(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4288073号
(P4288073)

(45)発行日　平成21年7月1日(2009.7.1)　(24)登録日　平成21年4月3日(2009.4.3)

(51)Int.Cl.		F I		
G01N 33/68	(2006.01)	G01N	33/68	
A61K 49/00	(2006.01)	A61K	49/00	Z
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	D
G01N 33/58	(2006.01)	G01N	33/58	Z

請求項の数 18　(全 71 頁)

(21)出願番号	特願2002-573679 (P2002-573679)
(86)(22)出願日	平成14年3月20日 (2002.3.20)
(65)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)
(86)国際出願番号	PCT/GB2002/001318
(87)国際公開番号	WO2002/075318
(87)国際公開日	平成14年9月26日 (2002.9.26)
審査請求日	平成17年3月15日 (2005.3.15)
(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)

(73)特許権者　507092584
ウイスタ・ラボラトリーズ・リミテッド
ＷＩＳＴＡ　ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＩＥＳ　ＬＴＤ.
シンガポール国、シンガポール　１３９９４８、ナンバー０７－０１／０２、アイアー・ラジャ・クレッセント　５１
(74)代理人　100078662
弁理士　津国　肇
(74)代理人　100113653
弁理士　束田　幸四郎
(74)代理人　100116919
弁理士　齋藤　房幸

最終頁に続く

(54)【発明の名称】神経原線維標識

(57)【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決定用診断用組成物であって、

該組成物が、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含み、

前記リガンドが、血液脳関門を通過することができ、そして検出可能な化学基と、共役し、キレートしまたは会合しており、

前記決定が、

（ｉ）対象に、前記組成物を導入するステップ、

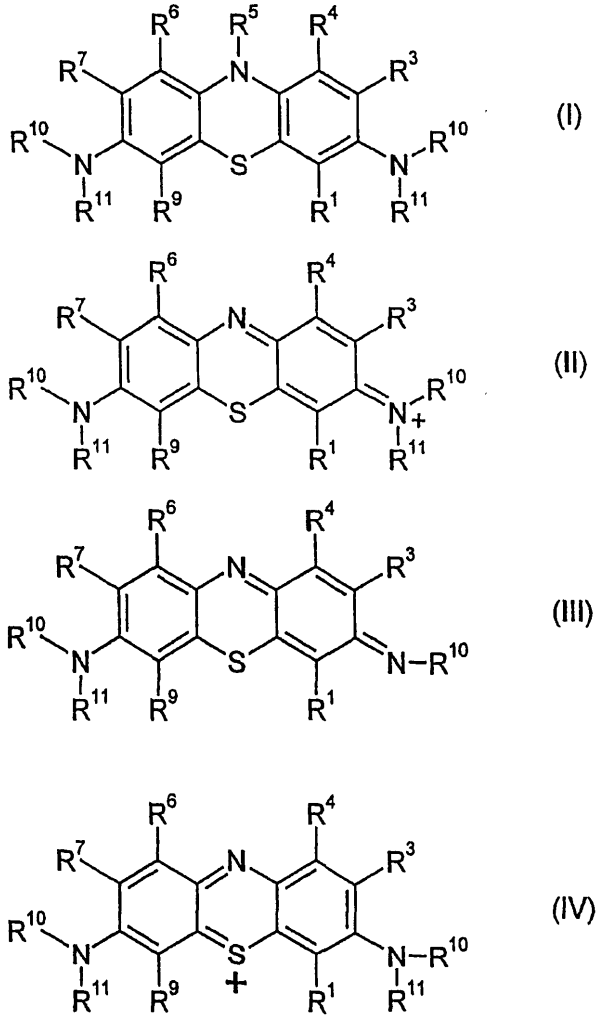
（ｉｉ）対象の脳の内側頭葉中の細胞外凝集ＰＨＦタウに結合したリガンドの存在および／または量を測定するステップ、

（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

により行われ、

リガンドが、下記式：

【化２２】



（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、
ことを特徴とする、前記組成物。

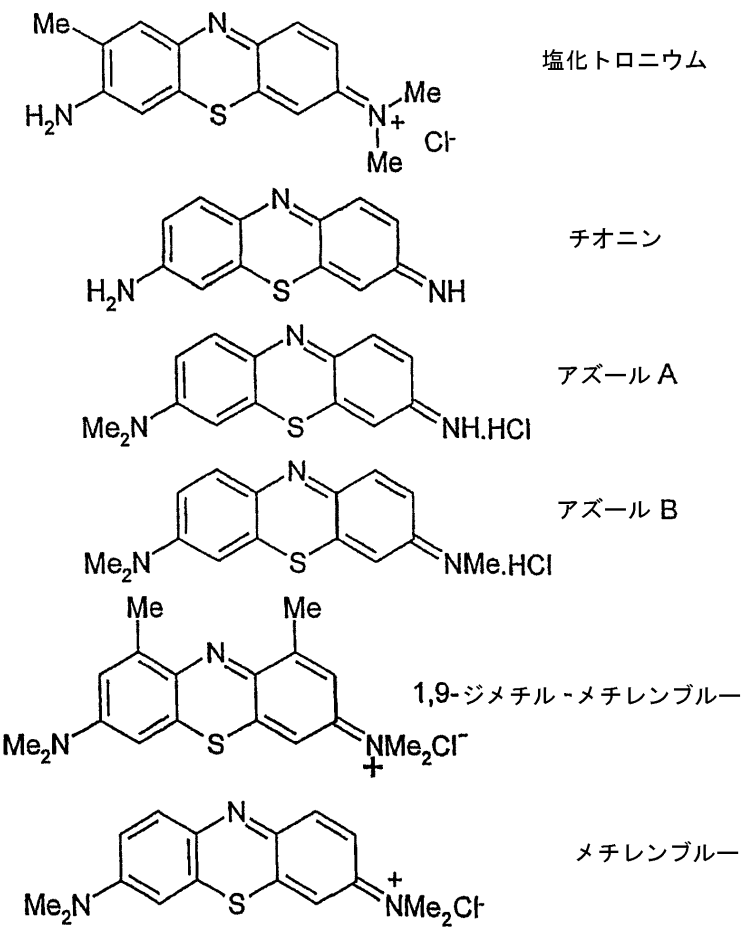
【請求項２】
疾患に罹患していると考えられる対象におけるタウオパシーの予後において使用するための、請求項１記載の組成物。

【請求項３】
タウオパシーがアルツハイマー病（ＡＤ）である、請求項１または２のいずれか一項記載の組成物。

【請求項４】
リガンドが、ＳＰＥＣＴ用に標識されていて細胞内に取り込まれ得ない、またはリガンドが、ポジトロン放出断層撮影（ＰＥＴ）用に標識されている、請求項１記載の組成物。

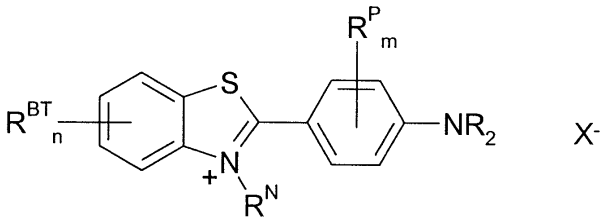
【請求項５】
リガンドが、請求項１記載の化合物と、無機酸または有機酸である酸とで形成される酸

付加塩である、請求項１～４のいずれか一項記載の組成物。
【請求項６】
リガンドが、下記式：
【化９７】

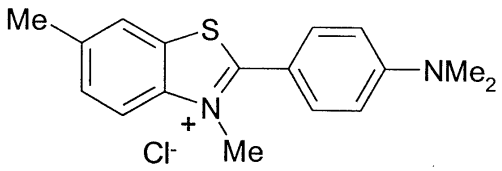


に示されるとおりである、請求項１～５のいずれか一項記載の組成物。
【請求項７】
リガンドが、ポジトロン放出炭素を含む、請求項１～６のいずれか一項記載の組成物。
【請求項８】
対象の脳の新皮質構造における細胞内凝集タウに結合するリガンドの存在および／または量を更に測定するステップを更に含む、請求項１～７のいずれか一項記載の組成物。
【請求項９】
内側頭葉における細胞外凝集ＰＨＦタウに結合させるために使用されるリガンド、および脳の新皮質構造の細胞内凝集ＰＨＦタウに結合させるために使用されるリガンドを、区別して標識する、請求項８記載の組成物。
【請求項１０】
決定方法のステップ（ｉ）および／または（ｉｉ）を、凝集ＰＨＦ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キング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１～９のいずれか一項記載の組成物。
【請求項１１】
ブロッキングリガンドが、
〔^{18}Ｆ〕ＦＤＤＮＰ；
式：

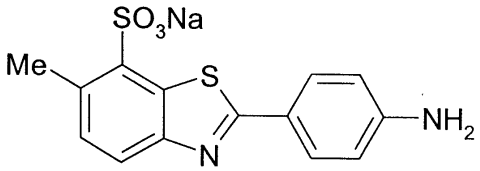
【化２３】



〔式中、
ｎは、０～４の整数であり；
各R^{BT}は、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）から独立して選択されるブロッキングリガンドのベンゾチアゾールの置換基であり；
ｍは、０～４の整数であり；
各R^Pは、独立して、フェニレンの置換基であり；
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、ベンゾチアゾリノの置換基であり、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〕
で示されるベンゾチアゾールからなるリストから選択される、請求項１０記載の組成物。
【請求項１２】
ブロッキングリガンドが、チオフラビン－Ｔである、請求項１１記載の組成物。
【請求項１３】
ブロッキングリガンドが、式：
【化２４】



で示されるベンゾチアゾールである、請求項１１記載の組成物。
【請求項１４】
ブロッキングリガンドが、式：
【化２５】



で示されるベンゾチアゾールである、請求項１１記載の組成物。
【請求項１５】
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１～１４のいずれか一項記載の組成物。

【請求項１６】

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１５記載の組成物。

【請求項１７】

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１５または請求項１６記載の組成物。

【請求項１８】

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１５～１７のいずれか一項記載の組成物。

【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関係する物質、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。

【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２Ｂ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。

【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、レヴィー小体痴呆、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。

【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２ｃ）。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、ＭＭＳ

Ｅ(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）。

【０００６】

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ＣＡＭＤＥＸ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、ＡＤ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。ＡＤ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。

【０００７】

最近、ある分子（ＦＤＤＮＰ、２－（１－｛６－［（２－［^{18}Ｆ］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、ＰＥＴ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., Am. J. Geriatr. Psychiatr. 2002, 10：24-35）。

【０００８】

ＮＦＴおよびアミロイド斑への結合が検討されているが、ＮＦＴ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βアミロイド原線維に高い親和性で結合する。

【０００９】

症例を、ＭＭＳＥ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ＲＲＴ値は、β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。

【００１０】

Spearmanの順位相関係数：

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

【００１１】

Pearson相関係数：

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

【００１２】

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１２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１２領域における平均ＮＦＴ負荷

【００１３】

しかし、β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２ｄを参照）、βアミロイド病変は、神経病理学的な病期分類の信頼のおける根拠を与えない(Braak and Braak, 1991)。したがって、ＦＤＤＮＰ

－ＲＲＴ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

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）。

【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一の、タンパク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)。

【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。

【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】

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】

ＳＰＥＣ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）。生化学的変化が、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)。

【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。

【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、ＳＥＰＣＴ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、ＳＥＰＣＴ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。

【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】

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／mm^2）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。
【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、
（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相関させるステップ
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に前にさえ、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。
【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。
【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との開示は、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。

【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）とリガンドの組合わせを含む、またはそのような組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。

【００４０】

細胞外タウへの結合

上記（ｉｉ）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、このようなリガンドで、ある程度標識される。

【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。

【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はなく、更なる化合物に共役化したときに、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。

【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., Am. 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）対象の脳の新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）。
【００５４】

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。

【００５５】

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。

【００５６】

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。

【００５７】

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ＡＤ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ＰＨＦタウを標識可能なリガンドであって、

方法が、

（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状態を相関させるステップ

を含む。

【００５８】

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ＡＤ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ＰＨＦ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。

【００５９】

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、本記載の他の箇所で検討するように、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。

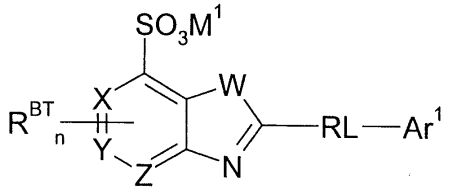
【００６１】

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リガンドは、式：

【００６２】

【化４３】



【００６３】

（式中：

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；

M^1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；

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、コア置換基である）

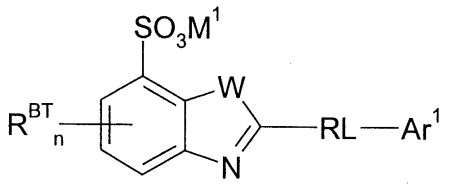
で表される化合物である。

【００６４】

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】

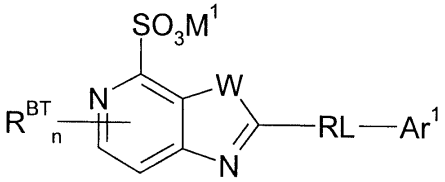
を有する。

【００６７】

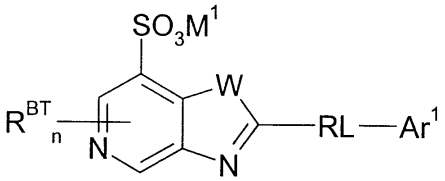
一つの実施態様において、ＸがＮであり；ＹおよびＺが、それぞれＣＨであり；化合物が下記式：

【００６８】

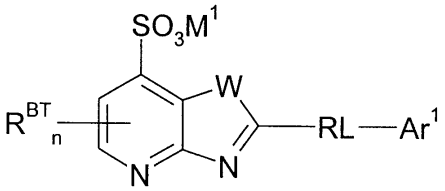
【化４５】



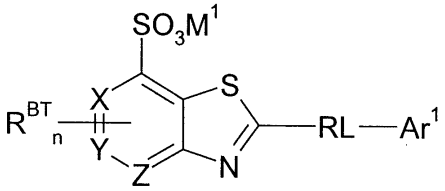
【００６９】
を有する。
【００７０】
一つの実施態様において、ＹがＮであり；ＸおよびＺが、それぞれＣＨであり；化合物が下記式：
【００７１】
【化４６】



【００７２】
を有する。
【００７３】
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：
【００７４】
【化４７】



【００７５】
を有する。
【００７６】
一つの実施態様において、ＷがＳであり、化合物が下記式：
【００７７】
【化４８】

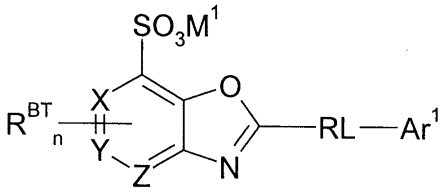


【００７８】
を有する。
【００７９】

一つの実施態様において、ＷがＯであり、化合物が下記式：

【００８０】

【化４９】



【００８１】

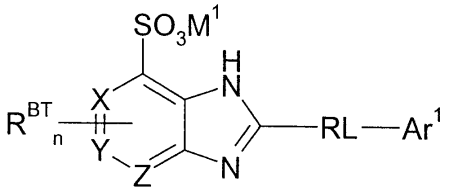
を有する。

【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：

【００８３】

【化５０】



【００８４】

を有する。

【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。

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。

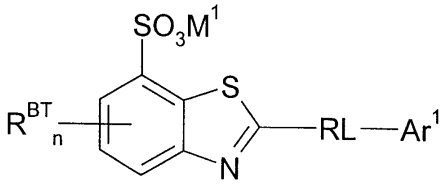
【００８８】

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。

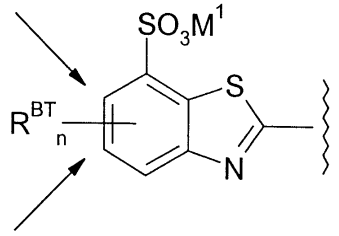
一つの実施態様において、ＺがＮであり；ＸおよびＹがそれぞれＣＨであり；ＷがＮＨである。

【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】



【００９２】
（式中：
M^1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；
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）
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Ar^1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Ar^1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の化合物のもののねじれ以下であることが好ましい。
【００９４】
一つの実施態様において、化合物は、約１４．７ＡＵから約１５．３ＡＵ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。
【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】

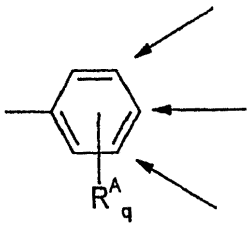


【００９８】

その分子のアリール「末端」では、Ａｒ[1]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。

【００９９】

【化５３】



【０１００】

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エアは、公開のドメインで入手可能である。

【０１０１】

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。

【０１０２】

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。

【０１０３】

一つの実施形態において、各R^{BT}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。

【０１０４】

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）、$-NO_2$、－ＣＮ、－Ｆ、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、$-NH_2$、$-NH_2$、－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。

【０１０５】

一つの実施態様において、各R^{BT}は、C_{1-4}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。

【０１０６】

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。

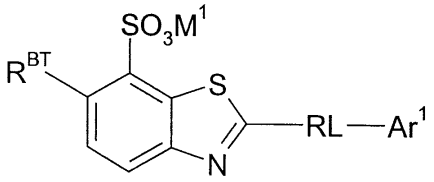
一つの実施態様において、ｎは１であり、R^{BT}は、－Ｍｅである。

【０１０７】

一つの実施態様において、化合物は、下記式：

【０１０８】

【化５４】



【０１０９】

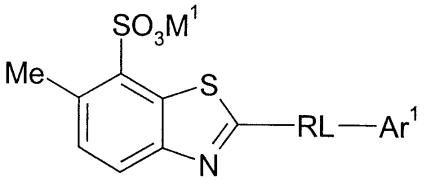
を有する。

【０１１０】

一つの実施態様において、化合物は下記式：

【０１１１】

【化５５】



【０１１２】

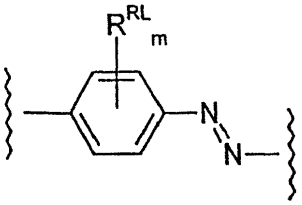
を有する。

【０１１３】

一つの実施態様において、ＲＬは、式：

【０１１４】

【化５６】



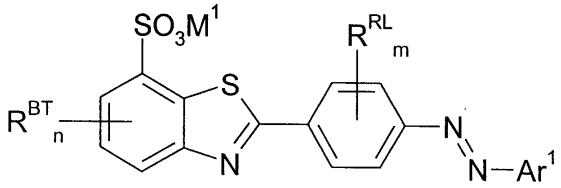
【０１１５】

（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】



【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、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。

【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）、$-NO_2$、－ＣＮ、－Ｆ、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、$-NH_2$、$-NH_2$、－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。

【０１２１】

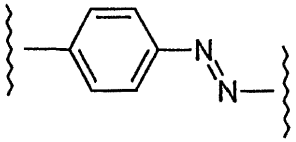
一つの実施態様において、各R^{RL}は、C_{1-4}アルキルより独立して選択される。

【０１２２】

一つの実施態様において、ＲＬは式：

【０１２３】

【化５８】



【０１２４】

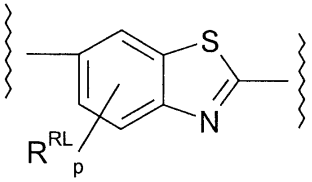
で示される基である。

【０１２５】

一つの実施態様において、ＲＬは式：

【０１２６】

【化５９】



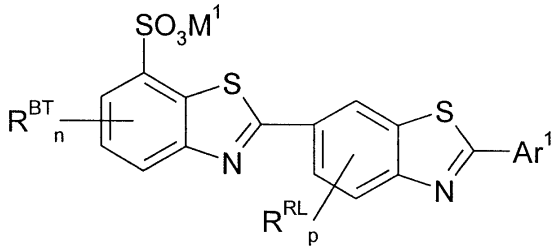
【０１２７】

（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ール置換基である）で示される基であり、そして化合物は、式：

【０１２８】

【化６０】



【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。

【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、$-NH_2$、$-NH_2$、－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】

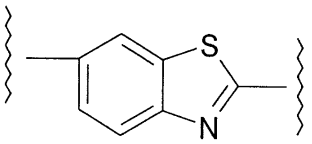
一つの実施態様において、各R^{RL}は、C_{1-4}アルキルより独立して選択される。

【０１３４】

一つの実施態様において、ＲＬは、式：

【０１３５】

【化６１】



【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。

【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。

【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

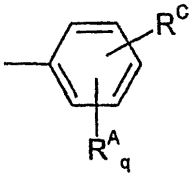
ン、ピリドピリジン、キノキサリンに由来するＣ$_{10}$複素環基；カルバゾールに由来するＣ$_{13}$複素環基；並びにアクリジン、キサンテン、フェノキサチイン、フェナジン、フェノキサジン、フェノチアジンに由来するＣ$_{14}$複素環基などがあげられるが、これらに限定されない。

【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】



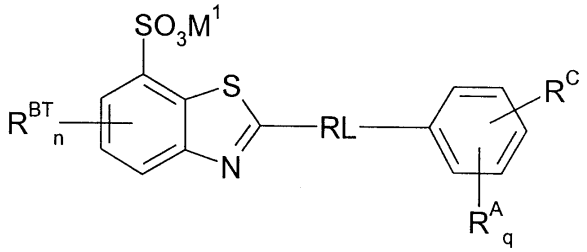
【０１４３】

（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、反応性共役化置換基であり、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：

【０１４４】

【化６３】



【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。

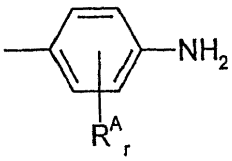
【０１４８】

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タビジンを有する分子との結合のため）。

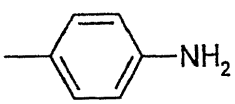
【０１４９】

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。

【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。
【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、上記定義のとおりの、－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、上記定義のとおりの、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】

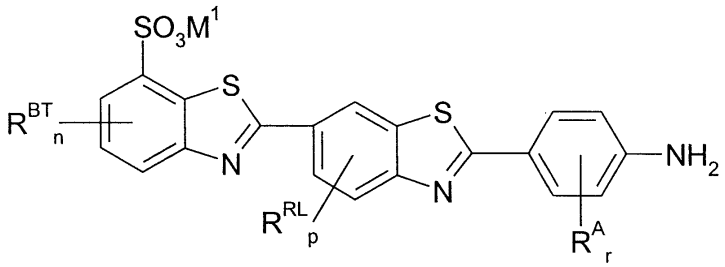
で示される基である。

【０１６３】

一つの実施態様においては、化合物は、式：

【０１６４】

【化６６】



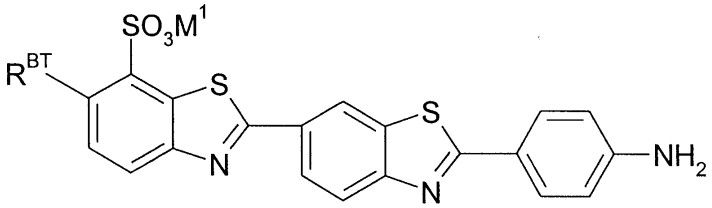
【０１６５】

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】

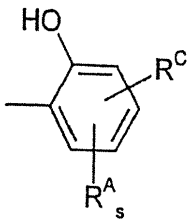
を有する。

【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、０～４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、反応性共役化置換基であり、R^Cは、上記定義のとおりの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。

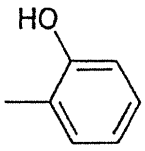
一つの実施態様において、ｓは４である。

【０１７２】

一つの実施態様において、Ａｒ[1]は、式：

【０１７３】

【化６９】



【０１７４】

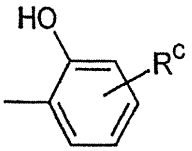
で示される基である。

【０１７５】

一つの実施態様において、Ａｒ[1]は、式：

【０１７６】

【化７０】



【０１７７】

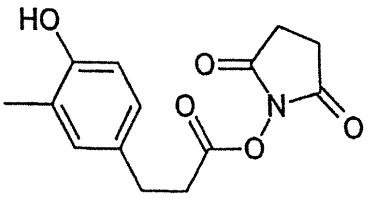
で示される基である。

【０１７８】

一つの実施態様においては、Ａｒ[1]は、式：

【０１７９】

【化７１】



【０１８０】

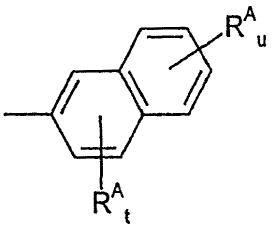
で示される基である。

【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】



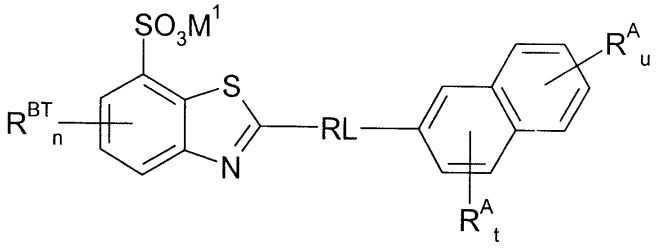
【０１８３】

（式中、

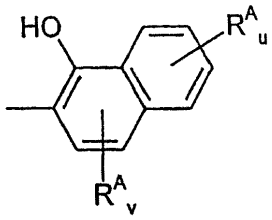
ｔは、０～３の整数であり、ｕは、０～４の整数であり、各Ｒ[A]は、独立して、上記定義のとおりのアリール置換基である）を有し、そして化合物は、式：

【０１８４】

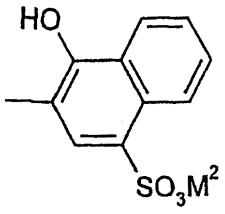
【化７３】



【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】

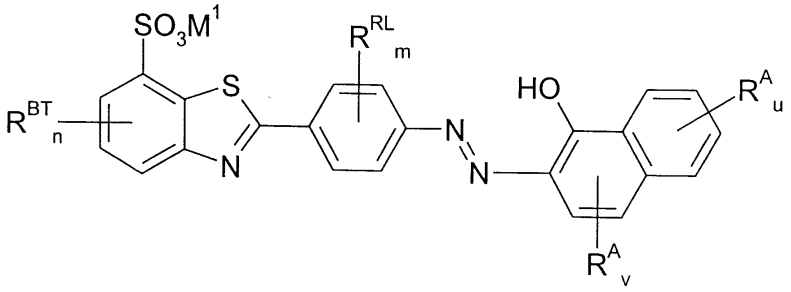


【０１８８】
（式中、
ｖは、０～２の整数であり、ｕは、０～４の整数であり、各Ｒ[A]は、独立して、アリール置換基である）を有する。
【０１８９】
一つの実施態様においては、Ａｒ[1]は、式：
【０１９０】
【化７５】

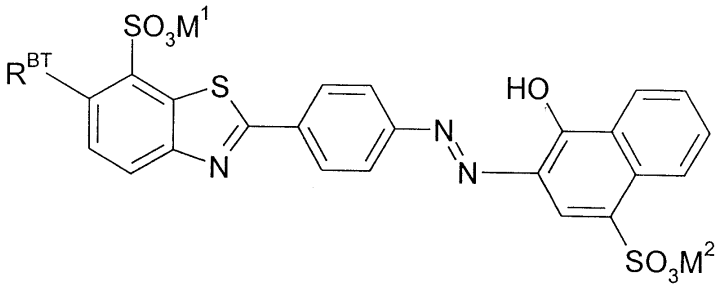


【０１９１】
を有する。
【０１９２】
一つの実施態様において、化合物は、式：
【０１９３】

【化７６】



【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】



【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）。
【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を、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。
【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。

【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８ｂ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８ａ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、アリールオキシ、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－ブロメチル、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、ブ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８ａまたは８ｂ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、－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、－Ｈ、－CH_3、－C_2H_5、または－C_3H_7

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。

【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。

【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。

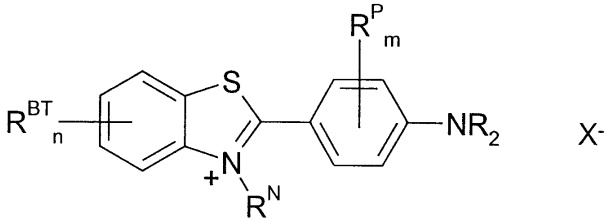
【０２１７】

ブロッキングリガンド

好ましくは、これらは、式：

【０２１８】

【化７８】



【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。
【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。
【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。
【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。

【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。

【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_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。

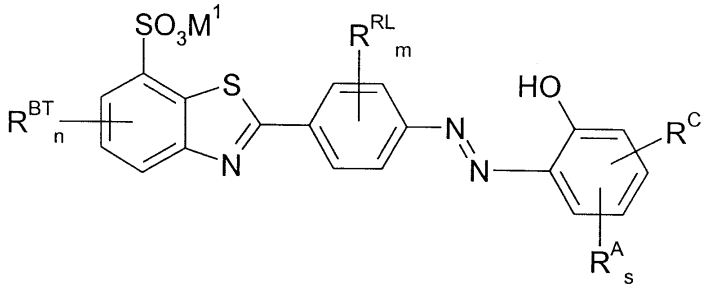
【０２３１】

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】



【０２３３】

（式中、

M^1は、アルカリ金属カチオンであり；

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。

【０２３５】

堅いリンカー基ＲＬおよびアリール基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】

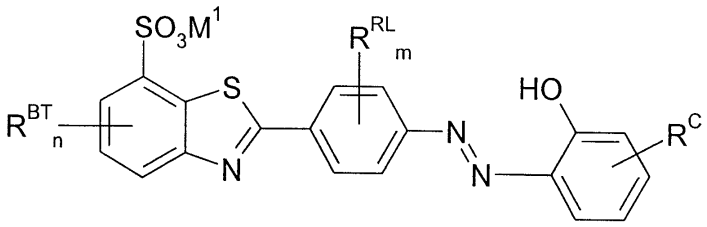
本明細書に示すように、このような化合物は、検出を容易にするために嵩高いＲ^{C}基を取り込むことを所望する場合に、特に効果的である。

【０２３７】

一つの実施態様において、化合物は、式：

【０２３８】

【化８０】



【０２３９】

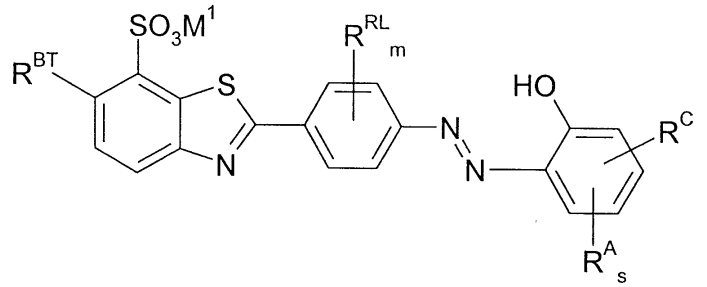
を有する。

【０２４０】

一つの実施態様において、化合物は、式：

【０２４１】

【化８１】



【０２４２】

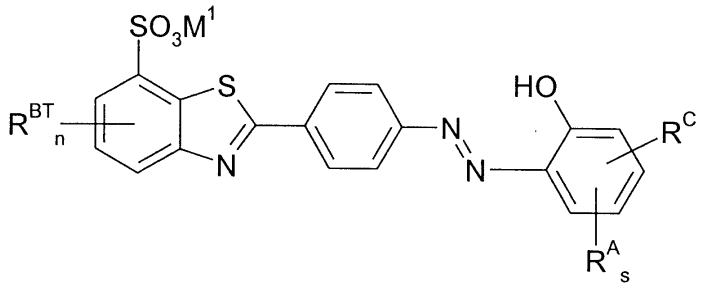
を有する。

【０２４３】

一つの実施態様において、化合物は、式：

【０２４４】

【化８２】



【０２４５】

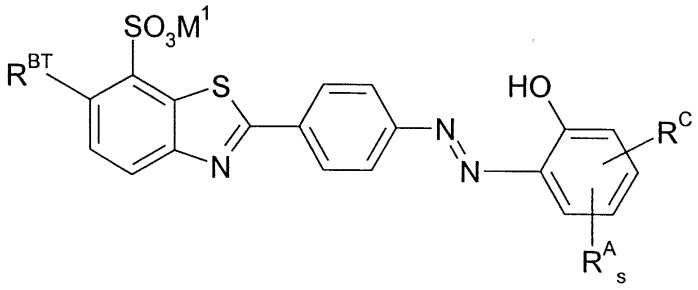
を有する。

【０２４６】

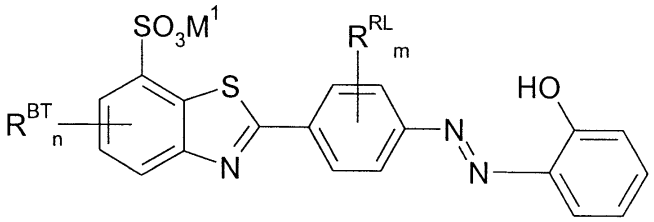
一つの実施態様において、化合物は、式：

【０２４７】

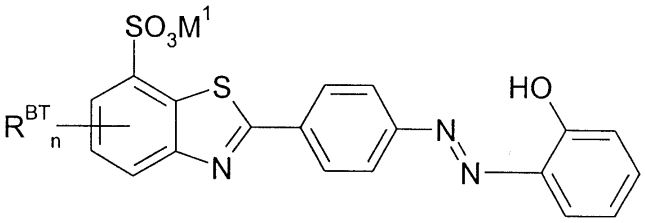
【化８３】



【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：
【０２５２】
【化８４】

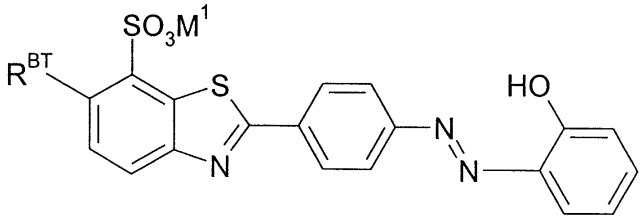


【０２５３】
を有する。
【０２５４】
一つの実施態様において、化合物は、式：
【０２５５】
【化８５】

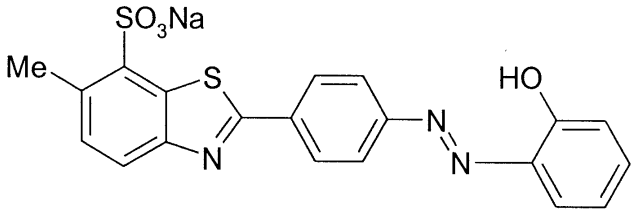


【０２５６】
を有する。
【０２５７】
一つの実施態様において、化合物は、式：
【０２５８】

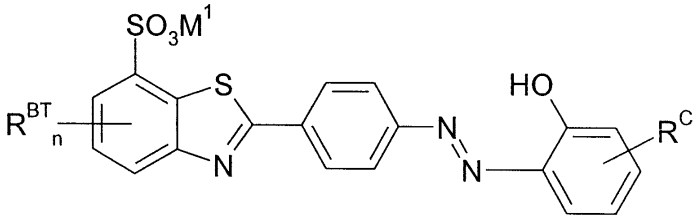
【化８６】



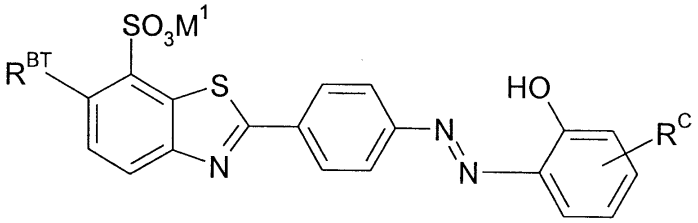
【０２５９】
を有する。
【０２６０】
一つの実施態様において、化合物は、式：
【０２６１】
【化８７】



【０２６２】
を有する。
【０２６３】
一つの実施態様において、化合物は、式：
【０２６４】
【化８８】



【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】

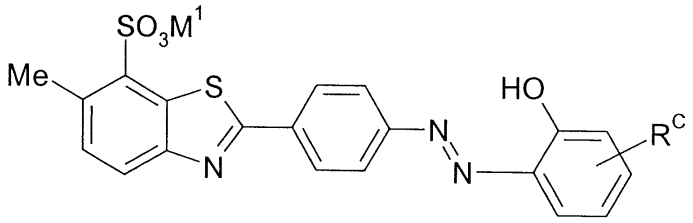


【０２６８】
を有する。
【０２６９】

一つの実施態様において、化合物は、式：

【０２７０】

【化９０】



【０２７１】

を有する。

【０２７２】

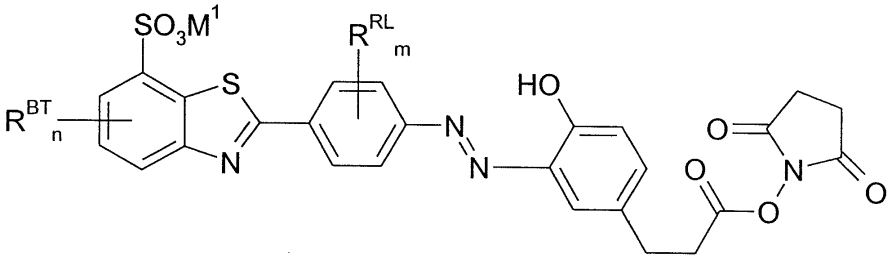
様々なR^{C}置換基が、本明細書の他の箇所で検討されている。

【０２７３】

一つの実施態様において、化合物は、式：

【０２７４】

【化９１】



【０２７５】

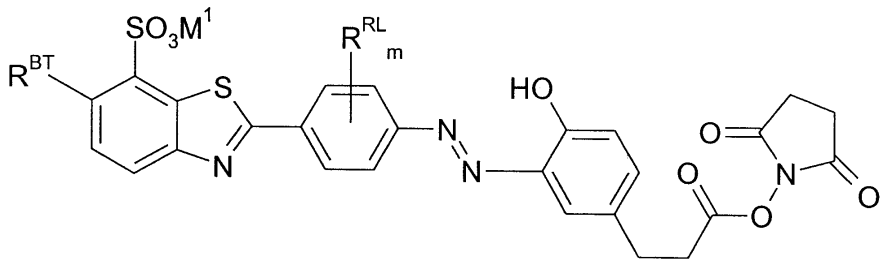
を有する。

【０２７６】

一つの実施態様において、化合物は、式：

【０２７７】

【化９２】



【０２７８】

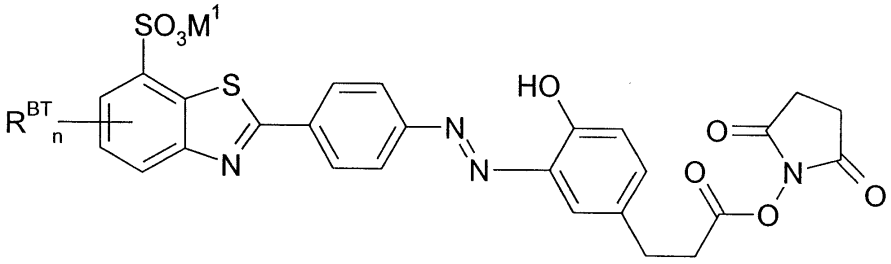
を有する。

【０２７９】

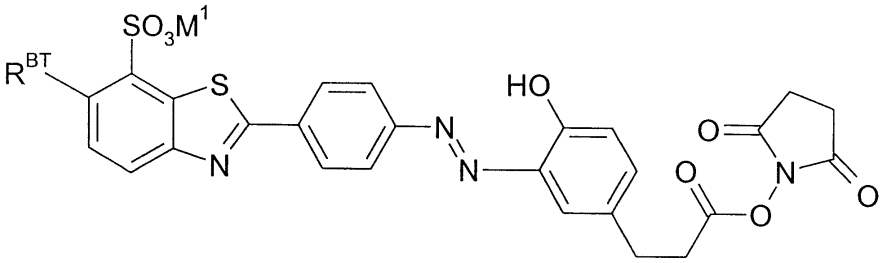
一つの実施態様において、化合物は、式：

【０２８０】

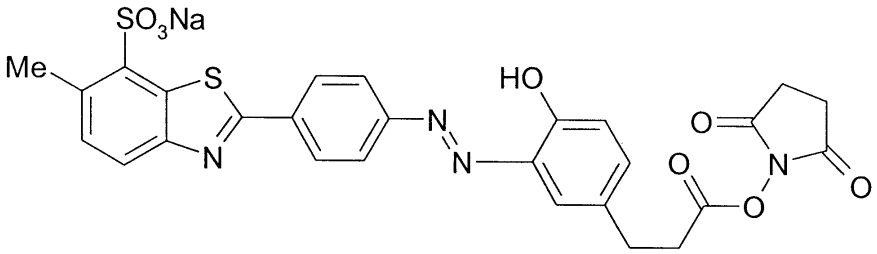
【化９３】



【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】



【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】



【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。
【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。

【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タウータウ凝集リガンド）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などの様様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。

【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鋳型分子を選択する。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、鋳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ＰＨＦから単離されたもの――WO96/30766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４ａの排除の程度を測定するステップを含んでもよい。

【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（ＩＩ）のもの）好ましいＳＢ－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に記載されたリガンドの使用に類似の方法により、実施していもよい。

【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（ＭＡＰ）として公知である。タウファミリーののメンバーは、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。

【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ＭＡＰ２があげられる(Matus, A., in "Microtubules" [Hyams and Lloyd, eds.] pp 155-166, John Wiley and Sons, NY)。ＭＡＰ２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の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－ＭＡＰ２凝集、ＭＡＰ２－ＭＡＰ２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。

【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ＳＢリガンドを、共役化させてもよいし、キレートさせてもよいし、あるいはさもなければ会合させてもよい。

【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ＳＢリガンド（例えば、式（ＩＩ）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的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ＳＢ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。

【０３００】

本発明による好ましいＳＢリガンド物質、またはそのようなリ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ＡＤ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ＳＢ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ＳＢリガンドに接触させること；（ｉｉｉ）検体に結合する好ましいＳＢ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相関させることにより、実施してもよい。

【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ＳＢ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ＡＤもしくはＡＤ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。

【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（ＰＳＰ）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相関するようであ

る。他の痴呆として、前頭側頭痴呆（ＦＴＤ）；第１７染色体にリンクしたパーキンソン病（ＦＴＤＰ－１７）；脱抑制－痴呆－パーキンソン病－筋萎縮（ＤＤＰＡＣ）；淡蒼球－橋－黒質変性（ＰＰＮＤ）；Ｇｕａｍ－ＡＬＳ症候群；淡蒼球－黒質－ルイス変性（ＰＮＬＤ）；皮質－基底変性（ＣＢＤ）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。

【０３０５】

診断用組成物は、上記ＳＢ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。

【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ｐＨ、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、例えば等張性ビーク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。

【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．WO96/30766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。

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、
（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】
（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の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、WO96/30766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。

【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
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１６μｍ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０．０００００１％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。

【０３２０】

光電子倍増管（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）
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

材料ｉｆＩを、Wischik et al (1985) Jj Cell Biol 100: 1905-1912に記載のとおり調製した。

【０３２２】

材料ｉｆＩＩを、Wischik 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ｉｆＩＩ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】

ｉｆＩＩの分光蛍光分析

これらの測定は、Perkin-Elmer分光蛍光計（モデル　ＭＰＦ－３）で行った。すべての測定に関してリガンド濃度０．０００００１％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３㎜で行った。

【０３２４】

競合結合アッセイ

材料ｉｆＩ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０．１～０．０００００１％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

ｉｆＩ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、ビ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ビオチン抗体とともにインキュベートした。

【０３２６】
ｉｆＩＩのスクシニル化およびクロマトグラフィー
洗浄したｉｆＩＩ画分を、８Ｍ尿素／５０ｍＭホウ酸塩（１ml、ｐＨ９）に溶解し、超音波破砕し、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ｉｆＩＩ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、ｉｆＩまたはｉｆＩＩ画分をI^{125}－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にｉｆＩＩ画分を調製した。この材料を、最終濃度０．１～０．０００１％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、ＬｉＰＴＡ染色後（１％）に直接検査した。あるいは、ｉｆＩＩ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ＬｉＰＴＡでそのまま染色するか、１次抗体として６．４２３を用いて免疫電子顕微鏡法のために更に処理した。２５，０００～４５,０００の公称倍率で電子顕微鏡写真を記録した。
【０３３１】
脳組織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ＰＨＦ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ＥＬＩＳＡを用い、罹患錐体細胞（ＰＣ）当たりＰＨＦ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１mm×１mm×０．１mm（０．０００１cm^3）内の罹患錐体細胞数の推定値を提供し、公称７μm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～４５μm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）。ＰＨＦコアタウフラグメントは１０ｋＤであるので（C. M. Wischik, et al., Proc. Natl. Acad. Scie. USA 85, 4506 (1988)）、コアＰＨＦタウレベルｐｇ／cm^3は１０×Ｐである。このことから、ＰＣ＝（Ｐ×１０）／（Ｔ／０．０００１）である。Ｂｒａａｋ病期４～６において（H. Braak, E. Braak, Acta Neuropathol. 82, 239 (1991)）、灰白質の領域ＰＣ値は以下のとおりであった。前頭皮質０．１３±０．０５ｐｇ／細胞、海馬０．６０±０．３９ｐｇ／細胞、側頭皮質１．０７４±０．４４ｐｇ／細胞、嗅内皮質１．５６±０．６３ｐｇ／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ＰＨＦを過小評価する程度（Lai et al., 1995, loc cit）を反映する。全平均は、ＡＤに関連するであろう細胞当たりＰＨＦレベルの近似値を提供する。その値は、Ｂｒａａｋ病期１～３の症例で０．３７±０．０８pg／細胞、Braak病期４～６の症例で１．０８±０．２８pg／細胞である。

【０３３２】

下記の表、ならびに図２６、２７、２９、および３１に示した細胞外凝集ＰＨＦ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、ｍＡｂ４２３と１時間インキュベートした後に、ｍＡｂ４２３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、浮遊ビブ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、ｍＡｂ４２３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ｍＡｂ４２３免疫反応性を得て、ＰＨＦ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ｍＡｂ４２３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ｍＡｂＡＴ８によるもつれの標識化密度または確率（図２８、３０、３２）と一致せず、神経病理学的病期に関してｍＡｂ４２３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、ｍＡｂ４２３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
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
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
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

【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×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。

【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充分であるが、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】

【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 (μg/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

【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。

【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、有効性がはるかに低かった。
【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。
【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。
【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。
【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。
【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 Teoe t 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。
【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 Chrystallogr., 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。
【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π結合の重なりの間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。
【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

【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の比較を示す。寸法はオングストローム単位（ＡＵ）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実質的に平らであることを例示している。しかしながら、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１５．２６１ＡＵ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１５．９２７ＡＵ）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、アルシアンブルーの存在下で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、アルシアンブルーは、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（WO96/30766）。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。

【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、充分に高濃度の、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。

【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。

【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WO96/30766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WO96/30766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ングした（Mcleod et al. (1987) EMBO J., 6, 729-736）。ｐＲＫ１７２は、ｐＢＲ３２２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ｐＢＲ３２２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ｃＤＮＡ構築物は、Novak et al. (1993) EMBO J., 12, 365

-370に記載のとおりｍＲＮＡから調製した。このｍＲＮＡを、特定のオリゴヌクレオチドプライマを用いるポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）の鋳型として用いた。センスプライマーはＮｄｅＩ部位を含有し、アンチセンスはＥｃｏＲＩ部位を含有した。ＰＣＲフラグメントを、上記のとおりｐＲＫ１７２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２２に示す。発現に用いたすべてのＤＮＡフラグメントの確実性は、両鎖の完全長配列決定によって確認した。

【０３７４】

ｈタウ４０（「Ｔ４０」）ｃＤＮＡ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、ＣＮＳ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２９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３１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。ＤＮＡ配列およびその予想されるアミノ酸配列を図２１に示す（配列番号４）。

【０３７５】

組換えプラスミドを用いて、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＢＬ２１（ＤＥ３）株を形質転換したが、この株はｌａｃ　ＵＶ５プロモーターの制御下にあるバクテリオファージＴ７ＲＮＡ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）。ＩＰＴＧ（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。

【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５０ｍＭのＰＩＰＥＳ、１ｍＭのジチオトレイトール（ＤＴＴ）を含有するバッファー（ｐＨ６．８）に懸濁した。上清中の熱安定性タンパク質をＰＩＰＥＳ／ＤＴＴ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ＮａＣｌ（０～０．５Ｍ）勾配を用いて、タウタンパク質を溶出した。画分を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、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、２５ｍＭのＭＥＳ、１ｍＭのＤＴＴ（ｐＨ６．２５）に対して透析し、約５ｍｇ／ｍｌ、－２０℃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）。

【０３７７】

調製２は以下の点で調製１と異なる。（１）超音波破砕段階の細胞濃度を５倍増加する。（２）非タウタンパク質のＤＥ５２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。

【０３７８】

Escherichia coliを、アンピシリン（５０μg/ml）を添加した２ｘＴＹ培地（Ｏｘｏｉｄ）で対数期後期に増殖させた。５Ｌ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、１ｍＭのＥＤＴＡ、１ｍＭのジチオトレイトール、および１ｍＭのフッ化フェニルメチルスルホニル（ＰＭＳＦ）を含有する５０ｍＭのＰＩＰＥＳ（ｐＨ６．８）に溶解し、４℃で超音波破砕（２×３分）によって細菌溶解した。混合物を１００００ｒｐｍで２０分間遠心分離した。上清を１ｇのＷｈａｔｍａｎ　ＤＥ５２と４℃で３時間回転した。混合物をカラムで分離し、ＤＥ５２に結合しない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$MgCl_2$、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１００

０の透析チューブを用いて、１ｍＭのＥＧＴＡ、１ｍＭのＭｇＣｌ$_2$、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。

【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】

	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	#1	1.48	5000	30000	3388	2		
(各6ml)	#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		

【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)： 280 nm の吸収	タﾝﾊﾟｸ質ｱｯｾｲ（BSA参照）	免疫反応性 (mAb 7/51; AU/ml)	タンパク質収量 (10 litres当り)
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

【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Ｖｅ／Ｖｏ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Ｖｅは、標準の溶出量であり、Ｖｏ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。

【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５０μｌを、３７℃で１時間インキュベートし、プレートを０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０で洗浄、次いで、結合部位を、ＰＢＳ２００μｌ＋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％Ｔｗｅｅｎ２０で洗浄し、ＰＢＳ＋２％無脂肪乳粉末に１：１０で希釈した１次抗体５０μｌと、３７℃で１時間インキュベートした。プレートを、０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０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）５０μｌと、３７℃で１時間インキュベートした。プレートを、０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０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ｐＨ５．０中ＴＭＢ［テトラメチルベンジジン］、新しく調製）５０μｌを加え、２分間に亘ってＯＤ６５０の変化率を読み取った。

【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ｍＡｂ７．５１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ｍＡｂ４９９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。

【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を上に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、WO 96/30766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。

【０３８９】

このアッセイは、９６ウェルＰＶＣプレート（Ｆａｌｃｏｎカタログ番号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（～１０μｇ／ｍｌ）５０μｌ、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、ｐＨ９．６（Na_2CO_3　１．５９ｇ／ｌ、$NaHCO_3$　２．９３ｇ／ｌ））

２．プレートを０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０で洗浄する。

３　２００μｌ　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％Ｔｗｅｅｎ２０で洗浄する。

５　ＰＢＳ＋１％魚皮ゼラチン＋０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０中dGAE（～１０μg/ml）および薬物の５０μｌ、３７℃で１時間インキュベートする。

６　プレートを０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０で洗浄する。

７　５０μｌ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％Ｔｗｅｅｎ２０で洗浄する。

９　５０μｌのＨＲＰ抗マウス（ＰＢＳ＋０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０に１：１０００で希釈）、３７℃で１時間インキュベートする。

１０　プレートを０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０で洗浄し、次いで、脱イオン水で１回ですすぐ。

１１　基質溶液５０μｌ、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、ｐＨ５．０＋ＴＭＢ（ＤＭＳＯ中１０mg/ml溶液１００ml中に1ml）＋H_2O_2（１０μl/１００ml））

【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。

【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。

【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。ｈＴ４０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１００μＭ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、ＤＭＭＢ５μＭで２３％、ＤＭＭＢ１５μＭで１７％のタウ－タウ結合（タウは典型的に１μＭ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。

【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ＢＭａｘ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Ｋｄ値は約１５倍である。すなわち、ＤＭＭＢの＞４μＭ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。

【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。

【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、WO96/30766を参照）の調製物とインキュベートした公知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、WO96/30766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;
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;
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;
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;

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.

【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。

【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高いが、ＡＤ症例の７０％が対照例に見出されたベータアミロイドのレベルと重なっている。

【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のビオチン化型（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－７－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。

【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す図である。

【図８ｂ】図８ｂ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ＰＨＦに結合したプリムリンの蛍光を示す図である。この図は、ＰＨＦ構造の攪乱物質である（参考文献３３）アルシアンブルーの存在下、４６０ｎｍ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１０】図１０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（「ＭＲ」、化合物：タウのモル比）の効果を示す図である。
【図１１ａ】図１１ａは、［^{11}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}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。ＨＰＬＣ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１１ｂ】図１１ｂは、チオニン、ＮａＨ、およびCH_3Iに基づく更なる合成を示す図である。
【図１２】図１２は、［^{11}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}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。ＨＰＬＣ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１３】図１３は、図４の化合物４ａの［^{18}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}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。ＨＰＬＣ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１４】図１４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　１４．７８ＡＵ　最大値　１５．１１ＡＵ　平均値　１４．９５ＡＵ　類似体　最小値　１５．０５ＡＵ　最大値　１５．２６ＡＵ　平均値　１５．１７ＡＵ　チアジンイエロー　最小値　１５．７３ＡＵ　最大値　１６．１４ＡＵ　平均値　１５．９３ＡＵ
【図１５】図１５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-Beng Teo et al., 1995, Acta Crystallogr., Sect. C, 591）。
【図１６】図１６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-Beng Teo et al., 1995, Acta Crystallogr., Sect. C, 591）。
【図１７】図１７は、Ｎ２Ａと示す化合物の結晶構造を示す図である（Gilardi, R.D.,1972, Acta Chrystallogr. Sect. B, 107）。
【図１８】図１８は、Ｎ２Ａと示す化合物の結晶構造を示す図である（Gilardi, R.D.,1972, Acta Chrystallogr. Sect. B, 107）。
【図１９】図１９は、ジアゾアミノベンゼンの結晶構造を示す図である（Gldkova & Kondrashev, 1972, Kristallografiya (41) 17 33）。
【図２０】図２０は、ジアゾアミノベンゼンの結晶構造を示す図である（Gldkova & Kondrashev, 1972, Kristallografiya (41) 17 33）。
【図２１】図２１は、図１５および１６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２２】図２２は、図１５および１６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２３】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を示す図である。寸法はオングストローム単位（ＡＵ）で示す。
【図２４】図２４は、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

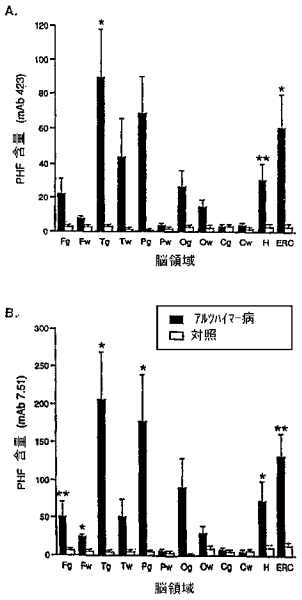
から炭素の距離である。
【図２５】図２５は、Braakの病期分類の関数として、細胞外のもつれの可能性を示す図である。Ｅ２／ＴｒａｎｓおよびＥ４／ＨＣにおける細胞外のもつれの確率に基づいて、病期２～４は病期１と明確に区別することができる。
【図２６】図２６は、Braakの病期分類の関数として、細胞内のもつれの可能性を示す図である。細胞内のもつれは、これらの領域における初期の識別の根拠には不充分であるが、新皮質領域を用いる病期４および５の識別では良好な根拠を提供する。
【図２７】図２７は、図２５に対応する図であるが、ここでは死亡の１２カ月前にＭＭＳＥスコアが２１を超える症例が選択された。類似の結果が得られる。
【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るが、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構造への結合を確証する。（ｂ）Novak et al. 1993（Novak M, Kabat J, Wischik 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ｍＡｂ４２３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、ｍＡｂ４２３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を不充分に標識するが、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、ｍＡｂ４２３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、ｄＧＡ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フロース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。ｍＡｂ７．５１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。ｍＡｂ４９９免疫反応性の約５０％が、サイズ＞６０ｋＤの種に対応する画分に溶出す

る。
【図３６】図３６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３７】図３７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３８】図３８は、調製１および２におけるタウ－タウ結合に対するＤＭＭＢ活性を示す図である。
【図３９ａ】図３９ａ～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（ｈＴ４０）が、固相（ｂ）中のｄＧＡ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、ｈＴ４０が固相（ｃ）で用いられた場合、dGAEの結合は、固相（ａ）中のｄＧＡへのdGAEの結合に関して得られたものと類似していた。
【図３９ｂ】図３９ａ～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（ｈＴ４０）が、固相（ｂ）中のｄＧＡ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、ｈＴ４０が固相（ｃ）で用いられた場合、dGAEの結合は、固相（ａ）中のｄＧＡへのdGAEの結合に関して得られたものと類似していた。
【図３９ｃ】図３９ａ～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（ｈＴ４０）が、固相（ｂ）中のｄＧＡ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、ｈＴ４０が固相（ｃ）で用いられた場合、dGAEの結合は、固相（ａ）中のｄＧＡへのdGAEの結合に関して得られたものと類似していた。
【図４０】図４０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４１ａ】図４１ａは、ＤＭＭＢ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５μＭのＤＭＭＢの阻害作用のブロッキングを示す図である。
【図４１ｂ】図４１ｂは、ＤＭＭＢ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５μＭのＤＭＭＢの阻害作用のブロッキングを示す図である。
【図４１ｃ】図４１ｃは、ＤＭＭＢ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、１５μＭ　ＤＭＭＢの阻害作用のブロッキングを示す図である。１５μＭ　ＤＭＭＢに関しても類似の結果が示される。
【図４１ｄ】図４１ｄは、ＤＭＭＢ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、１５μＭのＤＭＭＢの阻害作用のブロッキングを示す図である。１５μＭ　ＤＭＭＢに関しても類似の結果が示される。
【図４２】図４２は、増加する過剰モルのプリムリン存在下での、ＤＭＭＢ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ＤＭＭＢ濃度の０×、１×、５×、１０×、１００×のプリムリンと共インキュベートされた一定濃度のＤＭＭＢの存在下でのタウ－タウ結合が示される。ＤＭＭＢ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。
【図４３】図４３は、２５μＭのＤＭＭＢ、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＝（ＢＭａｘ×［Ｐｒｉｍ］）／（Ｋｄ＋［Ｐｒｉｍ］）　ここで、B_{Max}＝　１．６７　　Ｋｄ　＝　１３．３７　　ｒ　＝　０．９７７（実測値対予測値）
【図４４】図４４は、５μＭのＤＭＭＢ、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

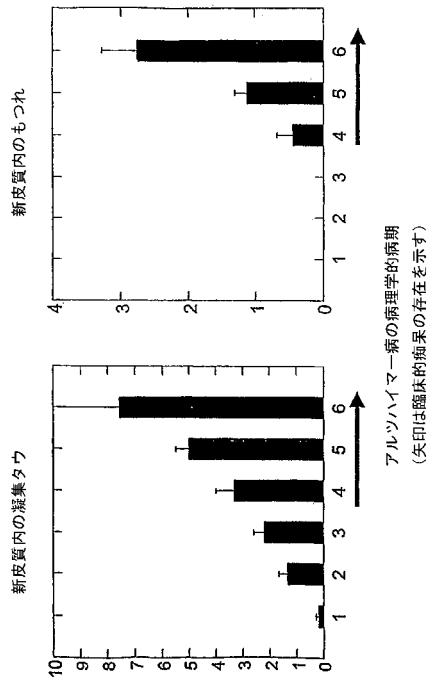
モデル化できる。　結合＝（ＢＭａｘ×［Ｐｒｉｍ］）／（Ｋｄ＋［Ｐｒｉｍ］）　ここで、B_{Max}＝　１．３８　　Ｋｄ　＝　１３．８６　　ｒ　＝　０．９２７（実測値対予測値）

【図４５】図４５は、５μＭ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＝（ＢＭａｘ×［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】



【図２ｂ】

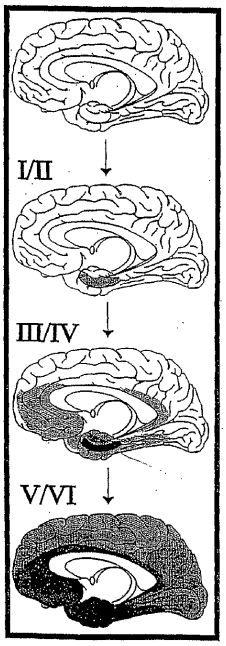
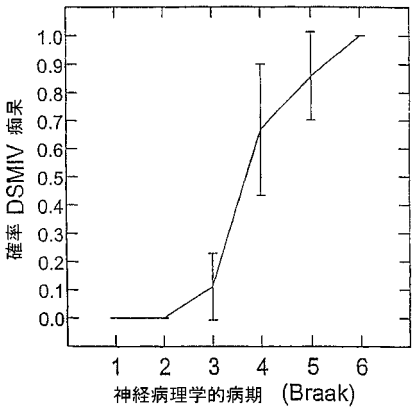
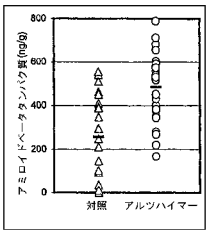


Figure 2b

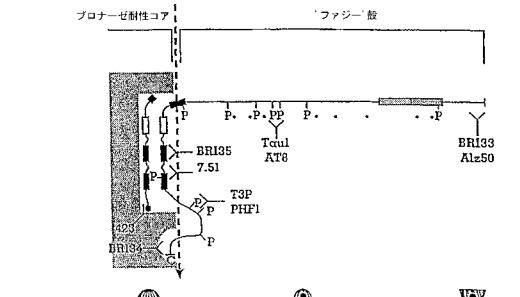
【図２ｃ】



【図２ｄ】

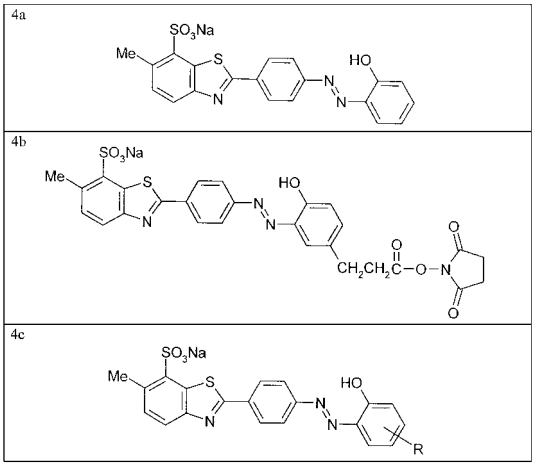


【図３】

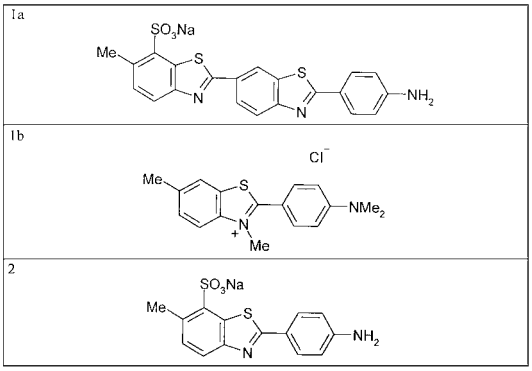


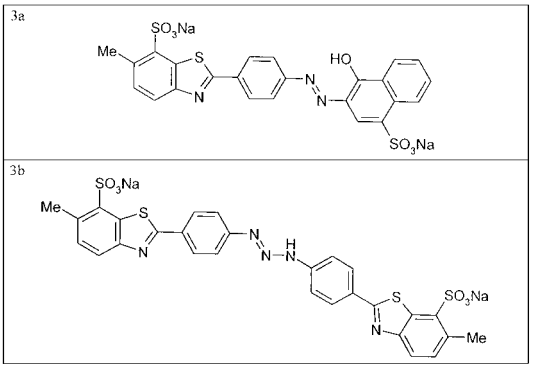
抗体	病期 3	病期 2	病期 1
BR 133	-	-	+++
mAb 16.8	-	-	+++
BR 134	+	++	+++
mAb 11.57	+/-	++	+++
mAb 25.6E	+/-	++	+++
BR 135	+++	+++	+++
mAb 423	+++	+++	+

【図４】

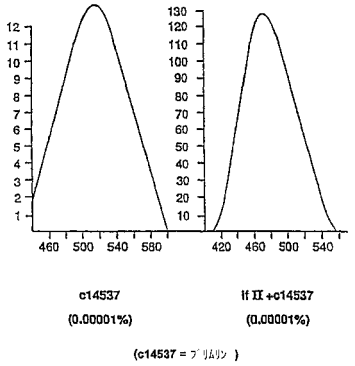


【図５】

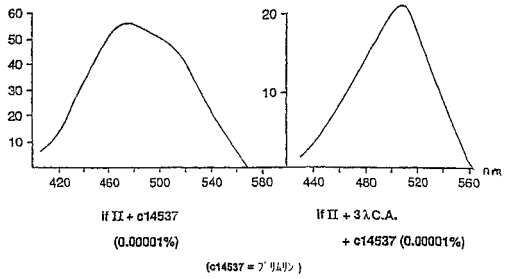




【図６】



【図７】



【図８ａ】

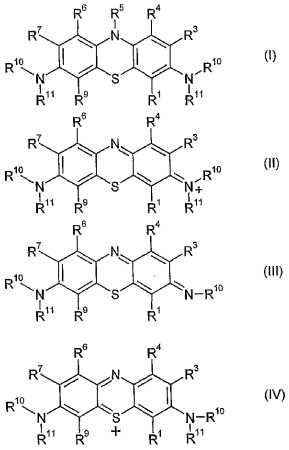
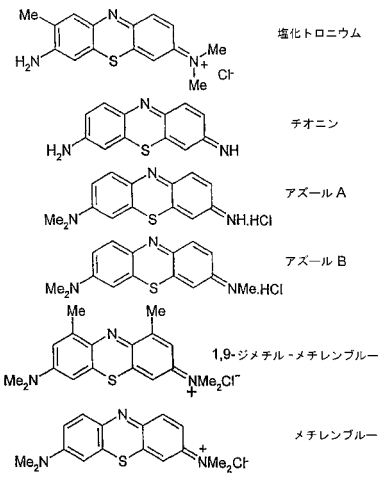


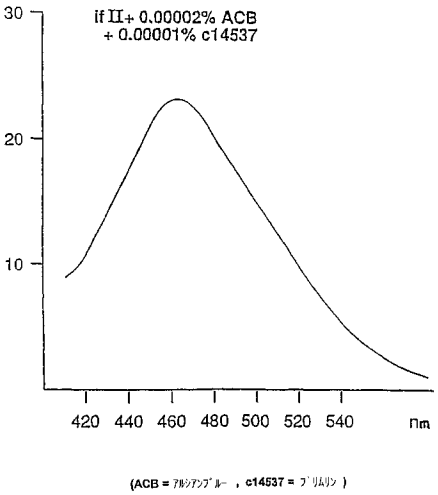
Figure 8a

【図８ｂ】

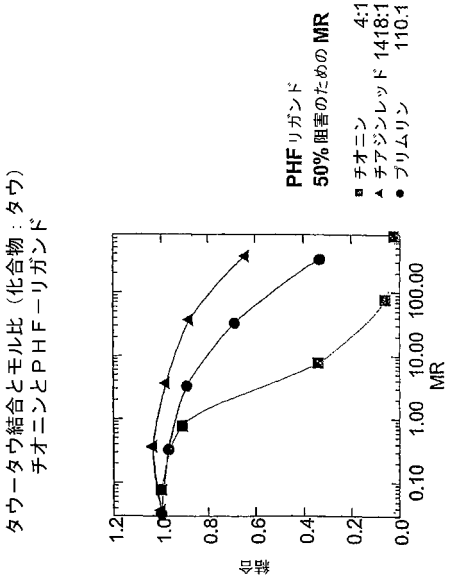
種々のメチル基を有するジアミノフェノチアジン



【図９】

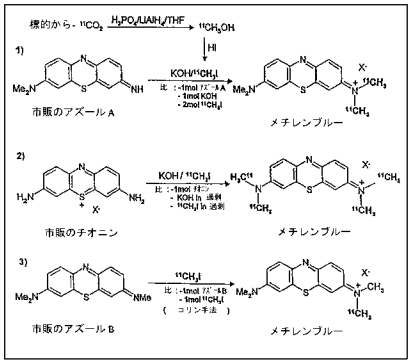


【図１０】

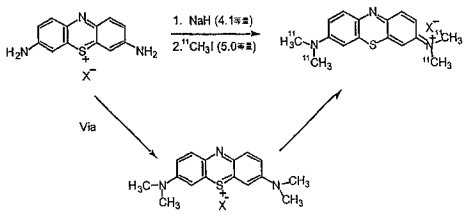


【図１１ａ】

[^{11}C] 標識メチレンブルーの合成

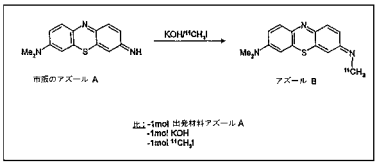


【図１１ｂ】



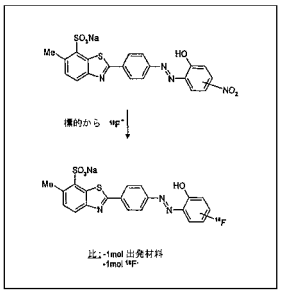
【図１２】

[^{11}C] 標識アズールＢの合成

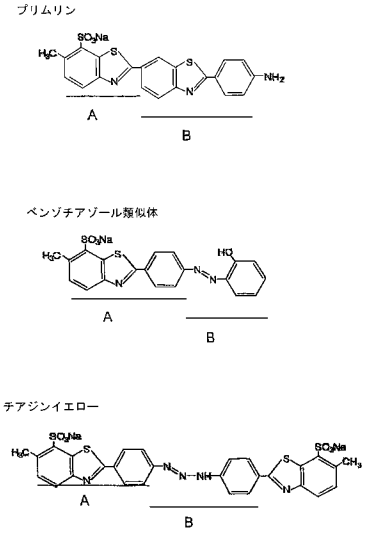


【図１３】

[^{18}F] 標識の合成



【図１４】



【図１５】

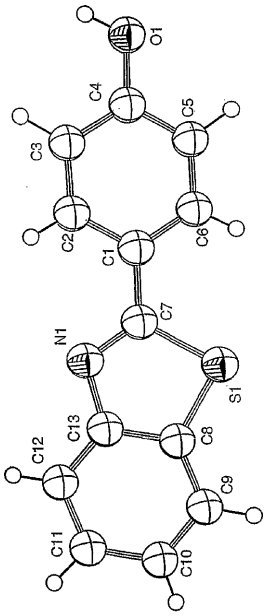


Figure 15

【図１６】

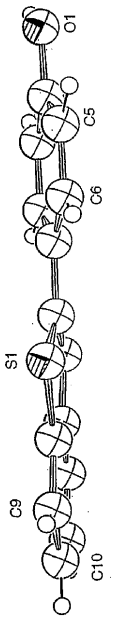


Figure 16

【図１７】

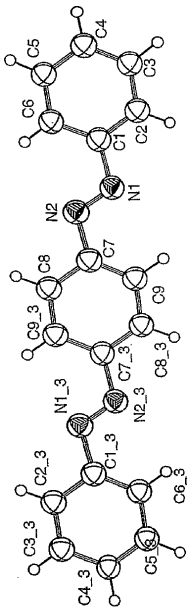


Figure 17

【図１８】

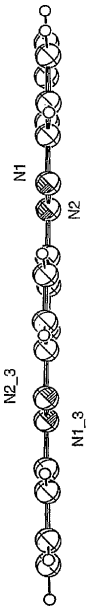


Figure 18

【図１９】

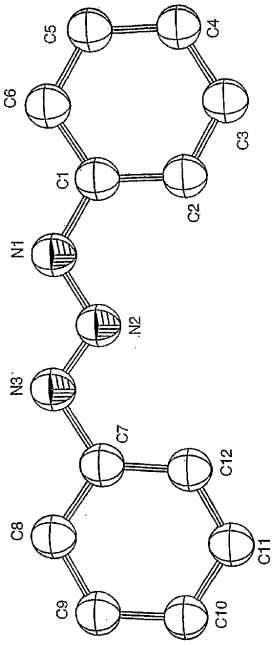


Figure 19

【図２０】

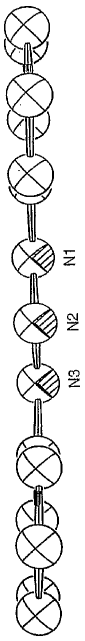


Figure 20

【図２１】

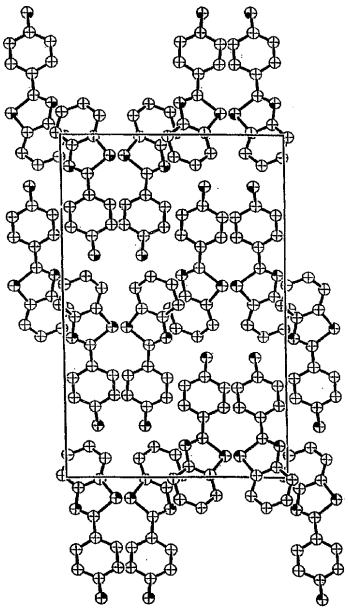


Figure 21

【図２２】

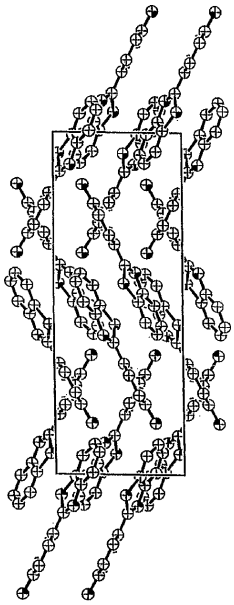
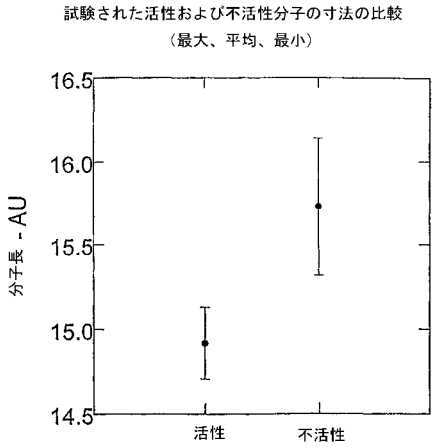
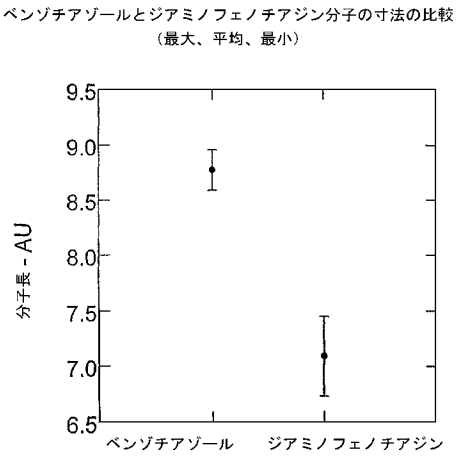


Figure 22

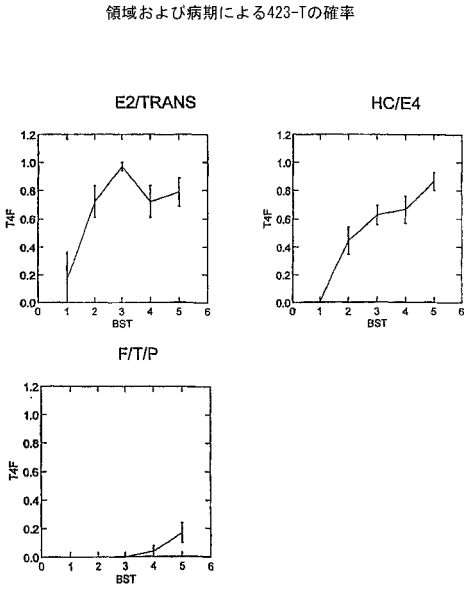
【図２３】



【図２４】

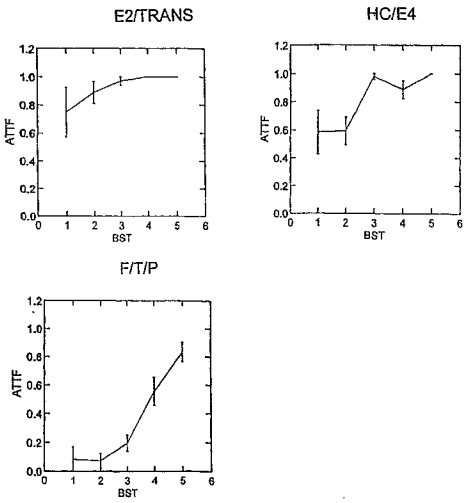


【図２５】



【図２６】

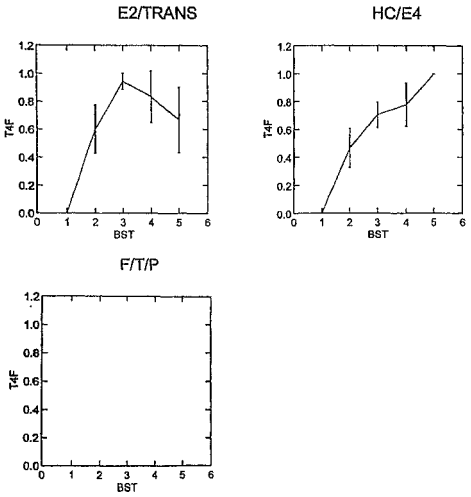
領域および病期によるAT8-Tの確率



【図２７】

領域および病期による423-Tの確率

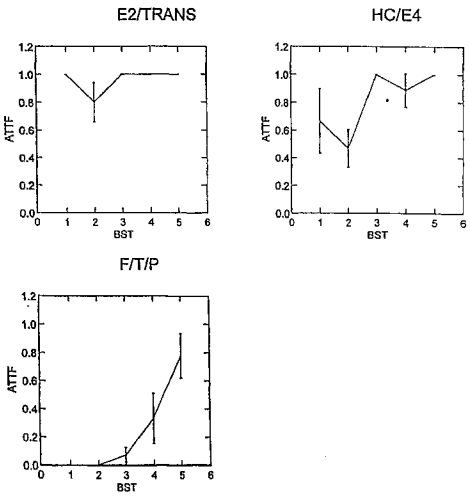
MMSE > 21



【図２８】

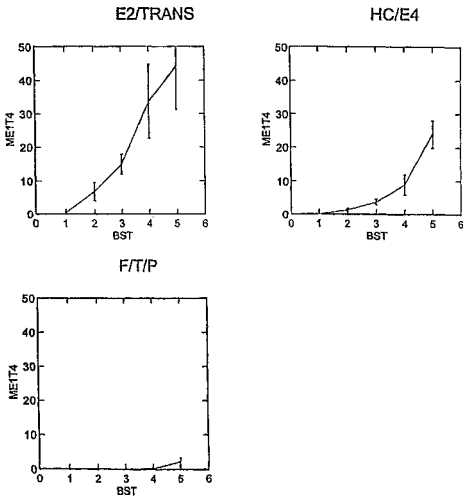
領域および病期によるAT8-Tの確率

MMSE > 21

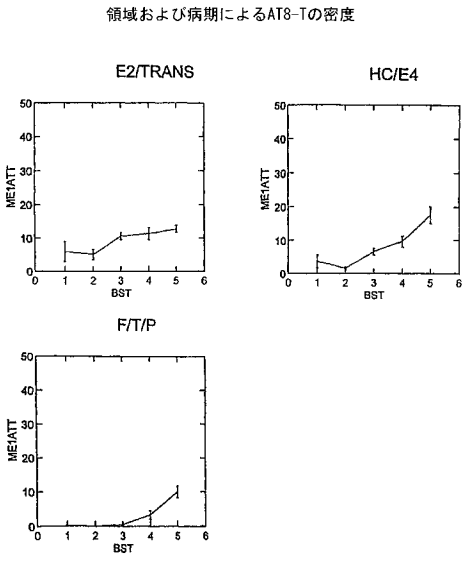


【図２９】

領域および病期による423-Tの密度



【図３０】



【図３１ａ】

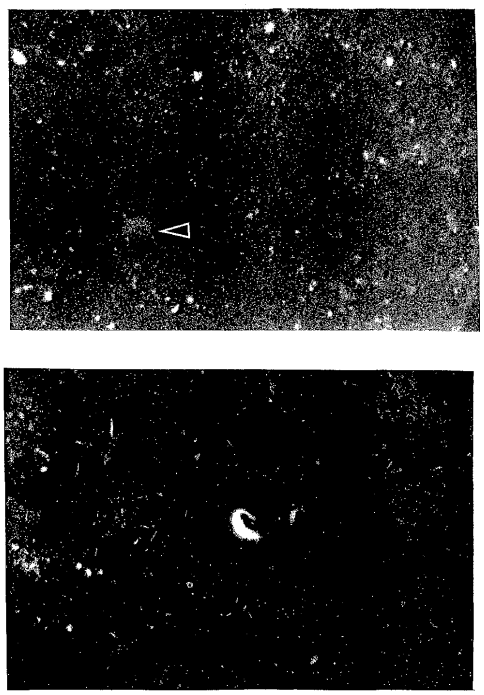


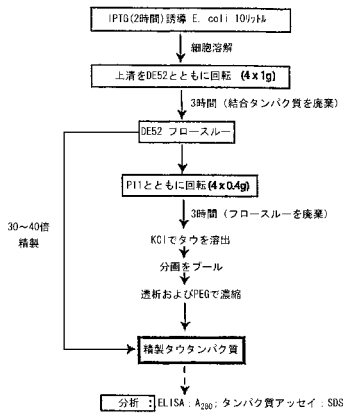
Figure 31a

【図３１ｂ】

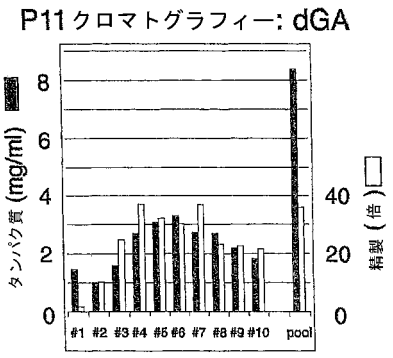


Figure 31b

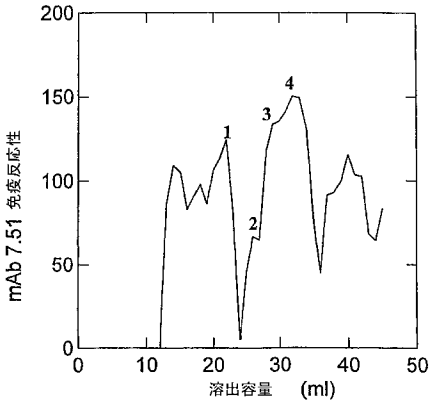
【図３２】



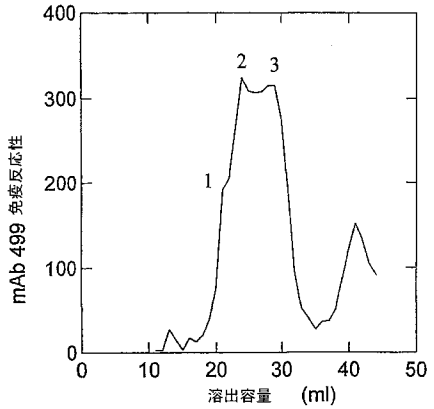
【図３３】



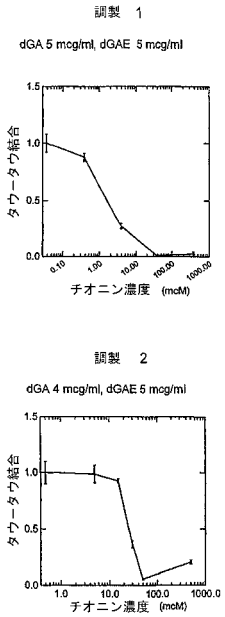
【図３４】



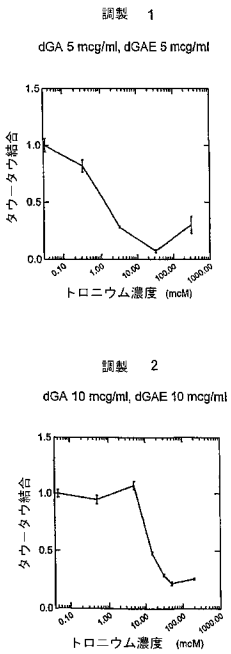
【図３５】



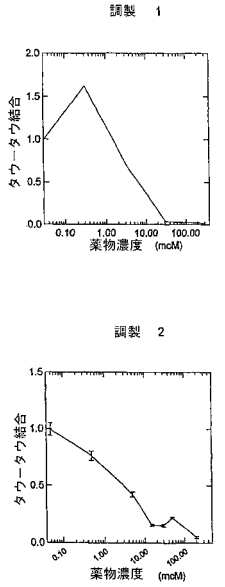
【図３６】



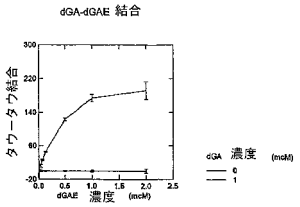
【図３７】



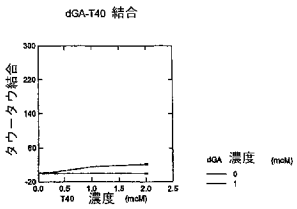
【図３８】



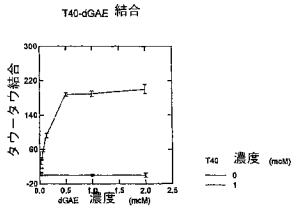
【図３９ａ】



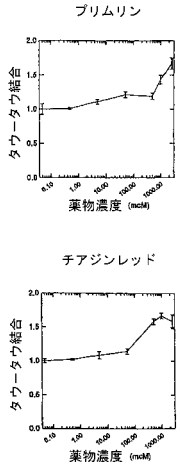
【図３９ｂ】



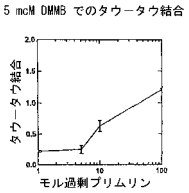
【図３９ｃ】



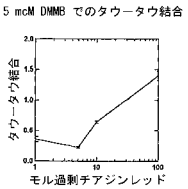
【図４０】



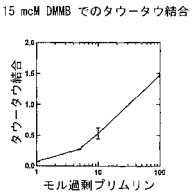
【図４１ａ】



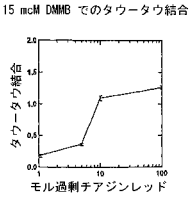
【図４１ｂ】



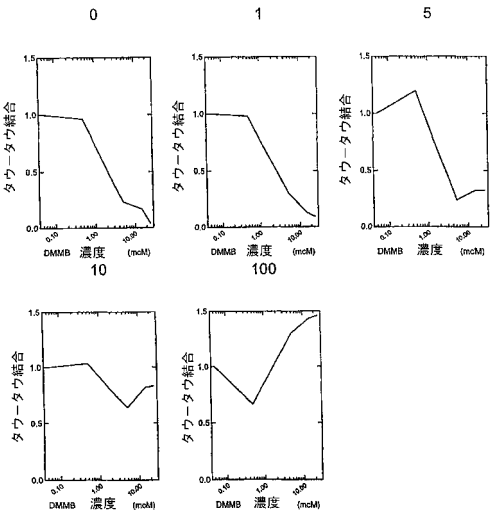
【図４１ｃ】



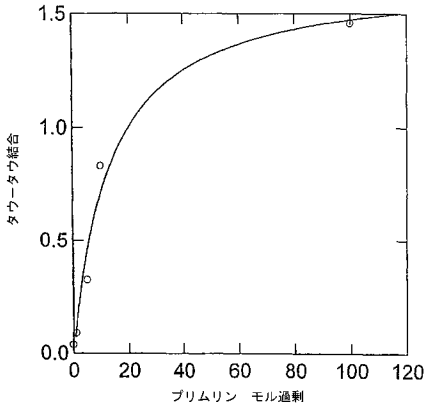
【図４１ｄ】



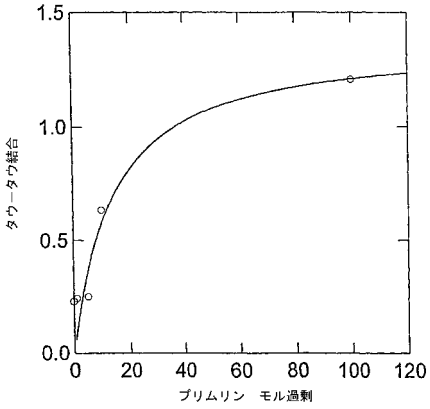
【図４２】



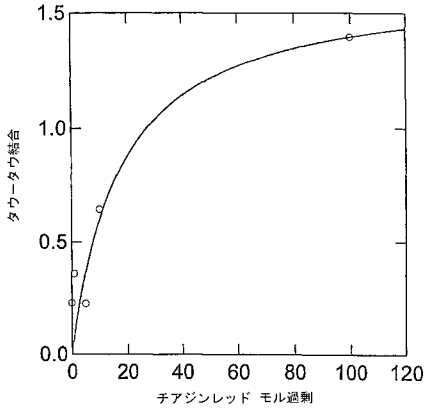
【図４３】


1.5
1.0
0.5
0.0
タウ－タウ結合
0
20
40
60
80
100
120
プリムリン　モル過剰

【図４４】


1.5
1.0
0.5
0.0
タウ－タウ結合
0
20
40
60
80
100
120
プリムリン　モル過剰

【図４５】


1.5
1.0
0.5
0.0
タウ－タウ結合
0
20
40
60
80
100
120
チアジンレッド　モル過剰

フロントページの続き

(72)発明者 ヴィスシック, 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

審査官 白形 由美子

(56)参考文献 特表平１１－５０２９２５（ＪＰ，Ａ）
Wischik, C.M., et al, Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines, Proc. Natl. Acad. Sci., １９９６年, Vol.93, p.11213-11218

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
G01N 33/48-33/98
A61K 49/00
PubMed
JSTPlus(JDreamII)
JMEDPlus(JDreamII)