

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-502939

(P2004-502939A)

(43) 公表日 平成16年1月29日(2004.1.29)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	D 2GO45
A6 1 K 45/00	A6 1 K 45/00	4CO84
A6 1 P 21/00	A6 1 P 21/00	
A6 1 P 25/16	A6 1 P 25/16	
A6 1 P 25/28	A6 1 P 25/28	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 59 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-508084 (P2002-508084)	(71) 出願人	399044160 イノジェネティックス・ナムローゼ・フェ ンノートシャップ INNOGENETICS N. V. ベルギー、ペー-9052ヘント、テヒノ ロギーパルク6番
(86) (22) 出願日	平成13年6月21日 (2001.6.21)	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 稜
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月26日 (2002.12.26)	(74) 代理人	100086405 弁理士 河宮 治
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/007029	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(87) 国際公開番号	W02002/003073	(72) 発明者	エウヘーン・ファンメヘレン ベルギー、ペー-9810ナザレスーエケ 、テン・エデストラート101番 最終頁に続く
(87) 国際公開日	平成14年1月10日 (2002.1.10)		
(31) 優先権主張番号	00870151.8		
(32) 優先日	平成12年6月30日 (2000.6.30)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
(31) 優先権主張番号	60/218, 907		
(32) 優先日	平成12年7月18日 (2000.7.18)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 神経学的疾患の分別診断

(57) 【要約】

本発明は、アルツハイマー病にかかっている個体と別の神経学的疾患疾患にかかっている個体との分別診断方法を提供する。より詳細には、本発明は、アルツハイマー病にかかっている個体と、レービー小体を伴う痴呆にかかっている個体、痴呆を伴わないPDにかかっている個体、多系統萎縮にかかっている個体および/または進行性核上麻痺にかかっている個体との分別診断方法を提供するものであり、該方法は、ホスホ - タウが神経学的マーカーとして使用されることを特徴とする。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

本発明は、ホスホ - タウが神経学的マーカーとして使用されることを特徴とする、アルツハイマー病にかかっている個体と別の神経学的疾患にかかっている個体との分別診断方法。

【請求項 2】

下記工程を含む請求項 1 記載の方法：

該個体中のホスホ - タウのレベルを決定し；

該個体中のホスホ - タウのレベルとアルツハイマー病にかかっている個体中のホスホ - タウのレベルとを比較し、低下したホスホ - タウのレベルにより、該個体がアルツハイマー病以外の神経学的疾患にかかっていることが示されることにより、該個体がアルツハイマー病以外の神経学的疾患にかかっていると推論する。

10

【請求項 3】

アルツハイマー病にかかっている個体が、レービー小体を伴う痴呆にかかっている個体、痴呆を伴わないパーキンソン病にかかっている個体、多系統萎縮にかかっている個体および/または進行性核上麻痺にかかっている個体から分別診断されることをさらに特徴とする、請求項 1 または 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4】

下記工程を含む請求項 3 記載の方法：

該個体中のホスホ - タウのレベルを決定し；

該個体中のホスホ - タウのレベルとアルツハイマー病にかかっている個体中のホスホ - タウのレベルとを比較し、低下したホスホ - タウのレベルにより、該個体がレービー小体を伴う痴呆、痴呆を伴わないパーキンソン病多系統萎縮および/または進行性核上麻痺にかかっていることが示されることにより、該個体がレービー小体を伴う痴呆、痴呆を伴わないパーキンソン病多系統萎縮および/または進行性核上麻痺にかかっていると推論する。

20

【請求項 5】

該個体から得られた試料について、インビトロにおいて実施されることをさらに特徴とする請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

該試料が該個体の脳脊髄液または血液誘導体から採取されることをさらに特徴とする請求項 5 記載の方法。

30

【請求項 7】

下記工程を含むことをさらに特徴とする請求項 6 記載の方法：

該個体からの脳脊髄液試料を得て、

該脳脊髄液試料中のホスホ - タウのレベルを決定し；

該脳脊髄液試料中のホスホ - タウのレベルとアルツハイマー病にかかっている個体からの脳脊髄液試料中のホスホ - タウのレベルとを比較し、低下したホスホ - タウのレベルにより、該個体がレービー小体を伴う痴呆、痴呆を伴わないパーキンソン病、多系統萎縮および/または進行性核上麻痺のごときアルツハイマー病以外の神経学的疾患にかかっていることが示されることにより、該個体がレービー小体を伴う痴呆、痴呆を伴わないパーキンソン病、多系統萎縮および/または進行性核上麻痺のごときアルツハイマー病以外の神経学的疾患にかかっていると推論する。

40

【請求項 8】

ホスホ - タウを特異的に認識する抗体を用いてホスホ - タウのレベルが免疫学的に決定されることをさらに特徴とする、請求項 1 ないし 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

アルツハイマー病にかかっている個体と別の神経学的疾患にかかっている個体とを分別診断するための診断キットの製造のための神経学的マーカーとしてのホスホ - タウの使用。

【請求項 10】

アルツハイマー病にかかっている個体と、レービー小体を伴う痴呆にかかっている個体、

50

痴呆を伴わないパーキンソン病にかかっている個体、多系統萎縮にかかっている個体および/または進行性核上麻痺にかかっている個体とを分別診断するための診断キットの製造のための神経学的マーカーとしてのホスホ - タウの使用。

【請求項 1 1】

アルツハイマー病にかかっている個体と別の神経学的疾患にかかっている個体とを分別診断するための診断キットの製造のための、ホスホ - タウを特異的に認識する抗体の使用。

【請求項 1 2】

アルツハイマー病にかかっている個体と、レービー小体を伴う痴呆にかかっている個体、痴呆を伴わないパーキンソン病にかかっている個体、多系統萎縮にかかっている個体および/または進行性核上麻痺にかかっている個体とを分別診断するための診断キットの製造のための、ホスホ - タウを特異的に認識する抗体の使用。

10

【請求項 1 3】

アルツハイマー病にかかっている個体と別の神経学的疾患にかかっている個体との分別診断において使用される診断キット。

【請求項 1 4】

アルツハイマー病にかかっている個体と、レービー小体を伴う痴呆にかかっている個体、痴呆を伴わないパーキンソン病にかかっている個体、多系統萎縮にかかっている個体および/または進行性核上麻痺にかかっている個体との分別診断において使用される診断キット。

【請求項 1 5】

個体におけるホスホ - タウのレベルを決定する工程を含む、アルツハイマー病、レービー小体を伴う痴呆、痴呆を伴わないパーキンソン病、多系統萎縮および/または進行性核上麻痺を予防または治療する化合物の個体に対する効果をスクリーニングあるいはモニターする方法。

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、神経学的疾患の診断の分野に関する。本発明は、アルツハイマー病と他の神経学的疾患とを分別診断する新規方法を提供する。より詳細には、本発明は、アルツハイマー病と、レービー小体を伴う痴呆、痴呆を伴わないパーキンソン病、多系統萎縮 (multi-system atrophy) および/または進行性核上麻痺 (progressive supranuclear palsy) とを分別診断する方法を提供する。

30

【0002】

発明の背景

神経学的疾患の診断において神経学的マーカーとしてのタウ (tau) およびホスホ - タウ (phospho-tau) の使用が要求されている (Blennow et al., 1995; Vigo-Pelfrey et al., 1995; Andreasen et al., 1998; Andreasen et al., 1999a; Ishiguro et al., 1999)。微小管結合蛋白タウは対になったらせん状フィラメント (PHF) および神経原線維の絡み (NFT) の主要蛋白成分であり、アルツハイマー病に関連している (Brion et al., 1985; Delacourte and Defossez, 1986; Grundke-Iqbal et al., 1986; Kosik et al., 1986; Wood et al., 1986; Kondo et al., 1988)。タウ蛋白は異なるイソフォームとして存在し、それらのうち4ないし6種は成人脳に見出されているが、胎児脳にはたった1種しか見出されていない。イソフォームの多様性はmRNAの別スプライシングによりヒト染色体17上の単一遺伝子から生じる (Himmler, 1989; Goedert et al., 1989; Andreadis et al., 1992)。分子クローニングから推論されるように、タウ蛋白の最も顕著な特徴は31または32個のアミノ酸の伸長部であり、それは当該分子のカルボキシ末端に生じ、3または4回の繰り返しを生じうる。

40

50

さらなる多様性はタウ分子のNH₂末端部における29または58アミノ酸の長さの挿入部により生じる (Goedert et al., 1989)。インビボにおいて、タウは、そのリピート領域(255~381)に局在化する微小管結合ドメインを用いる相互作用により、微小管のアッセムリーおよびニューロンの軸索コンパートメント中での安定性を促進する (Lewis et al., 1988)。正常な環境下において成人脳はタウ1モルあたり2~3モルのリン酸根を含む (Selden and Pollard, 1983; Ksiezak-Reding et al., 1992)。ラットおよびヒトにおいて研究されているように、正常タウ中の異なる部位のリン酸化は発達段階に依存する (Lee et al., 1991; Bramblett et al., 1993; Goedert et al., 1993)。神経原線維の絡みを示す脳領域において、リン酸化の結果として生じる60、64および68kDaのタウ変種が検出された (Delacourte et al., 1990; Goedert et al., 1992; Flament et al., 1990, Greenberg and Davies, 1990)。これらの脳はタウ1モルあたり6~8モルのリン酸根を含む (Ksiezak-Reding et al., 1992)。PHFから単離されたタウ (PHF-タウ)において、リン酸化は数個の位置で起こる (Iqbal et al., 1989; Lee et al., 1991; Hasegawa et al., 1992; Hanger et al., 1998; Buee et al., 1999)。

【0003】

アルツハイマー病 (AD) および前頭側頭骨痴呆 (FTD) はもっともありふれたタイプの、タウの異常に関連した初期の変性性痴呆であり、それぞれ42~75%および8~10%の罹病率である (Brun, 1993; Gustafson, 1993; Eblly et al., 1994)。フィラメント状タウの異常、すなわち神経原線維の絡み (neurofibrillary tangles) (NFT) は一貫してADにおいて見られる (Tomlinson and Corsellis, 1984) が、FTDにおいても見られうる (Spillantini and Goedert, 1998)。異常なタウ蛋白はADおよびFTDの両方に見られる (Vermeersch et al., 1995; Delacourte et al., 1996)。しかしながら、脳組織に関する研究により、タウの異常はADとFTDとは異なり、おそらくリン酸化の程度に関連しているのだろうということが示唆された (Delacourte et al., 1996)。タウの異常に関連した他の形態の痴呆は、家族性FTD、進行性核上麻痺 (PSP)、皮質基底変性 (CBD) および亜急性硬化性全脳炎を包含する。これらのタウオパチーの病理におけるリン酸化の役割はいまのところよくわかっていない。

【0004】

レービー小体を伴う痴呆 (DLB) は、進行性の痴呆または精神病を示す病気である。発症期において存在しないかあるいは穏やかなパーキンソン病の徴候は、最終的には普通のものとなり、硬直性 (rigidity) は重大である。レービー小体は脳幹、基底前脳、視床下部核および新皮質において豊富に見られる。レービー小体を伴う痴呆は、脳における絡みおよび過剰リン酸化タウの相対的不存在により特徴付けられる。パーキンソン病 (PD) は、人生の中期または後期に起こるレービー小体疾患の1のタイプであり、非常にゆっくりと進行し、長い経過をたどる。それは神経系疾患の一例と考えられ、主として黒質線状体のドパミン作動性システムに関連している。最近、レービー小体を伴う痴呆は、異なった患者管理を必要とする特別な形態の痴呆であると定義された (Leber et al., 1998; McKeith et al., 1999)。レービー小体を伴う痴呆は神経遮断薬に対して感受性があり、アルツハイマー病と区別することは臨床的に非常に困難である (McKeith et al., 1996; Ballard et al., 1998)。大部分の患者 (75%よりも多い) は神経病理学的にアルツハイマー病患者であると定義されるが、臨床的に診断されたアルツハイマー病患者の15ないし25%はレービー小体を伴う痴呆を有している (Hooten et al., 1998)。レービー小体を伴う痴呆がアセチルコリンエステラーゼ療法に対してより感受性が

あるので、レービー小体を伴う痴呆とアルツハイマー病との区別は治療の最適化に必須である (Levy et al., 1994; Perry et al., 1994; Wilcock et al., 1994)。

【0005】

脳脊髄液 (CSF) - アミロイドおよびCSF - タウはアルツハイマー病と正常な老化、うつ病およびパーキンソン病との区別に有効であり (Galasko et al., 1998; Kanai et al., 1998; Hulstaert et al., 1999)、これらのマーカーはそのような疾病の分別診断に十分に適したものである (Andreasen et al., 1999b)。しかしながら、アルツハイマー病と、レービー小体を伴う痴呆のごとき密接に関連した症状、前頭側頭骨痴呆、多系統萎縮 (MSA) および / または進行性核上麻痺のごときタウの異常に関連した他の痴呆との区別におけるそれらの役割はさらに議論的である。

10

【0006】

発明の目的

本発明の1の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体と別の神経学的疾病にかかっている個体を分別診断する方法を提供することである。

本発明の1の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体とレービー小体を伴う痴呆にかかっている個体を分別診断する方法を提供することである。

本発明の1の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体と痴呆を伴わないパーキンソン病にかかっている個体を分別診断する方法を提供することである。

20

本発明の1の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体と多系統萎縮にかかっている個体を分別診断する方法を提供することである。

本発明の1の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体と進行性核上麻痺にかかっている個体を分別診断する方法を提供することである。

本発明の1の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体と別の神経学的疾病にかかっている個体をインビトロで分別診断する方法を提供することである。

本発明の1の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体とレービー小体を伴う痴呆にかかっている個体をインビトロで分別診断する方法を提供することである。

本発明の1の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体と痴呆を伴わないパーキンソン病にかかっている個体をインビトロで分別診断する方法を提供することである。

30

本発明の1の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体と多系統萎縮にかかっている個体をインビトロで分別診断する方法を提供することである。

本発明の1の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体と進行性核上麻痺にかかっている個体をインビトロで分別診断する方法を提供することである。

本発明の1の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体と別の神経学的疾病にかかっている個体を分別診断するための診断キットを提供することである。

本発明の1の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体とレービー小体を伴う痴呆にかかっている個体を分別診断するための診断キットを提供することである。

本発明の1の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体と痴呆を伴わないパーキンソン病にかかっている個体を分別診断するための診断キットを提供することである。

40

本発明の1の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体と多系統萎縮にかかっている個体を分別診断するためのキットを提供することである。

本発明の1の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体と進行性核上麻痺にかかっている個体を分別診断するためのキットを提供することである。

本発明の1の目的は、レービー小体を伴う痴呆、痴呆を伴わないパーキンソン病、多系統萎縮および / または進行性核上麻痺を予防する化合物、あるいはレービー小体を伴う痴呆にかかっている個体、痴呆を伴わないパーキンソン病にかかっている個体、多系統萎縮にかかっている個体および / または進行性核上麻痺にかかっている個体を治療する化合物をスクリーニングし、あるいはそれらの効果をモニターする方法を提供する。

【0007】

50

表 1: 異なる診断群による人口統計学的データおよびCSFの結果

群	対象数	年齢, 男性/女性 (範囲)	MMSE	Aβ42, pM, メジアン(p25-p75)	Tau, pM, メジアン(p25-p75)	Ptau(181), pM, メジアン(p25-p75)
AD	80 (35/45)	72 (53-86)	78 22 (14-24)	69.2 (47.1-96.0)*	13.2 (9.4-17.0)*	14.7 (11.6-19.1)*
対照	40 (20/20)	70 (56-84)	20 30 (29-30)	99.3 (75.5-145.3)\$	3.0 (2.1-4.0)\$	7.8 (6.4-8.9)\$
FTD	69 (42/27)	67 (40-94)	61 22 (16-25)	90.3 (67.0-132.5)\$	7.5 (5.2-10.8)£,\$	9.4 (8.2-12.3)£,\$
LBD	43 (35/8)	72 (61-87)	37 19 (14-24)	72.2 (53-103)£	5.7 (1.6-9.0)\$	8.1 (6.1-10.0)\$
PD	15 (8/7)	70 (51-79)	1 23	72.3 (58.1-99.1)	4.2 (2.2-7.6)\$	7.4 (6.9-8.8)\$
MSA	16 (11/5)	64 (42-77)	3 20 (20-22)	91.5 (41.9-113.4)	5.3 (3.8-8.3)\$	7.6 (6.2-10.9)\$
PSP	15 (11/4)	67 (64-76)	4 26 (21-27)	96.6 (82.2-101.1)	2.8 (2.0-4.5)\$	6.9 (6.1-7.5)\$
CBD	5 (0/5)	70 (57-75)	4 13 (12-15)	70.2 (43.2-71.2)	12.9 (9.8-15.4)	12.7 (9.1-13.1)

AD = アルツハイマー病, FTD = 前頭側頭葉萎縮症, DLB = d レービー小体を伴う痴呆, PD = パーキンソン病,

MSA = 多系統萎縮症, PSP = 進行性核上麻痺, CBD = 皮質基底節変性

*対照とは有意に異なる(p<0.001)

£対照とは有意に異なる(p<0.05)

\$ADとは有意に異なる(p<0.001)

表2:

ROC分析を用いるCSF-タウとCSF-ホスホ-タウの分別力の比較

Groups	CSF-タウ (AUC ± SE)	CSF-ホスホ-タウ (AUC ± SE)	p-値
AD 対 対照 (n=40)	0.862 ± 0.038	0.897 ± 0.032	0.191
AD 対 FTD (n=69)	0.711 ± 0.045	0.754 ± 0.044	0.049
AD 対 DLB (n=43)	0.782 ± 0.048	0.839 ± 0.042	0.039
AD 対 パーキンソン病関 連症状 (n=46)	0.873 ± 0.035	0.864 ± 0.037	0.319

10

Hanley および McNeil に従って計算された曲線下の面積 (AUC) および標準偏差 (SE) を用いるレシーバーオペレイティング曲線 (ROC) 分析。

AD = アルツハイマー病, FTD = 前頭側頭骨痴呆, DLB = レービー小体を伴う痴呆, 痴呆を伴わないパーキンソン病を包含するパーキンソン病関連症状 (n = 15), 多系統萎縮 (n = 16) および 進行性核上麻痺 (n = 15)

【0009】

発明の詳細な説明

本発明は、ホスホ-タウが神経学的マーカーとして使用されることを特徴とする、アルツハイマー病 (AD) にかかっている個体と別の神経学的疾患にかかっている個体との分別診断方法に関する。より詳細には、本発明は下記工程：

該個体中のホスホ-タウのレベルを決定し；

該個体中のホスホ-タウのレベルとアルツハイマー病にかかっている個体中のホスホ-タウのレベルとを比較し、低下したホスホ-タウのレベルにより、該個体がアルツハイマー病以外の神経学的疾患にかかっていることが示されることにより、該個体がアルツハイマー病以外の神経学的疾患にかかっていると推論する

を含む上記方法に関する。

【0010】

本発明における「神経学的疾患にかかっている個体と別の神経学的疾患にかかっている個体との分別診断」は、個体におけるある種の神経学的疾患またはある種の神経学的疾患の原因が該個体のある種の神経変性症状に関連していることを根拠に、第1の神経学的疾患と第2の神経学的疾患とを識別することをいう。本発明の方法は、アルツハイマー病にかかっている個体と、アルツハイマー病以外の神経学的疾患にかかっている個体とを分別診断することを可能にする。特別な具体例において、本発明は、アルツハイマー病 (AD) にかかっている個体と、レービー小体を伴う痴呆 (DLB) にかかっている個体との分別診断を可能にする。別の特別な具体例において、本発明は、アルツハイマー病 (AD) にかかっている個体と、痴呆を伴わないパーキンソン病 (PD) にかかっている個体との分別診断を可能にする。もう1つの特別な具体例において、本発明は、アルツハイマー病 (AD) にかかっている個体と、多系統萎縮 (MSA) にかかっている個体との分別診断を可能にする。もう1つの特別な具体例において、本発明は、アルツハイマー病 (AD) にかかっている個体と、進行性核上麻痺 (PSP) にかかっている個体との分別診断を可能にする。アルツハイマー病、レービー小体を伴う痴呆、痴呆を伴わないパーキンソン病、多系統萎縮および進行性核上麻痺ならびに他の神経学的疾患は、Wilson et al. (1991) and McKeith et al. (1999) により詳細に説明さ

40

50

れている。

【0011】

本発明は、レービー小体を伴う痴呆、痴呆を伴わないPD、MSAまたはPSPにかかっている個体からのCSF中のホスホ - タウのレベルが、アルツハイマー病にかかっている個体からのCSF中のホスホ - タウのレベルと比較して低下しているという知見に基づく。上記神経学的疾患間でホスホ - タウのレベルが異なるという知見は、個体における上記神経学的疾患の分別診断のための診断試験の開発の根拠を形成する。したがって、本発明は、アルツハイマー病にかかっている個体と、レービー小体を伴う痴呆にかかっている個体、痴呆を伴わないPDにかかっている個体、多系統萎縮にかかっている個体および/または進行性核上麻痺にかかっている個体との分別診断方法に関するものであり、該方法は、ホスホ - タウが神経学的マーカーとして使用されることを特徴とする。

10

【0012】

よって、本発明の方法は、AD、DLB、痴呆を伴わないPD、MSAまたはPSPにかかっている疑いのある個体中のホスホ - タウのレベルを決定し、次いで、それを、前もって決定されているAD、DLB、痴呆を伴わないPD、MSAまたはPSPに特徴的なホスホ - タウのレベル範囲と比較する工程を含む。前もって決定されたアルツハイマー病に関するホスホ - タウのレベルの範囲内のホスホ - タウのレベルは、該個体がADにかかっていることを示すものである。前もって決定されたDLBに関するホスホ - タウのレベルの範囲内のホスホ - タウのレベルは、該個体がDLBにかかっていることを示すものである。前もって決定された痴呆を伴わないPDに関するホスホ - タウのレベルの範囲内のホスホ - タウのレベルは、該個体が痴呆を伴わないPDにかかっていることを示すものである。前もって決定されたMSAに関するホスホ - タウのレベルの範囲内のホスホ - タウのレベルは、該個体がMSAにかかっていることを示すものである。前もって決定されたPSPに関するホスホ - タウのレベルの範囲内のホスホ - タウのレベルは、該個体がPSPにかかっていることを示すものである。

20

【0013】

したがって、本発明は、ホスホ - タウが神経学的マーカーとして使用されることを特徴とする、アルツハイマー病にかかっている個体と、レービー小体を伴う痴呆にかかっている個体、痴呆を伴わないPDにかかっている個体、多系統萎縮にかかっている個体および/または進行性核上麻痺にかかっている個体との分別診断方法に関するものであり、該方法は下記工程：

30

該個体中のホスホ - タウのレベルを決定し；

該個体中のホスホ - タウのレベルとADにかかっている個体中のホスホ - タウのレベルとを比較し、低下したホスホ - タウのレベルにより、該個体がDLB、痴呆を伴わないPD、MSAおよび/またはPSPにかかっていることが示されることにより、該個体がDLB、痴呆を伴わないPD、MSAおよび/またはPSPにかかっていると推論するを含む。

【0014】

インピトロならびにインピボにおいてホスホ - タウのレベルを検出することができる。個体中のホスホ - タウレベルのインピトロでの検出方法は、該個体から試料を得て、該試料中のホスホ - タウのレベルを決定し、次いで、それを、上記神経学的疾患に関する前もって決定されたホスホ - タウのレベルと比較する工程を含む。

40

【0015】

用語「試料」は生物学的材料の源をいい、例えば、体液、脳抽出物、末梢血またはホスホ - タウ蛋白を含有する他の試料をいう。好ましい具体例において、患者の体液試料中のホスホ - タウのレベルの分析によりホスホ - タウのレベルをインピトロで決定する。用語「体液」は、ホスホ - タウ蛋白を含有する血液、リンパ液、尿および脳脊髄液(CSF)(これらに限らない)を包含するヒト身体中に存在するすべての液体をいう。血液試料は血漿試料または血清試料を包含しうる。

【0016】

50

本発明の好ましい具体例において、患者から採取された脳脊髄液試料中のホスホ - タウのレベルを決定する。したがって、本発明は、下記工程：

該個体からの脳脊髄液試料を得て、

該脳脊髄液試料中のホスホ - タウのレベルを決定し；

該脳脊髄液試料中のホスホ - タウのレベルとADにかかっている個体からの脳脊髄液試料中のホスホ - タウのレベルとを比較し、低下したホスホ - タウのレベルにより、該個体がDLB、痴呆を伴わないPD、MSAおよび/またはPSPのごときAD以外の神経学的疾患にかかっていることが示されることにより、該個体がDLB、痴呆を伴わないPD、MSAおよび/またはPSPのごときAD以外の神経学的疾患にかかっていると推論するを含む上記方法に関する。

10

【0017】

DLB、痴呆を伴わないPD、MSAおよび/またはPSPにかかっている疑いのある個体のCSF中のホスホ - タウのレベルを、ADにかかっている個体のCSF中のホスホ - タウのレベルと比較する。低下したCSF - ホスホ - タウのレベルは、DLB、痴呆を伴わないPD、MSAおよび/またはPSPにかかっている個体であると解釈される。

【0018】

ホスホ - タウは、タウ蛋白配列のいずれかの位置においてリン酸化を有するすべての形態のタウを包含し、より詳細には、ホスホ - タウは、いずれの神経学的疾患にもかかっている成人個体から単離されたヒト正常タウにおいてリン酸化されていないアミノ酸位置におけるリン酸化を意味する。

20

【0019】

「低下したホスホ - タウのレベル」は、患者において測定されたホスホ - タウのレベルがADにかかっている患者において測定されたホスホ - タウのレベルよりも低いことを意味する。抗体の使用（これに限らない）を包含する当該分野で知られたいずれの方法によってもホスホ - タウを定量することができる。好ましい具体例において、少なくとも下記工程を含む免疫アッセイによりホスホ - タウを定量する：

患者から試料を得て；

抗原 - 抗体複合体の生成に適した条件下で、ホスホ - タウを特異的に認識するモノクローナル抗体に該試料を接触させ；

該抗体の該試料への免疫学的結合を検出する。

30

【0020】

もう1つの具体例において、下記工程を含むサンドイッチELISAによりホスホ - タウを定量することができる：

患者から試料を得て；

抗原 - 抗体複合体の生成に適した条件下で、ホスホ - タウを認識する抗体（一次抗体または捕捉抗体）に該試料を接触させ；

抗原 - 抗体複合体の生成に適した条件下で、ホスホ - タウを特異的に認識するモノクローナル抗体（二次抗体またはディテクター抗体）に該試料を接触させ；

該二次抗体との特異的タグ付着またはカップリングのいずれかのためのマーカ - 抗原 - 抗体複合体を接触させ、該マーカ - は当業者に知られたいずれかのマーカ - であり；

40

さらに可能ならば、標準化の目的で、両抗体と反応しうる精製ホスホ - タウ蛋白またはホスホ - ペプチドに両抗体を接触させる。

【0021】

有利には、二次抗体自体はマーカ - あるいはマーカ - との直接または間接カップリングのための基を担持するものである。

【0022】

「認識」、「反応」、「免疫学的結合」あるいは「抗原 - 抗体複合体を生成」なる本明細書の表現は、抗体と抗原の免疫学的特性を考慮したすべての条件下で抗原と抗体との間の結合が起こることと解釈される。

【0023】

50

本明細書の用語「特異的に認識」は、該抗体がホスホ - タウと免疫学的複合体を形成できるが、ヒト正常タウとは形成できないことと解釈される。

【0024】

ホスホ - タウを特異的に認識するモノクローナル抗体を上記方法に用いてホスホ - タウを定量することができる。ホスホ - タウの定量に使用されるモノクローナル抗体はAT8 (WO93/08302)、AT180およびAT270 (WO95/17429)ならびにAT100 (WO96/04309)を包含する。ホスホ - タウを認識する当該分野で知られた他の抗体も同様に使用することができる。

【0025】

これらのモノクローナル抗体に由来するフラグメント、例えば、Fab、F(ab)'₂、ssFv (「1本鎖可変フラグメント」)ならびに抗体の可変領域を保持している他の抗体様構築物もまた、元の結合特性を保持しているかぎり、本発明の方法に使用することができる。かかるフラグメントは、通常には、例えば、抗体をパパイン、ペプシンまたは他のプロテアーゼで消化することにより得られる。モノクローナル抗体またはそのフラグメントは種々の用途のために修飾することができる。また、ミニ - 抗体および2価抗体、3価抗体、4価抗体および5価抗体のごとき多価抗体を本発明の方法に用いることもできる。これらのフラグメントおよび多価抗体の調製および/または使用は国際特許出願公開WO98/29442に詳細に記載されている。

【0026】

本発明の方法に使用されるモノクローナル抗体は、HおよびL鎖をコードするマウスおよび/またはヒトゲノムDNAから、あるいはHおよびL鎖をコードするcDNAクローンから組換えDNA法により製造されるマウスモノクローナル抗体のヒト化バージョンであってもよい。あるいは、本発明の方法に使用されるモノクローナル抗体はヒトモノクローナル抗体であってもよい。用語「ヒト化抗体」は、免疫グロブリンのフレームワーク領域の少なくとも一部がヒト免疫グロブリン配列由来であることを意味する。

【0027】

本発明の方法に使用される抗体を、酵素、蛍光またはラジオアイソトープ型の適当な標識で標識してもよい。

【0028】

個体中のホスホ - タウのレベルのインピボでの検出方法は、該個体中のホスホ - タウのレベルを決定し、次いで、それを、前もって決定されたAD、DLB、痴呆を伴わないPD、MSAまたはPSPに特徴的なホスホ - タウレベルと比較する工程を含む。本発明の1の具体例において、インピボにおけるイメージングによりホスホ - タウを定量することができる。Arbit et al. (1995), Tamada et al. (1995), Wakabayashi et al. (1995), Huang et al. (1996), Sandrock et al. (1996), Mariani et al. (1997)により記載された脳イメージング法(これらに限らない)を包含する非侵襲的方法によりホスホ - タウをインシトゥにて定量することができる。これらのインピボイメージング法は、例えば、ホスホ - タウを特異的に認識する標識抗体を用いることにより、ホスホ - タウの局在化を調べ、定量することを可能にするかもしれない。

【0029】

よって、本発明は、ADにかかっている個体と別の神経学的疾患にかかっている個体との分別診断のための神経学的マーカーとしてのホスホ - タウの使用に関する。詳細には、本発明は、ADにかかっている個体と、DLBにかかっている個体、痴呆を伴わないPDにかかっている個体、MSAにかかっている個体および/またはPSPにかかっている個体との分別診断のための神経学的マーカーとしてのホスホ - タウの使用に関する。

【0030】

また本発明は、アルツハイマー病にかかっている個体と、別の神経学的疾患にかかっている個体との分別診断のための診断キットの製造のためのマーカーとしてのホスホ - タウの使用にも関する。詳細には、本発明は、アルツハイマー病にかかっている個体と、DLB

にかかっている個体、痴呆を伴わないPDにかかっている個体、MSAにかかっている個体および/またはPSPにかかっている個体との分別診断のための診断キットの製造のためのマーカーとしてのホスホ - タウの使用にも関する。

【0031】

また本発明は、アルツハイマー病にかかっている個体と、別の神経学的疾患にかかっている個体との分別診断のための診断キットの製造のためのホスホ - タウを特異的に認識する抗体の使用にも関する。詳細には、本発明は、アルツハイマー病にかかっている個体と、DLBにかかっている個体、痴呆を伴わないPDにかかっている個体、MSAにかかっている個体および/またはPSPにかかっている個体との分別診断のための診断キットの製造のためのホスホ - タウを特異的に認識する抗体の使用にも関する。

10

【0032】

したがって、本発明は、ホスホ - タウを特異的に認識する抗体を含む、アルツハイマー病にかかっている個体と別の神経学的疾患にかかっている個体との分別診断のための診断キットにも関する。詳細には、本発明は、ホスホ - タウを特異的に認識する抗体を含む、アルツハイマー病にかかっている個体とDLBにかかっている個体、痴呆を伴わないPDにかかっている個体、MSAにかかっている個体および/またはPSPにかかっている個体との分別診断のための診断キットに関する。

【0033】

本発明の方法を実施するための可能なキットはイムノアッセイに基づくものであり、以下のものを含む：

20

ホスホ - タウのエピトープを有する免疫学的複合体を形成する抗体（一次抗体）；

ホスホ - タウを特異的に認識するモノクローナル抗体（二次抗体）；

該二次抗体に特異的にタグを付すあるいはカップリングさせるためのマーカー；

一次抗体と試験試料との間、二次抗体と試験試料との間および/または結合二次抗体とマーカーとの間の免疫学的反応を行うための適当な緩衝液；

可能ならば、標準化目的で精製ホスホ - タウ蛋白またはホスホ - ペプチド。

【0034】

さらに本発明は、アルツハイマー病にかかっている個体と別の神経学的疾患にかかっている個体との分別診断のための上記診断キットの使用に関する。詳細には、本発明は、アルツハイマー病にかかっている個体とDLBにかかっている個体、痴呆を伴わないPDにかかっている個体、MSAにかかっている個体および/またはPSPにかかっている個体との分別診断のための上記診断キットの使用に関する。

30

【0035】

また本発明は、アルツハイマー病、レービー小体を伴う痴呆、痴呆を伴わないパーキンソン病、多系統萎縮および/または進行性核上麻痺を予防または治療する化合物の、個体に対する効果をスクリーニングあるいはモニターする方法にも関する。

【0036】

特別な事情がない限り、本明細書および特許請求の範囲において、「含む」および「特徴とする」は、記述された数または工程あるいは数または工程の群以外の数または工程あるいは数または工程の群を包含するものと理解される。

40

【0037】

特に有利な具体例を示す下記実施例を参照して本発明を説明する。しかしながら、これらの実施例は説明であり、本発明を限定するものと解すことはできないといことに留意すべきである。

【0038】

実施例 1

対象および方法

CSFの研究に参与している14の大学のセンターに、多中心検定(multicenter study)に参加するようコンタクトした。各センターに、正確に10人のAD患者からの500 μ lのCSF(McKhann et al., 1984)ならびにD

50

LB (McKeith et al., 1996) またはFTD (Anonymous, 1994) 患者からの最少でも6つの試料を含めるよう要求した。8つのセンターがこれらの条件に従った。PSP (Golbe et al., 1993)、CBD (Rinne et al., 1994) および多系統萎縮 (MSA) (Colosimo et al., 1995) 患者からのCSFが利用可能な場合には、それらも研究に加えた。センター1箇所あたり10の試料が利用可能な場合には、神経学的問題および認識の問題および痴呆を伴わないパーキンソン病 (PD) (Langston et al., 1992) を有しない年齢を合わせた対照を含めた。

【0039】

研究目的に利用可能なCSF試料に関して研究を行ない、必要な場合には、研究の開始に先立って地方のIndependent Ethics Committee / Institutional Review Board (IEC / IRB) によりプロトコルが検閲され、承認された。 10

【0040】

腰椎穿刺を用いて試料をポリプロピレンチューブに集めた。凍結 - 融解は - アミロイド₄₂ (A₄₂) レベルに重大な影響を及ぼすことが示されている ((Andreasen et al., 1999; Vanderstichele et al., 1998)) ので、凍結 - 融解サイクルの回数が付記された。1マイクロリットルあたり500個未満の赤血球を含むCSF試料を除外した。

【0041】

CSF - A₄₂ (K-1080, Innogenetics) ((Andreasen et al., 1999; Vanderstichele et al., 1998))、hTau (K-1032, Innogenetics) (Vandermeer et al., 1993; Blennow et al., 1995; Van de Voorde et al., 1995)) に関する標準キットならびにthe INNOTEST PHOSPHO-TAUの研究用バージョンを用いて、Innogenetics (Gent, Belgium) にてすべての決定を行なった。ホスホ - タウキットは、捕捉用ヒト - 特異的抗体HT7および検出用ホスホ - スレオニン - 181 - 特異的抗体AT270を用いて開発されたものである ((Goedert et al., 1994; Vanmechelen et al., 2000))。標準物質として、対応スレオニン181がリン酸化された合成ペプチド (Ac - P₁₅₄ RGAAPPQKGGQANATRIPAKTPPAKKT (p) PPSSE₁₈₇ - NH₂) を用いた。アッセイの実行範囲をカバーする5つのプールされたCSF試料を用いてホスホ - タウアッセイの信頼性および品質をモニターした。 20 30

【0042】

統計学的方法

Shapiro - Wilk検定を用いてCSF - タウ、A₄₂およびホスホ - タウの正規分布を試験し、正規性が拒絶された場合には、非 - パラメトリック (Kruskal - Wallis) 検定を比較に使用した。ADまたは対照群との比較のために、Dunnのマルチプルコンパリゾン検定 (multiple comparison test) を用いてp - 値を調節した。レシーバーオペレイティングカーブ (receiver operating curve) (ROC) 分析を用いて、ADと対照、DLB、FTDまたはパーキンソン病関連症状との間におけるタウおよびホスホタウの分別力をそれぞれ試験した ((Hanley and McNeil, 1983))。Spearman rank correlation coefficientを用いて正の相関を決定した。 40

【0043】

異なる神経学的疾患群におけるCSF - ホスホ - タウレベル

8つのセンターから全部で294のCSF試料を集めた。1のセンターからのCSF試料の輸送は5日よりも長くかかり、輸送中に試料が融解した。したがって、1のCSF試料 (FTD) を除いてこれらのCSF試料の新たな部分試料が再輸送された。センター2か 50

らの5つの試料(5FTD)およびセンター8からの5つの試料(5PD)もアッセイしなかった。なぜなら、すべての試験を行なうには輸送されたCSF量が不十分であったからである。要約すると、異なる診断群からの283のCSF試料(40対照, 80AD, 43DLB, 69FTD, 15PD, 15PSP, 16MSAおよび5CBD)を、生化学的マーカーの少なくとも1つについてアッセイした(表1参照)。

1985年から1999年にわたってCSF試料を集めた。予想したように、DLB患者群中の男性のパーセンテージが高い。

【0044】

ホスホ - タウ試験の品質をモニターするために使用された5つのQC試料についてホスホ - タウのレベルおよびそれらの信頼区間を決定した。すべてのQC試料に関する値は確立された判断基準中におさまった(結果示さず)。

10

【0045】

A 42およびタウに関してセンターの影響が観察されたが、AD群中のホスホ - タウについては観察されなかった。A 42に関して凍結 - 融解の影響が観察された($p < 0.0001$)が、タウおよびホスホ - タウに関しては観察されず、このことはADおよびDLB群において特に顕著であった。センター03からのCSFの分析において影響がさらに確認された。これらの試料はタウおよびA 42の両方に関して前もってアッセイされ、2回の凍結 - 融解サイクル後にInnogenetics (Gent, Belgium)において再アッセイされた。10の対照試料のうち8つにおいてCSF - A 42の正味20%の減少が観察された。

20

【0046】

異なるマーカーに対する年齢の影響はいずれの診断群においても観察されなかった。全群におけるタウおよびMMSEを除いて、男性または女性のAD群あるいは全AD群においてバイオマーカーとMMSEとの間に有意な相関は見られなかった(Spearman, $r = -0.275$ [$-0.491, -0.059$], $p = 0.01$)。ApoE遺伝子型はCSF - タウまたはCSF - ホスホ - タウレベルとは相関していなかったが、CSF - A 42に関しては有意な相関が観察された(Spearman, $r = -0.263$ [$-0.434, -0.093$], $p = 0.003$)。

【0047】

すべての群においてA 42、タウおよびホスホ - タウについて正規性が拒絶されたので、非 - パラメトリック検定を用いて分析を行なった(表1)。対照群と比較して有意に上昇したCSF - タウレベルがAD群($p < 0.001$)およびFTD群($p < 0.05$)に存在した。FTDにおいてCSF - タウレベルが上昇したが、AD群のレベルよりも有意に高かった($p < 0.01$)。ADおよびFTDのほかにPSPをリファレンス群として用いた場合、CBDはCSF - タウレベルよりも有意に高かった($p < 0.05$)。ADおよび対照を用いて比較した場合、ホスホ - タウに関して類似のパターンが観察された。対照群と比較した場合、有意に低下したA 42レベルがAD群($p < 0.001$)およびFTD群($p < 0.05$)においてのみ観察され、すべての群のA 42をAD群と比較すると、ADとFTDとの間の明らかに有意な相違が示される($p < 0.001$)。CBDを除くすべてのパーキンソン病関連症状において、バイオマーカーの平均レベルは正常範囲内であったので、その後の分析においてこれらの群を1つの群として扱った。

30

40

【0048】

診断群とは無関係な、すべての患者に関するタウとホスホ - タウとの間の強い相関($y = 0.75x + 4.6$, $r = 0.904$, $p < 0.001$)により、タウを用いて得られるADと他の群との間の分別は、ホスホ - タウを用いて得ることもできることが示唆される。ROC分析を用いて、全タウの分別力とホスホ - タウの分別力を比較した。ADとFTDとの分別およびADとDLBとの分別に関してタウとホスホ - タウとの間の有意な相違が観察されたが、対照またはパーキンソン病関連症状と比較した場合のADに関して相違は観察されなかった(表2)。DLBにおいて男性の例が多すぎるので、男性のADと男性のDLBに関してROC分析を行ったところAUCは 0.800 ± 0.057 であ

50

り、女性および男性を一緒にした場合と比肩しうるものであった。

【0049】

CSF - タウとCSF - β -アミロイド42を結び合わせる、すでに確立されている分別基準線 ($A_{42} = 240 + 1.18 \tau$) を用いて、感度 (98% (CI 91 - 99%)) および対照集団に対する特異性 (73% (CI 56 - 85%)) を、以前の研究と比較した。この分別基準線の特異性はFTDに対して77% (CI 66 - 85%)、DLBに対して67% (CI 52 - 80%)、パーキンソン関連症状に関して68% (CI 50 - 81%) であった。

【0050】

文献

- Andreadis A., Brown W., Kosik K. (1992) Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochem.* 31: 10626 - 10633.
- Andreasen N., Vanmechelen E., Van de Voorde A., Davidsson P., Hesse C., Tarvonen S., Raiha I., Sourander L., Winblad B., Blennow K. (1998) Cerebrospinal fluid tau protein as a biochemical marker for Alzheimer's disease: a community-based follow-up study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 64: 298 - 305. 10
- Andreasen N., Minthon L., Clarberg A., Davidsson P., Gottfries J., Vanmechelen E., Vanderstichele H., Winblad B., Blennow K. (1999a) Sensitivity, specificity and stability of CSF-tau in AD in a community-based patient sample. *Neurology* 53: 1488 - 1494. 20
- Andreasen N., Hesse C., Davidsson P., Minthon L., Wallin A., Winblad B., Vanderstichele H., Vanmechelen E., Blennow, K. (1999b) Cerebrospinal fluid beta-amyloid(1-42) in Alzheimer disease: differences between early- and late-onset Alzheimer disease and stability during the course of disease. *Arch. Neurol.* 56: 673 - 680. 30
- Anonymous (1994) Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia. The Lund and Manchester Groups. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 57: 416 - 418.
- Arbit E., Cheung N.K., Yeh S.D., Daghighian F., Shang J.J., Cordon-Cardo C., Pentlow K., Canete A., Finn R., Larson S.M. (1995) Quantitative studies of monoclonal antibody targeting to disialogangliosid GD2 in human brain tumors. *Eur. J. Nucl. Med.* 22: 419 - 426. 40
- Ballard C., Grace J., McKeith I., Holmes C. (1998) Neuroleptic sensitivity in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. *Lancet* 351: 1032 - 3.
- Blennow K., Wallin A., Agren H., Spenger C. 50

- , Siegfried J., Vanmechelen E. (1995) Tau protein in cerebrospinal fluid: a biochemical marker for axonal degeneration in Alzheimer disease? *Mol. Chem. Neuropathol.* 26: 231 - 245.
- Bramblett G., Goedert M., Jakes R., Merrick S., Trojanowski J., Lee V. (1993) The abnormal phosphorylation of tau at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates phosphorylation during development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron.* 10: 1089 - 1099. 10
- Brion J., Passareiro J., Nunez J., Flament-Durand J. (1985) Mise en evidence immunologique de la proteine tau au niveau des lesions de degenerescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer. *Arch. Biol.* 95: 229 - 235.
- Brun A. (1993) Frontal lobe degeneration of non-Alzheimer type revisited. *Dementia* 4: 126 - 131. 20
- Buee L., Delacourte A. (1999) Comparative biochemistry of tau in progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, FTD P-17 and Pick's disease. *Brain Pathol.* 9: 681 - 693.
- Colosimo C., Albanese A., Hughes A.J., de Bruin V.M., Lees, A.J. (1995) Some specific clinical features differentiate multiple system atrophy (striatonigral variety) from Parkinson's disease. *Arch. Neurol.* 52: 294 - 298. 30
- Delacourte A., Defossez A. (1986) Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J. Neurol. Sci.* 76: 173 - 180.
- Delacourte A., Flament S., Dibe E., Hublau P., Sablonniere B., Hemon B., Sherrer V., Defossez A. (1990) Pathological proteins Tau 64 and 69 are specifically expressed in the somatodendritic domain of the degenerating cortical neurons during Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 80: 111 - 117. 40
- Delacourte A., Buee L., Vermersch P. (1996) Immunocytochemistry in frontotemporal dementia. In: Pasquier F, Lebert F., Scheltens P. (eds.) *Frontotemporal dementia*. ICG Publications, Dordrecht, The Netherlands. pp. 115 - 124. 50

- Ebly E.M., Parhad I.M., Hogan D.B., Fung T.S. (1994) Prevalence and types of dementia in the very old: results from the Canadian Study of Health and Aging. *Neurology* 44: 1593-1600.
- Flament S., Delacourte A. (1990) Tau Marker? *Nature* 346: 6279.
- Galasko D., Chang L., Motter R., Clark C.M., Kaye J., Knopman D., Thomas R., Kholodenko D., Schenk D., Lieberburg I., Miller B., Green R., Basherad R., Kertiles L., Boss M.A., Seubert P. (1998) High cerebrospinal fluid tau and low amyloid beta42 levels in the clinical diagnosis of Alzheimer disease and relation to apolipoprotein E genotype. *Arch. Neurol.* 55: 937-945.
- Goedert M., Spillantini M.G., Jakes R., Rutherford D., Crowther R.A. (1989) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3: 519-526.
- Goedert M., Spillantini M.G., Cairns N.J., Crowther R.A. (1992) Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8: 159-168.
- Goedert M., Jakes R., Crowther R., Six J., Lubke U., Vandermeeren M., Cras P., Trojanowski J.Q., Lee V. (1993) The abnormal phosphorylation of tau protein at serine 202 in Alzheimer's disease recapitulates phosphorylation during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 90: 5066-5070.
- Goedert M., Jakes R., Crowther R.A., Cohen P., Vanmechelen E., Vandermeeren M., Cras P. (1994) Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease: identification of phosphorylation sites in tau protein. *Biochem. J.* 301: 871-877.
- Goedert M., Crowther R.A., Spillantini M.G. (1998) Tau mutations cause frontotemporal dementias. *Neuron* 21: 955-958.
- Golbe L.I., Davis P.H. (1993) Progressive supranuclear palsy. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Greenberg S., Davies P. (1990) A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacr

10

20

30

40

50

- ylamide gel electrophoresis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5827-5831.
- Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Tung Y., Quinlan M., Wisniewski H., Binder L. (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein (tau) in Alzheimer's cytoskeletal pathology. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 83: 4913-4917.
- Gustafson L. (1993) Clinical picture of frontal lobe degeneration of non-Alzheimer type. Dementia 4: 143-148. 10
- Hanger D.P., Betts J.C., Loviny T.L., Blackstock W.P., Anderton B.H. (1998) New phosphorylation sites identified in hyperphosphorylated tau (paired helical filament-tau) from Alzheimer's disease brain using nanoelectrospray mass spectrometry. J. Neurochem. 71: 2465-2476.
- Hanley J.A., McNeil B.J. (1983) A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. Radiology 148: 839-843. 20
- Hasegawa M., Morishima-Kawashima M., Takio K., Suzuki M., Titani K., Ihara Y. (1992) Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in Alzheimer's disease brain. J. Biol. Chem 267: 17047-17054.
- Himmler A. (1989) Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts. Mol. Cell Biol. 9(4): 1389-96. 30
- Hooten W.M., Lyketsos C.G. (1998) Differentiating Alzheimer's disease and frontotemporal dementia: receiver operator characteristic curve analysis of four rating scales. Dement. Geriatr. Cogn. Disord. 9: 164-174.
- Huang Q., He G., Lan Q., Li X., Qian Z., Chen J., Lu Z., Du Z. (1996) Target imaging diagnosis of human brain glioma. Clinical analysis of 40 cases. Nucl. Med. Commun. 17: 311-316. 40
- Hulstaert F., Blennow K., Ivanoiu A., Schoonderwaldt H.C., Riemenschneider M., De Deyn P.P., Bancher C., Cras P., Wiltfang J., Mehta P.D., Iqbal K., Pottel H., Vanmechelen E., Vanderstichele H. (1999). Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid(1-42) and tau levels in CSF. Neurology 52: 1555-1562.
- Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Smith A., George L., Tung Y., Zaidi T. (1989) Identificati 50

on and localisation of a Tau peptide to paired helical filaments of Alzheimer's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86: 5646-5650.

Ishiguro K., Ohno H., Arai H., Yamaguchi H., Urakami K., Park J.M., Sato K., Kohno H., Imahori K. (1999) Phosphorylated tau in human cerebrospinal fluid is a diagnostic marker for Alzheimer's disease. Neurosci. Lett. 270: 91-94.

Kanai M., Matsubara E., Isoe K., Urakami K., Nakashima K., Arai H., Sasaki H., Abe K., Iwatsubo T., Kosaka T., Watanabe M., Tomidokoro Y., Shizuka M., Mizushima K., Nakamura T., Igeta Y., Ikeda Y., Amari M., Kawarabayashi T., Ishiguro K., Harigaya Y., Wakabayashi K., Okamoto K., Hirai S., Shoji M. (1998) Longitudinal study of cerebrospinal fluid levels of tau, A beta1-40, and A beta1-42 (43) in Alzheimer's disease: a study in Japan. Ann. Neurol. 44: 17-26.

Kondo J., Honda T., Mori H., Hamada Y., Miura R., Ogawara M., Ihara Y. (1988) The carboxyl third of tau is tightly bound to paired helical filaments. Neuron 1: 827-834.

Kosik K.S., Joachim C.L., Selkoe D.J. (1986) Microtubule-associated protein tau is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 83: 4044-4048.

Ksiezak-Reding H., Liu W.K., Yen S.H. (1992) Brain Res. 597: 209-219.

Langston J.W., Widner H., Goetz C.G., Brooks D., Fahn S., Freeman T., Watts R. (1992). Core assessment program for intracerebral transplantations (CAPIT). Mov. Disord. 7: 2-13.

Lebert F., Pasquier F., Souliez L., Petit H. (1998) Tacrine efficacy in Lewy body dementia. Int. J. Geriatr. Psychiatry 13: 516-519.

Lee V., Balin B., Otvos L., Trojanowski J. (1991) A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal tau. Science 251(4994): 675-8.

Levy R., Eagger S., Griffiths M., Perry E., Honavar M., Daen A., Lantos P. (1994) Lewy bodies and response to tacrine in Alzheimer's disease. Lancet 343: 176-178.

Lewis S., Wang D., Cowan N. (1988) Microtub

10

20

30

40

50

- ule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with Tau protein. *Science* 242: 936-939.
- Mariani G., Lasku A., Pau A., Villa G., Motta C., Calcagno G., Taddei G.Z., Castellani P., Syrigos K., Dorcaratto A., Epenetos A.A., Zardi L., Viale G.A. (1997) A pilot pharmacokinetic and immunoscintigraphic study with the technetium-99m labeled monoclonal antibody BC-1 directed against oncofetal fibronectin in patients with brain tumours. *Cancer* 15: 2484-2489. 10
- McKeith I.G., Galasko D., Kosaka K., Perry E.K., Dickson D.W., Hansen L.A., Salmon D.P., Lowe J., Mirra S.S., Byrne E.J., Lennox G., Quinn N.P., Edwardson J.A., Ince P.G., Bergeron C., Burns A., Miller B.L., Lovestone S., Collerton D., Jansen E.N., Ballard C., de Vos R.A., Wilcock G.K., Jellinger K.A., Perry, R.H. (1996) Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the consortium on DLB international workshop. *Neurology* 47: 1113-1124. 20
- McKeith I.G., O'Brien J.T., Ballard C. (1999) Diagnosing dementia with Lewy bodies. *Lancet* 354: 1227-1228.
- McKhann G., Drachman D., Folstein M., Katzman R., Price D., Stadlan E.M. (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report on the NINCDS-ADRDA Work group under the auspices of department of health and human services task force on Alzheimer's disease. *Neurology* 34: 939-944. 30
- Perry E.K., Haroutunian V., Davis K.L., Levy R., Lantos P., Eagger S., Honavar M., Dean A., Griffiths M., McKeith I.G., et al. (1994) Neocortical cholinergic activities differentiate Lewy body dementia from classical Alzheimer's disease. *Neuroreport* 5: 747-749. 40
- Rinne J.O., Lee M.S., Thompson P.D., Marsden C.D. (1994). Corticobasal degeneration. A clinical study of 36 cases. *Brain* 117 (Pt 5): 1183-1196.
- Sandrock D., Verheggen R., Helwig A.T., Munz D.L., Markakis E., Emrich D. (1996) Immunoscintigraphy for the detection of brain abscesses. *Nucl. Med. Commun.* 17: 311-316.
- Selden S., Pollard T. (1983) Phosphorylati 50

- on of microtubule-associated proteins regulates their interaction with actin filaments. *J. Biol. Chem.* 258(11): 7064-71.
- Spillantini M.G., Goedert M. (1998) Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 21: 428-433.
- Tamada K., Fujinaga S., Watanabe R., Yamashita R., Takeuchi Y., Osano M. (1995) Specific deposition of passively transferred monoclonal antibodies against herpes simplex virus type 1 in rat brain infected with the virus. *Microbiol-Immunol.* 39: 861-871. 10
- Tomlinson B.E., Corsellis J.A.N. (1984) Ageing and the demntias. In: Hume Adams J., Corsellis J.A.N., Duchen L.W. (eds.) *Greenfield's neuropathology*. Edward Arnold, London, UK. pp. 951-1025.
- Vandermeeren M., Mercken M., Vanmechelen E., Six J., Van de Voorde A., Martin J.J., Cras P. (1993) Detection of tau proteins in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Neurochem.* 61: 1828-1834. 20
- Van de Voorde A., Vanmechelen E., Vandermeeren M., Dessaint F., Beeckman W., Cras P. (1995) Detection of tau in cerebrospinal fluid. In: Iqbal K., Mortimer J.A., Winblad B. and Wisniewski H.M. *Alzheimer's disease: Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders*. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore. pp. 189-195. 30
- Vanderstichele H., Blennow K., D'Heuvaert N., Buyse M.-A., Wallin A., Andreasen N., Seubert P., Van de Voorde A., Vanmechelen, E. (1998) Development of a specific diagnostic test for measurement of β -amyloid(1-42) [A4(1-42)] in CSF. In: Fisher A., Hanin A. and Yoshida M. *Progress in Alzheimer's and Parkinson's diseases*. Plenum Press, New York and London. pp. 773-778. 40
- Vermersch P., Bordet R., Ledoze F., Ruchoux M.M., Chapon F., Thomas P., Destee A., Lechevallier B., Delacourte A. (1995) CR Demonstration of a specific profile of pathological Tau proteins in frontotemporal dementia cases. *Acad. Sci.* 318: 439-445.
- Vigo-Pelfrey C., Seubert P., Barbour R., Blomquist C., Lee M., Lee D., Coria F., Chang 50

L., Miller B., Lieverburg I., et al. (1995) Elevation of microtubule-associated protein tau in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Neurology* 45: 788-793.

Wakabayashi T., Yoshida J., Okada H., Sugita K., Itoh K., Tadokoro M., Ohshima M. (1995) Radioimaging of human glioma by indium-111 labelled G-22 anti-glioma monoclonal antibody. *Noshuyo-Byori* 12: 105-110.

10

Wilcock G.K., Scott M.I. (1994) Tacrine for senile dementia of Alzheimer's or Lewy body type. *Lancet* 344: 544-544.

Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AS, Root RK (1991) *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 12th Edition, McGraw-Hill Inc, NY, USA.

Wood J., Mirra S., Pollock N., Binder L. (1986) Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 83: 4040-4043.

20

【国際公開パンフレット】

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

(18) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 January 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/03073 A1

- (51) International Patent Classification: G01N 33/68 (81) Designated States (traditional): AP, AG, AI, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GU, GT, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KH, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/EP91/07029 (84) Designated States (regionally): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (22) International Filing Date: 21 June 2001 (21.06.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
06870151.8 30 June 2000 (30.06.2000) EP
06/218,907 18 July 2000 (18.07.2000) US
- (71) Applicant for all designated States except US: INNOGENETICS N.V. [BE/BE]; Industriepark Zwijnaarde 7, Box 4, B-9052 Ghent (BE).
- (72) Inventors; and
Inventors/Applicants for US only: VANMECHTELIN, Engen [BE/BE]; Ten Edestraat 101, B-9810 Nazareth-Eike (BE); VANDERSCHELE, Hugo [BE/BE]; Tuijnvijsstraat 43, B-2000 Ghent (BE); HILSTAFERT, Frank [BE/BE]; Klaverpool 15, B-9050 Gentbrugge (BE).
- (74) Common Representative: INNOGENETICS N.V.; Industriepark Zwijnaarde 7, Box 4, B-9052 Ghent (BE).
- Published:
with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of amendment.
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/03073 A1

(54) Title: DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF NEUROLOGICAL DISEASES

(57) Abstract: The present invention provides a method for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from another neurological disease. More specifically, the present invention provides a method for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from dementia with Lewy bodies, versus an individual suffering from Parkinson's disease without dementia, versus an individual suffering from multi-system atrophy and/or versus an individual suffering from progressive supranuclear palsy, said method characterized that phospho tau is used as a neurological marker.

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF NEUROLOGICAL DISEASES**FIELD OF THE INVENTION**

5

The present invention relates to the field of the diagnosis of neurological diseases. The present invention provides a new method for the differential diagnosis of Alzheimer's disease versus other neurological diseases. More particular, the present invention provides a method for the differential diagnosis of Alzheimer's disease versus dementia with Lewy bodies, versus Parkinson's disease without dementia, versus multi-system atrophy and/or versus progressive supranuclear palsy.

10

BACKGROUND OF THE INVENTION

15

The use of tau and phospho-tau as neurological markers in the diagnosis of neurological diseases has been postulated (Blennow et al., 1995; Vigo-Pelfrey et al., 1995; Andreassen et al., 1998; Andreassen et al., 1999a; Ishiguro et al., 1999). The microtubule-associated protein tau is a major protein component of paired helical filaments (PHF) and neurofibrillar tangles (NFT), associated with Alzheimer's disease (Brion et al., 1985; Delacourte and Defossez, 1986; Grundke-Iqbal et al., 1986; Kosik et al., 1986; Wood et al., 1986; Kondo et al., 1988). Tau protein exists in different isoforms, of which 4 to 6 are found in adult brain but only 1 isoform is detected in fetal brain. The diversity of the isoforms is generated from a single gene on human chromosome 17 by alternative mRNA splicing (Himmler, 1989; Goedert et al., 1989; Andreadis et al., 1992). The most striking feature of tau protein, as deduced from molecular cloning, is a stretch of 31 or 32 amino acids, occurring in the carboxy-terminal part of the molecule, which can be repeated either 3 or 4 times. Additional diversity is generated through 29 or 58 amino acid-long insertions in the NH₂-terminal part of tau molecules (Goedert et al., 1989). *In vivo* tau promotes microtubule assembly and stability in the axonal compartment of neurons by interactions involving its microtubule binding domain which is localized in the repeat

20

25

30

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

2

region of tau (255-381) (Lewis et al., 1988). In normal circumstances adult brain contains 2-3 mole phosphate per mole of tau (Selden and Pollard, 1983; Ksiezak-Reding et al., 1992). Phosphorylation of different sites in normal tau as studied in rat and humans is dependent on the developmental state (Lee et al., 1991; Bramblett et al., 1993; Goedert et al., 1993). Tau variants of 60, 64 and 68 kDa arising as a consequence of phosphorylation have been detected in brain areas showing neurofibrillary tangles (Delacourte et al., 1990; Goedert et al., 1992; Flament et al., 1990; Greenberg and Davies, 1990). These brains contain 6-8 mole phosphate per mole tau (Ksiezak-Reding et al., 1992). In tau isolated from PHF (PHF-tau), phosphorylation occurs at several positions (Iqbal et al., 1989; Lee et al., 1991; Hasegawa et al., 1992; Hanger et al., 1998; Bucc et al., 1999).

Alzheimer's disease (AD) and frontotemporal dementia (FTD) are the most common types of primary degenerative dementia associated with a tau pathology, having a prevalence of respectively 42-75% and 8-10% (Brun, 1993; Gustafson, 1993; Ebly et al., 1994). Filamentous tau pathology i.e. neurofibrillary tangles (NFT), are consistently found in AD (Tomlinson and Corsellis, 1984) but may also be found in FTD (Spillantini and Goedert, 1998). Pathological tau proteins are found both in AD and FTD (Venneresch et al., 1995; Delacourte et al., 1996). Studies on brain tissue, however, have suggested that the tau pathology differs between AD and FTD, possibly being related to the degree of phosphorylation (Delacourte et al., 1996). Other forms of dementia associated with a tau pathology include familial FTD, progressive supranuclear palsy (PSP), corticobasal degeneration (CBD) and subacute sclerosing panencephalitis. The role of hyperphosphorylation in the pathology of these tauopathies is at present not well understood.

Dementia with Lewy bodies (DLB) is an illness that presents with progressive dementia or psychosis. Parkinsonian signs, which may be absent or mild at the onset, eventually become common and rigidity is usually severe. Lewy bodies are found profusely in the brainstem, basal forebrain, hypothalamic nuclei and neocortex. Dementia with Lewy bodies is characterized by the relative absence of tangles and hypophosphorylated tau in the brain. Parkinson's disease (PD) is a type of Lewy Body disease occurring in the

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

3

middle or late life, with very gradual progression and a prolonged course. It can be considered as an example of neuronal system disease, involving mainly the nigrostriatal dopaminergic system. Dementia with Lewy bodies was recently defined as a special form of dementia requiring differential patient management (Lebert et al., 1998; McKeith et al., 1999). Dementia with Lewy bodies, which is sensitive to neuroleptics, is clinically very difficult to differentiate from Alzheimer's disease (McKeith et al., 1996; Ballard et al., 1998). Most patients (more than 75%) are neuropathologically defined as Alzheimer's disease patients while it is estimated that 15 to 25 % of the clinically diagnosed Alzheimer's disease patients have dementia with Lewy bodies (Hooten et al., 1998). As dementia with Lewy bodies is more susceptible to acetylcholinesterase treatment, differentiation of dementia with Lewy bodies from Alzheimer's disease is essential for optimization of treatment (Levy et al., 1994; Petry et al., 1994; Wilcock et al., 1994).

Cerebrospinal fluid (CSF) β -amyloid and CSF-tau have been validated to discriminate Alzheimer's disease from normal aging, depression and Parkinson's disease (Galasko et al., 1998; Kanai et al., 1998; Hulstaert et al., 1999) and these markers are well suited for the differential diagnosis of these disorders (Andreassen et al., 1999b). More controversial, however, is their role in the discrimination of Alzheimer's disease from closely related conditions such as dementia with Lewy bodies and from other dementia associated with tau pathology such as frontotemporal dementia, multi-system atrophy (MSA) and/or progressive supranuclear palsy. At present, no accurate methods exist for the differential diagnosis of these neurological diseases.

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

4

AIMS OF THE INVENTION

It is an aim of the present invention to provide a method for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from another neurological disease.

5 It is an aim of the present invention to provide a method for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from dementia with Lewy bodies.

10 It is an aim of the present invention to provide a method for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from Parkinson's disease without dementia.

It is an aim of the present invention to provide a method for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from multi-system atrophy.

15 It is an aim of the present invention to provide a method for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from progressive supranuclear palsy.

It is an aim of the present invention to provide an *in vitro* method for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from another neurological disease.

20 It is an aim of the present invention to provide an *in vitro* method for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from dementia with Lewy bodies.

25 It is an aim of the present invention to provide an *in vitro* method for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from Parkinson's disease without dementia.

It is an aim of the present invention to provide an *in vitro* method for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from multi-system atrophy.

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

5

It is an aim of the present invention to provide an *in vitro* method for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from progressive supranuclear palsy.

5 It is an aim of the present invention to provide a diagnostic kit for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from another neurological disease.

It is an aim of the present invention to provide a diagnostic kit for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from dementia with Lewy bodies.

10 It is an aim of the present invention to provide a diagnostic kit for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from Parkinson's disease without dementia.

15 It is an aim of the present invention to provide a diagnostic kit for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from multi-system atrophy.

It is an aim of the present invention to provide a diagnostic kit for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from progressive supranuclear palsy.

20 It is an aim of the present invention to provide a method to screen or monitor the effect of compounds which prevent dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease without dementia, multi-system atrophy and/or progressive supranuclear palsy or which treat an individual suffering from dementia with Lewy bodies, an individual suffering from Parkinson's disease without dementia, an individual suffering from multi-system atrophy and/or an individual suffering from progressive supranuclear palsy.

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

6

TABLES

Table 1: Demographic data and CSF results by different diagnostic groups.

Group	Subjects, n (M/F)	Age, y, median, (range)	MMSE n	AB42, pM, median (p25-p75)		Tau, pM, median (p25-p75)		Ptau(181), pM, median (p25-p75)	
				n	Median (p25-p75)	n	Median (p25-p75)	n	Median (p25-p75)
AD	80 (55/45)	72 (53-86)	78	22 (14-24)	69.2 (47.1-96.0)*	13.2 (9.4-17.0)*	14.7 (11.6-19.1)*		
Controls	40 (20/20)	70 (56-84)	20	30 (29-30)	99.3 (75.5-145.3)§	3.0 (2.1-4.0)§	7.8 (6.4-8.9)§		
FTD	69 (42/27)	67 (40-94)	61	22 (16-25)	90.3 (67.0-132.5)§	7.5 (5.2-10.8)§,§	9.4 (8.2-12.3)§,§		
LBD	43 (35/8)	72 (61-87)	37	19 (14-24)	72.2 (53-103)§	5.7 (1.6-9.0)§	8.1 (6.1-10.0)§		
PD	15 (8/7)	70 (51-79)	1	23	72.3 (58.1-99.1)	4.2 (2.2-7.6)§	7.4 (6.9-8.8)§		
MSA	16 (11/5)	64 (42-77)	3	20 (20-22)	91.5 (41.9-113.4)	5.3 (3.8-8.3)§	7.6 (6.2-10.9)§		
PSP	15 (11/4)	67 (64-76)	4	26 (21-27)	96.6 (82.2-101.1)	2.8 (2.0-4.5)§	6.9 (6.1-7.5)§		
CBD	5 (0/5)	70 (57-75)	4	13 (12-15)	70.2 (43.2-71.2)	12.9 (9.8-15.4)	12.7 (9.1-13.1)		

AD = Alzheimer's disease, FTD = frontotemporal dementia, DLB = dementia with Lewy bodies, PD = Parkinson's disease,

MSA = multi-system atrophy, PSP = progressive supranuclear palsy, CBD = corticobasal degeneration

*Significantly different from controls (p<0.001)

§Significantly different from controls (p<0.05)

§§Significantly different from AD (p<0.001)

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

7

Table 2: Comparison of the discriminative power of CSF-tau and CSF-phospho-tau using ROC analysis.

Groups	CSF-tau (AUC \pm SE)	CSF-phospho-tau (AUC \pm SE)	p-value
AD vs controls (n=40)	0.862 \pm 0.038	0.897 \pm 0.032	0.191
AD vs FTD (n=69)	0.711 \pm 0.045	0.754 \pm 0.044	0.049
AD vs DLB (n=43)	0.782 \pm 0.048	0.839 \pm 0.042	0.039
AD vs Parkinson related conditions (n=46)	0.873 \pm 0.035	0.864 \pm 0.037	0.319

Receiver operating curve (ROC) analysis with area under the curve (AUC) and standard error (SE) calculated according to Hanley and McNeil.

- 5 AD = Alzheimer's disease, FTD = frontotemporal dementia, DLB = dementia with Lewy bodies, Parkinson-related conditions include Parkinson's disease without dementia (n=15), multiple system atrophy (n=16) and progressive supranuclear palsy (n=15).

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

8

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention relates to a method for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease (AD) versus an individual suffering from another neurological disease characterized that phospho-tau is used as a neurological marker. More specifically, the present invention relates to a method as described above comprising the steps of:

- determining the level of phospho-tau in said individual;
 - inference that said individual is suffering from a neurological disease other than Alzheimer's disease by comparing the obtained level of phospho-tau in said individual with the level of phospho-tau in individuals suffering from Alzheimer's disease, whereby a decreased level of phospho-tau being an indication that said individual is suffering from a neurological disease other than Alzheimer's disease.
- 'Differential diagnosis of an individual suffering from a neurological disease versus an individual suffering from another neurological disease' as used in the present invention refers to the discrimination between said first neurological disease and other neurological diseases in this way that a certain neurological disease or a certain cause of neurological disorder in an individual is associated with a certain neurodegenerative condition of said individual. The method of the present invention allows the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from a neurological disease other than Alzheimer's disease. In a specific embodiment, the present invention allows the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease (AD) versus an individual suffering from dementia with Lewy bodies (DLB). In another specific embodiment, the present invention allows the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease (AD) versus an individual suffering from Parkinson's disease (PD) without dementia. In another specific embodiment, the present invention allows the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease (AD) versus an individual suffering from multi-system atrophy (MSA). In another specific embodiment, the present invention allows the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease (AD) versus an

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

9

individual suffering from progressive supranuclear palsy (PSP). Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease without dementia, multi-system atrophy and progressive supranuclear palsy as well as other neurological diseases have been described in detail by Wilson et al. (1991) and McKeith et al. (1999).

5 The present invention is based on the finding that the level of phospho-tau in CSF from individuals suffering from dementia with Lewy bodies, from PD without dementia, from MSA or from PSP is significantly decreased compared to the level of phospho-tau in CSF from individuals suffering from Alzheimer's disease. The indication that the level of phospho-tau differs between said neurological diseases, forms the basis for the
10 development of a diagnostic test for the differential diagnosis of said neurological diseases in an individual. Accordingly, the present invention relates to a method for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from dementia with Lewy bodies, versus an individual suffering from Parkinson's disease without dementia, versus an individual suffering from multi-
15 system atrophy and/or versus an individual suffering from progressive supranuclear palsy, said method characterized that phospho-tau is used as a neurological marker.

The method of the invention thus comprises the step of determining the level of phospho-tau in said individual suspected of suffering from AD, from DLB, from PD without dementia, from MSA or from PSP and comparing it with a previously defined phospho-tau level range characteristic for AD, DLB, PD without dementia, MSA or PSP. A level
20 of phospho-tau falling within the previously defined phospho-tau level range for Alzheimer's disease is an indication that said individual is suffering from AD. A level of phospho-tau falling within the previously defined phospho-tau level range for DLB is an indication that said individual is suffering from DLB. A level of phospho-tau falling
25 within the previously defined phospho-tau level range for PD without dementia is an indication that said individual is suffering from PD without dementia. A level of phospho-tau falling within the previously defined phospho-tau level range for MSA is an indication that said individual is suffering from MSA. A level of phospho-tau falling
30 within the previously defined phospho-tau level range for PSP is an indication that said individual is suffering from PSP.

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

10

Accordingly, the present invention relates to a method for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from dementia with Lewy bodies, versus an individual suffering from Parkinson's disease without dementia, versus an individual suffering from multi-system atrophy and/or versus
5 an individual suffering from progressive supranuclear palsy, comprising the steps of:

- determining the level of phospho-tau in said individual;
- inference that said individual is suffering from DLB, from PD without dementia, from MSA and/or from PSP by comparing the obtained level of phospho-tau in said individual with the level of phospho-tau in individuals
10 suffering from AD, whereby a decreased level of phospho-tau being an indication that said individual is suffering from DLB, from PD without dementia, from MSA and/or from PSP.

The level of phospho-tau can be detected *in vitro* as well as *in vivo*. The method for the *in vitro* detection of the level of phospho-tau in an individual comprises the steps of
15 obtaining a sample from said individual, determining the level of phospho-tau in said sample and comparing it with a previously defined phospho-tau level range for said neurological disease.

The term 'sample' refers to any source of biological material, for instance body fluids, brain
20 extract, peripheral blood or any other sample comprising phospho-tau protein. In a preferred embodiment, the level of phospho-tau is determined *in vitro* by analysis of the level of phospho-tau in a body fluid sample of the patient. The term 'body fluid' refers to all fluids that are present in the human body including but not limited to blood, lymph, urine and cerebrospinal fluid (CSF) comprising phospho-tau protein. The blood sample
25 may include a plasma sample or a serum sample.

In a preferred embodiment of the present invention the level of phospho-tau is determined in a cerebrospinal fluid sample taken from the patient. In accordance, the present invention relates to a method as described above, comprising the steps of:

- obtaining a cerebrospinal fluid sample from said individual;
- 30 - determining the level of phospho-tau in said cerebrospinal fluid sample;

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

11

- 5 - inference that said individual is suffering from a neurological disease other than AD such as DLB, PD without dementia, MSA and/or PSP by comparing the obtained level of phospho-tau in said cerebrospinal fluid sample with the level of phospho-tau in a cerebrospinal fluid sample from individuals suffering from AD, whereby a decreased level of phospho-tau being an indication that said individual is suffering from another neurological disease such as DLB, PD without dementia, MSA and/or PSP.
- 10 The level of phospho-tau as measured in the CSF of the individual suspected to suffer from DLB, from PD without dementia, from MSA and/or from PSP is compared with the level of phospho-tau in the CSF of an individual suffering from AD. A decreased level of CSF-phospho-tau is interpreted as an indication of the individual suffering from DLB, from PD without dementia, from MSA and/or from PSP.
- 15 Phospho-tau include all forms of tau that have a phosphorylation on any position of the tau protein sequence, but more specifically it refers to phosphorylations on amino acid positions that are not phosphorylated in human normal tau isolated from adult individuals not suffering from any neurological disorder.
- 'A decreased level of phospho-tau' means that the level of phospho-tau measured in the patient is lower than the level of phospho-tau measured in patients suffering from AD.
- 20 Phospho-tau can be quantified by any method known in the art, including but not limited to the use of antibodies. In a preferred embodiment, phospho-tau is quantified by an immunoassay comprising at least the following steps:
- obtaining a sample from the patient;
 - 25 - bringing said sample into contact with a monoclonal antibody specifically recognizing phospho-tau, under conditions being suitable for producing an antigen-antibody complex;
 - detecting the immunological binding of said antibody to said sample.
- In another embodiment, phospho-tau can be quantified by a sandwich ELISA comprising
- 30 the following steps:
- obtaining a sample from the patient;

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

12

- bringing said sample into contact with an antibody (primary antibody or capturing antibody) recognizing phospho-tau, under conditions being suitable for producing an antigen-antibody complex;
- 5 - bringing said sample into contact with a monoclonal antibody (secondary antibody or detector antibody) specifically recognizing phospho-tau, under conditions being suitable for producing an antigen-antibody complex;
- bringing the antigen-antibody complex into contact with a marker either for specific tagging or coupling with said secondary antibody, with said marker being any possible marker known to the person skilled in the art;
- 10 - possibly also, for standardization purposes, bringing the antibodies in contact with a purified phospho-tau protein or phospho-peptide reactive with both antibodies.

Advantageously, the secondary antibody itself carries a marker or a group for direct or indirect coupling with a marker.

- 15 The expression 'recognizing', 'reacting with', 'immunological binding' or 'producing an antigen-antibody complex' as used in the present invention is to be interpreted that binding between the antigen and antibody occurs under all conditions that respect the immunological properties of the antibody and the antigen.

The expression 'specifically recognizing' as used in the present invention is to be interpreted that said antibody is capable of forming an immunological complex with phospho-tau but not with human normal tau.

Any monoclonal antibody that specifically recognizes phospho-tau can be used in said method for the quantification of phospho-tau. Monoclonal antibodies for use in the quantification of phospho-tau include AT8 (WO 93/08302), AT180 and AT270 (WO 20 95/17429) and AT100 (WO 96/04309). Other antibodies known in the art that specifically recognize phospho-tau can be used as well.

25 Also fragments derived from these monoclonal antibodies such as Fab, F(ab)₂, ssFv ('single chain variable fragment') and other antibody-like constructs that retain the variable region of the antibody, providing they have retained the original binding properties, can be used in a method of the present invention. Such fragments are commonly generated by, for instance, enzymatic digestion of the antibodies with papain, pepsin, or other proteases. It is well

30

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

13

known to the person skilled in the art that monoclonal antibodies, or fragments thereof, can be modified for various uses. Also mini-antibodies and multivalent antibodies such as diabodies, triabodies, tetravalent antibodies and peptabodies can be used in a method of the invention. The preparation and use of these fragments and multivalent antibodies has been

5 described extensively in International Patent Application WO 98/29442. The monoclonal antibodies used in a method of the invention may be humanized versions of the mouse monoclonal antibodies made by means of recombinant DNA technology, departing from the mouse and/or human genomic DNA sequences coding for H and L chains or from cDNA clones coding for H and L chains. Alternatively the monoclonal

10 antibodies used in a method of the invention may be human monoclonal antibodies. The term 'humanized antibody' means that at least a portion of the framework regions of an immunoglobulin is derived from human immunoglobulin sequences.

The antibodies used in a method of the present invention may be labeled by an appropriate label of the enzymatic, fluorescent, or radioactive type.

15 The method for the *in vivo* detection of the level of phospho-tau in an individual comprises the steps of determining the level of phospho-tau in said individual and comparing it with a previously defined phospho-tau level range characteristic for AD, DLB, PD without dementia, MSA or PSP. In an embodiment of the invention, phospho-tau can be quantified by *in vivo* imaging. Phospho-tau can be quantified *in situ* by non-

20 invasive methods including but not limited to brain imaging methods described by Arbit et al. (1995), Tamada et al. (1995), Wakabayashi et al. (1995), Huang et al. (1996), Sandrock et al. (1996), Mariani et al. (1997). These *in vivo* imaging methods may allow the localization and quantification of phospho-tau, for example, by use of labeled antibodies specifically recognizing phospho-tau.

25 The present invention thus relates to the use of phospho-tau as a neurological marker for the differential diagnosis of an individual suffering from AD versus an individual suffering another neurological disease. The present invention specifically relates to the use of phospho-tau as a neurological marker for the differential diagnosis of an individual

30 suffering from AD versus an individual suffering from DLB, versus an individual

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

14

suffering from PD without dementia, versus an individual suffering from MSA and/or versus an individual suffering from PSP.

The present invention also relates to the use of phospho-tau as a neurological marker for the manufacture of a diagnostic kit for the differential diagnosis of an individual suffering
5 from Alzheimer's disease versus an individual suffering from another neurological disease. The present invention specifically relates to the use of phospho-tau as a neurological marker for the manufacture of a diagnostic kit for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from DLB, versus an individual suffering from PD without dementia, versus an individual
10 suffering from MSA and/or versus an individual suffering from PSP.

The present invention also relates to the use of an antibody that specifically recognizes phospho-tau for the manufacture of a diagnostic kit for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from another neurological disease. The present invention specifically relates to the use of an
15 antibody that specifically recognizes phospho-tau for the manufacture of a diagnostic kit for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from DLB, versus an individual suffering from PD without dementia, versus an individual suffering from MSA and/or versus an individual suffering from PSP.

In accordance, the present invention also relates to a diagnostic kit for use in the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from another neurological disease, comprising an antibody that specifically recognizes phospho-tau. The present invention specifically relates to a
20 diagnostic kit for use in the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from DLB, versus an individual suffering from PD without dementia, versus an individual suffering from MSA and/or versus an individual suffering from PSP, comprising an antibody that specifically recognizes phospho-tau.

A possible kit for carrying out the method of the invention is based on an immunoassay
30 and comprises:

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

15

- an antibody (primary antibody) which forms an immunological complex with an epitope of phospho-tau;
- a monoclonal antibody (secondary antibody) which specifically recognizes phospho-tau;
- 5 - a marker either for specific tagging or coupling with said secondary antibody;
- appropriate buffer solutions for carrying out the immunological reaction between the primary antibody and the test sample, between the secondary antibody and the test sample and/or between the bound secondary antibody and the marker;
- 10 - possibly, a purified phospho-tau protein or a phospho-peptide for standardization purposes.

The present invention further relates to the use of a diagnostic kit as described above for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from another neurological disease. The present invention specifically relates to the use of a diagnostic kit as described above for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from DLB, versus an individual suffering from PD without dementia, versus an individual suffering from MSA and/or versus an individual suffering from PSP.

20 The invention also relates to a method to screen or monitor the effect on an individual of compounds which prevent or treat Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease without dementia, multi-system atrophy and/or progressive supranuclear palsy.

25 Throughout this specification and the claims which follow, unless the context requires otherwise, the word "comprise", and variations such as "comprises" and "comprising", will be understood to imply the inclusion of a stated integer or step or group of stated integers or steps but not to the exclusion of any other integer or step or group of integers or steps.

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

16

The present invention will now be illustrated by reference to the following examples that set forth particularly advantageous embodiments. However, it should be noted that these examples are illustrative and can not be construed as to restrict the invention in any way.

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

17

EXAMPLES**Subjects and methods**

- 5 14 university centers involved in CSF research were contacted to participate in a multicenter study. Each center was requested to include 500 μ l CSF of exactly 10 AD patients (McKhann et al., 1984) and a minimum of 6 samples from patients with DLB (McKeith et al., 1996) or FTD (Anonymous, 1994). Eight centers complied with these conditions. If CSF was available from patients with PSP (Golbe et al, 1993), CBD (Rinne
- 10 et al., 1994) and multiple system atrophy (MSA) (Colosimo et al., 1995) they were also included in the study. Age-matched controls without neurological and cognitive problems and Parkinson's disease (PD) without dementia (Langston et al., 1992) were included if 10 samples were available per center.
- 15 The study was performed on CSF samples available for research purposes and if required the protocol was reviewed and approved by the local Independent Ethics Committee/Institutional Review Board (IEC/IRB) prior to the study start.
- Samples were collected in polypropylene tubes using lumbar puncture. Because it has
- 20 been demonstrated that freeze-thawing seriously affects β -amyloid₄₂ (A β 42) levels (Andreasen et al., 1999b; Vanderstichele et al., 1998) the number of freeze-thaw cycles was documented. CSF samples that contained > 500 red blood cells per microliter were not included.
- 25 All determinations were performed at Innogenetics (Gent, Belgium) using standard kits for CSF-A β 42 (K-1080, Innogenetics) (Andreasen et al., 1999b; Vanderstichele et al., 1998), hTau (K-1032, Innogenetics)(Vandermeeren et al., 1993; Blennow et al., 1995; Van de Voorde et al., 1995) and a research version of the INNOTEST PHOSPHO-TAU. The phospho-tau kit is developed using a human-specific antibody, HT7, for capturing
- 30 and a phospho-threonine-181-specific antibody, AT270, for detection (Goedert et al., 1994). As a standard, a synthetic peptide (Ac-

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

18

P₁₃₄RGAAIPGQKGGQANATRIPAKTPPAPKT(p)PPSSGE₁₃₇-NH₂) with the corresponding threonine 181 phosphorylated was used. The reliability and performance of the phospho-tau assay was monitored using 5 pooled CSF samples, covering the performance range of the assay.

5

Statistical methods

Normal distribution of CSF-tau, A β 42 and phospho-tau were tested using the Shapiro-Wilk test and if normality was rejected, non-parametric (Kruskal-Wallis) tests were used for comparison. For comparisons with the AD or control group, p-values were adjusted using Dunn's multiple comparison test. Receiver operating curve (ROC) analysis was used to examine the discriminatory power of tau and phospho-tau between AD and controls, DLB, FTD or Parkinson-related conditions, respectively (Hanley and McNeil, 1983). Possible correlations were determined with the Spearman rank correlation coefficient.

15

CSF-phospho-tau levels in the different neurological disease groups

Overall 294 CSF samples were collected from 8 centers. Transportation of CSF samples from one center took longer than 5 days and samples were thawed during transportation. Consequently, new aliquots of these CSF samples were reshipped, apart from one CSF sample (FTD). Five samples from center 2 (5 FTD) and 5 from center 8 (5 PD) were also not assayed because the amount of CSF that was shipped was not sufficient to perform all tests. In summary, 283 CSF samples from the different diagnostic groups (40 controls, 80 AD, 43 DLB, 69 FTD, 15 PD, 15 PSP, 16 MSA and 5 CBD) were assayed for at least one of the biochemical markers (see Table 1). CSF samples were collected between 1985 and 1999. The percentage of males in the group of patients with DLB is high, as expected.

25

The levels of phospho-tau and their confidence intervals were determined on five QC samples which were used to monitor the performance of the phospho-tau tests. Values for all QC samples fell within the established criteria (results not shown).

30

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

19

Center effects were observed for A β 42 and tau, but not for phospho-tau in the AD group. An effect of freeze-thawing was observed ($p < 0.0001$) for A β 42, but not for tau and phospho-tau and was particularly pronounced in the AD and DLB groups. The effect was

5 further confirmed in the analysis of CSF from center 03. These samples have been assayed previously on site for both tau and A β 42 and were re-assayed at Innogenetics (Gent, Belgium) after two freeze-thaw cycles. An overall 20% reduction of CSF-A β 42 was observed in 8 of the 10 control samples.

10 No effect of age on the different markers was observed in any of the diagnostic groups. No significant correlation was found between a biomarker and MMSE in the male or female AD group or the total AD group, except for tau and MMSE in the total group (Spearman, $r = -0.275$ [-0.491, -0.059], $p = 0.01$). ApoE genotype did not correlate with CSF-tau or CSF-phospho-tau levels, while a significant correlation was observed for

15 CSF-A β 42 (Spearman, $r = -0.263$ [-0.434, -0.093], $p = 0.003$).

Normality was rejected for A β 42, tau and phospho-tau in all groups and thus analyses were performed using non-parametric tests (Table 1). Significantly increased CSF-tau levels were present in the AD ($p < 0.001$) and FTD group ($p < 0.05$) compared to the control

20 group. Although CSF-tau levels were increased in FTD, levels were significantly higher in the AD group ($p < 0.01$). Using PSP as a reference group, in addition to AD and FTD, CBD had significantly higher CSF-tau levels ($p < 0.05$). For phospho-tau a similar pattern was observed when AD and controls were used to compare. Significantly decreased A β 42

25 levels are only observed in the AD ($p < 0.001$) and DLB group ($p < 0.05$) compared to the control group and comparing A β 42 levels of all groups with the AD group shows a clearly significant difference between AD and FTD ($p < 0.001$). Since in all the Parkinson-related conditions, except CBD, mean levels of biomarkers were within the normal range, these groups were treated as one group in the subsequent analysis.

30 The strong correlation between tau and phospho-tau for all patients, independent of the diagnostic group ($y = 0.75x + 4.6$, $r = 0.904$, $p < 0.001$) suggests that the discrimination

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

20

- between AD and other groups obtained with tau can also be obtained with phospho-tau. Using ROC analysis, the discriminative power of total tau with that of phospho-tau was compared. A significant difference between tau and phospho-tau was observed for discriminating AD versus FTD and AD versus DLB, while no difference was observed for AD compared to controls or to the Parkinson-related conditions (Table 2). Since males are overrepresented in the DLB group, the ROC analysis was also performed for male AD versus male DLB with an AUC of 0.800 ± 0.057 , comparable to females and males together.
- 10 Using the previously established discrimination line that combines CSF-tau and CSF- β -amyloid₄₂ ($A\beta_{42} = 240 \div 1.18 \text{ tau}$) (Hulstaert et al., 1999), the sensitivity (98% (CI 91-99%)) and specificity for the control population (73% (CI 56-85%)) was comparable to the previous studies. The specificity of this discrimination line for FTD is 77% (CI 66-85%), for DLB 67% (CI 52-80%) and for the Parkinson-related conditions 68% (CI 50-81%).
- 15

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

21

REFERENCES

- Andreadis A., Brown W., Kosik K. (1992) Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochem.* 31: 10626-10633.
- 5 Andreason N., Vanmechelen E., Van de Voorde A., Davidsson P., Hesse C., Tarvonen S., R  ih   I., Sourander L., Winblad B., Blennow K. (1998) Cerebrospinal fluid tau protein as a biochemical marker for Alzheimer's disease: a community-based follow-up study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 64: 298-305.
- 10 Andreason N., Minthon L., Clarberg A., Davidsson P., Gottfrics J., Vanmechelen E., Vanderstichele H., Winblad B., Blennow K. (1999a) Sensitivity, specificity and stability of CSF-tau in AD in a community-based patient sample. *Neurology* 53: 1488-1494.
- 15 Andreason N., Hesse C., Davidsson P., Minthon L., Wallin A., Winblad B., Vanderstichele H., Vanmechelen E., Blennow, K. (1999b) Cerebrospinal fluid beta-amyloid(1-42) in Alzheimer disease: differences between early- and late-onset Alzheimer disease and stability during the course of disease. *Arch. Neurol.* 56: 673-680.
- 20 Anonymous (1994) Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia. The Lund and Manchester Groups. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 57: 416-418.
- Arbit E., Cheung N.K., Yeh S.D., Daghighian F., Shang J.J., Cordon-Cardo C., Pentlow K., Canete A., Finn R., Larson S.M. (1995) Quantitative studies of monoclonal antibody targeting to disialogangliosid GD2 in human brain tumors. *Eur. J. Nucl. Med.* 22: 419-426.
- Ballard C., Grace J., McKeith I., Holmes C. (1998) Neuroleptic sensitivity in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. *Lancet* 351: 1032-3.

30

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

22

- Blenow K., Wallin A., Agren H., Spenger C., Siegfried J., Vannechelen E. (1995) Tau protein in cerebrospinal fluid: a biochemical marker for axonal degeneration in Alzheimer disease? *Mol. Chem. Neuropathol.* 26: 231-245.
- 5 Branblett G., Goedert M., Jakes R., Merrick S., Trojanowski J., Lee V. (1993) The abnormal phosphorylation of tau at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates phosphorylation during development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron.* 10: 1089-1099.
- 10 Brion J., Passareiro J., Nuncz J., Flament-Durand J. (1985) Mise en evidence immunologique de la proteinc tau au niveau des lesions de degenerescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer. *Arch. Biol.* 95: 229-235.
- Bruin A. (1993) Frontal lobe degeneration of non-Alzheimer type revisited. *Dementia* 4: 15 126-131.
- Buec L., Delacourte A. (1999) Comparative biochemistry of tau in progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, FTDP-17 and Pick's disease. *Brain Pathol.* 9: 681-693.
- 20 Colosimo C., Albanese A., Hughes A.J., de Bruin V.M., Lees, A.J. (1995) Some specific clinical features differentiate multiple system atrophy (striatonigral variety) from Parkinson's disease. *Arch. Neurol.* 52: 294-298.
- 25 Delacourte A., Dèfossez A. (1986) Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J. Neurol. Sci.* 76: 173-180.
- Delacourte A., Flament S., Dibe E., Hublau P., Sablonniere B., Hemon B., Serey V., 30 Dèfossez A. (1990) Pathological proteins Tau64 and 69 are specifically expressed in the

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

23

somatodendritic domain of the degenerating cortical neurons during Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 80: 111-117.

5 Delacourte A., Buée L., Vermeersch P. (1996) Immunocytochemistry in frontotemporal dementia. In: Pasquier F, Lebert F, Scheltens P. (eds.) *Frontotemporal dementia*. ICG Publications, Dordrecht, The Netherlands. pp. 115-124.

10 Ebly E.M., Parhad I.M., Hogan D.B., Fung T.S. (1994) Prevalence and types of dementia in the very old: results from the Canadian Study of Health and Aging. *Neurology* 44: 1593-1600.

Flament S., Delacourte A. (1990) Tau Marker? *Nature* 346: 6279.

15 Galasko D., Chang L., Motter R., Clark C.M., Kaye J., Knopman D., Thomas R., Kholodenko D., Schenk D., Lieberburg I., Miller B., Green R., Basheer R., Kertiles L., Boss M.A., Seubert P. (1998) High cerebrospinal fluid tau and low amyloid beta42 levels in the clinical diagnosis of Alzheimer disease and relation to apolipoprotein E genotype. *Arch. Neurol.* 55: 937-945.

20 Goedert M., Spillantini M.G., Jakes R., Rutherford D., Crowther R.A. (1989) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3: 519-526.

25 Goedert M., Spillantini M.G., Cairns N.J., Crowther R.A. (1992) Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8: 159-168.

30 Goedert M., Jakes R., Crowther R., Six J., Lübke U., Vandenneeren M., Cras P., Trojanowski J.Q., Lee V. (1993) The abnormal phosphorylation of tau protein at serine 202 in Alzheimer's disease recapitulates phosphorylation during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 90: 5066-5070.

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

24

Goedert M., Jakes R., Crowther R.A., Cohen P., Vanmechelen E., Vandcrmeeren M., Cras P. (1994) Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease: identification of phosphorylation sites in tau protein. *Biochem. J.* 5 301: 871-877.

Goedert M., Crowther R.A., Spillantini M.G. (1998) Tau mutations cause frontotemporal dementias. *Neuron* 21: 955-958.

10 Golbe L.L., Davis P.H. (1993) *Progressive supranuclear palsy*. Baltimore: Williams & Wilkins.

Greenberg S., Davies P. (1990) A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5827-5831. 15

Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Tung Y., Quinlan M., Wisniewski H., Binder L. (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein (tau) in Alzheimer's cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 83: 4913-4917. 20

Gustafson L. (1993) Clinical picture of frontal lobe degeneration of non-Alzheimer type. *Dementia* 4: 143-148.

Hanger D.P., Betts J.C., Loviny T.L., Blackstock W.P., Anderton B.H. (1998) New 25 phosphorylation sites identified in hyperphosphorylated tau (paired helical filament-tau) from Alzheimer's disease brain using nanoelectrospray mass spectrometry. *J. Neurochem.* 71: 2465-2476.

Hanley J.A., McNeil B.J. (1983) A method of comparing the areas under receiver 30 operating characteristic curves derived from the same cases. *Radiology* 148: 839-843.

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

25

- Hasegawa M., Morishima-Kawashima M., Takio K., Suzuki M., Titani K., Ihara Y. (1992) Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in Alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem* 267: 17047-17054.
- 5 Himmler A. (1989) Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts. *Mol. Cell Biol.* 9(4): 1389-96.
- Hooten W.M., Lyketsos C.G. (1998) Differentiating Alzheimer's disease and frontotemporal dementia: receiver operator characteristic curve analysis of four rating
- 10 scales. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 9: 164-174.
- Huang Q., He G., Lan Q., Li X., Qian Z., Chen J., Lu Z., Du Z. (1996) Target imaging diagnosis of human brain glioma. Clinical analysis of 40 cases. *Nucl. Med. Commun.* 17: 311-316.
- 15 Hulstaert F., Blennow K., Ivanoiu A., Schoonderwaldt H.C., Riemenschneider M., De Deyn P.P., Bancher C., Cras P., Wiltfang I., Mehta P.D., Iqbal K., Pottel H., Vannechelen E., Vanderstichele H. (1999). Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid(1-42) and tau levels in CSF. *Neurology* 52: 1555-1562.
- 20 Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Smith A., George L., Tung Y., Zaidi T. (1989) Identification and localisation of a Tau peptide to paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 86: 5646-5650.
- 25 Ishiguro K., Ohno H., Arai H., Yamaguchi H., Urakami K., Park J.M., Sato K., Kobno H., Imahori K. (1999) Phosphorylated tau in human cerebrospinal fluid is a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 270: 91-94.
- Kanai M., Matsubara E., Ise K., Urakami K., Nakashima K., Arai H., Sasaki H., Abe K.,
- 30 Iwatsubo T., Kosaka T., Watanabe M., Tomidokoro Y., Shizuka M., Mizushima K., Nakamura T., Igeta Y., Ikeda Y., Amari M., Kawarabayashi T., Ishiguro K., Igarigaya Y.,

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

26

- Wakabayashi K., Okamoto K., Hirai S., Shoji M. (1998) Longitudinal study of cerebrospinal fluid levels of tau, A beta1-40, and A beta1-42(43) in Alzheimer's disease: a study in Japan. *Ann. Neurol.* 44: 17-26.
- 5 Kondo J., Houda T., Mori H., Hamada Y., Miura R., Ogawara M., Ihara Y. (1988) The carboxyl third of tau is tightly bound to paired helical filaments. *Neuron* 1: 827-834.
- Kosik K.S., Joachim C.L., Selkoe D.J. (1986) Microtubule-associated protein tau is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 83: 4044-4048.
- 10 Ksiezak-Reding H., Liu W.K., Yen S.H. (1992) *Brain Res.* 597: 209-219.
- Langston J.W., Widner H., Goetz C.G., Brooks D., Fahn S., Freeman T., Watts R. (1992). Core assessment program for intracerebral transplantations (CAPIT). *Mov. Disord.* 7: 2-13.
- 15 Lebert F., Pasquier F., Souliez L., Petit H. (1998) Tacrine efficacy in Lewy body dementia. *Int.J.Geriatr.Psychiatry* 13: 516-519.
- 20 Lee V., Balin B., Otvos L., Trojanowski J. (1991) A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal tau. *Science* 251(4994): 675-8.
- Levy R., Eagger S., Griffiths M., Perry E., Honavar M., Daen A., Lantos P. (1994) Lewy bodies and response to tacrine in Alzheimer's disease. *Lancet* 343: 176-178.
- 25 Lewis S., Wang D., Cowan N. (1988) Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with Tau protein. *Science* 242: 936-939.
- 30 Mariani G., Laschi A., Pau A., Villa G., Motta C., Calcagno G., Taddei G.Z., Castellani P., Syrigos K., Dorcaratto A., Epenetos A.A., Zardi L., Viale G.A. (1997) A pilot

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

27

pharmacokinetic and immunoscintigraphic study with the technetium-99m labelled monoclonal antibody BC-1 directed against oncofetal fibronectin in patients with brain tumours. *Cancer* 15: 2484-2489.

- 5 McKeith I.G., Galasko D., Kosaka K., Perry E.K., Dickson D.W., Hansen L.A., Salmon D.P., Lowe J., Mirra S.S., Byrne E.J., Lennox G., Quinn N.P., Edvardsson J.A., Ince P.G., Bergeron C., Burns A., Miller B.L., Lovestone S., Collerton D., Jansen E.N., Ballard C., de Vos R.A., Wilcock G.K., Jellinger K.A., Perry, R.H. (1996) Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the consortium on DLB international workshop. *Neurology* 47: 1113-1124.

McKeith I.G., O'Brien J.T., Ballard C. (1999) Diagnosing dementia with Lewy bodies. *Lancet* 354: 1227-1228.

- 15 Mc Khann G., Drachman D., Folstein M., Katzman R., Price D., Stadlan E.M. (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report on the NINCDS-ADRDA Work group under the auspices of department of health and human services task force on Alzheimer's disease. *Neurology* 34: 939-944.

- 20 Perry E.K., Haroutunian V., Davis K.L., Levy R., Lantos P., Fagher S., Honavar M., Dean A., Griffiths M., McKeith I.G., et al. (1994) Neocortical cholinergic activities differentiate Lewy body dementia from classical Alzheimer's disease. *Neuroreport* 5: 747-749.

- 25 Rinne J.O., Lee M.S., Thompson P.D., Marsden C.D. (1994). Corticobasal degeneration. A clinical study of 36 cases. *Brain* 117 (Pt 5): 1183-1196.

Sandrock D., Verheggen R., Helwig A.T., Münz D.L., Markakis E., Emrich D. (1996) Immunoscintigraphy for the detection of brain abscesses. *Nucl. Med. Commun.* 17: 311-

- 30 316.

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

28

- Selden S., Pollard T. (1983) Phosphorylation of microtubule-associated proteins regulates their interaction with actin filaments. *J. Biol. Chem.* 258(11): 7064-71.
- 5 Spillantini M.G., Goedert M. (1998) Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 21: 428-433.
- Tamada K., Fujinaga S., Watanabe R., Yamashita R., Takuchi Y., Osano M. (1995) Specific deposition of passively transferred monoclonal antibodies against herpes simplex virus type 1 in rat brain infected with the virus. *Microbiol-Immunol.* 39: 861-871.
- 10 Tomlinson B.E., Corsellis J.A.N. (1984) Ageing and the demtias. *In: Elume Adams J., Corsellis J.A.N., Duchon L.W. (eds.) Greenfield's neuropathology.* Edward Arnold, London, UK. pp. 951-1025.
- 15 Vandermeeren M., Mercken M., Vanmechelen E., Six J., Van de Voorde A., Martin J.J., Cras P. (1993) Detection of tau proteins in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Neurochem.* 61: 1828-1834.
- 20 Van de Voorde A., Vanmechelen E., Vandermeeren M., Dessaint F., Beeckman W., Cras P. (1995) Detection of tau in cerebrospinal fluid. *In: Iqbal K., Mortimer J. A., Winblad B. and Wisniewski H. M. Alzheimer's disease: Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders.* John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore. pp. 189-195.
- 25 Vanderstichele H., Blennow K., D'Heuvaert N., Buyse M.-A., Wallin A., Andreasen N., Scudot P., Van de Voorde A., Vanmechelen, E. (1998) Development of a specific diagnostic test for measurement of β -amyloid(1-42) [β A₄(1-42)] in CSF. *In: Fisher A., Hanin A. and Yoshida M. Progress in Alzheimer's and Parkinson's diseases.* Plenum Press, New York and London. pp. 773-778.
- 30

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

29

- Verniersch P., Bordet R., Ledoze F., Ruchoux M.M., Chapon F., Thomas P., Destee A., Lechevallier B., Delacourte A. (1995) C R Demonstration of a specific profile of pathological Tau proteins in frontotemporal dementia cases. *Acad. Sci.* 318: 439-445.
- 5 Vigo-Pelfrey C., Scubert P., Barbour R., Blomquist C., Lee M., Lee D., Coria F., Chang L., Miller B., Lieverburg I., et al. (1995) Elevation of microtubule-associated protein tau in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Neurology* 45: 788-793.
- Wakabayashi T., Yoshida J., Okada H., Sugita K., Itoh K., Tadokoro M., Ohshima M.
10 (1995) Radioimaging of human glioma by indium-111 labelled G-22 anti-glioma monoclonal antibody. *Noshuyo-Byori* 12: 105-110.
- Wilcock G.K., Scott M.I. (1994) Tacrine for senile dementia of Alzheimer's or Lewy
body type. *Lancet* 344: 544-544.
- 15 Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AS, Root RK (1991) *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 12th Edition, McGraw-Hill Inc, NY, USA.
- 20 Wood J., Mirra S., Pollock N., Binder L. (1986) Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 83: 4040-4043.

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

30

CLAIMS

- 1) A method for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from another neurological disease characterized that phospho-tau is used as a neurological marker.
- 5
- 2) A method according to claim 1 comprising the steps of:
- determining the level of phospho-tau in said individual;
 - inference that said individual is suffering from a neurological disease other than Alzheimer's disease by comparing the obtained level of phospho-tau in said individual with the level of phospho-tau in individuals suffering from Alzheimer's disease, whereby a decreased level of phospho-tau being an indication that said individual is suffering from a neurological disease other than Alzheimer's disease.
- 10
- 3) A method according to any of claims 1 to 2 further characterized that an individual suffering from Alzheimer's disease is differentially diagnosed versus an individual suffering from dementia with Lewy bodies, versus an individual suffering from Parkinson's disease without dementia, versus an individual suffering from multi-system atrophy and/or versus an individual suffering from progressive supranuclear palsy.
- 15
- 20
- 4) A method according to claim 3 comprising the steps of:
- determining the level of phospho-tau in said individual;
 - inference that said individual is suffering from dementia with Lewy bodies, from Parkinson's disease without dementia, from multi-system atrophy and/or from progressive supranuclear palsy by comparing the obtained level of phospho-tau in said individual with the level of phospho-tau in individuals suffering from Alzheimer's disease, whereby a decreased level of phospho-tau being an indication that said individual is suffering from dementia with Lewy bodies, from Parkinson's disease
- 25
- 30

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

31

without dementia, from multi-system atrophy and/or from progressive supranuclear palsy.

- 5 5) A method according to any of claims 1 to 4 further characterized that said method is carried out *in vitro*, on a sample obtained from said individual.
- 6) A method according to claim 5 further characterized that said sample is taken from the cerebrospinal fluid or from blood derivatives of said individual.
- 10 7) A method according to claim 6 further characterized that said method comprises the steps of:
- obtaining a cerebrospinal fluid sample from said individual;
 - determining the level of phospho-tau in said cerebrospinal fluid sample;
 - inferring that said individual is suffering from a neurological disease other
- 15 than Alzheimer's disease such as dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease without dementia, multi-system atrophy and/or progressive supranuclear palsy by comparing the obtained level of phospho-tau in the cerebrospinal fluid sample of said individual with the level of phospho-tau
- 20 in a cerebrospinal fluid sample of individuals suffering from Alzheimer's disease, whereby a decreased level of phospho-tau being an indication that said individual is suffering from a neurological disease other than Alzheimer's disease such as dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease without dementia, multi-system atrophy and/or progressive supranuclear palsy.
- 25 8) Method according to any of claims 1 to 7 further characterized that the level of phospho-tau is determined immunologically, making use of an antibody that specifically recognizes phospho-tau.

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

32

- 9) Use of phospho-tau as a neurological marker for the manufacture of a diagnostic kit for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from another neurological disease.
- 5 10) Use of phospho-tau as a neurological marker for the manufacture of a diagnostic kit for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from dementia with Lewy bodies, versus an individual suffering from Parkinson's disease without dementia, versus an individual suffering from multi-system atrophy and/or versus an individual suffering from progressive
10 supranuclear palsy.
- 11) Use of an antibody that specifically recognizes phospho-tau for the manufacture of a diagnostic kit for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from another neurological disease.
15
- 12) Use of an antibody that specifically recognizes phospho-tau for the manufacture of a diagnostic kit for the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from dementia with Lewy bodies, versus an individual suffering from Parkinson's disease without dementia, versus an
20 individual suffering from multi-system atrophy and/or versus an individual suffering from progressive supranuclear palsy.
- 13) A diagnostic kit for use in the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from another neurological disease.
25
- 14) A diagnostic kit for use in the differential diagnosis of an individual suffering from Alzheimer's disease versus an individual suffering from dementia with Lewy bodies, versus an individual suffering from Parkinson's disease without dementia, versus an
30 individual suffering from multi-system atrophy and/or versus an individual suffering from progressive supranuclear palsy.

WO 02/03073

PCT/EP01/07029

33

- 15) Method to screen or monitor the effect on an individual of compounds which prevent or treat Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease without dementia, multi-system atrophy and/or progressive supranuclear palsy, said method comprising the step of determining the level of phospho-tau in said individual.
- 5

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. CT/EP 01/07029
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) MEDLINE, EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 133, no. 9, 28 August 2000 (2000-08-28) Columbus, Ohio, US; abstract no. 117039, E. VANMECHELEN ET AL.: "Quantification of tau phosphorylated at threonine 181 in human cerebrospinal fluid: a sandwich ELISA with a synthetic phosphopeptide for standardization." page 328; column 1; XPO02154344 abstract & NEUROSCI. LETT., vol. 285, no. 1, 2000, pages 49-52, --- -/-	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the priority date of another citation or other special reason (as specified) "C" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "T" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
4 December 2001	11/12/2001	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5810 (Attention 2) Tel. + (31-70) 540-2010, Tx. 31 691 apo.nl, Fax. (+31-70) 540-3010	Authorized officer Griffith, G	

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 2000)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 01/07029

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ²	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DATABASE MEDLINE 'Online' US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; STRONG C ET AL: "Abnormally phosphorylated tau protein in senile dementia of Lewy body type and Alzheimer disease: evidence that the disorders are distinct." retrieved from STM Database accession no. 96307681 XP002154345 abstract & ALZHEIMER DISEASE AND ASSOCIATED DISORDERS, (1995 WINTER) 9 (4) 218-22., -----	1-15
Y	US 5 601 985 A (TROJANOWSKI JOHN Q ET AL) 11 February 1997 (1997-02-11) abstract column 8, paragraph 2; claim 3 -----	1-15
Y	US 6 008 024 A (VAN DE VOORDE ANDRE ET AL) 28 December 1999 (1999-12-28) claims 1,4,5,8 & WO 95 17429 A 29 June 1995 (1995-06-29) cited in the application -----	1-15

Form PCT/ISA/210 (revised on 04 second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 01/07029

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5601985	A 11-02-1997	US 5733734 A	31-03-1998
US 6008024	A 28-12-1999	AU 698383 B2	29-10-1998
		AU 1273695 A	10-07-1995
		CA 2178212 A1	29-06-1995
		WO 9517429 A1	29-06-1995
		EP 0737208 A1	16-10-1996
		JP 9506771 T	08-07-1997

Form PCT/ISBA/210 (patent family members) July 1998

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, S D, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 フーホ・ファンデルスティヘレ
ベルギー、ベ - 9 0 0 0 hent、タインウェイクストラート 4 3 番

(72) 発明者 フランク・フルスタート
ベルギー、ベ - 9 0 5 0 hentブルッヘ、クラファープール 1 5 番

F ターム(参考) 2G045 DA36 FB03 JA01
4C084 AA17 CA62 NA14 ZA011 ZA021 ZA161 ZA941 ZC781

专利名称(译)	神经疾病的单独诊断		
公开(公告)号	JP2004502939A	公开(公告)日	2004-01-29
申请号	JP2002508084	申请日	2001-06-21
[标]申请(专利权)人(译)	Innogenetics公司南玫瑰汾笔记本闭嘴基因创新有限公司		
申请(专利权)人(译)	Innogenetics公司, Namuroze芬恩笔记本闭嘴		
[标]发明人	エウヘーンファンメヘレン フーホファンデルステイヘレ フランクフルスタート		
发明人	エウヘーン・ファンメヘレン フーホ・ファンデルステイヘレ フランク・フルスタート		
IPC分类号	G01N33/53 A61K45/00 A61P21/00 A61P25/16 A61P25/28 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/68		
CPC分类号	A61P21/00 A61P25/16 A61P25/28 G01N33/6896 G01N2800/28 G01N2800/2821 G01N2800/2835		
FI分类号	G01N33/53.D A61K45/00 A61P21/00 A61P25/16 A61P25/28 G01N33/15.Z G01N33/50.Z		
F-TERM分类号	2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/JA01 4C084/AA17 4C084/CA62 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA021 4C084/ZA161 4C084/ZA941 4C084/ZC781		
代理人(译)	田中, 三夫		
优先权	2000870151 2000-06-30 EP 60/218907 2000-07-18 US		
其他公开文献	JP4851052B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种用于鉴别患有阿尔茨海默病的个体与患有神经疾病的另一个个体的鉴别诊断的方法。更具体地, 本发明从阿尔茨海默氏病提供了一个单独的痛苦, 雷维小体的痛苦痴呆有关的个人, 个人从PD无患痴呆, 个体从多系统萎缩症和患/或来自进行性核上性麻痹的个体痛苦提供了一种鉴别诊断的方法, 该方法包括磷酸 - 其中, 所述tau蛋白被用作神经学标记物。

表1:異なる診断群による人口統計学的数据およびCSFの結果

群	対象数	年齢, M±SD	MMSE	AM4, pM	タウ pM, pM	
					メジアン(p25-p75)	メジアン(p25-p75)
(男/女)	(健常)	歳		メジアン		
				(p25-p75)	(p25-p75)	
AD	80 (53/45)	72 (53-86)	78 22 (14-24)	69.2 (47.1-96.0)*	13.2 (9.4-17.0)*	14.7 (11.6-19.1)*
对照	40 (20/20)	70 (56-84)	20 30 (29-30)	99.3 (75.5-145.3)\$	3.0 (2.1-4.0)\$	7.8 (6.4-9.9)\$
FTD	69 (42/27)	67 (40-94)	61 22 (16-25)	90.3 (67.4-132.5)\$	7.5 (5.2-10.8)\$	9.4 (8.2-12.3)\$
LBD	43 (33/8)	72 (61-87)	37 19 (14-24)	72.2 (53-103)\$	5.7 (1.6-9.0)\$	8.1 (6.1-10.0)\$
PD	15 (8/7)	70 (51-79)	1 23	72.3 (58.1-99.1)	4.2 (2.2-7.6)\$	7.4 (6.9-8.8)\$
MSA	16 (11/5)	64 (42-77)	3 20 (20-22)	91.5 (41.9-133.4)	5.3 (3.8-8.3)\$	7.6 (6.2-10.9)\$
PSY	15 (11/4)	67 (64-76)	4 26 (21-27)	96.6 (82.2-101.1)	2.8 (2.0-4.5)\$	6.9 (6.1-7.5)\$
CBD	5 (0/5)	70 (57-75)	4 13 (12-15)	70.2 (45.2-71.2)	12.9 (9.8-15.4)	12.7 (9.1-13.1)

AD=アルツハイマー病, FTD=前頭側頭型痴呆, LBD=レネビー(体老性)痴呆, PD=パーキンソン病,

MSA=多系統萎縮症, PSP=進行性核上性麻痺, CBD=皮質基底節変性

*対照とは有意に異なる(p<0.001)