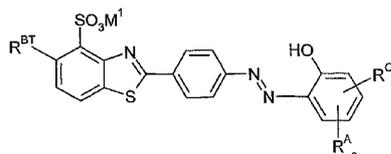


5

In one embodiment, the compound has the formula:



In one embodiment, the compound has the formula:



10 In various embodiments, *s* may be as discussed above.

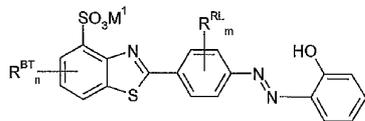
In one embodiment, each R^A is independently selected from the substituents given above in relation to formula (I).

WO 02/075318

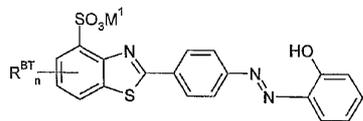
PCT/GB02/01318

36

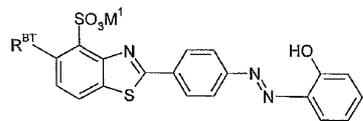
In one embodiment, the compound has the formula:



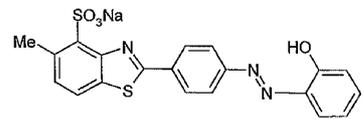
In one embodiment, the compound has the formula:



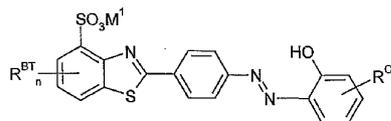
5 In one embodiment, the compound has the formula:



In one embodiment, the compound has the formula:



10 In one embodiment, the compound has the formula:

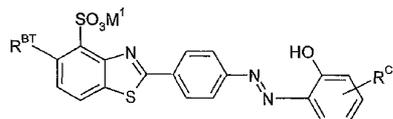


In one embodiment, the compound has the formula:

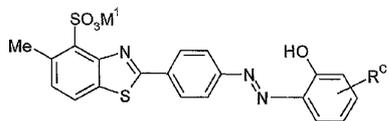
WO 02/075318

PCT/GB02/01318

37



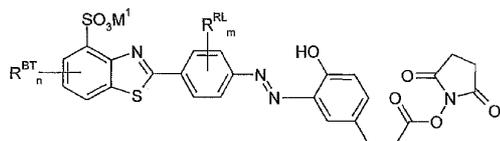
In one embodiment, the compound has the formula:



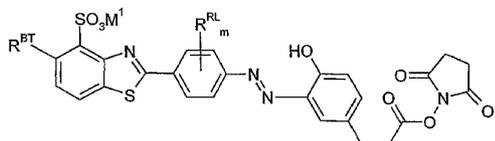
Various R^C substituents are discussed elsewhere herein.

5

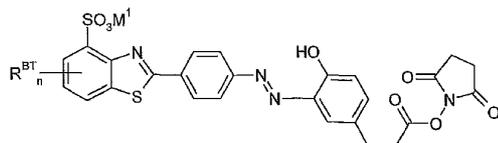
In one embodiment, the compound has the formula:



In one embodiment, the compound has the formula:



10 In one embodiment, the compound has the formula:

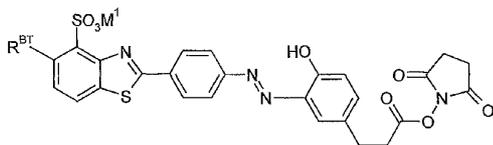


WO 02/075318

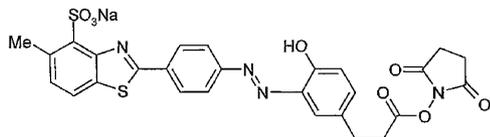
PCT/GB02/01318

38

In one embodiment, the compound has the formula:



In one embodiment, the compound has the formula:



5

Some of these preferred compounds are shown in Figures 4a-c, and derivatives thereof.

Thus, according to one aspect, the present invention provides a compound represented by the formula shown in Figure 4a, or a derivative thereof e.g. wherein R^e is a conjugating group as described above. As shown in the Examples hereinafter, such derivatives (e.g. compound 4b) retain the appropriate binding activity.

15

The novel compounds disclosed (e.g. of formula (II)) herein are useful *inter alia* as synthetic ligands of neurofibrillary tangles, such as those characteristic of AD. The discovery of the minimum critical structure required for binding to these tangles thus provides for the possibility of designing high-affinity ligands which can be used to target the tangles, and can thus be used in the diagnosis, prognosis or treatment of diseases such as AD.

20

Such compounds will be referred to below as preferred SB ligands.

25

Mimetics of preferred SB ligands

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

39

In general, there are several steps commonly taken in the design of a mimetic from a compound having a given target property (in this case a preferred SB tau-tau aggregation ligand) of which the most important is that the particular parts of the compound that are critical and/or important in determining the target property are determined. The provision by the present inventors of the minimum critical structure required for high affinity binding to aggregated tau molecules has obviated this step.

10 The minimum critical structure of compound 4a can be modeled according to its physical properties, e.g. stereochemistry, bonding, size and/or charge, using data from a range of sources, e.g. spectroscopic techniques, X-ray diffraction data and NMR. Computational analysis, similarity mapping (which models the charge and/or volume of the ligand, rather than the bonding between atoms) and other techniques can be used in this modeling process.

In a variant of this approach, the three-dimensional structure of the preferred SB ligand and its binding partner are modeled. This can be especially useful where the ligand and/or binding partner change conformation on binding, allowing the model to take account of this in the design of the mimetic. A template molecule is then selected onto which chemical groups which mimic the minimum critical structure can be grafted. The template molecule and the chemical groups grafted on to it can conveniently be selected so that the mimetic is easy to synthesise, is likely to be pharmacologically acceptable, and does not degrade *in vivo*, while retaining the required biological activity. The mimetic or mimetics found by this approach can then be screened to see whether they have the target property, or to what extent they exhibit it. Further optimisation or modification can then be carried out to arrive at one or more final mimetics for further testing or optimisation, e.g. *in vivo* or clinical testing. Optimisation may include selecting a mimetic compound as described above, and contacting it with a preparation of aggregated tau molecules (e.g. preaggregated tau in solution, or bound to a solid phase, or isolated from PHFs - see WO96/30766 and assays described below) and determining the extent to which the test substance(s) binds to the

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

40

aggregated tau molecules and/or displaces compound 4a from the molecules.

Methods of labelling aggregated tau

5
10
15
20
25
In one aspect, the present invention thus provides a method of labelling aggregated tau or tau-like molecules, comprising contacting the aggregated tau molecules with a preferred SB-ligand compound or derivative thereof as provided herein (e.g. of formula (II)) and detecting the presence of said compound or derivative. Methods of use may be performed e.g. by analogy to the use of the ligands given in Refs 26-34.

15
20
25
Where used herein, the term "tau protein" refers generally to any protein of the tau protein family. Tau proteins are characterised as being one among a larger number of protein families which co-purify with microtubules during repeated cycles of assembly and disassembly (Shelanski et al. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70., 765-768), and are known as microtubule-associated-proteins (MAPs). Members of the tau family share the common features of having a characteristic N-terminal segment, sequences of approximately 50 amino acids inserted in the N-terminal segment, which are developmentally regulated in the brain, a characteristic tandem repeat region consisting of 3 or 4 tandem repeats of 31-32 amino acids, and a C-terminal tail.

30
35
"Tau like" molecules include, for instance, MAP2, which is the predominant microtubule-associated protein in the somatodendritic compartment (Matus, A., in "Microtubules" [Hyams and Lloyd, eds.] pp 155-166, John Wiley and Sons, NY). MAP2 isoforms are almost identical to tau protein in the tandem repeat region, but differ substantially both in the sequence and extent of the N-terminal domain (Kindler and Garner (1994) Mol. Brain Res. 26, 218-224). Nevertheless, aggregation in the tandem-repeat region is not selective for the tau repeat domain. Thus it will be appreciated that any discussion herein in relation to tau protein or tau-tau aggregation should be taken as relating also to tau-MAP2 aggregation, MAP2-MAP2 aggregation and so on.

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

41

The preferred SB ligand may be conjugated, chelated, or otherwise associated with, a further group or entity which has a diagnostic, prognostic or therapeutic purpose or effect, e.g. to a fluorescent group which thus enables visualisation of neurofibrillary tangles to which the ligand binds.

Diagnostic compositions and uses

10 Generally, a preferred SB ligand according to the present invention (e.g. of formula (II)) may be provided in an isolated and/or purified form, i.e. substantially pure. This may include being in a composition where it represents at least about 90% active ingredient, more preferably at least about 95%, more preferably at 15 least about 98%. Such a composition may, however, include inert carrier materials or other pharmaceutically- and physiologically- acceptable excipients. A composition according to the present invention may include in addition to a preferred SB ligand as disclosed herein, one or more other molecules of diagnostic, 20 prognostic or therapeutic use.

A preferred SB ligand substance according to the present invention, or a composition comprising such a ligand, may be provided for use in a method of diagnosis, prognosis or treatment of the human or 25 animal body by therapy, especially in relation to a condition such as AD as described below.

In a further aspect, the present invention provides a method of diagnosis or prognosis, the method comprising administering to the 30 mammal a diagnostically- or prognostically- effective amount of one or more preferred SB ligands as described herein. This aspect embraces such compounds for use in a method of diagnosis or prognosis. Both *in vitro* and *in vivo* uses are encompassed by this aspect. *In vitro* methods may be performed by (i) obtaining a sample 35 of appropriate tissue from a subject; (ii) contacting the sample with the preferred SB ligand; (iii) detecting the amount and/or localisation of the preferred SB ligand bound to the sample (iv) correlating the result of (v) with the stage or severity of the

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

42

disease in the subject.

In a further aspect, the present invention provides the use of a preferred SB ligand or derivative as provided herein, in the
5 manufacture of a composition for the diagnosis, prognosis or therapy of a disease as described above.

The disease or condition may be e.g. AD, or an AD-like condition, or any other condition in which aggregated protein molecules are
10 implicated.

Notably it is not only Alzheimer's Disease in which tau protein (and aberrant function or processing thereof) may play a role. The pathogenesis of neurodegenerative disorders such as Pick's disease
15 and Progressive Supranuclear Palsy (PSP) appears to correlate with an accumulation of pathological truncated tau aggregates in the dentate gyrus and stellate pyramidal cells of the neocortex, respectively. Other dementias include fronto-temporal dementia (FTD); parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17);
20 disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex (DDPAC); pallido-ponto-nigral degeneration (PPND); Guam-ALS syndrome; pallido-nigro-luysian degeneration (PNLD); cortico-basal degeneration (CBD) and others (see Wischik et al. 2000, loc. cit, for detailed discussion - especially Table 5.1). All of these
25 diseases, which are characterized primarily or partially by abnormal tau aggregation, are referred to herein as "tauopathies".

Diagnostic compositions may comprise, in addition to one of the above SB-ligand derivatives, a diagnostically acceptable excipient,
30 carrier, buffer, stabiliser, or other materials well known to those skilled in the art. Such materials should be non-toxic and should not interfere with the binding activity of the substance to aggregated tau, or the efficacy of any bioactive group linked to or otherwise associated with the substance. The precise nature of the
35 carrier or other material may depend on the route of administration, e.g. oral, intravenous, cutaneous or subcutaneous, nasal, intramuscular, intraperitoneal routes.

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

43

- Diagnostic compositions for oral administration may be in tablet, capsule, powder or liquid form. A tablet may include a solid carrier such as gelatin or an adjuvant. Liquid diagnostic compositions generally include a liquid carrier such as water, petroleum, animal or vegetable oils, mineral oil or synthetic oil. Physiological saline solution, dextrose or other saccharide solution or glycols such as ethylene glycol, propylene glycol or polyethylene glycol may be included.
- 5
- 10 For intravenous, cutaneous or subcutaneous injection, or injection at the site of affliction, the ligand will be in the form of a parenterally acceptable aqueous solution which is pyrogen-free and has suitable pH, isotonicity and stability. Those of relevant skill in the art are well able to prepare suitable solutions using, for example, isotonic vehicles such as Sodium Chloride Injection, Ringer's Injection, Lactated Ringer's Injection. Preservatives, stabilisers, buffers, antioxidants and/or other additives may be included, as required.
- 15
- 20 A composition as described above may be administered alone or in combination with other treatments, either simultaneously or sequentially, depending on the condition to be treated.

Identification of ligands

- 25 A further method for identifying ligands for aggregated tau requires a screening assay which can be used in a format which permits high through-put screening of chemical libraries to identify compounds with the required activity. Until now, no such method has been readily available. Preferred methods would not require pre-labelled compounds, since the labelling process may severely limit chemical search capacity.
- 30

- In a further aspect of the present invention a method is provided which can be used as a high through-put screening assay, which is not limited by the need to have pre-labelled test substances. In preferred embodiments the method employs the following steps:
- 35
1. the high capacity generation of tau proteins in a form which

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

44

- have undergone partial aggregation in the course of preparation;
2. using tau proteins prepared in this manner for testing putative ligands in the tau-tau binding assay provided in WO96/30766 to identify substances which have minimal or entirely absent activity
- 5 as tau-aggregation inhibitors or enhance tau-tau binding at high concentrations;
3. testing putative ligands in the presence of an exemplary potent tau-aggregation inhibitor, such as DMMB, at an inhibitory concentration;
- 10 4. putative ligands can be identified by the property that they lack capacity to block tau-tau binding through the repeat domain, but block the inhibitory activity of a potent tau-aggregation inhibitor.
- 15 Thus the invention provides an *in vitro* method for identifying a ligand capable of labeling aggregated PHF tau protein, the method comprising the steps of:
- (i) providing a first agent suspected of being capable of labeling aggregated PHF tau protein,
- 20 (ii) contacting (a) a tau protein or a derivative thereof containing the tau core fragment bound to a solid phase so as to expose a high affinity tau capture site (e.g. a truncated tau protein corresponding to the core fragment and terminating at Ala390 - dGA), with (b) a liquid phase tau protein or derivative
- 25 thereof capable of binding to the solid phase tau protein or derivative (e.g. dGAE which terminates at Glu-391), and (c) said selected first agent and (d) a second agent known to be tau-tau binding inhibitor,
- (iii) selecting a first agent which fully or partially relieves the
- 30 inhibition of binding of the liquid phase tau protein or derivative of (b) to the solid phase tau protein or derivative of (a) by the inhibitor (d).
- Agents satisfying (iii) may be provided as ligands.
- 35 Preferably the method is carried out in conjunction with (before, during, after) the following steps:

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

45

(ibis) contacting (a) a tau protein or a derivative thereof containing the tau core fragment bound to a solid phase so as to expose a high affinity tau capture site, (b) a liquid phase tau protein or derivative thereof capable of binding to the solid phase tau protein or derivative, with (c) said first agent and, (ibis.1) detecting inhibition of tau-tau binding as exhibited by inhibition of binding of the liquid phase tau protein or derivative of (b) to the solid phase tau protein or derivative of (a), (ibis.2) selecting a first agent which has minimal or absent activity as tau-tau binding inhibitors and/or optionally enhance tau-tau binding.

Agents satisfying (iii) and (ibis.2) may be provided as ligands.

The inhibitor is preferably a diaminophenathiozine as described above (most preferably DMB). The compounds selected for screening may be any compound, including SB-ligands.

In preferred forms the liquid phase tau protein or derivative is prepared in a form which has undergone partial aggregation prior to exposure to the solid phase. Apart from that, the assay may be carried out broadly as described in W096/30766 and summarised in more detail in the Examples below. Preferably alkaline or physiological conditions (e.g. PBS) are used for the binding steps, and results are detected immunologically.

These and other aspects of the present invention will become more apparent on reading the ensuing non-limiting Examples, in which embodiments of the invention will be described by way of example only. Reference is made to the accompanying figures, in which:

Brief description of the Figures

Figure 1 shows the regional distribution of PHF-tau, measured using antibodies mAb423 (A) or mAb7.51 after formalic acid treatment of the PHF fraction (B), for 18 cases of AD. Taken from Mukaetova-Ladinska et al., (1993), Am. J. Pathol. 143, 565-578.

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

46

- Figure 2 (a) shows the aggregation of tau molecules and the appearance of neurofibrillary tangles during the pathological stages of AD. Taken from (Mukaetova-Ladinska, E.B. *et al.* (2000) *Am. J. Pathol.* Vol. 157, No. 2, 623-636); (b) shows the
- 5 neuropathological staging proposed by Braak; (c) shows that the appearance of clinical dementia by DSM-IV criteria appears to correspond statistically to the transition between stages III and IV;
- (d) shows levels of SDS-insoluble beta-amyloid protein isolated
- 10 from control cases and cases with Alzheimer's disease, as reported in Harrington *et al.*, (*Am J Pathol* 1994; 145: 1472-1484). Although the mean level is higher in AD than in controls, 70% of AD cases overlap with levels of beta-amyloid found in control subjects.
- 15 Figure 3 shows a schematic representation of a neurofibrillary tangle (top), and the immunoreactivity changes that are observed during disease progression (bottom). Taken from Bondareff *et al.* (1994) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53, 2, 158-164.
- 20 Figure 4 shows the chemical structures of: the minimum critical structure which enables high affinity binding to aggregated tau molecules (compound 4a); a biotinylated version of compound 4a (compound 4b); and an R-substituted derivative of compound 4a (compound 4c), wherein R is any suitable substituent.
- 25 Figure 5 shows the chemical structures of: primulin (compound 1a); thioflavin-T (compound 1b); 2-(4-amino phenyl)-6-methyl-1-sulphonate benzothiazole (compound 2); thiazin red (compound 3a); and thiazin yellow (compound 3b).
- 30 Figure 6 shows the fluorescence peaks of primulin in solution (left), and when bound within a pure preparation of PHFs (right).
- 35 Figure 7 shows the fluorescence peaks of primulin bound to PHFs, in the absence (left) and presence (right) of citraconic anhydride. As is shown, citraconic anhydride has the effect of disrupting the orderly structure of PHFs and releasing free tau and free unbound primulin. Citraconic anhydride also has the effect of reversing

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

47

the charge on lysine residues and this may also play a role in releasing the primulin.

5 Figures 8a and 8b illustrate exemplary tau-tau binding inhibitors, as disclosed in WO 96/30766.

10 Figure 9 shows the fluorescence of primulin bound to PHFs in the presence of alcian blue. The figure demonstrates that, in the presence of alcian blue, a disrupter of PHF structure (Ref 33), there is no disturbance of the characteristic bound primulin fluorescence peak at 460nm.

15 Figure 10 shows the effect of various compounds ("MR", molar ratio of compound:tau) on tau-tau binding using tau proteins prepared according the method provided in WO96/30766 and referred to herein as "Preparation 1".

20 Figure 11a show schematically the synthesis of [¹¹C]-labelled methylene blue. The reaction proceeds via N-methylation of the amines with [¹¹C]iodomethane. HPLC can be used to purify the desired product from any by-products. Figure 11b shows a further synthesis based on thionin, NaH and CH₃I.

25 Figure 12 shows schematically the synthesis of [¹¹C]-labelled Azure B. The reaction proceeds via N-methylation of the amines with [¹¹C]iodomethane. HPLC can be used to purify the desired product from any by-products.

30 Figure 13 shows schematically the synthesis of a [¹⁸F]-labelled derivative of compound 4a of Figure 4. The reaction proceeds via nucleophilic aromatic substitution whereby a nitro-group on a precursor compound is exchanged for a [¹⁸F] fluoro group. HPLC can be used to purify the desired product from any by-products.

35 Figure 14 shows the structures Primulin, Benthothiazole Analogue and Thiazin Yellow. The sizes of these molecules have been determined on the basis of C-C distances known from chrystal structures, and designated A and B for each molecule. The C-C

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

48

lengths are as follows:

	Primulin	Minimum	14.78 AU
		Maximum	15.11 AU
5		Mean	14.95 AU
	Analogue	Minimum	15.05 AU
		Maximum	15.26 AU
10		Mean	15.17 AU
	Thiaz. Yellow	Minimum	15.73 AU
		Maximum	16.14 AU
		Mean	15.93 AU

15 Figures 15 and 16 illustrate the crystal structure of the 'B' part of the primulin structure (Soon-Beng Teo et al., 1995, Acta Crystallogr., Sect. C, 591.

20 Figures 17 and 18 illustrate the crystal structure of a compound denoted N2A (Gilardi, R.D., 1972, Acta Crystallogr., Sect. B, 107).

25 Figures 19 and 20 show the crystal structure of a diazoaminobenzene (Gladkova & Kondrashev, 1972, Kristallografiya (41) 17 33.

Figures 21 and 22 illustrate how the molecule of Figures 15 and 16 crystalises in space.

30 Figure 23 shows a comparison of the mean, maximum and minimum extents of molecules which are active ligands (primulin and "analog"), and thiazin yellow (which is inactive as a ligand). The dimensions are given in angstrom units (AU).

35 Figure 24 shows a similar comparison for the basic benzothiazole nucleus (i.e. molecules 1b and 2 of Figure 5) and the diaminophenothiazines. These distances are carbon-to-carbon distances.

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

49

Figure 25 shows probability of extracellular tangles as a function of Braak staging. Stages 2 - 4 can be clearly distinguished from stage 1 on the basis of probability of extracellular tangles in E2/Trans and E4/HC.

5

Figure 26 shows probability of intracellular tangles as a function of Braak staging. Intracellular tangles provide a poor basis for discrimination of early stages in these regions, but a good basis for discriminating stages 4 and 5 using neocortical regions.

10

Figure 27 corresponds to Figure 25, but wherein cases with MMSE scores greater than 21 in the 12 months prior to death were selected. Similar results are obtained.

15

Figure 28 corresponds to Figure 26, but using cases with MMSE scores greater than 21 in the 12 months prior to death were selected. Similar results are obtained.

20

Figure 29 shows extracellular tangle densities (counts per mm^2) as a function of Braak staging. Similar results are obtained to those shown in Figure 25.

25

Figure 30 shows intracellular tangle densities (counts per mm^2) as a function of Braak staging.

30

Figure 31a shows a barely visible tangle visualised with thioflavin-T at 0.001% (arrowhead). In ifI suspensions such as this, tangles can be seen by blue fluorescence which is not distinct from that associated with binding of contaminants in the preparation. The bottom panel shows that blue tangle fluorescence produced by thioflavin-T at 0.001% is displaced by yellow tangle fluorescence produced by primulin at 0.001%. Figure 31b shows Electron-microscopy of PHFs labelled after Pronase digestion. (a) Chemical labelling with the biotinylated benzothiazole analogue shown as 4b in Figure 4. PHFs were deposited on a carbon-coated grid after Pronase digestion, and incubated briefly with compound 4b, and then incubated with an anti-biotin antibody preparation that had been conjugated with colloidal gold. Decoration of

35

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

50

isolated PHFs establishes that the compound 4b binds to the proteolytically stable PHF structure. (b) mAb 423 immunolabelling of isolated PHFs after Pronase digestion., followed by incubation with a gold-conjugated goat anti-mouse second antibody as described in Novak et al. 1993 (Novak M, Kabat J, Wischik CM (1993) "Molecular characterisation of the minimal protease-resistant tau unit of the Alzheimers' disease paired helical filament", EMBO J 12: 365-370). As shown in this paper, mAb 423 labels PHFs derived from intracellular tangles (which preserve N-terminal tau immunoreactivity in the fuzzy outer coat) poorly, but Pronase digested PHFs strongly. Likewise Mena et al. (1996) (Mena R, Edwards PC, Harrington CR, Mukaetova-Ladinska EB, Wischik CM, "Staging the pathological assembly of truncated tau protein into paired helical filaments in Alzheimer's disease", Acta Neuropathol 91: 633-641) shows that in intracellular tangles mAb 423 immunoreactivity is largely occluded, but can be exposed by formic acid pretreatment of sections.

Figure 32 shows "Preparation 2" of purified tau protein as described in Example 7 below.

Figure 33 shows a graphical plot of the results of a preparative run for dGA. "Purification-fold" is expressed as the ratio of specific immunoreactivity for each fraction (ie immunoreactivity / protein concentration) to specific immunoreactivity in the DE flow-through.

Figure 34 shows gel filtration chromatography of purified dGAE. Apparent elution size in non-denaturing conditions:
1 - ~320 kD; 2 - ~80 kD; 3 - ~30 kD; 4 - ~10 kD
About 64% of mAb 7.51 immunoreactivity elutes in fractions corresponding to species of size > 15kD.

Figure 35 shows gel filtration chromatography of purified T40. Apparent elution size in non-denaturing conditions:
1 - ~450 kD; 2 - ~160 kD; 3 - ~55 kD.
About 50% of mAb 499 immunoreactivity elutes in fractions corresponding to species of size > 60kD.

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

51

Figure 36 shows thionine activity against tau-tau binding in Preparations 1 & 2.

5 Figure 37 shows tolonium chloride activity against tau-tau binding in Preparations 1 & 2.

Figure 38 shows DMMB activity against tau-tau binding in Preparations 1 & 2.

10

Figures 39a-c show that full-length tau protein (hT40) prepared according to the Preparation 2 protocol demonstrated minimal tau-tau binding activity when used in the aqueous-phase with dGA in the solid-phase (b). However, when hT40 was used in the solid-phase (c), 15 binding of dGAE was similar to that obtained for binding of dGAE to dGA in the solid-phase (a).

Figure 40 shows primulin and thiazin red have no inhibitory activity against tau-tau binding in Preparation 2, and indeed 20 enhance such binding at high concentrations.

Figure 41 shows blocking of inhibitory effects of 5 μM DMMB on tau-tau binding in the presence of increasing concentrations of Primulin (a) and Thiazin Red (b), expressed as "molar excess" 25 relative to DMMB. Similar results are shown for 15 μM DMMB in the presence of increasing concentrations of Primulin (c) and Thiazin Red (d).

Figure 42 shows attenuation and reversal of inhibition of Tau-Tau binding by DMMB in the presence of increasing molar excess of 30 Primulin. For each graph, Tau-Tau binding is shown in the presence of constant concentrations of DMMB co-incubated with Primulin at 0x, 1x, 5x, 10x, 100x the DMMB concentrations shown. Inhibition of Tau-Tau binding produced by DMMB is progressively attenuated and 35 reversed in the presence of increasing molar excess of Primulin.

Figure 43 shows a tau-Tau binding curve in the presence of 25 μM DMMB and increasing Primulin molar excess as shown. Tau-Tau binding

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

52

can be modelled as follows:

$$\text{Binding} = (\text{BMax} \times [\text{Prim}]) / (\text{Kd} + [\text{Prim}])$$

5 Where B_{Max} = 1.67
 Kd = 13.37
 r = 0.977 (observed vs predicted)

10 Figure 44 shows a tau-Tau binding curve in the presence of 5 μM
DMMB and increasing Primulin molar excess as shown. Tau-Tau binding
can be modelled as follows:

$$\text{Binding} = (\text{BMax} \times [\text{Prim}]) / (\text{Kd} + [\text{Prim}])$$

15 Where B_{Max} = 1.38
 Kd = 13.86
 r = 0.927 (observed vs predicted)

20 Figure 45 shows a tau-Tau binding curve in the presence of 5 μM
DMMB and increasing Thiazin Red molar excess as shown. Tau-Tau
binding can be modelled as follows:

$$\text{Binding} = (\text{BMax} \times [\text{TR}]) / (\text{Kd} + [\text{TR}])$$

25 Where B_{Max} = 1.64
 Kd = 17.45
 r = 0.915 (observed vs predicted)

Examples

30

Methods and materials

PHF-binding compounds

35 Compounds used herein were supplied by ICI Pharmaceuticals unless
stated otherwise. Thioflavin-T and thiazine yellow were purchased
from Fluka AG.

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

53

Quantitation of Fluorescence

Serial 16 μm sections are cut from the hippocampus of a case dying with clinically and neuropathologically confirmed AD. These sections were stained with thioflavin-S at concentrations 0.01%, 0.001% or 0.0001% in water for 5-10 min, then washed in water, and mounted in Apathe's aqueous medium. In a second series of experiments, sections were cut from the hippocampus and nucleus basalis of Meynert. These sections were stained with primulin at concentrations 0.1%, 0.01%, 0.001% and 0.00001% in water for 5-10 min, then washed in water, and mounted in Apathe's aqueous medium.

A Leitz fluorescence microscope fitted with a photo-multiplier tube (Model MPV-2) was used to quantitate fluorescence emission. Three Leitz filter blocks were used as follows:

1. Filter block H2, code 513 417
Excitation range Band pass 390-490nm
Mirror RKP 510 (i.e. transmit below 510 nm)
Suppression filter LP 515 (i.e. reflect above 515 nm)
3. Filter block G, code 513 416
Excitation range Band pass 350-460 nm
Mirror RKP 510 (i.e. transmit below 510 nm)
Suppression filter LP 515 (i.e. reflect above 515 nm)
4. Filter block A, code 513 410
Excitation range UV band pass 340-380 nm
Mirror RKP 400 (i.e. transmit below 400 nm)
Suppression filter LP 430 (i.e. reflect above 430 nm)

Preparation of If I and II

If I material was prepared as described by Wischik et al (1985) J Cell Biol 100: 1905-1912.

If II material was prepared as described by Wischik et al (1995) Neurobiol Aging 16: 409-431. For experiments involving non-pronase

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

54

digested ifII an identical protocol was followed, omitting the pronase digestion step.

Spectrofluorimetry of ifII

5

These measurements were carried out in a Perkin-Elmer spectrofluorimeter (model MPF-3). A concentration of ligand of 0.00001% was routinely used for all measurements. Primulin was found to have an excitation peak at 370 nm and an emission peak at 515 nm. All measurements were therefore carried out at a standard excitation wavelength of 370 nm, and a constant slit width of 3 nm.

10

Competitive Binding Assay

IfI material was homogenised in a 0.2 ml glass homogeniser in PBS. To the suspension, test compounds were added to final concentrations ranging from 0.1% to 0.00001%. These were allowed to incubate for 5 min and primulin was added at equivalent or lower concentration. The suspensions were transferred to a glass slide, and examined by fluorescence microscopy across a range of fluorescence filter blocks, covering excitation and emission wavelengths between 380 nm and 570 nm. The end point sought in these observations was displacement of typical primulin fluorescence from tangle fragments.

15

Ligand Electronmicroscopy

PHFs derived from an ifI fraction were deposited on a carbon coated grid after pronase digestion, and incubated briefly with a preparation of biotinylated Primulin, and then incubated with an anti-biotin antibody that has been conjugated with colloidal gold by the method of Slot and Gueze (1981).

20

Succinylation and Chromatography of IfII

25

Washed ifII fractions were taken up in 8 M urea/50 mM borate (1 ml, pH 9) and sonicated, 1 ml succinic anhydride in acetone was added to a final concentration of 250 mM succinate in 4 ml, and the pH

30

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

55

was maintained at 8.5 with sodium hydroxide. The solution was clarified by centrifugation and applied to a Sephacryl S200 column equilibrated bicarbonate. The column eluate was monitored at either 230 or 280 nm.

5

Because succinylated fractions could not be visualised by Coomassie staining or silver staining of gels, bands were detected by autoradiography after specific chemical labelling of ifII fractions with Bolton-Hunter reagent (Amersham).

10

For photoaffinity labelling of PHF derived peptides, ifI or ifII fractions were pre-incubated with an I¹²⁵-labelled photolabile derivative.

15

The photolabelled fraction running at a Kav of 0.21 was concentrated by ultrafiltration through an Amicon YM2 membrane (10ml), digested with chymotrypsin (0.01 mg/ml) in 50 mM ammonium bicarbonate. Chymotryptic fragments for sequence analysis were isolated by Dr H.C. Thogersen by reverse phase HPLC using a C18 column, with a 0-100% acetyl nitrile gradient, with 0.1% trifluoroacetic acid. Chymotryptic peptides were sequenced.

20

Morphological Studies of PHFs in the presence of phenothiazines

25

For these experiments, ifII fractions were prepared as described above for electron microscopy. This material was either incubated directly with preparations of phenothiazines at final concentrations ranging between 0.1% and 0.0001% and then applied to carbon coated grids, and examined directly after LiPTA staining (1%). Alternatively, ifII suspensions were deposited on carbon coated grids, partially dried, and washed with solutions of phenothiazine. Such preparations were either stained directly with LiPTA or were processed further for immunoelectron microscopy using 6.423 as the primary antibody. Electron micrographs were recorded at nominal magnifications between 25,000 and 45,000.

30

35

Calculation of aggregated tau protein in the extracellular space expressed in µg/g of brain tissue as a function of Braak staging

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

56

Previously reported PHF-tau levels in pmol/g (P) and tangle counts per mm² (T) in a clinically and neuropathologically staged cohort (R.Y.K. Lai, et al., *Neurobiol Aging* 16, 433 (1995)) were used to derive an estimate of PHF-tau level per affected pyramidal cell (PC) in pg/cell using the same ELISA in human brain. The tangle count per mm² provides an estimate of the number of affected pyramidal cells within a volume 1 mm x 1 mm x 0.1 mm (0.0001 cm³), allowing that any tangle profile counted in a nominal 7 μm section could extend ~ 45 μm orthogonal to the section in either direction (S.M. Blinks, I.I. Glezer, *The human brain in figures and tables, a quantitative handbook*; Plenum Press, NY, 1968, Table 204). The core PHF-tau level in pg/cm³ is 10 x P since the PHF-core tau fragment is 10 kD (C.M. Wischik, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4506 (1988)). From this, PC = (P x 10) / (T / 0.0001). At Braak stages 4-6 (H. Braak, E. Braak, *Acta Neuropathol.* 82, 239 (1991)), regional values for PC in grey matter were: frontal cortex, 0.13 ± 0.05 pg/cell; hippocampus, 0.60 ± 0.39 pg/cell; temporal cortex, 1.074 ± 0.44; entorhinal cortex 1.56 ± 0.63 pg/cell. These differences reflect anatomical differences, different regional rates of disease progression (C. Baner, H. Braak, P. Fischer, K. Jellinger, *Neurosci. Lett.* 162, 179 (1993), also Gertz et al., *Acta Neuropathol.* 95, 154 (1988)), and the degree to which tangle counts underestimate PHFs accumulating in dystrophic neuritis at more advanced stages of pathology (Lai et al, 1995, *loc cit*). The overall means provide an approximation for the PHF-levels per cell which would be relevant to AD. These are 0.37 ± 0.08 pg/cell for cases at Braak stages 1-3, and 1.08 ± 0.28 pg/cell for cases at Braak stages 4-6.

For the purpose of estimating extracellular aggregated PHF tau, shown below in the Table, and in Figure 26, 27, 29 and 31, tangles were counted as extracellular if mAb 423 immunoreactivity could be demonstrated after treatment of glass-mounted sections with 98% formic acid for 5 minutes prior to incubation with mAb 423 for 1 hr. For the avoidance of doubt, this methodology differs from that reported in Mena et al. (1996) where free-floating vibrotome sections were incubated briefly with formic acid, and then overnight with mAb 423. As shown in that report, this latter

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

57

overnight free-floating section protocol achieved maximal mAb 423 immunoreactivity in intracellular tangles, and showed that all intracellular tangles contain mAb 423 immunoreactivity, albeit in a state substantially occluded by the fuzzy outer coat of the PHF (see Figure 3). The purpose of the present protocol was to ensure maximum labelling of the Stage 3 and Stage 2 tangles illustrated in Figure 3. Some minor degree of labelling of intracellular tangles could not be entirely excluded, and counting attempts have also been made where a subjective discrimination has been attempted. However, the latter estimates do not agree with density or probability of labelling of tangles by mAb AT8 (Figures 28, 30, 32), which is solely intracellular, and shows completely different profiles with respect neuropathological stage from those revealed using mAb 423. For the purposes of the present calculations, therefore, counts of mAb 423-immunoreactive tangles were taken as substantially or entirely representative of extracellular tangle pathology at Stages 2 and 3 as shown in Figure 3, but substantially not Stage 1 of Figure 3. For the avoidance of doubt, the Stages referred to in Figure 3 are not Braak stages, but stages of degeneration of a single neurone containing a tangle.

The specific data shown in Table 1 was based on the following:

Number	BST	ME1T4	PC	PT4	REG3B	SE1T4
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
6	1.0000	0.0	0.6000	0.0	2.0000	0.0

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

58

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
5 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
11	1.0000	0.0	0.6000	0.0	3.0000	0.0
10 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
15 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

wherein:

20

BST is Braak Stage

ME1T4 is the extracellular tangle count

PC is an estimate of the PHF-tau concentration per cell (calculated as above)

25

PT4 is the PHF content ascribed to extracellular tangles (PC x ME1T4)

REG3B is the grouping of brain regions into 3 groups as per Figs 26 and 27 of the SE1T4 is the standard error of the extracellular tangle count

30

Example 1 - aggregated tau in Braak staging

35

Based on immunochemical properties (Refs 26, 27, 30), it is possible to distinguish intracellular tangles from extracellular tangles. Both frequency of cases with tangles in these categories (ie probability) and their quantity (ie counts per mm²) were determined in a prospective case series and grouped into the

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

59

regions known to represent stages in the progression of pathology according to the system of Braak and Braak

As shown in Figure 25, stages 2 - 4 can be clearly distinguished from stage 1 on the basis of probability of extracellular tangles in E2/Trans and E4/HC. Also shown are the figures for F/T/P regions (neocortical regions - frontal, temporal, parietal).

Conversely, intracellular tangles provide a poor basis for discrimination of early stages in these regions, but a good basis for discriminating stages 4 and 5 using neocortical regions. Similarly, when cases with MMSE scores greater than 21 in the 12 months prior to death were selected, similar results were obtained. Again, similar results were obtained when tangle densities were determined.

These results can be converted into approximations for the quantity of aggregated tau protein in the extracellular space expressed in $\mu\text{g/g}$ of brain tissue as described in Materials and Methods above. The results are shown in Table 1. These are underestimates, as the tangle counts underestimate the quantity of aggregated tau protein.

Table 1: ESTIMATE PHF-TAU CONTENT IN ECT'S BY REGION AND STAGE

REGION	BST	PHF/TAU ($\mu\text{g/g}$)
E2/TRANS	1	0.62
	2	10.49
	3	23.34
	4	52.46
	5	69.12
HC/E4	1	0
	2	0.83
	3	2.23
	4	5.36

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

60

	5	14.36
F/T/P	1	0
	2	0
5	3	0
	4	0.08
	5	1.32

Table 1 shows quantity of aggregated tau protein in the
 10 extracellular space expressed in $\mu\text{g/g}$ of brain tissue as a function
 of Braak staging. The data was calculated as described in the
 materials and methods.

In summary, these results demonstrate that extracellular deposits
 15 of PHF-tau in medial temporal lobe structures provide a basis for
 empirical staging of the neurofibrillary degeneration of AD. Such
 staging could only be accomplished by radio-imaging methods
 provided suitable ligands could be created.

20 Example 2 - assessment of compounds binding within the aggregated
 repeat domain of PHF-core tau protein

A prototype compound was obtained as one component of the crude,
 commercially-available preparation of thioflavin-S was separated
 25 into ~20 distinct constituents by analytical thin-layer
 chromatography, and preparative chromatography. Tests showed that
 not all of the constituents were able to act as effective tangle
 ligands. Specifically, pure primulin (Figure 5, compound 1a) was
 found to label tangles, but the benzothiazole thioflavin-T (Figure
 30 5, compound 1b) was much less effective, although it labelled
 amyloid preferentially.

Furthermore, compound 1a was found to displace compound 1b at
 tangles when the latter was introduced at 10-fold excess into crude
 35 tangle extracts.

A possible difference was postulated to be the sulphonate group at
 position 1 (Figure 5, compound 2 [2 - (4 - amino phenyl) - 6 -

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

61

methyl - 1 - sulphonate benzothiazole}). However, primulin (compound 1a) was found to displace this from tangles (though not amyloid). Therefore, tangle labelling is not due solely to the sulphonated benzothiazole structure, indicating that a longer aromatic structure is required.

Purified thiazin red (Figure 5, compound 3a) was found to compete with primulin at equivalent concentrations, whereas the compound 3b (thiazin yellow, Figure 5) did not. Therefore, an extended aromatic benzothiazole structure does not, *per se*, determine high binding affinity within tangles.

In order to define a minimum critical requirement for competitive binding, the sulphonated benzothiazole was extended by addition of a single phenyl group across a diamino-linkage. This compound (Figure 4, compound 4a), although not fluorescent, was found to compete out thiazin red and primulin fluorescence at equivalent concentrations. Compound 4a therefore defines the minimum critical structure required for high affinity binding within the tangle.

In order to prove that the binding site within the tangle was in fact the PHF itself, compound 4a was further extended with addition of a biotin group (Figure 4, compound 4b). Since this was still found to compete primulin and thiazin red, compound 4b preserved high affinity binding within the tangle. Furthermore, immunogold-conjugated anti-biotin antibody was found to label isolated PHFs pre-incubated with compound 4b, whereas no labelling was demonstrated without pre-incubation or pre-incubation with biotin alone (Fig 31b). Finally, when a photo-activated conjugate of the compound was prepared, it was possible to identify and sequence the labelled protein. This was found to be the same core tau fragment as that isolated from the core of the PHF, which comprises the repeat region of the tau protein.

In summary, these results demonstrate unequivocally that the binding site for compounds 4a and 4b is within the aggregated repeat domain of the tau protein of the PHF-core. Furthermore, they demonstrate that compound 4a can be used as a chelate for

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

62

addition of functional groups without disturbing ligand activity within the PHF core. Therefore, compound 4a could be used as chelate for addition of technetium or other imaging moiety to generate a ligand suitable for detecting e.g. extracellular tangles in AD.

Example 3 - determination of optimum dimensions of ligand molecules

Figure 14 shows three of the structures described above, along with their dimensions as indicated. For example, the C11-C1 distance and C10-C1 distance are shown for primulin, a benzothiazole analogue (denoted 'analog'), and 'thiazin yellow'.

Figure 15 and 16 illustrate the crystal structures of the 'B' part of the primulin structure (Soon-Beng Teo et al., 1995, Acta Crystallogr., Sect. C, 591). As can be seen from Figure 16, which is a 'side-on' view, the molecule is essentially flat, although it has a slight twist. The 'A' part of primulin can be computed from the same molecule. From this, one can derive measures of A+B, which provide an indication of the actual length of one of the active species of the present invention.

To compute the size of the "analog" shown in Figure 14, measurement A was used from the data of Figure 15, and measurement B was determined from a molecule denoted NZA and shown in Figures 17 and 18 (Gilardi, R.D., 1972, Acta Crystallogr., Sect. B, 107). As can be seen from the side-on view in Figure 18, this part of the molecule is completely flat. The same measurements apply to thiazin red, which is identical in its dimensions to the "analog".

The size of thiazin yellow (shown in Figure 14) was determined as follows. The 'A' part comes from the molecule of Figure 15 which was used for primulin, while the 'B' part comes from the molecule shown in Figures 19 and 20 (Gladkova et al., 1972, Kristallografiya 41). Again, part B of the molecule is completely flat, and the only difference with respect to the molecule shown in Figure 17 is the distance between the aromatic groups.

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

63

Figures 21 and 22 illustrate how the molecule of Figure 15 crystallises in space. As can be seen, the molecule forms an alternating 'herring-bone' pattern, and does not stack. In comparison, the crystal structure of methylene blue indicates that the molecules form stacks with alternating sheets of water molecules between the pi-bonded stacks.

Table 2 tabulates the minimum, maximum and mean dimensions for primulin ("PRIM"), the analog ("ANAL"), thiazin yellow, and the benzothiazole unit alone (i.e. structures 1b and 2 as shown in Figure 5). The corresponding methylene blue dimensions are given as 'MBCC' (carbon to carbon) and 'MBNN' (nitrogen to nitrogen):

	1	2	3	4	5	6
	PRIM	ANAL	THIAZY	BENZTHIA	MBCC	MBNN
Minimum	14.7830	15.0500	15.7270	8.7700	7.0849	9.9600
Maximum	15.1120	15.2610	16.1380	8.9550	7.4443	9.9600
Mean	14.9475	15.1680	15.9273	8.8625	7.3031	9.9600

Figure 23 shows a comparison of the mean, maximum and minimum extents of molecules which are active ligands (primulin and "analog"), and thiazin yellow (which is inactive as a ligand). The dimensions are given in angstrom units (AU). In Figure 24, a similar comparison is made for the basic benzothiazole nucleus (i.e. molecules 1b and 2 of Figure 5) and the diaminophenothiazines. These distances are carbon-to-carbon distances.

The above results illustrate that the molecules provided herein are substantially flat. There is, however, a fundamental difference in activity between ligands according to the present invention and other molecules discussed above. As is shown in the Figures, suitable ligands according to the invention comprise long, flat molecules with dimensions between 14.783 and 15.261 AU. On the other hand, a longer molecule, such as thiazin yellow, which exceeds these dimensions (mean 15.927 AU) does not serve as an effective ligand, even though it is flat. However, certain shorter, flat, molecules bind preferentially to amyloid.

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

64

Example 4 - PET using ligand molecules and inhibitors

5 Figures 11 to 13 indicate typical synthesis methods which could be used to convert either the diaminophenothiazines or the "analog" into positron emitting species.

Figure 11b in particular shows a method whereby thionin is treated with NaH followed by labelled methyl iodide to give methylene blue.
10 A similar procedure can be adopted for the synthesis of methylene blue starting from Azure A and Azure B. Other strong bases may also be used.

Other methods that may be used include HCl and labelled MeOH; labelled trimethyl phosphoric acid; labelled dimethylsulphoxide and
15 Labelled formaldehyde. The chemistry of the syntheses and general methodology are all familiar to persons skilled in the art. These examples are given without any implied restriction as to ultimate methodology.

20

Example 5 - blocking ligands

Compounds such as thioflavin-T and -S strongly stain amyloid deposits. However Figure 31 demonstrates that such compounds can be
25 displaced from tangles by primulin. Therefore these compounds may be used as blocking reagents to saturate binding sites which are not of interest without inhibiting the binding of ligands to aggregated tau.

30 Example 6 - comparison of ligand molecules and inhibitors

There appears to be a fundamental difference in activity of the molecules which are effective ligands, compared with those which are effective inhibitors of tau-tau binding. The benzothiazole
35 molecule does not disrupt PHFs, nor indeed do any of the ligands, whereas the diaminophenothiazine series constitute PHF-disrupters and tau aggregation inhibitors.

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

65

Further investigations into the relationship between aggregation-dependent tau ligands and tau aggregation inhibitors were carried out using primulin. Primulin in solution has a fluorescence peak at 520 nm. This shifts to 470 nm when primulin is bound within a pure preparation of PHFs (Figure 6). Treatment of PHFs with citraconic anhydride, which has been shown to disrupt the structure of the PHF and liberate free tau (as well as reversing the charge on lysines), was found abolish the 470 nm fluorescence peak (Figure 7). Therefore, binding by such compounds is dependent on the polymerised state of tau found in the PHF, but is not present in free tau.

Compounds have been identified which disrupt the structure of the PHF and reverse the proteolytic stability of the PHF core (see WO 96/30766). Examples of such compounds are shown in accompanying Figure 8. The present inventors have now identified that these compounds bind to tau at a specific binding site within the high affinity tau-tau binding domain. However, it is found that such compounds may not disrupt the binding of primulin to tau in aggregated tau molecules, as shown by the retention of the fluorescence peak of primulin at 470 nm in the presence of alcian blue (Figure 9).

Thus it appears that although alcian blue can inhibit tau-tau interactions, either the site of the inhibition, or perhaps the order of binding interaction at which it acts, are such as to leave binding site for SB-ligands extant. Thus compounds which act as ligands of aggregated tau do not appear to bind at the same site(s) as compounds which are tau-aggregation inhibitors, although they may still affect the inhibitory properties of those inhibitors (see Example 7 below).

This point was further examined by studying the potency of typical aggregated tau ligands as tau-aggregation inhibitors. It has been shown previously that tau aggregation inhibitors (e.g. diaminophenothiazines) can be identified on the basis of inhibition of tau-tau binding in a solid-phase assay (WO 96/30766). When tested in the same assay, primulin and thiazin red were found to be

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

66

weak inhibitors of tau-tau binding (Figure 10). Thus, although these compounds are potent ligands for tau within the PHF-core, they are at most weak inhibitors at the site required for inhibition of tau-tau binding.

5 Demonstration that compounds of the diaminophenothiazine-like class bind tau in the aggregated state is provided by the direct demonstration of disruption of PHF structure in the presence of sufficiently high concentrations, particularly of compounds such as
10 methylene blue. Thus, compounds of the diaminophenothiazine-like class which are inhibitors of tau-tau binding can serve as aggregated-tau ligands at lower concentrations.

In summary, the inventors have found that it is possible to define
15 two classes of binding site within the core-PHF tau aggregate. Both are potentially useful for the development of radiological imaging ligands:

(i) Sulphonated benzothiazole-like sites: compounds of this type,
20 associated with suitable chelates such as technetium, may serve as ligands for extracellular tangles, due to their size and charge.

(ii) Diaminophenothiazine-like sites: such compounds, when suitably
25 labelled with a positron-emitting functional group, would serve as ligands for all tau aggregates, and would be capable of crossing the blood-brain-barrier (Ref 36) and entering cells. Thus these compounds, and derivatives thereof, have potential use in the labelling of intracellular tangles, e.g. those present in the
30 brains of AD patients, or intracellular tangles when used at lower concentration.

Example 7 - example assays for identifying further diagnostic
ligands based on relief of inhibition

35 (i) Preparation of Tau protein in which partial aggregation has
occurred.

The preparation ("Preparation 2") is shown schematically in Figure

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

67

32, and differs from earlier described methods (e.g. in WO96/30766- "Preparation 1" - shown in (ii) below).

5 The recombinant cDNA plasmids are those described in WO96/30766 the disclosure of which is herein incorporated by reference.

10 Briefly, tau cDNA was generated using standard protocols (Sambrook, Fritsch & Maniatis "Molecular cloning. A Laboratory Manual" (1989) Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.) from mRNA isolated from brain tissue of an Alzheimer patient whose tissue was obtained 3 h after death. The cDNA library was screened with synthetic 17-mer oligonucleotide probes derived from the sequence from part of a PHF core protein (Goedert et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 4051-4055). Full length cDNA clones were subcloned into the EcoRI site of M13mp19 and site-directed mutagenesis used to introduce a NdeI site in the context of the initiator codon. Following cleavage with NdeI and EcoRI, the resulting cDNA fragments were subcloned downstream of the T7 RNA polymerase promoter into NdeI/EcoRI -cut expression plasmid pRK172 (McLeod et al. (1987) EMBO J., 6, 729-736). pRK172 is a derivative of pBR322 that is propagated at very high copy number in E. coli due to removal of the pBR322 copy number control region. The plasmid carries an ampicillin resistance gene for selection of recombinant clones.

25 cDNA constructs coding for truncated forms of tau were prepared from mRNA as described in Novak et al. (1993) EMBO J., 12, 365-370. The mRNA was used as a template for polymerase chain reaction (PCR) using specific oligonucleotide primers. The sense primer contained an NdeI site and the anti-sense, an EcoRI site. PCR fragments were subcloned into pRK172 as described above. The primers used for construction of dGAE are given in Figure 22. The authenticity of all DNA fragments used for expression was confirmed by full length sequencing of both strands.

35 Details for the construction of htau40 ("T40") cDNA are described in (Goedert et al. (1989), Neuron 3: 519-526). This sequence is the largest form of tau found in the CNS and encodes tau protein that contains both the 2 N-terminal inserts of 29 amino acids each

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

68

and an extra 31 amino acid repeat in the tubulin-binding domain. The DNA sequence and its predicted amino acid sequence are shown in Figure 21 (SEQ ID NO: 4).

- 5 Recombinant plasmids were used to transform *E. coli* BL21 (DE3) a strain used for prokaryotic expression which carries a chromosomal copy of the bacteriophage T7 RNA polymerase gene under control of the *lac* UV5 promoter (Studier and Moffat (1986), *J. Mol. Biol.* 189, 113-130). Exponentially growing cultures were induced with IPTG
10 (iso-propyl thiogalactoside) for 3h.

- Large-scale purification (1 litre bacterial culture) of tau fragments was carried out as described by Goedert and Jakes (1990, *EMBO J.*, 9, 4225-4230), with minor modifications. Cells were
15 disrupted by rapid freezing of the cell pellet in liquid nitrogen. The pellets were then suspended in buffer containing 50 mM PIPES, 1 mM dithiothreitol (DTT) (pH 6.8). The thermostable proteins in the supernatant were dialysed against PIPES/DTT, then applied to a column containing phosphocellulose equilibrated in the same buffer.
20 Tau protein was eluted with a gradient of NaCl (0-0.5M) in the above buffer. Fractions were analysed by SDS-PAGE and both Coomassie staining and immunoblotting. Those fractions containing tau were pooled, dialysed against 25mM MES, 1 mM DTT (pH 6.25) and stored at -20°C at approximately 5 mg/ml. Protein concentrations
25 were measured by the Lowry method (Harrington CR(1990), "Lowry protein assay containing sodium dodecyl sulphate in microtitre plates for protein determinations on fractions from brain tissue", *Analytical Biochemistry* 186: 285-287).

- 30 Preparation 2 differs from Preparation 1 above in the following respects: (1) The concentration of cells at the sonication stage is increased by 5-fold. (2) A batchwise adsorption of non-tau proteins to DE52 is included. (3) The proteins are not subjected to heat treatment. (4) The final step involves concentration using
35 polyethylene glycol.

Escherichia coli is grown in 2xTY medium (Oxoid) supplemented with ampicillin (50 micrograms per ml) to late-logarithmic phase. Cells

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

69

from 5 litres of culture are harvested by centrifugation and the cell pellets frozen rapidly over liquid nitrogen. The pellets are taken up with 50 mM PIPES (pH 6.8) containing 1mM EDTA, 1mM dithiothreitol and 1mM phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF) and bacteria lysed by sonication (2 x 3 min) at 4C. The mixture is centrifuged at 10,000 rpm for 20 min. The supernatant is rotated with 1 gram of Whatman DE52 for 3 hr at 4C. The mixture is separated on a column and the flow-through material that fails to bind to DE52 is incubated for 3 hr at 4C, with rotation, with 0.4 g of Whatman F11 (freshly regenerated according to manufacturer's recommendations). The column is washed with column buffer (50 mM PIPES, pH 6.8 containing 1mM EGTA, 5mM EDTA, 0.2mM MgCl₂, 5mM β-mercaptoethanol and 1mM PMSF). Tau protein is eluted stepwise with a 0.1 to 1 M gradient of KCl in column buffer. Fractions containing tau (determined by immunoassay) are pooled and dialysed against 80mM PIPES (pH6.8) containing 1mM EGTA, 1mM MgCl₂ and 5mM β-mercaptoethanol, using dialysis tubing with a molecular weight cut-off of 1,000. The dialysate is concentrated by applying polyethylene glycol 8000 to the outside of the sac for 2-3 hr. The final concentration of tau ranged from 3 to 10 mg per ml.

In a typical large scale preparative run, the specific immunoreactivity of tau is purified approximately 30- to 40-fold from the material that fails to bind to DE52. Approximately 60% of the tau is recovered in the final product with 10% failing to bind to F11 and the remainder in fractions ignored from the column.

Table 3 shows the details of a preparative run for dGA. "Purification-fold" is expressed as the ratio of specific immunoreactivity for each fraction (ie immunoreactivity / protein concentration) to specific immunoreactivity in the DE flow-through.

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

70

	Vol (ml)	mg/ml	AU/ml	AU	AU/mg	Purif'n (-fold)	Recovery (%AU)
Total cells	200	26	40000	8000000	1538		
DE flow thro'	240	20	40000	8600000	2000	100	100%
P11 flow thro'	220	19	5000	1100000	253		11% in P11 flow thro'
Fractions (5ml each)							
#1	1.48	1.48	5000	30000	3388	2	
#2	0.88	0.88	20000	120000	20492	10	
#3	1.80	1.80	80000	490000	50000	25	
#4	1.88	1.88	20000	370000	74204	15	
#5	3.03	3.03	200000	1200000	64767	32	
#6	3.31	3.31	200000	1200000	60458	30	82% in pooled fractions
#7	2.61	2.61	200000	1200000	73749	37	
#8	2.04	2.04	120000	590000	74926	37	
#9	2.20	2.20	100000	600000	45637	23	20% in discarded fractions
#10	1.83	1.83	80000	480000	43784	22	
Pure dGA	14.5	8.4	600000	8700000	71429	36	

Figure 33 is a graphical plot of the data from Table 3.

Table 4 summarises yields from typical preparative runs for the tau protein species: dGA, dGAE and hT40.

Tau preparation	Protein concentration (mg/ml) based on:		Immunoreactivity (mAb 7/51; AU/ml)	Protein yield (per 10 litres)
	abs at 280 nm	Protein assay (BSA ref)		
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

based on extinction coefficients		abs at 280 nm	
BSA (reference)	10 mg/ml		8.6
Tau protein	10 mg/ml		14.7

Proteins were separated by running down a 50 x 1cm sepharose CL-6B gel filtration column equilibrated with PBS buffer and run at room temperature. A molecular weight standard curve was prepared for the column by running molecular weight markers over the range 12,400 to 200,000 down the column. A standard curve was prepared by plotting the log₁₀ of the Mr in Kd against Ve/Vo for each protein standard, where Ve is the elution volume for the standard and Vo is the void volume for the column determined with blue dextran.

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

71

T40 or dGAE were loaded in 0.5ml buffer containing 5% glycerol and collected in 1ml fractions. Presence of protein in the fractions was determined spectrophotometrically by the absorbance at 280nm. Presence of dGAE or T40 was detected by ELISA with monoclonal antibody 7/51 or 499 respectively. ELISA assay was carried out in 96 well PVC plates as follows:

50µl samples of each fraction incubate 1hr at 37C, wash plate in 0.05% tween-20 and then block binding sites with 200µl PBS + 2% non fat milk powder for 1hr at 37C. Wash plate in 0.05% tween-20, incubate with 50µl primary antibody diluted 1:10 in PBS + 2% non fat milk powder for 1hr at 37C. Wash plate in 0.05% tween-20, incubate with 50µl secondary antibody (goat anti-mouse IgG:HRP conjugate) diluted in PBS + 2% non fat milk powder for 1hr at 37C. Wash plate in 0.05% tween-20 then rinse in deionised water, add 50µl freshly prepared substrate (TMB [tetramethylbenzidine] in sodium acetate buffer pH5.0 with H₂O₂, freshly prepared) and read rate of change in OD 650 over 2 minutes.

The elution profile of purified dGAE and purified T40 is shown in Figures 34 (dGAE) and 35 (hT40). Although both these fragments typically run at about 12 kD and 55 kD respectively, about 64% of mAb 7.51 immunoreactivity (dGAE) elutes in fractions corresponding to species of size > 15kD and about 50% of mAb 499 immunoreactivity (hT40) eluted in fractions corresponding to species of size > 60kD. Thus the tau proteins are present, at least in part, in pre-aggregated form.

(ii) effect of tau aggregation inhibitors measured using different preparations of Tau protein

When the proteins dGA and dGAE were prepared as indicated above ("Preparation 2"), the properties of the tau-tau binding assay were altered relative to the properties obtained using the preparative method described in WO96/30766 ("Preparation 1").

The assay is performed using 96 well PVC plates (Falcon Cat. No. 353912 are used), and the following steps:

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

72

1. 50 μ l dGA (~10 μ g/ml) in carbonate buffer, incubate 1 h at 37°C.
(Carbonate buffer: 50 mM carbonate bicarbonate, pH 9.6 (Na_2CO_3 1.59 g/l, NaHCO_3 2.93 g/l))
- 5 2. Wash plate in 0.05% Tween-20.
- 3 200 μ l PBS+2% Marvel, incubate 1 h at 37°C.
- 10 4. Rinse plate 2X in deionised water, then wash in 0.05% Tween-20.
- 5 50 μ l dGAE (~10 μ g/ml) plus drug in PBS+1% fish skin gelatin+0.05% Tween-20, incubate 1 h at 37°C.
- 15 6 Wash plate in 0.05% Tween-20.
- 7 50 μ l antibody 423 (1:10 dilution in PBS+2% Marvel), incubate 1 h at 37°C.
- 20 8 Rinse plate 2X in deionised water, then wash in 0.05% Tween-20.
- 9 50 μ l HRP-anti-mouse (1:1000 dilution in PBS+0.05% Tween-20), incubate 1 h at 37°C.
- 25 10 Wash plate in 0.05% Tween-20, then rinse 1X with deionised water.
- 11 50 μ l substrate solution, read immediately initial rate over 2 min in plate reader at OD650.
- 30 (Substrate solution: 50 mM sodium acetate, pH 5.0 + TMB (1 ml/100 ml of a 10 mg/ml solution in DMSO) + H_2O_2 (10 μ l/100 ml)).

The compounds thionine and tonium chloride were found to require higher concentrations to exert inhibitory effects in Preparation 2 than in Preparation 1. This is shown in Figures 36 and 37. Furthermore, the compound dimethyl methylene blue (DMMB) was found to have a higher inhibitory potency in Preparation 2 than in

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

73

Preparation 1. This is shown in Figure 38.

As similar differences could be seen in Tau protein prepared by the Preparation 1 method, but which had been allowed to aggregate in vitro over time, the interpretation of this effect is as follows.
5 Higher concentrations of compounds such as thionine and tolonium chloride are required since two effects have to be achieved in order to achieve maximal inhibition of tau-tau binding:

- 10 1. disruption of pre-existing aggregates in the aqueous-phase;
2. inhibition of binding of aqueous-phase species to the solid phase.

The greater potency of DMME in the Preparation 2 assay can be
15 explained by greater binding affinity at the site of action required for both inhibitory effects.

Full-length tau protein (hT40) prepared according to the Preparation 2 protocol demonstrated minimal tau-tau binding
20 activity when used in the aqueous-phase with dGA in the solid-phase. However, when hT40 was used in the solid-phase, binding of dGAE was similar to that obtained for binding of dGAE to dGA in the solid-phase (see Figure 39a-c). The interpretation is that in hT40 aggregates formed in the aqueous-phase tau-tau binding has already
25 occurred in or through domains required for the binding interaction with dGA in the solid-phase. When hT40 is first plated in the solid-phase, the binding to PVC unfolds the protein/aggregates in such a manner as to make the critical tau-tau binding sites
30 available.

(iii) effect of tau aggregation inhibitors measured using different preparations of Tau protein

In the Preparation 2 assay format, potent ligands of the kind
35 typified by Primulin and Thiazin Red have no inhibitory activity on tau-tau binding. This is shown in Figure 40 (cf. Figure 10). Indeed in this assay, these compounds enhance tau-tau binding at concentrations greater than 100 μ M (i.e. 100-fold molar ratio with

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

74

respect to tau protein).

5 DMMB typically reduces tau-tau binding (with tau present typically at 1 μ M) to 23% at DMMB 5 μ M and 17% at DMMB 15 μ M relative to that seen in the absence of DMMB.

10 Unexpectedly, this inhibitory effect can be completely reversed by co-incubation in the presence of increasing concentrations of high affinity ligands typified by Primulin and Thiazin Red. This is shown in Figure 41.

15 Therefore, aggregated-tau ligands may be characterised functionally as compounds which do not themselves inhibit tau-tau binding, but block the inhibitory effects of potent inhibitors of tau-tau binding.

20 As can be seen in Figure 42, inhibition of Tau-Tau binding produced by DMMB is progressively attenuated and reversed in the presence of increasing molar excess of Primulin. A similar effect can be shown for Thiazin Red. This indicates that the maximum inhibitory effect of DMMB is reduced by these compounds, and hence that they are acting as non-competitive inhibitors of DMMB. One possible explanation might be that the ligands stabilise the tau aggregates used in the assay, for example in regions outside the critical binding domain required for DMMB activity, and hence prevent the inhibitory effect of DMMB on Tau-Tau binding.

30 Figures 43 - 45 show that for any given concentration of DMMB, there is quantitative enhancement of Tau-Tau binding in the presence of Primulin (43, 44) or Thiazin Red (45) which can be modelled by a standard Michaelis-Menten equation. This implies that the Tau-aggregation enhancement effect of these ligands is proportional to the fraction of ligand-binding sites occupied, presumably within the Tau aggregates introduced into the aqueous-phase of the assay. The mean E_{max} for both ligands is ~ 1.6. That is, the maximum ligand effect is to produce 1.6-fold the Tau-Tau binding signal seen in the absence of any drug. The mean K_d for this effect is ~ 15x. That is, for any given concentration of DMMB

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

75

> 4 μM , 50% of maximal enhancement of Tau-Tau binding can be seen when the ligand molar excess is 15-fold relative to the concentration of DMMB.

5 Example 8 - example assays for identifying further diagnostic ligands based on ligands provided herein

10 Having defined two classes of ligands as described above suitable for labelling PHFs in AD, further ligands can be developed using the compounds/derivatives in screening assays. Furthermore, modelling methods can be based on the ligands already presented.

(i) *Identification of novel ligands at the sulphonated-benzothiazole site.*

15

Using a suitably labelled preparation of a known sulphonated benzothiazole, incubated with a preparation of aggregated tau molecules (e.g. preaggregated tau in solution, or bound to a solid phase, or highly enriched PHFs isolated from AD brain - see 20 WO96/30766) compounds suspected of being suitable ligands can be introduced, and their capacity to compete with the known ligand in such a way as to prevent binding within the PHF can be tested.

(ii) *Identification of novel ligands at the phenothiazine site.*

25

The tau-tau binding assay described in WO 96/30766 can be used as a preliminary screen to identify potential inhibitors at the tau-tau binding site. Likewise, a suitably-labelled preparation of known 30 diaminophenothiazines, incubated with an aggregated tau as described above, could be used to screen for other compounds which are suspected of being competitors at this PHF-binding site and thus potentially suitable PHF ligands.

35 The physical implementation of competitive assays is well known in the art. It may include measurement of fluorescence, radioactivity or any other suitable reporting system which derives from sulphonated benzothiazole-like compounds or diaminophenothiazine-like compounds not bound to PHFs, i.e. those which remain in

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

76

solution.

References

- 5 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;
3 Mori, E et al. (1997), *Am. J. Psychiatry* 154:1, p18;
4 Juottonen, K. (1998); *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 65, 322-
10 327;
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;
8 Fox, N. et al. (1996), *Brain* 119, 2001-7;
15 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-
20 114;
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. Nurol.* 42, 85-94;
16 Ibanez, V. et al. (1998), *Neurol.* 50, 1585-1593;
25 17 Wischik, C.W. et al. (2000) "Neurobiology of Alzheimer's
Disease", Eds. Dawson 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;
30 20 Marin, D.B. et al. (1998), *Artherosclerosis* 140, 173-180;
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;
35 25 Hodges, J.R. et al. (1999), *PNAS USA* 96, 9444-8;
26 Mena, R. et al. (1995), *Acta Neuropathol.* 89, 50-6;
27 Mena, R. et al. (1996), *Acta Neuropathol.* 91, 633-641;

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

77

- 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;
- 5 31 Resch, J.F. *et al.* (1991) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1, 10, 519-522;
- 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;
- 10 35 WO 96/30766;
- 36 Muller, T. (1992), *Acta Anat.* 144, 39-44.

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

78

Claims

- 1 A method for determining the stage of neurofibrillary degeneration associated with a tauopathy in a subject believed to suffer from the disease, which method comprises the steps of:
- 5 (i) introducing into the subject a ligand capable of labelling aggregated paired helical filament (PHF) tau protein,
(ii) determining the presence and/or amount of ligand bound to extracellular aggregated PHF tau in the medial temporal lobe of the brain of the subject,
- 10 (iii) correlating the result of the determination made in (ii) with the extent of neurofibrillary degeneration in the subject.
- 2 A method as claimed in claim 1 wherein the determination in step (ii) is used to establish the density ligand binding.
- 15 3 A method as claimed in claim 1 or claim 2 wherein the correlation in step (iii) is made by reference to historical data.
- 20 4 A method as claimed in any one of the preceding claims wherein the tauopathy is Alzheimer Disease (AD).
- 5 A method as claimed in claim 4 wherein the extent of neurofibrillary degeneration is related to the neuropathological staging of the progression of AD according to the defined hierarchical system shown in Figure 2c.
- 25 6 A method as claimed in any one of the preceding claims wherein the ligand is capable of crossing the blood brain barrier.
- 30 7 a method as claimed in any one of the preceding claims wherein the ligand is conjugated, chelated, or otherwise associated, with a detectable chemical group.
- 35 8 A method as claimed in claim 7 wherein the ligand is labelled for SPECT and is not capable taken up intracellularly.
- 9 A method as claimed in claim 8 wherein a ligand comprises a

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

79

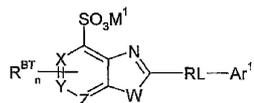
technetium-chelating group.

10 A method as claimed in claim 7 wherein the ligand is labelled for positron emission tomography (PET).

5

11 A method as claimed in claim 10 wherein the ligand comprises a positron-emitting carbon, optionally incorporated into a methyl group present in the ligand.

10 12 A method as claimed in any one of the preceding claims wherein the ligand is a compound of the formula:



wherein:

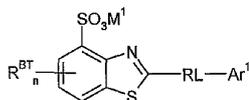
15 W is S, O, or NH;
 exactly one of X, Y, and Z is CH or N;
 the others of X, Y, and Z are CH;
 M¹ is an alkali metal cation selected from: Li, Na, K, or Cs.

20 RL is a rigid linker group;
 Ar¹ is an C₅₋₂₀aryl group;
 n is an integer from 0 to 3; and,
 each R^{BT} is independently a core substituent.

13 A method as claimed in claim 12 wherein each of X, Y, and Z is CH.

25

14 A method as claimed in claim 13 wherein the ligand is a compound of the formula:



30

wherein:

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

80

M¹ is an alkali metal cation selected from: Li, Na, K, or Cs.

RL is a rigid linker group;

Ar¹ is an C₆₋₂₀aryl group;

5 n is an integer from 0 to 3; and,

each R^{BT} is independently a benzothiazole substituent.

15 A method as claimed in any one of claims 12 to 14 wherein each of the rigid linker group, RL, and the aryl group, Ar¹, are
10 substantially planar.

16 A method as claimed in any one of claims 12 to 15 wherein the rigid linker group, RL, and the aryl group, Ar¹, together with the core group, form a compound which is substantially planar.

15

17 A method as claimed in any one of claims 12 to 16 wherein the twist is no greater than that of the compound of Figure 16.

18 A method as claimed in any one of claims 12 to 17 wherein the
20 compound has a compound length which is from about 14.7 AU to about 15.3 AU.

19 A method as claimed in any one of claims 12 to 18 wherein each
25 R^{BT} is independently C₁₋₄alkyl, hydroxy, C₁₋₄alkoxy, nitro, cyano, halo, or amino.

20 A method as claimed in claim 19 wherein each R^{BT} is
independently -Me, -Et, -nPr, -iPr, -OH, -OMe, -OEt, -O(nPr),
-O(iPr), -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -NH₂, -NH₂, -NHMe, -NHET,
30 -NH(iPr), -NH(nPr), -NMe₂, -NSt₂, N(iPr)₂, or -N(nPr)₂.

21 A method as claimed in claims 19 wherein each R^{BT} is
independently C₁₋₄alkyl.

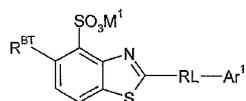
35 22 A method as claimed in any one of claims 19 to 21 wherein n is 1, and R^{BT} is independently -Me, -Et, -nPr, or -iPr.

WO 02/075318

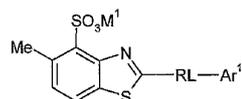
PCT/GB02/01318

81

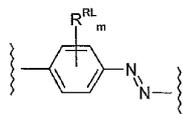
23 A method as claimed in any one of claims 12 to 22 wherein the ligand has the following formula:



5 24 A method as claimed in claim 23 wherein the ligand has the following formula:

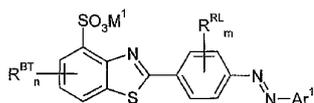


25 A method as claimed in any one of claims 12 to 24 wherein RL is a group of the formula:



wherein:

m is an integer from 0 to 4, and
 each R^{RL} is independently a rigid linker aryl substituent,
 15 and the ligand has the formula:



26 A method as claimed in claim 25 wherein each R^{RL} is independently C₁₋₄-alkyl, hydroxy, C₁₋₄-alkoxy, nitro, cyano, halo, or amino.
 20 amino.

27 A method as claimed in claim 26 wherein each R^{RL} is independently -Me, -Et, -nPr, -iPr, -OH, -OMe, -OEt, -O(nPr),

WO 02/075318

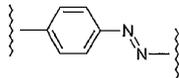
PCT/GB02/01318

82

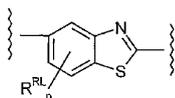
-O(*i*Pr), -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -NH₂, -NH₂, -NHMe, -NHET, -NH(*i*Pr), -NH(*n*Pr), -NMe₂, -NEt₂, N(*i*Pr)₂, or -N(*n*Pr)₂.

28 A method as claimed in claim 26 wherein each R^{RL} is
5 independently C₁₋₄alkyl.

29 A method as claimed in any one of claims 1 to 24 wherein RL is a
group of the formula:

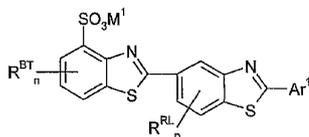


10 30 A method as claimed in any one of claims 1 to 24 wherein RL is a
group of the formula:



wherein

p is an integer from 0 to 3, and
15 each R^{RL} is independently a rigid linker aryl substituent,
and the compounds have the formula:



31 A method as claimed in claim 30 wherein each R^{RL} is
independently C₁₋₄alkyl, hydroxy, C₁₋₄alkoxy, nitro, cyano, halo, or
20 amino.

32 A method as claimed in claim 31 wherein each R^{RL} is
independently -Me, -Et, -*n*Pr, -*i*Pr, -OH, -OMe, -OEt, -O(*n*Pr), -
O(*i*Pr), -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -NH₂, -NH₂, -NHMe, -NHET, -
25 NH(*i*Pr), -NH(*n*Pr), -NMe₂, -NEt₂, N(*i*Pr)₂, or -N(*n*Pr)₂.

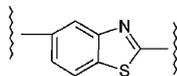
WO 02/075318

PCT/GB02/01318

83

33 A method as claimed in claim 31 wherein each R^{RL} is independently C₁₋₄ alkyl.

34 A method as claimed in any one of claims 12 to 24 and 30 to 33
5 wherein RL is a group of the formula:



35 A method as claimed in any one of claims 12 to 34 wherein Ar¹ is selected from groups derived from benzene (C₆), naphthalene (C₁₀),
10 anthracene (C₁₄), phenanthrene (C₁₄), naphthacene (C₁₈), and pyrene (C₁₆).

36 A method as claimed in any one of claims 12 to 34 wherein Ar¹ is selected from:

15 C₅heteroaryl groups derived from furan (oxole), thiophene (thiole), pyrrole (azole), imidazole (1,3-diazole), pyrazole (1,2-diazole), triazole, oxazole, isoxazole, thiazole, isothiazole, oxadiazole, and oxatriazole; and

C₆heteroaryl groups derived from isoxazine, pyridine (azine),
20 pyridazine (1,2-diazine), pyrimidine (1,3-diazine), pyrazine (1,4-diazine), triazine, tetrazole, and oxadiazole (furan).

37 A method as claimed in any one of claims 12 to 34 wherein Ar¹ is selected from:

25 C₈heterocyclic groups derived from benzofuran, isobenzofuran, indole, isoindole, purine, benzimidazole;

C₁₀heterocyclic groups derived from quinoline, isoquinoline, benzodiazine, pyridopyridine, quinoxaline;

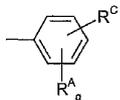
C₁₃heterocyclic groups derived from carbazole; and,
30 C₁₄heterocyclic groups derived from acridine, xanthene, phenoxathiin, phenazine, phenoxazine, phenothiazine.

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

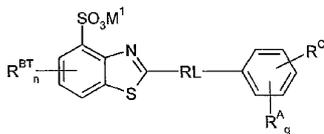
84

38 A method as claimed in claim 35 wherein Ar¹ is an aryl group having a phenyl core, and has the formula:



wherein

5 q is an integer from 0 to 5; and
 each R^A is independently an aryl substituent;
 R^C, if present, is a reactive conjugating substituent, or
 R^C is, or contains, a detectable label;
 10 and the compound has the formula:



39 A method as claimed in claim 38 wherein R^C is present and is a
 reactive conjugating substituent, and is, or contains, a reactive
 15 functional group suitable for conjugation to another molecule by
 chemical reaction therewith, to form a covalent linkage
 therebetween.

40 A method as claimed in claim 39 wherein R^C is present and is, or
 20 contains, an active ester.

41 A method as claimed in claim 40 wherein R^C is present and is, or
 contains, a succinimidyl ester.

25 42 A method as claimed in claim 39 wherein R^C is present and is a
 reactive conjugating substituent, and is, or contains, a moiety
 suitable for conjugation to another molecule by a strong non-
 covalent interaction.

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

85

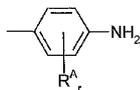
- 43 A method as claimed in claim 42 wherein R^C is present and is, or contains, biotin.
- 44 A method as claimed in claim 39 wherein R^C is present and is a reactive conjugating substituent, and is, or contains, a moiety suitable for conjugation to another molecule by complex or chelate formation.
- 45 A method as claimed in claim 44 wherein R^C is present and is, or contains, a technetium-chelating group.
- 46 A method as claimed in claim 45 wherein R^C is present and is, or contains diethylenetriaminepentaacetic acid.
- 47 A method as claimed in claim 38 wherein R^C is present and is, or contains, a detectable label.
- 48 A method as claimed in claim 47 wherein R^C is present and is, or contains, a dye, a fluorescent marker, an antigenic group, a stable or an unstable isotope, or a positron-emitting carbon atom.
- 49 A method as claimed in claim 48 wherein R^C is present and is, or contains, ^{18}F .
- 50 A method as claimed in claim 48 wherein R^C is present and is, or contains, a positron-emitting carbon atom.
- 51 A method as claimed in any one of claims 38 to 50 wherein each R^A is independently selected from:
-OH, -NH₂, -NHR¹, -NR¹R², -SO₃M², and C₁₋₄alkyl;
wherein:
R¹ and R² are each C₁₋₄alkyl, and
M² is an alkali metal cation selected from Li, Na, K, or Cs.
- 52 A method as claimed in claim 51 wherein at least one R^A is -OH or -NH₂.

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

86

53 A method as claimed in claim 52 wherein Ar¹ is an aryl group having an amino-substituted phenyl core, and has the formula:



wherein

5 r is an integer from 0 to 4,
and each R^A is independently an aryl substituent.

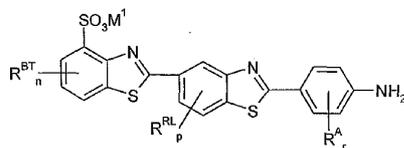
54 A method as claimed claim 53 wherein each R^A is independently selected from:

10 -OH, -NH₂, -NHR¹, -NR¹R², -SO₃M², and C₁₋₄alkyl;

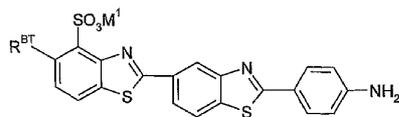
wherein:

R¹ and R² are each C₁₋₄alkyl, and
M² is an alkali metal cation selected from Li, Na, K, or Cs.

15 55 A method as claimed in claim 54 wherein the ligand has the formula:



20 56 A method as claimed in claim 55 wherein the ligand has the formula:

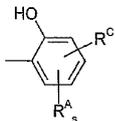


WO 02/075318

PCT/GB02/01318

87

57 A method as claimed in claim 52 wherein Ar¹ is an aryl group having a hydroxy-substituted phenyl core, and has the formula:



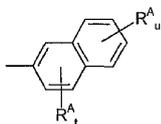
5 wherein
 s is an integer from 0 to 4, and
 each R^A is independently an aryl substituent, and
 R^C, if present, is a reactive conjugating substituent, or
 R^C is, or contains, a detectable label.

10

58 A method as claimed in claim 57 wherein the ligand is as defined in any one of claims 108 to 150.

59 A method as claimed in claim 35 wherein Ar¹ is an aryl group having a naphthyl core, and has the formula:

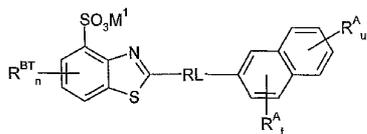
15



wherein

t is an integer from 0 to 3,
 u is an integer from 0 to 4, and
 each R^A is independently an aryl substituent,
 and the compound has the formula:

20

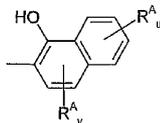


WO 02/075318

PCT/GB02/01318

88

60 A method as claimed in claim 59 wherein Ar^1 is an aryl group having a hydroxy-substituted naphthyl core, and has the formula:



5 wherein

v is an integer from 0 to 2,
u is an integer from 0 to 4, and
each R^A is independently an aryl substituent.

10 61 A method as claimed in claim 59 or claim 60 wherein each R^A is independently selected from:

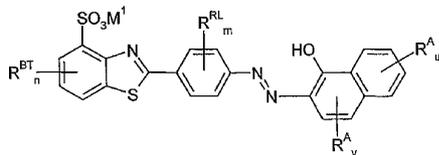
-OH, $-NH_2$, $-NHR^1$, $-NR^1R^2$, $-SO_3M^2$, and C_{1-4} alkyl;

wherein:

R^1 and R^2 are each C_{1-4} alkyl, and

15 M^2 is an alkali metal cation selected from: Li, Na, K, or Cs.

62 A method as claimed in claim 61 wherein the ligand has the formula:



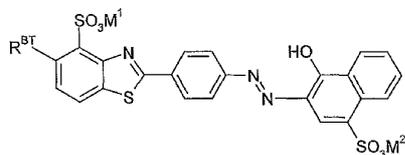
20

WO 02/075318

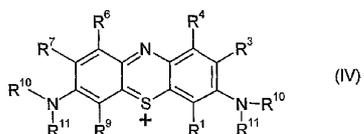
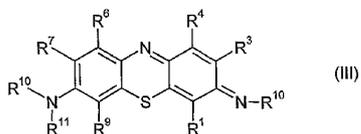
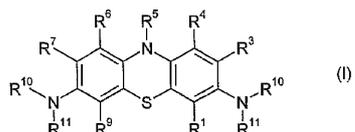
PCT/GB02/01318

89

63 A method as claimed in claim 62 wherein the ligand has the formula:



64 A method as claimed in any one of claims 1 to 11 wherein the ligand is a compound of one of the following formulae:



10

wherein:

each of R_1 , R_3 , R_4 , R_6 , R_7 and R_9 is independently hydrogen,

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

90

- halogen, hydroxy, carboxy, substituted or unsubstituted alkyl, haloalkyl, or alkoxy;
R₃ is independently hydrogen, hydroxy, carboxy, substituted or unsubstituted alkyl, haloalkyl, or alkoxy;
- 5 R₁₀ and R₁₁ are independently selected from hydrogen, hydroxy, carboxy, substituted or unsubstituted alkyl, haloalkyl, or alkoxy;
or a pharmaceutically acceptable salt thereof.
- 10 65 A method as claimed in claim 64 wherein:
each of R₁, R₂, R₄, R₆, R₇ and R₉ is independently hydrogen, halogen, hydroxy, carboxy, substituted or unsubstituted C₁₋₆alkyl, C₁₋₄haloalkyl, or C₁₋₆alkoxy;
R₅ is independently hydrogen, hydroxy, carboxy, substituted
15 or unsubstituted C₁₋₆alkyl, C₁₋₄haloalkyl, or C₁₋₆alkoxy;
R₁₀ and R₁₁ are independently selected from hydrogen, hydroxy, carboxy, substituted or unsubstituted C₁₋₆alkyl, C₁₋₄haloalkyl, or C₁₋₆alkoxy.
- 20 66 A method as claimed in claim 65 wherein said C₁₋₆alkyl is selected from: methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, isopentyl, tert-pentyl, hexyl, and isoheptyl.
- 25 67 A method as claimed in claim 65 or claim 66 wherein the substituents of said substituted C₁₋₆alkyl are selected from: mercapto, thioether, nitro, amino, aryloxy, halogen, hydroxyl, carbonyl, C₅₋₂₀aryl, C₁₋₆cycloalkyl, and non-aryl C₃₋₂₀heterocyclyl.
- 30 68 A method as claimed in any one of claims 65 to 67 wherein said C₁₋₄haloalkyl is selected from: chloromethyl, 2-bromomethyl, 1-chloroisopropyl, 3-fluoropropyl, 2,3-dibrombutyl, 3-chloroisobutyl, iodo-t-butyl, and trifluoromethyl.
- 35 69 A method as claimed in any one of claims 64 to 68 wherein the ligand is an acid addition salt formed between a compound described in said claims and an acid.

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

91

- 70 A method as claimed in claim 69 wherein the acid is an inorganic acid or an organic acid.
- 71 A method as claimed in claim 70 wherein the ligand is a chloride salt.
5
- 72 A method as claimed in claim 70 wherein said organic acid is selected from: acetic acid, citric acid, maleic acid, fumaric acid, tartaric acid, methanesulphonic acid, and p-toluenesulphonic acid.
10
- 73 A method as claimed in any one of claims 64 to 72 wherein:
R₁, R₂, R₄, R₆, R₇ and R₉ are independently -H, -CH₃, -C₂H₅, or -C₃H₇;
R₁₀ and R₁₁ are independently -H, -CH₃, -C₂H₅ or -C₃H₇;
15 R₅ is independently -H, -CH₃, -C₂H₅, or -C₃H₇.
- 74 A method as claimed in claim 73 wherein the ligand is shown in Figure 8b.
- 20 75 A method as claimed in any one of claims 64 to 74 wherein the ligand comprises a positron-emitting carbon.
- 76 A method as claimed in any one of the preceding claims wherein (ii) further comprises the step of additionally determining the presence and/or amount of a ligand bound to intracellular aggregated tau in a neocortical structure of the brain of the subject.
25
- 77 A method as claimed in claim 76 wherein the ligand used to bind to extracellular aggregated PHF tau in the medial temporal lobe and the ligand used to bind to intracellular aggregated PHF tau in the neocortical structure of the brain are labelled distinctively.
30
- 78 A method as claimed in claim 76 or claim 77 wherein the ligand used to bind intracellular aggregated tau is the ligand described in any one of claims 64 to 75.
35
- 79 A method as claimed in any one of the preceding claims wherein

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

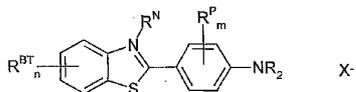
92

the ligand binds aggregated PHF tau preferentially with respect to competing binding sites present in the relevant region of the brain.

5 80 A method as claimed in any one of the preceding claims wherein steps (i) and/or (ii) of the method are performed in conjunction with the further step of introducing into the subject a further blocking ligand which labels the competing binding sites present in the relevant region of the brain preferentially to the ligand used
10 to bind aggregated PHF tau.

81 A method as claimed in claim 80 wherein the blocking ligand is [¹⁸F]FDDNP.

15 82 A method as claimed in claim 80 wherein the blocking ligand is a benzothiazole of the formula:



wherein:

n is an integer from 0 to 4;
20 each R^{BT} is independently a blocking ligand benzothiazole substituent;
m is an integer from 0 to 4;
each R^P is independently a phenylene substituent;
each R is independently -H or an amino substituent; and,
25 either:
R^N and X⁻ are both absent and the associated (tertiary) nitrogen atom is neutral;
or:
30 R^N is a benzothiazolino substituent and the associated (quaternary) nitrogen atom bears a positive charge, and X⁻ is a counter ion.

83 A method as claimed in claim 82 wherein the blocking ligand is thioflavin-T.

35

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

93

- 84 A method as claimed in claim 82 wherein each R^{BT} is independently C₁₋₄alkyl, -SO₂H, or -SO₂M³, wherein M³ is a cation.
- 85 A method as claimed in claim 84 wherein M³ is an alkali metal cation selected from: Li, Na, K, or Cs.
- 86 A method as claimed in any one of claims 82 to 85 wherein n is 1, and R^{BT} is -Me, -Et, -nPr, or -iPr.
- 10 87 A method as claimed in claim 86 wherein n is 1, and R^{BT} is -Me.
- 88 A method as claimed in claim 84 wherein one of the R^{BT} groups is -SO₂H or -SO₂M³, and another of the R^{BT} groups is C₁₋₄alkyl.
- 15 89 A method as claimed in any one of claims 82 to 85 wherein n is 2, and one R^{BT} is C₁₋₄alkyl, and one R^{BT} is -SO₂H or -SO₂M³.
- 90 A method as claimed in claim 89 wherein n is 2, and one R^{BT} is -Me, and one R^{BT} is -SO₂H or -SO₂M³.
- 20 91 A method as claimed in any one of claims 82 to 90 wherein R^N and X⁻ are both absent and the associated (tertiary) nitrogen atom is neutral.
- 25 92 A method as claimed in any one of claims 82 to 90 wherein R^N is a benzothiazolino substituent and the associated (quaternary) nitrogen atom bears a positive charge, and X⁻ is a counter ion.
- 93 A method as claimed in any one of claims 82 to 90 wherein R^N is C₁₋₄alkyl.
- 30 C₁₋₄alkyl.
- 94 A method as claimed in claim 93 wherein R^N is -Me, -Et, -nPr, or -iPr.
- 35 95 A method as claimed in any one of claims 82 to 90 wherein X⁻ is Cl⁻, Br⁻, and I⁻.
- 96 A method as claimed in any one of claims 82 to 95 wherein R^P is

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

94

C₁₋₄alkyl.

97 A method as claimed in any one of claims 82 to 96 wherein each R is -H, and the amino group is -NH₂.

5

98 A method as claimed in any one of claims 82 to 96 wherein one R is -H and one R is an amino substituent.

99 A method as claimed in any one of claims 82 to 96 wherein each R is an amino substituent.

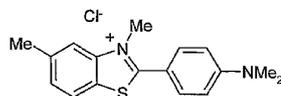
10

100 A method as claimed in claim 99 wherein each of the amino substituents is C₁₋₄alkyl.

15 101 A method as claimed in any one of claims 82 to 96 wherein the amino group, -NR₂, is -NH₂, -NHMe, -NHET, -NH(iPr), -NH(nPr), -NMe₂, -NEt₂, N(iPr)₂, or -N(nPr)₂.

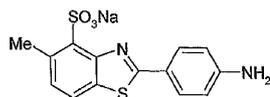
102 A method as claimed in claim 101 wherein the blocking ligand is a benzthiazole of the formula:

20



103 A method as claimed in claim 101 wherein the blocking ligand is a benzthiazole of the formula:

25



25

104 A method as claimed in any one of the preceding claims for use in the diagnosis or prognosis of a tauopathy in a subject believed to suffer from said disease.

30

105 A method as claimed in claim 104 wherein tauopathy is AD.

WO 02/075318

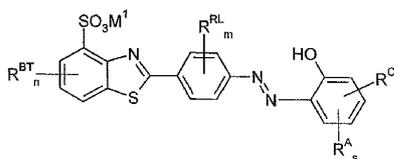
PCT/GB02/01318

95

106 A ligand as described in any one of claims 1 to 79 for use in a method of diagnosis or prognosis of a tauopathy in a subject believed to suffer from said disease, said method being a method as described in claim 104 or claim 105.

107 A ligand as described in any one of claims 1 to 79 for use in a method for determining the effectiveness of a treatment of a subject with a tau-tau aggregation inhibitor to inhibit neurofibrillary degeneration in that subject, the method comprising use of a method as described in any one of claims 1 to 103.

108 A ligand of the formula:



15 wherein:

M^1 is an alkali metal cation;
 n is an integer from 0 to 3;
 each R^{BT} is a independently benzothiazole substituent;
 m is an integer from 0 to 4;
 each R^{RL} is independently a rigid linker aryl substituent;
 s is an integer from 0 to 4;
 each R^A is independently an aryl substituent; and,
 R^C , if present, is a reactive conjugating substituent, or
 R^C is, or contains, a detectable label.

25

109 A ligand as claimed in claim 108 wherein M^1 is Li, Na, K, or Cs.

110 A ligand as claimed in claim 108 or claim 109 wherein each R^{BT} is independently C_1 -alkyl, hydroxy, C_1 -alkoxy, nitro, cyano, halo, or amino.

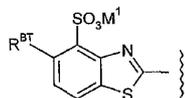
30

WO 02/075318

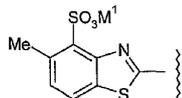
PCT/GB02/01318

96

- 111 A ligand as claimed in claim 110 wherein each R^{BT} is independently -Me, -Et, -nPr, -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, or -N(nPr)₂.
- 112 A ligand as claimed in claim 110 wherein each R^{BT} is independently C₁₋₄alkyl.
- 113 A ligand as claimed in claim 112 wherein each R^{BT} is independently -Me, -Et, -nPr, or -iPr.
- 114 A ligand as claimed in claim 113 wherein each R^{BT} is -Me.
- 115 A ligand as claimed in claim 113 wherein n is 1, and R^{BT} is independently -Me, -Et, -nPr, or -iPr.
- 116 A ligand as claimed in claim 115 wherein n is 1, and R^{BT} is -Me.
- 117 A ligand as claimed in any one of claims 108 to 116 wherein the benzothiazole group has the following formula:



- 118 A ligand as claimed in claim 117 wherein the ligand has the following formula:



- 119 A ligand as claimed in any one of claims 108 to 118 wherein each R^{BT} is independently C₁₋₄alkyl, hydroxy, C₁₋₄alkoxy, nitro, cyano, halo, or amino.

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

97

- 120 A ligand as claimed in claim 119 wherein each R^{R1} is independently -Me, -Et, -nPr, -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, or -N(nPr)₂.
- 121 A ligand as claimed in claim 120 wherein each R^{R2} is independently C₁₋₄alkyl.
- 10 122 A ligand as claimed in any one of claims 108 to 121 wherein each R^A is independently selected from:
-OH, -NH₂, -NHR¹, -NR¹R², -SO₂M², and C₁₋₄alkyl;
wherein:
R¹ and R² are each C₁₋₄alkyl, and
15 M² is an alkali metal cation.
- 123 A ligand as claimed in claim 122 wherein M² is Li, Na, K, or Cs.
- 20 124 A ligand as claimed in any one of claims 108 to 123 wherein R^C is present and is a reactive conjugating substituent, and is, or contains, a reactive functional group suitable for conjugation to another molecule by chemical reaction therewith, to form a covalent linkage therebetween.
- 25 125 A ligand as claimed in claim 124 wherein R^C is present and is, or contains, an active ester.
- 126 A ligand as claimed in claim 125 wherein R^C is present and
30 is, or contains, a succinimidyl ester.
- 127 A ligand as claimed in claim 124 wherein R^C is present and is a reactive conjugating substituent, and is, or contains, a moiety suitable for conjugation to another molecule by a strong non-
35 covalent interaction.
- 128 A ligand as claimed in claim 127 wherein R^C is present and is, or contains, biotin.

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

98

129 A ligand as claimed in claim 124 wherein R^C is present and is a reactive conjugating substituent, and is, or contains, a moiety suitable for conjugation to another molecule by complex or chelate formation.

130 A ligand as claimed in claim 129 wherein R^C is present and is, or contains, a technetium-chelating group.

10 131 A ligand as claimed in claim 130 wherein R^C is present and is, or contains diethylenetriaminepentaacetic acid.

132 A ligand as claimed in any one of claims 108 to 123 wherein R^C is present and is, or contains, a detectable label.

15

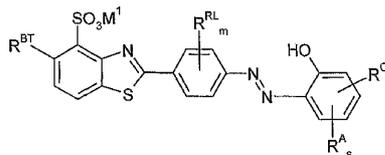
133 A ligand as claimed in claim 132 wherein R^C is present and is, or contains, a dye, a fluorescent marker, an antigenic group, a stable or an unstable isotope, or a positron-emitting carbon atom.

20 134 A ligand as claimed in claim 133 wherein R^C is present and is, or contains, ¹⁸F.

135 A ligand as claimed in claim 134 wherein R^C is present and is, or contains, a positron-emitting carbon atom.

25

136 A ligand as claimed in any one of claims 108 to 135 wherein the ligand has the formula:

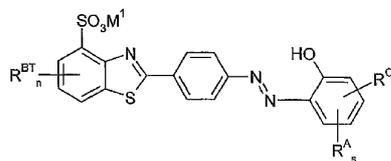


WO 02/075318

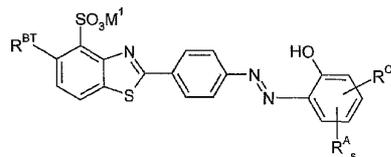
PCT/GB02/01318

99

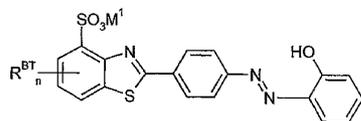
137 A ligand as claimed in claim 136 wherein the ligand has the formula:



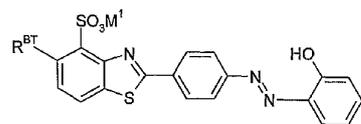
5 138 A ligand as claimed in claim 137 wherein the ligand has the formula:



10 139 A ligand as claimed in claim 137 wherein the ligand has the formula:



140 A ligand as claimed in claim 139 wherein the ligand has the formula:



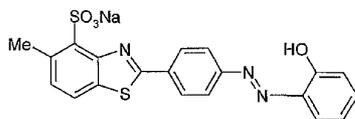
15

WO 02/075318

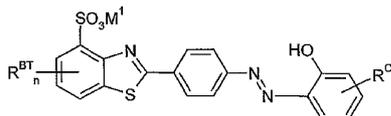
PCT/GB02/01318

100

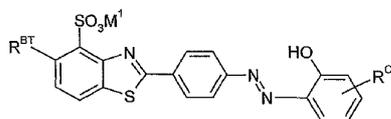
141 A ligand as claimed in claim 140 wherein the ligand has the formula:



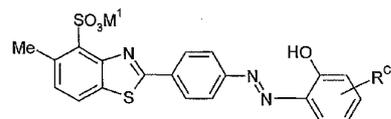
5 142 A ligand as claimed in claim 137 wherein the ligand has the formula:



10 143 A ligand as claimed in claim 142 wherein the ligand has the formula:



144 A ligand as claimed in claim 143 wherein the ligand has the formula:



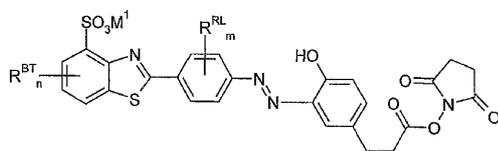
15

WO 02/075318

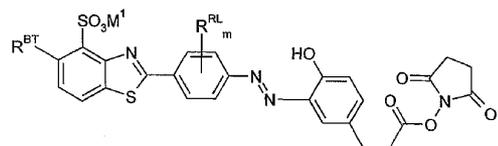
PCT/GB02/01318

101

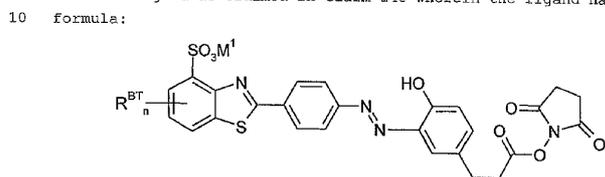
145 A ligand as claimed in claim 142 wherein the ligand has the formula:



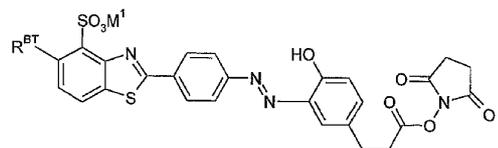
5 146 A ligand as claimed in claim 145 wherein the ligand has the formula:



147 A ligand as claimed in claim 145 wherein the ligand has the formula:



148 A ligand as claimed in any one of claim 147 wherein the ligand has the formula:



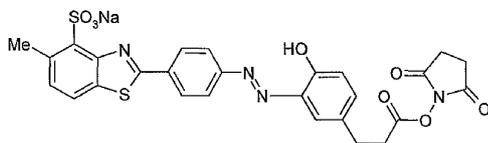
15

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

102

149 A ligand as claimed in claim 148 wherein the ligand has the formula:



5 150 A ligand as claimed in any one of claims 136 to 149 which is conjugated, chelated, or otherwise associated, with a detectable chemical group.

10 151 A diagnostic composition comprising as its active ingredient at least 90%, 95%, or 98% of the ligand of any one of claims 108 to 150.

15 152 A diagnostic composition as claimed in claim 151 further comprising a carrier material or other pharmaceutically- and physiologically-acceptable excipient.

20 153 A method of labelling aggregated tau or tau-like molecules, comprising contacting the aggregated molecules with a ligand or composition of any one of claims 108 to 152.

25 154 An *in vitro* method of diagnosis or prognosis of a tauopathy in a subject believed to suffer from the disease, the method comprising (i) obtaining a sample of appropriate tissue from a subject; (ii) contacting the sample with a ligand or composition of any one of claims 108 to 152; (iii) detecting the amount and/or localisation of the ligand bound to the sample (iv) correlating the result of (iii) with the stage or severity of the disease in the subject.

30 155 A method as claimed in claim 153 where the tauopathy is AD.

156 A ligand according to any one of claims 108 to 150 for use in a method of diagnosis, prognosis or therapeutic treatment of the

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

103

human or animal body for a tauopathy.

157 A ligand as claimed in claim 156 where the tauopathy is AD.

5 158 A method for identifying a compound capable of binding aggregated tau protein, the method comprising the steps:
(i) providing a sample of aggregated tau protein to which a ligand as claimed in any one of claims 108 to 150 has been bound,
(ii) contacting the sample with the putative tau-binding compound,
10 (iii) determining the extent of displacement of the ligand from the aggregated tau protein by the putative tau-binding compound
(iv) correlating the result of the determination made in (iii) with the ability of the compound to bind aggregated tau protein.

15 159 A method as claimed in claim 158 wherein the aggregated tau protein is in solution or bound to a solid phase.

160 An in vitro method for identifying a ligand capable of labeling aggregated PHF tau protein, the method comprising the
20 steps of:
(i) providing a first agent suspected of being capable of labeling aggregated PHF tau protein,
(ii) contacting (a) a tau protein or a derivative thereof containing the tau core fragment bound to a solid phase so as to
25 expose a high affinity tau capture site, with (b) a liquid phase tau protein or derivative thereof capable of binding to the solid phase tau protein or derivative, and (c) said selected first agent and (d) a second agent known to be tau-tau binding inhibitor,
(iii) selecting first agent which fully or partially relieves the
30 inhibition of binding of the liquid phase tau protein or derivative of (b) to the solid phase tau protein or derivative of (a) by the inhibitor (d).

161 A method as claimed in claim 160 wherein step (ii) is
35 carried out in conjunction with:
(i) contacting (a) a tau protein or a derivative thereof containing the tau core fragment bound to a solid phase so as to expose a high affinity tau capture site, with (b) a liquid phase

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

104

- tau protein or derivative thereof capable of binding to the solid phase tau protein or derivative, and (c) said first agent, and (ibis.1) detecting inhibition of tau-tau binding as exhibited by inhibition of binding of the liquid phase tau protein or derivative of (b) to the solid phase tau protein or derivative of (a), (ibis.2) selecting first agent which has minimal or absent activity as tau-tau binding inhibitors and/or optionally enhance tau-tau binding.
- 10 162 A method as claimed in claim 160 or claim 161 wherein the inhibitor is a diaminophenathiozine as described in any one of claims 64 to 74.
- 15 163 A method as claimed in claim 162 wherein the inhibitor is DMMB.
- 20 164 A method as claimed in any one of claims 160 to 163 wherein the liquid phase tau protein or derivative is prepared in a form which has undergone partial aggregation prior to exposure to the solid phase.
- 25 165 A method as claimed in claim 174 wherein said preparation of liquid phase tau protein or derivative comprises the steps of:
(i) sonicating said tau protein or derivative and/or
(ii) exposing said tau protein or derivative to PEG through a semi-permeable membrane.
- 30 166 A method as claimed in any one of claims 160 to 165, wherein the step of contacting said agent and liquid phase tau protein or derivative with said solid phase tau protein or derivative is carried out in an alkaline buffer of pH 9-10.
- 35 167 A method as claimed in any one of claims 160 to 165, wherein the step of contacting said agent and liquid phase tau protein or derivative with said solid phase tau protein or derivative is carried out in physiological buffer conditions.

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

105

- 168 A method as claimed in any one of claims 160 to 165, wherein the step of contacting the or each agent and liquid phase tau protein or derivative with said solid phase tau protein or derivative is carried out in 50-400 mM sodium chloride or a salt or salt mixture of comparable ionic strength, and in a pH range of 4-10.
- 169 A method as claimed in any one of claims 160 to 168, wherein said liquid phase tau protein or derivative is labeled.
- 170 A method as claimed in any one of claims 160 to 168 wherein said liquid phase tau protein or derivative is immunologically distinguishable from said solid phase tau protein or derivative, and the binding is detected by antibodies.
- 171 A method as claimed in any one of claims 160 to 170 wherein a truncated tau protein corresponding to the core fragment and terminating at Ala390 (dGA) is plated on a solid phase in buffer conditions unfavourable to tau-tau association,
- 172 A method as claimed in any one of claims 160 to 171 wherein a truncated tau protein corresponding to the core fragment and terminating at Glue-391 (dGAE) or a full-length protein is added in liquid phase together with the or each agent
- 173 A method as claimed in any one of claims 158 to 172 further comprising the step of formulating the agent as a diagnostic or prognostic reagent.
- 174 A method as claimed in any one of claims 158 to 172 further comprising the step of using the agent as a ligand in the method of any one of claims 1 to 11.

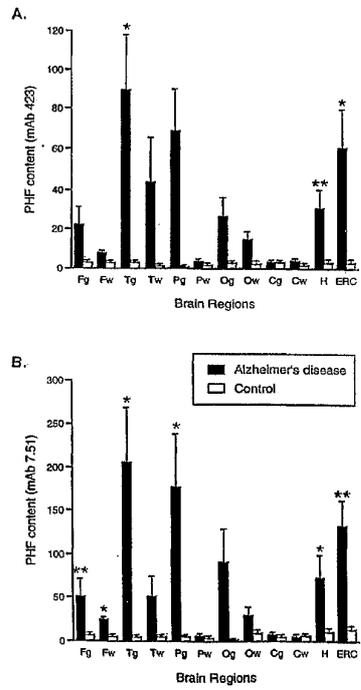


Figure 1

2/54

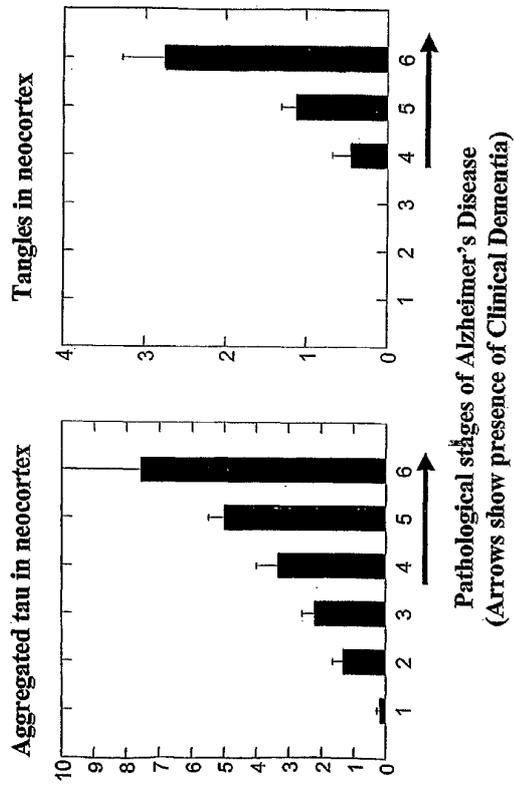


Figure 2a

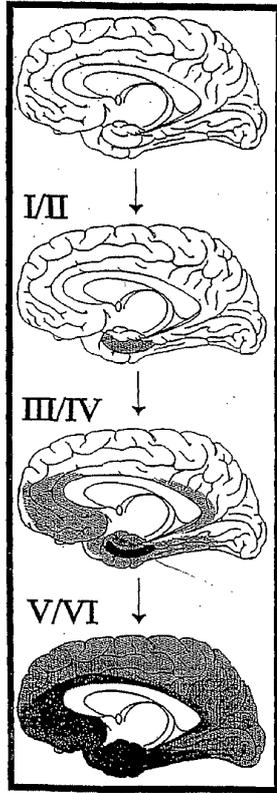


Figure 2b

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

4/54

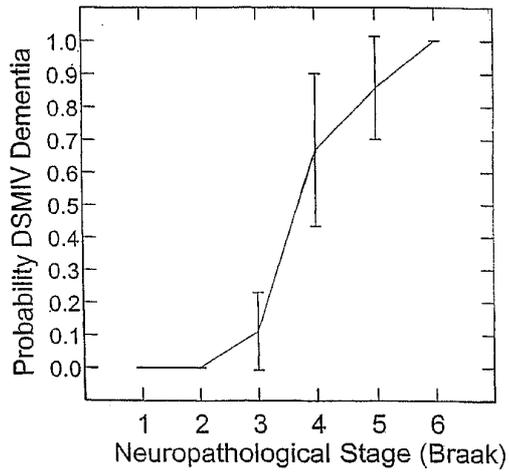


Figure 2c

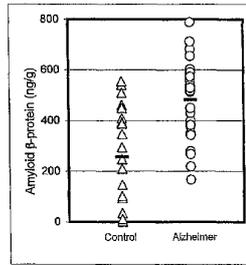


Figure 2d

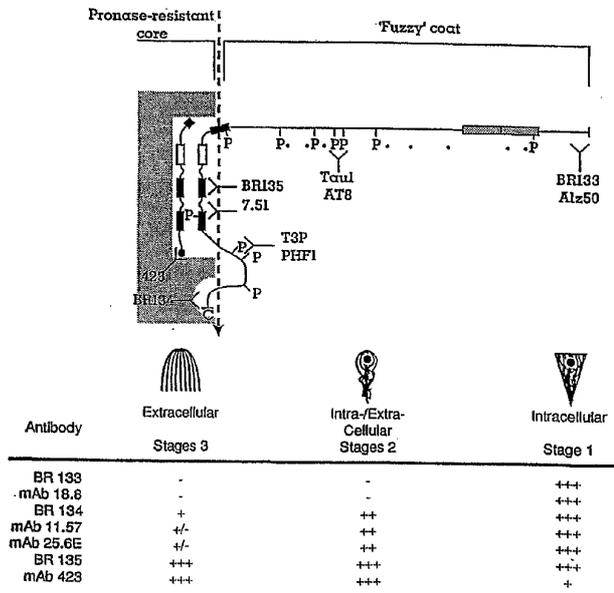


Figure 3

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

7/54

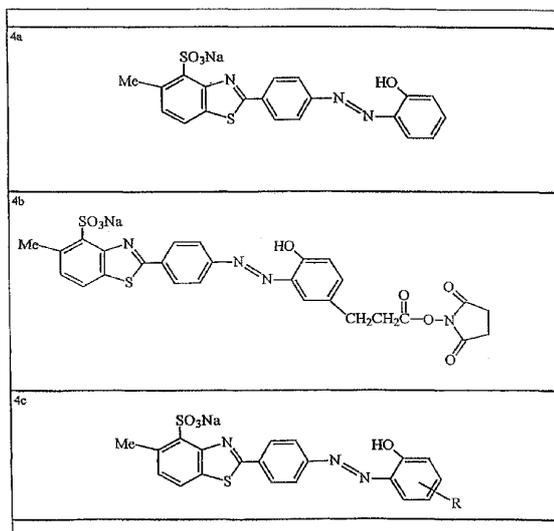


Figure 4

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

8/54

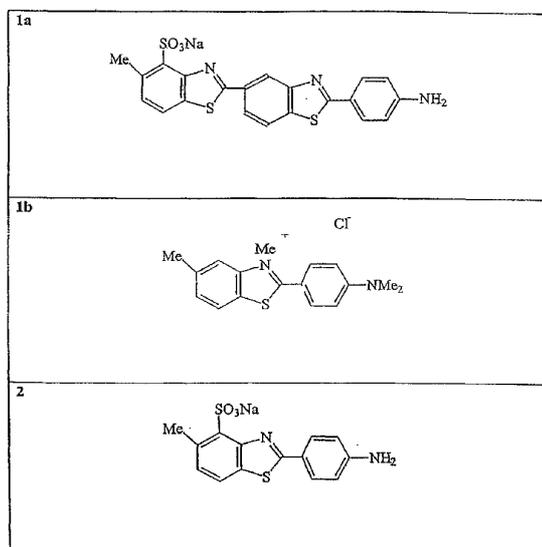


Figure 5

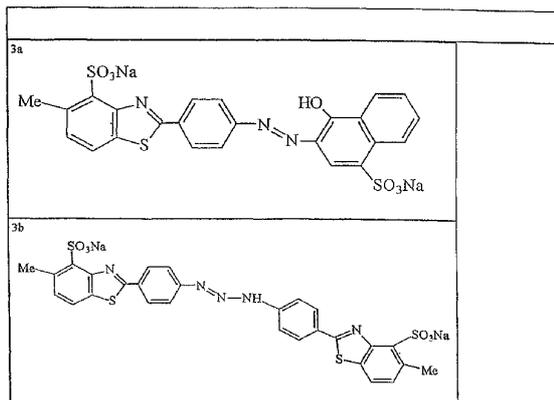


Figure 5 cont ...

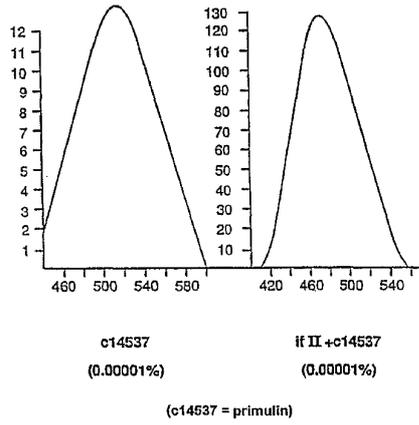


Figure 6

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

11/54

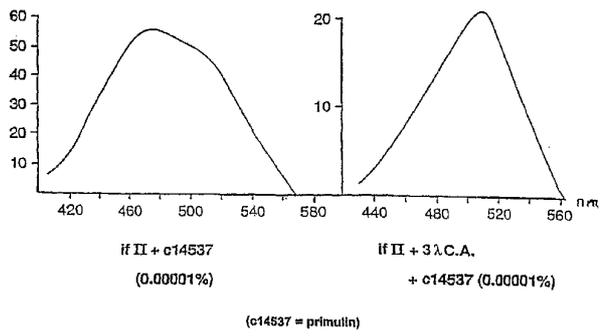


Figure 7

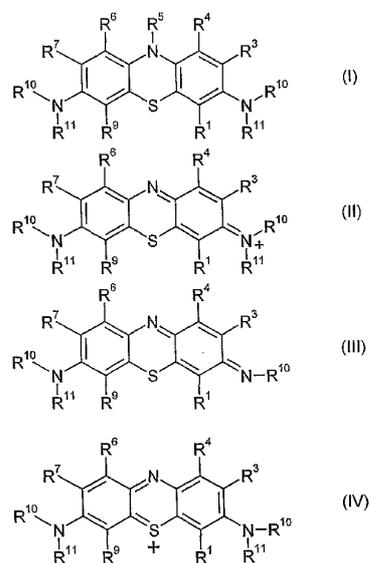


Figure 8a

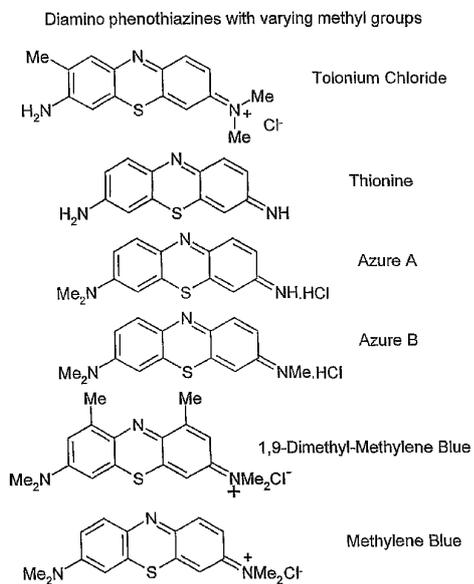
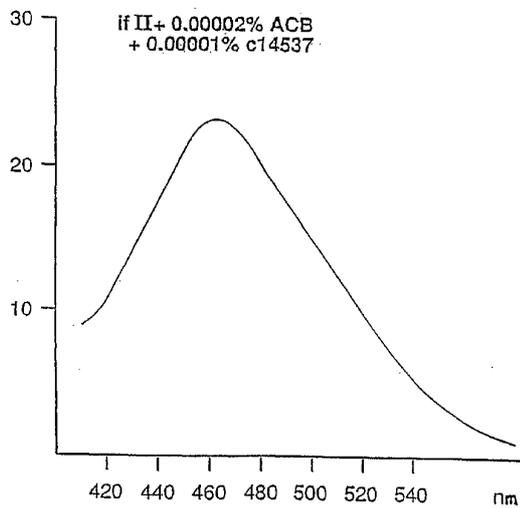


Figure 8b

14/54



(ACB = Alcian Blue, c14537 = primulin)

Figure 9

Tau-tau binding vs Molar Ratio (compound:tau)
Thionine vs PHF-ligands

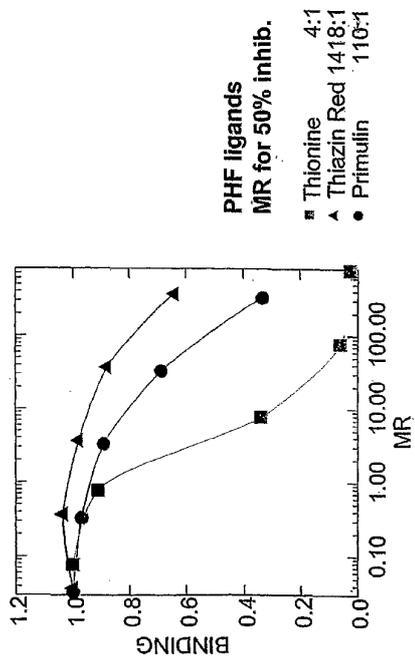


Figure 10

Synthesis of [¹¹C] labelled Methylene Blue

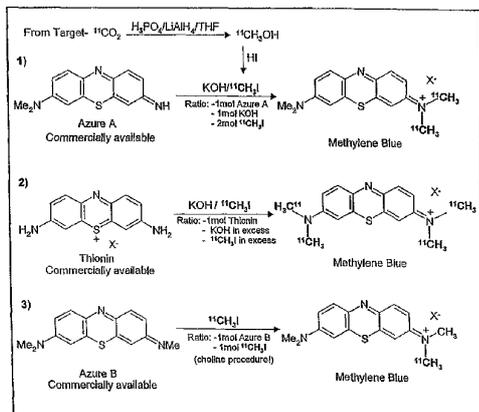


Figure 11a

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

17/54

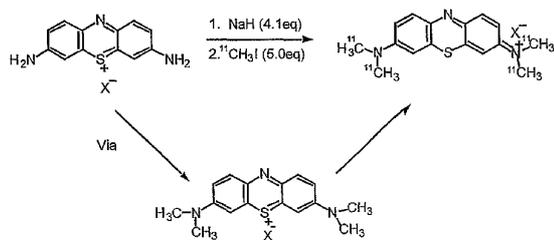


Figure 11b

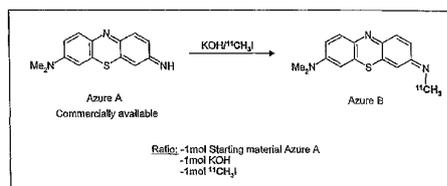
Synthesis of [¹⁴C] labelled Azure B

Figure 12

Synthesis of [¹⁸F] labelled

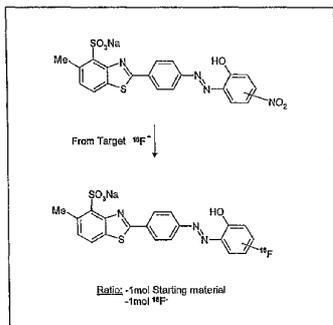
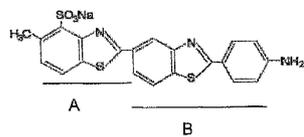
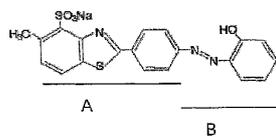


Figure 13

Primulin



Benzothiazole analogue



Thiazin yellow

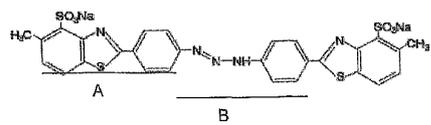


Figure 14

21/54

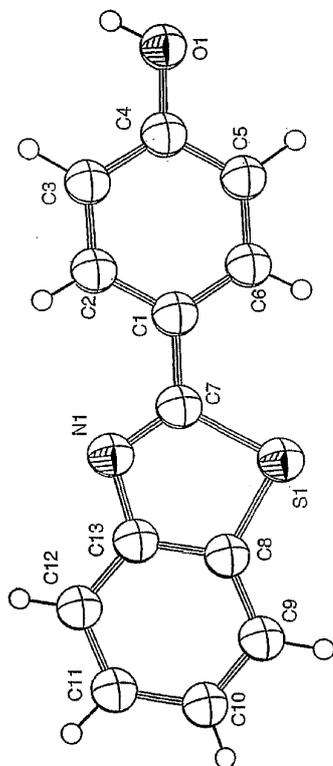


Figure 15

22/54

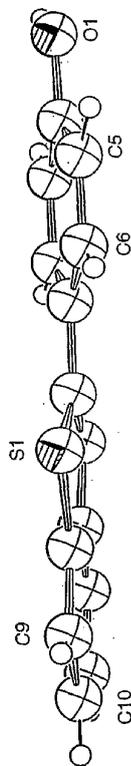


Figure 16

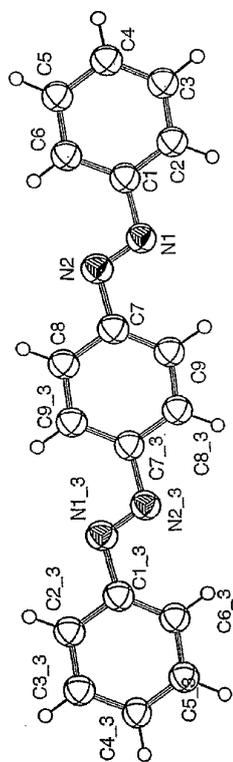


Figure 17

25/54

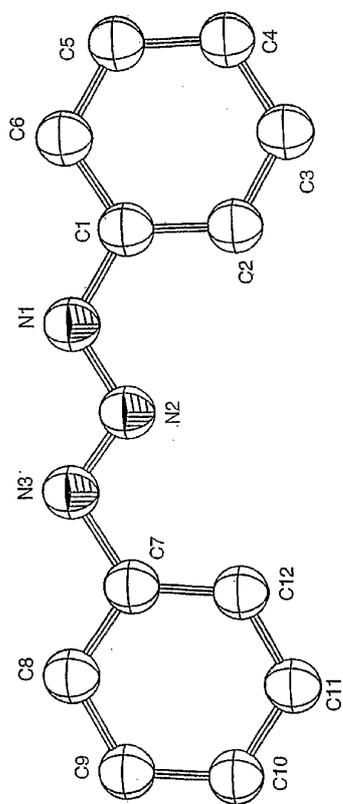


Figure 19

26/54

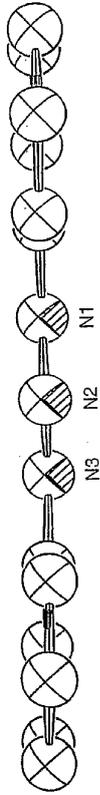


Figure 20

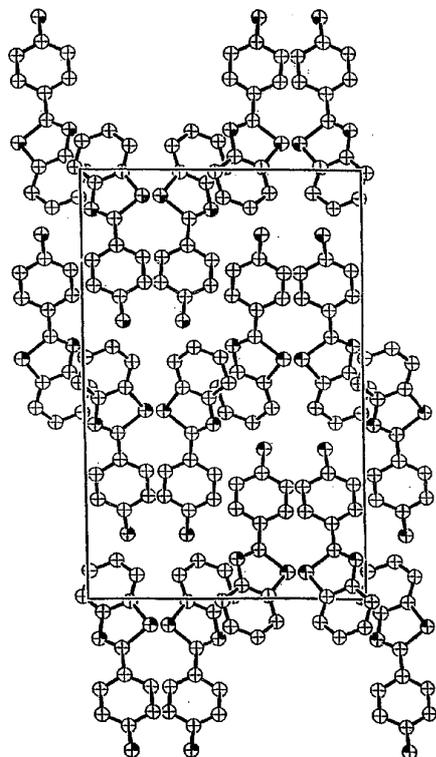


Figure 21

28/54

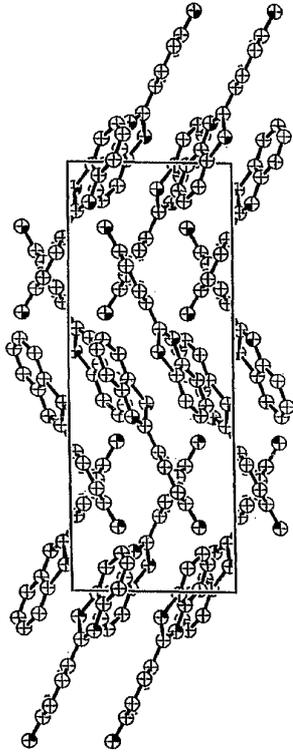


Figure 22

Comparison of dimensions of active and inactive molecules tested (maximum, mean, minimum)

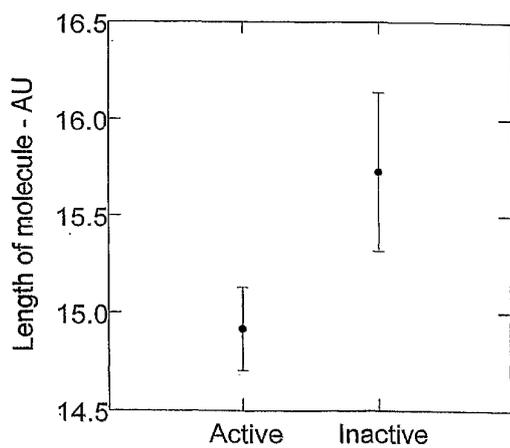


Figure 23

Comparison of dimensions of
benzothiazole and diaminophenothiazine molecules
(maximum, mean, minimum)

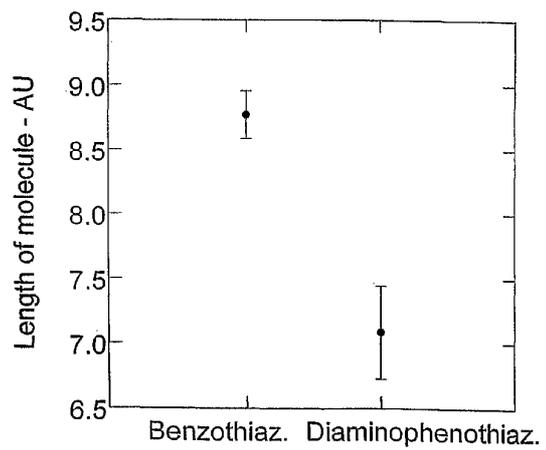


Figure 24

PROBABILITY OF 423-T'S BY REGION AND STAGE

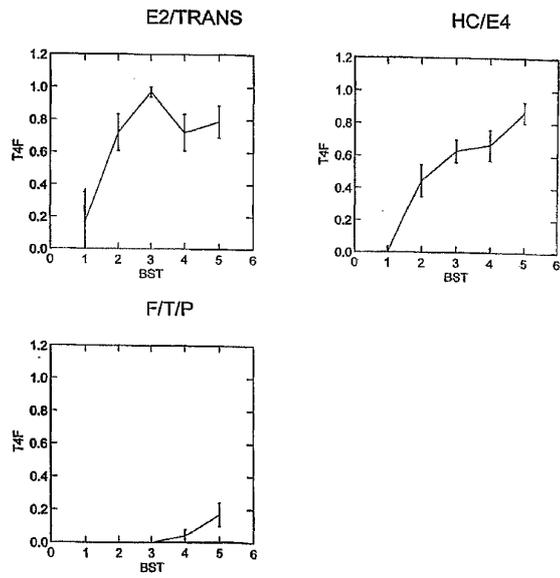


Figure 25

PROBABILITY AT8-T'S BY REGION AND STAGE

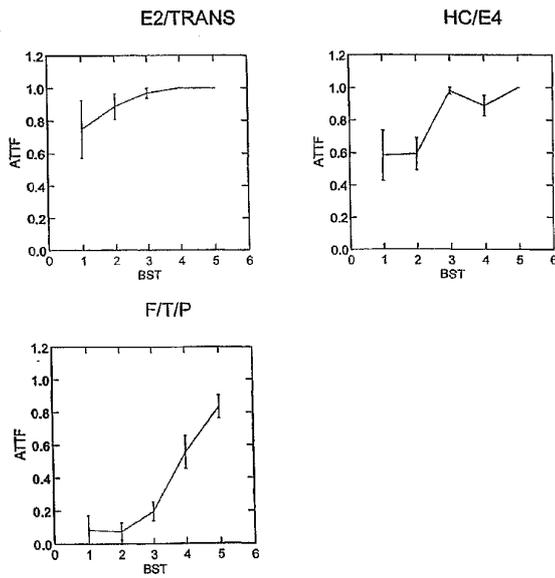


Figure 26

PROBABILITY OF 423-T'S BY REGION AND STAGE
MMSE > 21

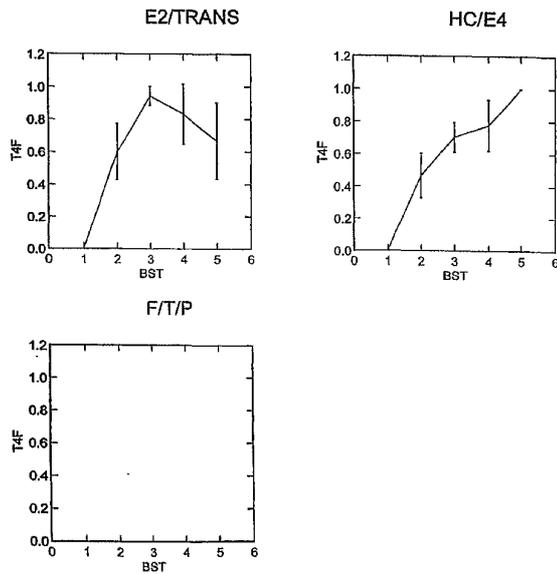


Figure 27

PROBABILITY OF AT8-T'S BY REGION AND STAGE
MMSE > 21

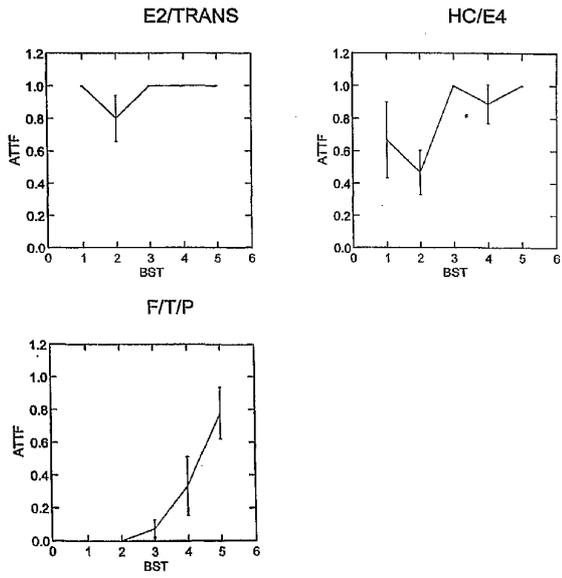


Figure 28

DENSITY OF 423-T'S BY REGION AND STAGE

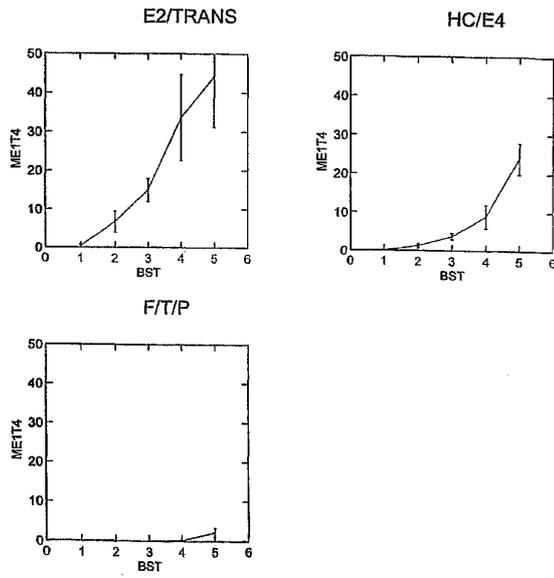


Figure 29

DENSITY OF AT8-T'S BY REGION AND STAGE

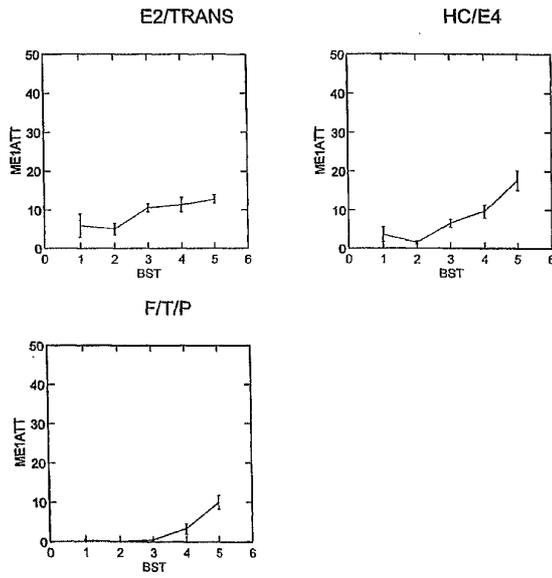


Figure 30

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

37/54

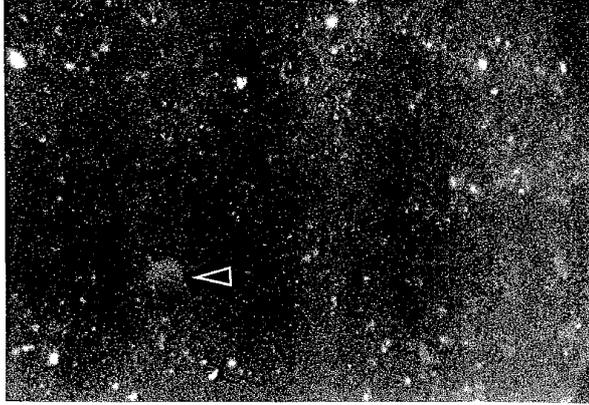


Figure 31a

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

38/54



Figure 31b

39/54

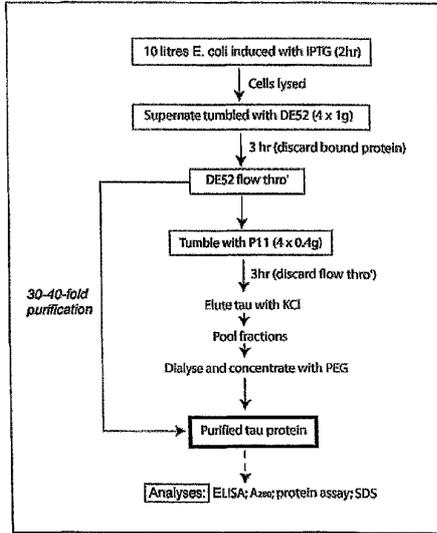


Figure 32

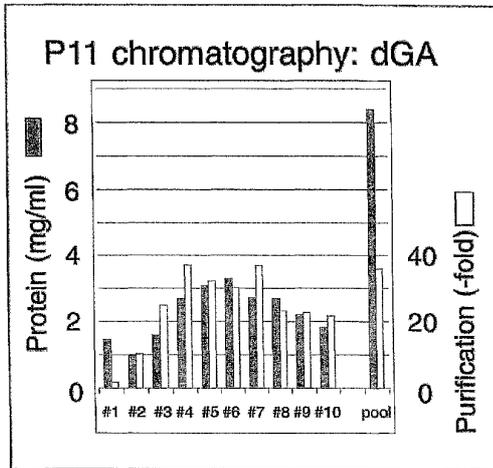


Figure 33

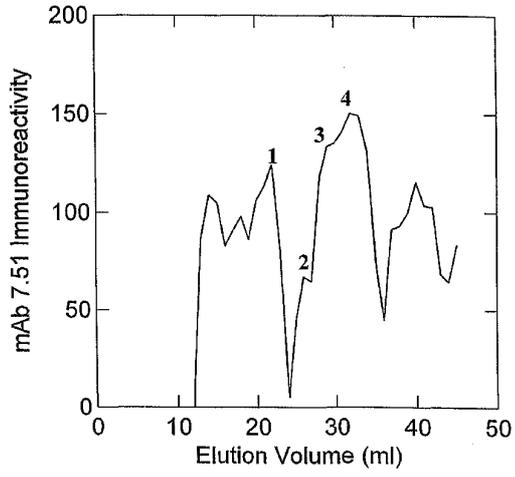


Figure 34

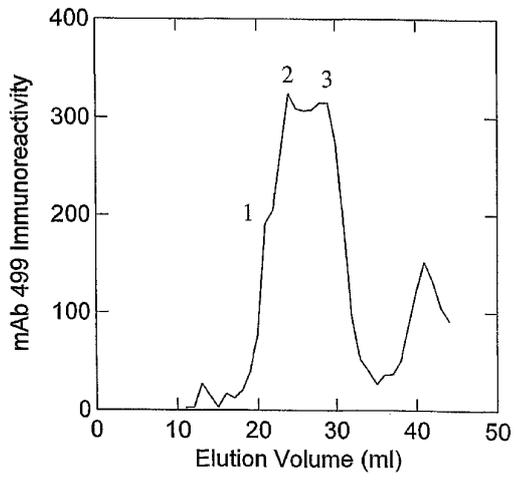


Figure 35

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

43/54

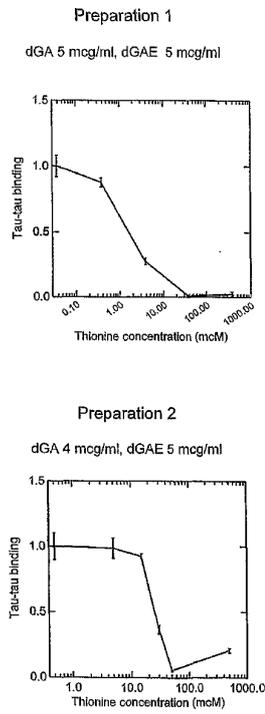


Figure 36

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

44/54

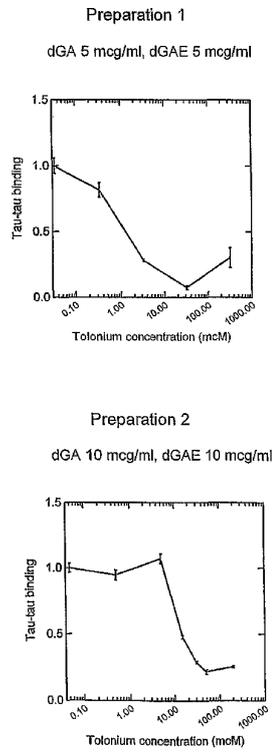


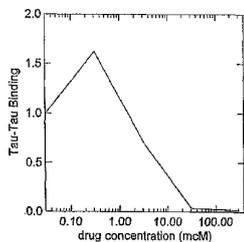
Figure 37

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

45/54

Preparation 1



Preparation 2

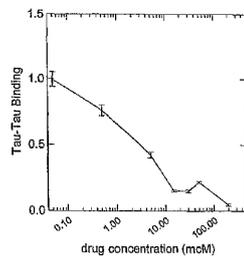


Figure 38

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

46/54

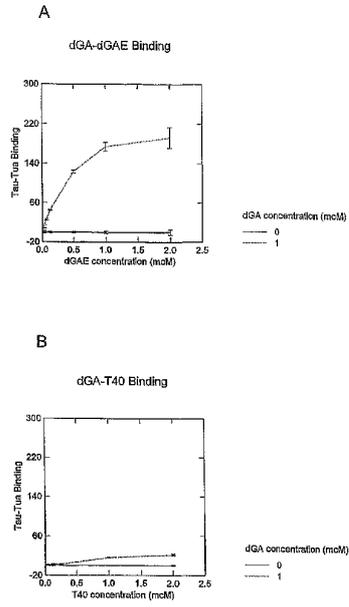


Figure 39a and 39b

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

47/54

C

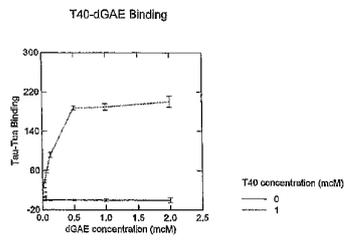


Figure 39c

WO 02/075318

PCT/GB02/01318

48/54

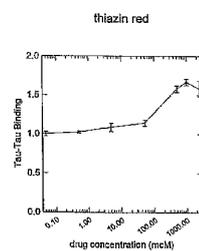
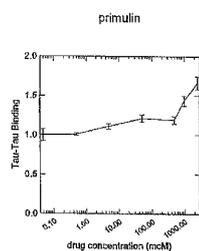


Figure 40

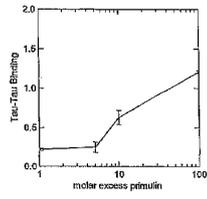
WO 02/075318

PCT/GB02/01318

49/54

(a)

Tau-Tau Binding at 5 mM DMMB



(b)

Tau-Tau Binding at 5 mM DMMB

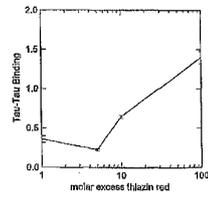


Figure 41a and 41b

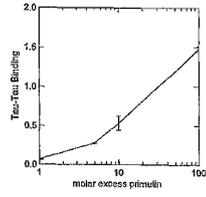
WO 02/075318

PCT/GB02/01318

50/54

(c)

Tau-Tau Binding at 15 mM DMMB



(d)

Tau-Tau Binding at 15 mM DMMB

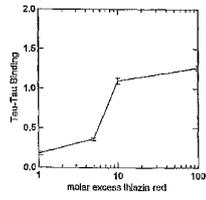


Figure 41c and 41d

51/54

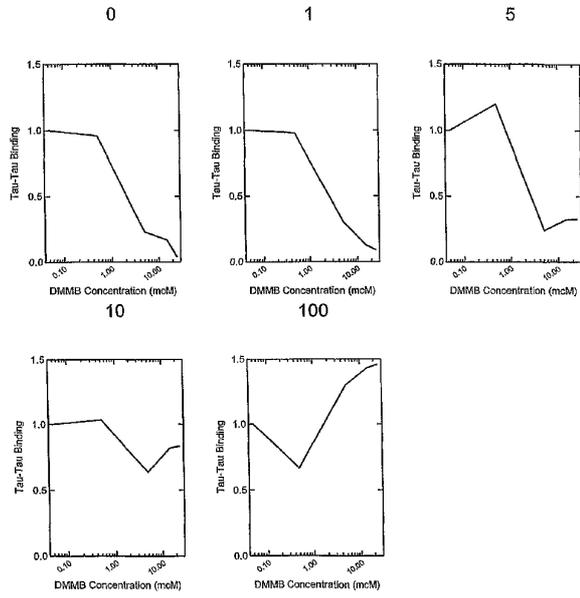


Figure 42

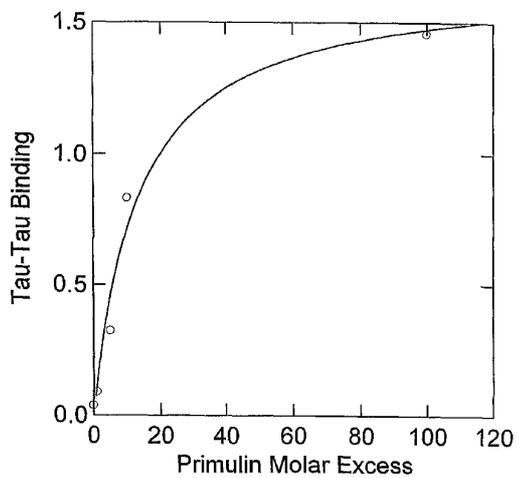


Figure 43

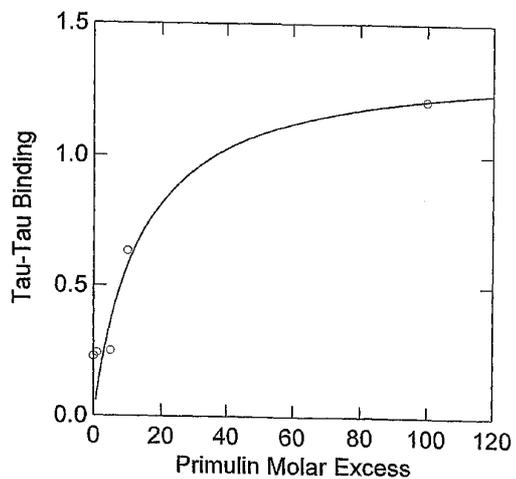


Figure 44

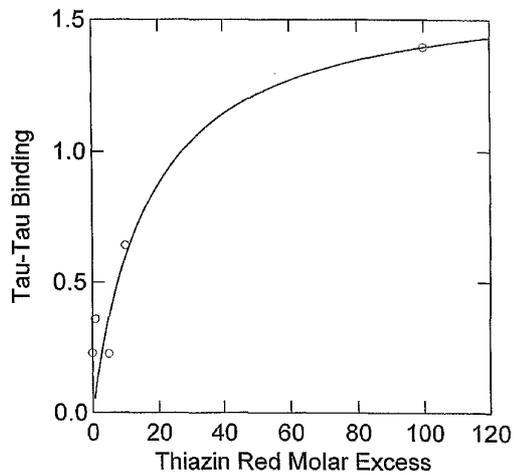


Figure 45

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
26 September 2002 (26.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2002/075318 A3

(51) International Patent Classification: G01N 33/68, C07D 277/62, G01N 33/58, C07D 279/18

(21) International Application Number: PCT/GB2002/001318

(22) International Filing Date: 20 March 2002 (20.03.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 0106953.3 20 March 2001 (20.03.2001) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY OF ABERDEEN [GB/GB]; Regent Walk, Aberdeen, Aberdeenshire AB24 3FX (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): WISCHIK, Claude,

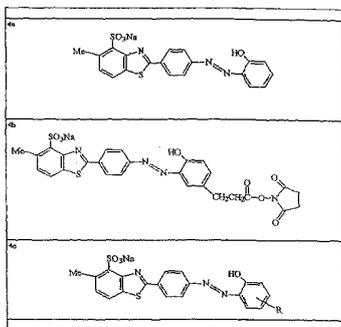
Michel [FR/GB], Department of Mental Health, University of Aberdeen, University Medical Buildings, Foresterhill, Aberdeenshire AB25 2ZD (GB). HARRINGTON, Charles, Robert [GB/GB]; Department of Mental Health, University of Aberdeen, University Medical Buildings, Foresterhill, Aberdeenshire AB25 2ZD (GB). RICKARD, Janet, Elizabeth [GB/GB]; Department of Mental Health, University of Aberdeen, University Medical Buildings, Foresterhill, Aberdeenshire AB25 2ZD (GB). HORSLEY, David [GB/GB]; Department of Mental Health, University of Aberdeen, University Medical Buildings, Foresterhill, Aberdeenshire AB25 2ZD (GB).

(74) Agents: KREMER, Simon, M. et al.; Mewburn Ellis, York House, 23 Kingsway, London, Greater London WC2B 6HP (GB).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,

[Continued on next page]

(54) Title: NEUROFIBRILLARY LABELS



(57) Abstract: Disclosed are methods for determining the stage of neurofibrillary degeneration associated with a tauopathy in a subject believed to suffer from the disease, which methods comprise the steps of: (i) introducing into the subject a ligand capable of labelling aggregated paired helical filament (PHF) tau protein, (ii) determining the presence and/or amount of ligand bound to extracellular aggregated PHF tau in the medial temporal lobe of the brain of the subject, (iii) correlating the result of the determination made in (ii) with the extent of neurofibrillary degeneration in the subject. The methods can be used for pre-mortem diagnosis and staging of tauopathies such as Alzheimer's Disease. Preferred ligands include sulphonated-benzothiazole-like compounds and diamino-phenothiazines. Novel ligands (e.g. sulphonated-benzothiazole-like compounds) are also provided. The method may also include the use of "blocking ligands" to block competing binding sites. In other aspects the invention provides in vitro methods for identifying ligands capable of labeling aggregated PHF tau protein, the methods comprising the steps of: (i) providing a first agent suspected of being capable of labeling aggregated PHF tau protein, (ii) contacting (a) a tau protein or a derivative thereof

containing the tau core fragment bound to a solid phase so as to expose a high affinity tau capture site, with (b) a liquid phase tau protein or derivative thereof capable of binding to the solid phase tau protein or derivative, and (c) said selected first agent and (d) a second agent known to be tau-tau binding inhibitor, (iii) selecting first agent which fully or partially relieves the inhibition of binding of the liquid phase tau protein or derivative of (b) to the solid phase tau protein or derivative of (a) by the inhibitor (d). Ligands may also be tested to confirm that they are not themselves inhibitors.

WO 2002/075318 A3

WO 2002/075318 A3



MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TI, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(84) **Designated States (regional):** ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) **Date of publication of the international search report:**
11 March 2004

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 02/01318
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 601N33/68 C07D277/62 601N33/58 C07D279/18		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 601N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DEZUTTER N A ET AL: "99mTc-MAMA-chrysinine G, a probe for beta-amyloid protein of Alzheimer's disease." EUROPEAN JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE, GERMANY NOV 1999, vol. 26, no. 11, November 1999 (1999-11), pages 1392-1399, XP002266003 ISSN: 0340-6997 the whole document ---	1-108, 124, 130, 132, 133, 135-157
A	EP 1 048 302 A (PFIZER PROD INC) 2 November 2000 (2000-11-02) the whole document ---	1-108, 124, 130, 132, 133, 135-157
	---	---
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 December 2003		Date of mailing of the international search report 28/01/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax (+31-70) 340-3015		Authorized officer Döpfer, K-P

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/GB 02/01318

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 199228 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1992-226472 XP002266008 & CA 1 302 250 C (RES FOUND MENTAL HYGIENE INC), 2 June 1992 (1992-06-02) abstract ---	1
A	CONDAMINES O ET AL: "New immunoassay for the mapping of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease using two monoclonal antibodies against human paired helical filament tau proteins." NEUROSCIENCE LETTERS, IRELAND 9 JUN 1995, vol. 192, no. 2, 9 June 1995 (1995-06-09), pages 81-84, XP002266004 ISSN: 0304-3940 the whole document ---	1, 2, 4, 5, 7
A	WO 93 03369 A (VOORHEIS PAUL H) 18 February 1993 (1993-02-18) paragraph '05.3!'; claims ---	1, 151, 154, 155
A	WO 96 05837 A (BAYER AG ;URBAHNS KLAUS (DE); HEINE HANS GEORG (DE); JUNGE BODO (D) 29 February 1996 (1996-02-29) the whole document ---	1, 64-81
A	WO 96 04915 A (EINSTEIN COLL MED ;DAVIES PETER (US); VINCENT INEZ J (US)) 22 February 1996 (1996-02-22) abstract ---	1, 64-81
A	MUKAETOVA-LADINSKA ELIZABETA B ET AL: "Staging of cytoskeletal and beta-amyloid changes in human isocortex reveals biphasic synaptic protein response during progression of Alzheimer's disease" AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 157, no. 2, August 2000 (2000-08), pages 623-636, XP002266005 ISSN: 0002-9440 cited in the application the whole document ---	1-5, 7
A	MENA RAUL ET AL: "Staging the pathological assembly of truncated tau protein into paired helical filaments in Alzheimer's disease" ACTA NEUROPATHOLOGICA, vol. 91, no. 6, 1996, pages 633-641, XP002266006 ISSN: 0001-6322 the whole document ---	1-5, 7

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/GB 02/01318

C:(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 30766 A (HOFFMANN LA ROCHE ;HARRINGTON CHARLES ROBERT (GB); WISCHIK CLAUDE) 3 October 1996 (1996-10-03) the whole document ---	1,64-81
T	LAI ROBERT Y K ET AL: "Examination of phosphorylated tau protein as a PHF-precursor at early stage Alzheimer's disease" NEUROBIOLOGY OF AGING, vol. 16, no. 3, 1995, pages 433-445, XP002266007 ISSN: 0197-4580 the whole document ---	
T	SMITH C ET AL: "The molecular pathology of Alzheimer's disease: are we any closer to understanding the neurodegenerative process?" NEUROPATHOLOGY AND APPLIED NEUROBIOLOGY, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, LONDON, GB, vol. 20, no. 4, 1 August 1994 (1994-08-01), pages 322-338, XP002001576 ISSN: 0305-1846 the whole document -----	

Form PCT/ISA/210 (continuation of section 4) (July 1992)

International Application No. PCT/GB 02 01318

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 1-107 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.1

Rule 39.1(iv) PCT - Diagnostic method practised on the human or animal body

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/GB 02/01318
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(e) for the following reasons:	
<p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: — because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210</p>	
<p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
<p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.</p>	
<p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p>	
<p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p>	
<p>Remark on Protest</p> <p style="margin-left: 100px;"><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.</p> <p style="margin-left: 100px;"><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/GB 02/01318

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1048302	A	02-11-2000	AU 2892700 A 02-11-2000
			CA 2307081 A1 30-10-2000
			EP 1048302 A2 02-11-2000
			JP 2000351739 A 19-12-2000
			US 2002064500 A1 30-05-2002
CA 1302250	C	02-06-1992	NONE
WO 9303369	A	18-02-1993	AU 2414092 A 02-03-1993
			EP 0600951 A1 15-06-1994
			WO 9303369 A1 18-02-1993
			US 5492812 A 20-02-1996
WO 9605837	A	29-02-1996	DE 4430091 A1 29-02-1996
			AU 3345395 A 14-03-1996
			CA 2198256 A1 29-02-1996
			WO 9605837 A1 29-02-1996
			EP 0777481 A1 11-06-1997
			IL 115027 A 31-01-2000
			JP 10504820 T 12-05-1998
			TW 408117 B 11-10-2000
			US 5861394 A 19-01-1999
			ZA 9507113 A 15-04-1996
WO 9604915	A	22-02-1996	AU 708682 B2 12-08-1999
			AU 3279395 A 07-03-1996
			CA 2196529 A1 22-02-1996
			EP 0778773 A1 18-06-1997
			WO 9604915 A1 22-02-1996
			JP 11506414 T 08-06-1999
WO 9630766	A	03-10-1996	AT 221662 T 15-08-2002
			AU 5334496 A 16-10-1996
			BR 9607846 A 14-07-1998
			CA 2215397 A1 03-10-1996
			DE 69622701 D1 05-09-2002
			DE 69622701 T2 06-03-2003
			DK 817969 T3 25-11-2002
			WO 9630766 A1 03-10-1996
			EP 1067386 A2 10-01-2001
			EP 0817969 A1 14-01-1998
			ES 2180753 T3 16-02-2003
			JP 11502925 T 09-03-1999
			PT 817969 T 31-12-2002
			TR 9701039 T1 21-02-1998
			US 2002168687 A1 14-11-2002
			US 6376205 B1 23-04-2002

Form PCT/ISA/218 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ヴィスシク, クロード・ミシェル
イギリス国、アバディーンシャー エービー 25 2ゼットディー、フォレスタールヒル、ユニバーシティ・メディカル・ビルディングズ、ユニバーシティ・オブ・アバディーン、デパートメント・オブ・メンタル・ヘルス

(72) 発明者 ハリントン, チャールズ・ロバート
イギリス国、アバディーンシャー エービー 25 2ゼットディー、フォレスタールヒル、ユニバーシティ・メディカル・ビルディングズ、ユニバーシティ・オブ・アバディーン、デパートメント・オブ・メンタル・ヘルス

(72) 発明者 リッカード, ジャネット・エリザベス
イギリス国、アバディーンシャー エービー 25 2ゼットディー、フォレスタールヒル、ユニバーシティ・メディカル・ビルディングズ、ユニバーシティ・オブ・アバディーン、デパートメント・オブ・メンタル・ヘルス

(72) 発明者 ホースレイ, デービッド
イギリス国、アバディーンシャー エービー 25 2ゼットディー、フォレスタールヒル、ユニバーシティ・メディカル・ビルディングズ、ユニバーシティ・オブ・アバディーン、デパートメント・オブ・メンタル・ヘルス

F ターム(参考) 2G045 BB10 BB50 BB51 DA36 FB03 FB07
4C085 HH11 KA09 KA26 KA27 KB09 KB57

【要約の続き】

部位を露出するように固相に結合させたタウコアフラグメントを含む、タウタンパク質またはその誘導体を、(b) 固相タウタンパク質または誘導体に結合可能な液相タウたんぱく質またはその誘導体、および(c) 選択された第一作用物質、および(d) タウ-タウ結合阻害剤であることが知られている第二作用物質に接触させるステップ、(i i i) (b) の液相タウタンパク質または誘導体の、(a) の固相タウタンパク質または誘導体への結合の、阻害剤(d) による阻害を完全にまたは一部低減する第一作用物質を選択するステップ、を含む、凝集PHFタウタンパク質を標識可能なリガンドのin vitro同定法を提供する。リガンドを試験して、それ自体が阻害剤ではないことを確認してもよい。

专利名称(译)	神经原纤维标记物		
公开(公告)号	JP2004537034A	公开(公告)日	2004-12-09
申请号	JP2002573679	申请日	2002-03-20
申请(专利权)人(译)	阿伯丁大学的大学学院		
[标]发明人	ヴイスシッククロードミシエル ハリントンチャールズロバート リッカードジャネットエリザベス ホースレイデービッド		
发明人	ヴイスシック,クロード・ミシエル ハリントン,チャールズ・ロバート リッカード,ジャネット・エリザベス ホースレイ,デービッド		
IPC分类号	A61K49/00 C07D277/66 C07D279/20 C07D417/12 G01N33/53 G01N33/58 G01N33/68		
CPC分类号	C07D417/12 C07D277/66 C07D279/20 G01N33/583 G01N33/6896		
FI分类号	G01N33/68 A61K49/00.Z G01N33/53.D G01N33/58.Z		
F-TERM分类号	2G045/BB10 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB07 4C085/HH11 4C085/KA09 4C085/KA26 4C085/KA27 4C085/KB09 4C085/KB57		
代理人(译)	津国 肇 筱田文雄		
优先权	2001006953 2001-03-20 GB		
其他公开文献	JP4288073B2 JP2004537034A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开的是确定与信受试者tau蛋白病相关的神经原纤维变性的阶段的方法，从疾病是患中，(i)的受试者，聚集成对螺旋丝(PHF)引入能够标记tau蛋白的配体中，确定存在和/或在受试者中的(ii)所述脑的内侧颞叶结合至细胞外聚集的tau蛋白PHF配体量，(iii)(ii)包括将受试者中进行的测量结果与受试者中神经原纤维变性的程度相关联。该方法可用于死亡前诊断和阿尔茨海默病等tau蛋白病的分期。优选的配体包括磺化苯并噻唑类化合物和二氨基吩噻嗪。还提供了新型配体，例如磺化苯并噻唑类化合物。该方法还包括使用“阻断配体”来阻断竞争性结合位点。在另一个方面，本发明是，(i)提供将聚集PHFtau蛋白标签的第一试剂，(ii)(a)中的固相，以暴露具有高亲和力的tau捕获位点含tau蛋白核心片段的第一试剂结合，一个tau蛋白或它们的衍生物，其被选择的(b)固相tau蛋白或液相tau蛋白或其衍生物能够结合到所述衍生物和，(c)中，和(d)的tau-已知tau结合抑制剂，所述液相tau蛋白或(iii)(b)中，固相tau蛋白的衍生物的第二剂接触的步骤(a)并选择一种完全或部分降低抑制剂(d)与聚集的PHF tau蛋白或衍生物结合的抑制作用的第一种药物到。可以测试配体以确认它本身不是抑制剂。

