

(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2004-504366
(P2004-504366A)

(43) 公表日 平成16年2月12日(2004.2.12)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/47	C O 7 K 14/47	2 G O 4 5
A61K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 3
A61P 3/02	A 6 1 P 3/02 1 O 4	4 C O 8 4
A61P 5/14	A 6 1 P 5/14	4 H O 4 5
A61P 17/02	A 6 1 P 17/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 95 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2002-513931 (P2002-513931)
 (86) (22) 出願日 平成13年7月25日 (2001.7.25)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年1月24日 (2003.1.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2001/001066
 (87) 国際公開番号 W02002/008449
 (87) 国際公開日 平成14年1月31日 (2002.1.31)
 (31) 優先権主張番号 60/220,813
 (32) 優先日 平成12年7月25日 (2000.7.25)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

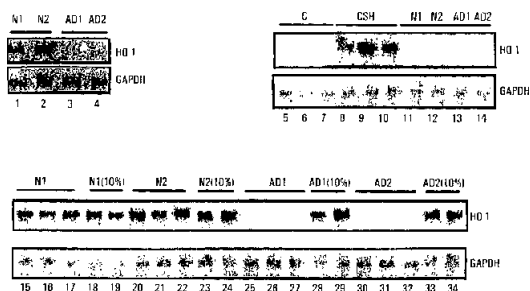
(71) 出願人 500471973
 ザ、サー、モーティマー、ビー、デイビス
 - ジュウィッシュ、ゼネラル、ホスピタル
 THE SIR MORTIMER B.
 DAVIS - JEWISH GENER
 AL HOSPITAL
 カナダ国ケベック州、モントリオール シ
 ユマン、ド、ラ、コート-サント-カトリ
 ーヌ、3755 レディー、デイビス、イン
 スチット フォー、メディカル、リサ
 ーチ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 痴呆性疾患の診断および予知試験としてのHO-1 サプレッサー

(57) 【要約】

本発明は、痴呆性疾患の開始を予測し、診断し、または予知するための改良法に関する。上記方法は、患者から得られる組織または体液中のヘムオキシゲナーゼ - 1 サプレッサー (HOS) 活性および/または因子のレベルを測定し、このレベルを上記HOS因子または活性のレベルを少なくとも1名の対照者から得た相当する組織または体液中の相当するHOS活性および/または因子のレベルと比較することを含んでなる。組織または体液は、血液、血漿、リンパ球、脳脊髄液、尿、唾液、上皮または繊維芽細胞が適当である。この方法は、痴呆性疾患がアルツハイマー病、加齢に伴う認識低下、軽度認識障害、痴呆を伴うパーキンソン病、進行性核上性麻痺、血管性(すなわち、多発脳梗塞性)痴呆、レヴィー体痴呆、ハンチントン病、ダウン症候群、正常圧水頭症、皮質基核神経節変性症、多系統萎縮症、頭部外傷、脳梅毒、クロイツフェルト・ヤコブ病および他のプリオン疾患、HIVおよび他の脳炎、および甲状腺機能低下症およびビタミンB12欠損症のような代謝障害のいずれかである場合に有用である。この方法は、鬱病の「疑似痴呆」



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヘムオキシゲナーゼ - 1 サプレッサー (HOS) 因子であって、ヘムオキシゲナーゼ - 1 (HO - 1) のレベルの増加を減衰させることを特徴とする、因子。

【請求項 2】

前記減衰が、HO - 1 のレベルを増加させることができる実験薬品または処理へ暴露することに対応して起こる、請求項 1 に記載の因子。

【請求項 3】

因子がタンパク質を含んでなる、請求項 1 に記載の因子。

【請求項 4】

実験薬品または処理への暴露が、酸化ストレス、金属イオン、アミノ酸類似体、スルフヒドリル剤、インターロイキン - 1、腫瘍壊死因子 - (TNF -)、および高体温のいずれか 1 種以上への暴露を含んでなる、請求項 2 に記載の因子。

【請求項 5】

スルフヒドリル剤がシステアミンおよびホモシステインからなる群から選択される、請求項 4 に記載の因子。

【請求項 6】

スルフヒドリル剤がシステアミンである、請求項 5 に記載の因子。

【請求項 7】

患者から得た組織または体液中のヘムオキシゲナーゼ - 1 サプレッサー (HOS) 因子または活性のレベルを測定し、

前記 HOS 因子または活性のレベルを、少なくとも 1 名の対照者から得た相当する組織または体液中の相当する HOS 因子または活性のレベルと比較する

ことを含んでなる患者の痴呆性疾患の評価方法であって、

これによって、前記 HOS 因子または活性のレベルが、少なくとも 1 名の対照者から得た相当する組織または体液中の HOS 因子または活性の相当するレベルより高いときには、前記患者は痴呆性疾患に罹っており、

痴呆性疾患の開始を予測し、痴呆性疾患を診断し、または予知するのに用いることを特徴とする、方法。

【請求項 8】

痴呆性疾患に罹っている患者において、HO - 1 依存性の痴呆性疾患と HO - 1 非依存性の痴呆性疾患とを区別するための診断方法であって、

痴呆性疾患に罹っている患者から得た組織または体液中のヘムオキシゲナーゼ - 1 サプレッサー (HOS) 因子または活性のレベルを測定し、

前記 HOS 因子または活性のレベルを、少なくとも 1 名の対照者から得た相当する組織または体液中の相当する HOS 因子または活性のレベルと比較する

ことを含んでなり、

HOS 因子または活性のレベルが、少なくとも 1 名の対象者から得た相当する組織または体液中の相当する HOS 因子または活性のレベルから有意に異なっているときには、患者は HO - 1 依存性痴呆性疾患に罹っており、HOS 因子または活性のレベルが、少なくとも 1 名の対象者から得た相当する組織または体液中の相当する HOS 因子または活性のレベルから有意に異なっていないときには、患者は HO - 1 非依存性痴呆性疾患に罹っていることを特徴とする、方法。

【請求項 9】

組織または体液が、血液、血漿、リンパ球、脳脊髄液、尿、唾液、上皮、および繊維芽細胞から選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

組織または体液が、血液、血漿、リンパ球、脳脊髄液、尿、唾液、上皮、および繊維芽細胞から選択される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

組織または体液が、血液、血漿、リンパ球、脳脊髄液、尿、唾液、上皮、および繊維芽細胞から選択される、請求項 8 に記載の方法。

10

20

30

40

50

痴呆性疾患が、アルツハイマー病、加齢に伴う認識低下、軽度認識障害、痴呆を伴うパーキンソン病、進行性核上性麻痺、血管性（すなわち、多発脳梗塞性）痴呆、レヴィー体痴呆、ハンチントン病、ダウン症候群、正常圧水頭症、皮質基底核神経節変性症、多系統萎縮症、頭部外傷、脳梅毒、クロイツフェルト・ヤコブ病および他のプリオン疾患、HIVおよび他の脳炎、および、甲状腺機能低下症およびビタミンB12欠損症のような代謝障害からなる群から選択される、請求項7に記載の方法。

【請求項12】

対照者が同年齢の正常者である、請求項7に記載の方法。

【請求項13】

痴呆性疾患を予知する目的で用い、且つ対照者が相当する組織または体液を別の時期に得ていた患者である、請求項7に記載の方法。 10

【請求項14】

HO-1依存性の痴呆性疾患がアルツハイマー病である、請求項8に記載の方法。

【請求項15】

対照者が同年齢の正常者である、請求項8に記載の方法。

【請求項16】

対照者が相当する組織または体液を別の時期に得ていた患者である、請求項8に記載の方法。

【請求項17】

試料中のヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) サプレッサー (HOS) 因子または活性のレベルを評価する方法であって、 20

試料を細胞培養物に暴露し、

この細胞培養物を、HO-1タンパク質またはHO-1をコードするmRNAのレベルを増加することができる実験薬品または処理に暴露し、

HO-1タンパク質またはHO-1をコードするmRNAのレベルを測定し、

前記HO-1タンパク質またはHO-1をコードするmRNAのレベルを、HO-1タンパク質またはHO-1をコードするmRNAの相当する対照レベルと比較することにより

、前記HO-1タンパク質またはHO-1をコードするmRNAのレベルがHOS因子または活性のレベルと逆相関するようにする 30

ことを含んでなる、方法。

【請求項18】

試料中のヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) サプレッサー (HOS) 因子または活性のレベルを評価する方法であって、

試料を請求項1に記載の因子を認識する抗体に暴露し、

免疫複合体を単離して、

この免疫複合体におけるHOS因子または活性のレベルを測定する

ことを含んでなる、方法。

【請求項19】

試料中のヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) サプレッサー (HOS) 因子または活性のレベルを評価する方法であって、 40

試料をレポーター構築物に暴露し、ここでこのレポーター構築物がHO-1プロモーター領域とレポーター遺伝子とを含んでなり、このレポーター遺伝子が検出可能なレポーター活性を有するタンパク質をコードしてなり、

レポーター活性のレベルを測定し、

レポーター活性のレベルをレポーター活性の相当する対照レベルと比較することにより、

レポーター活性のレベルがHOS因子または活性のレベルと逆相関するようにする

ことを含んでなる、方法。

【請求項20】

HOS活性またはHOS因子の阻害剤または活性剤の存在について候補化合物をスクリー 50

ニングする方法であって、

候補化合物を、H O S 活性またはH O S 因子を含んでなることが知られている試料に暴露して；

H O S 活性またはH O S 因子のレベルを、下記 (a) ~ (c) からなる群より選択される方法を用いて評価し；

(a) 試料中のヘムオキシゲナーゼ - 1 (H O - 1) サプレッサー (H O S) 因子または活性のレベルを評価する方法であって、

試料を細胞培養物に暴露し、

この細胞培養物を、H O - 1 をコードする m R N A のレベルを増加することができる実験薬品または処理に暴露し、

H O - 1 タンパク質またはH O - 1 をコードする m R N A のレベルを測定し、

前記H O - 1 タンパク質またはH O - 1 をコードする m R N A のレベルを、H O - 1 タンパク質またはH O - 1 をコードする m R N A の相当する対照レベルと比較することにより

、前記H O - 1 タンパク質またはH O - 1 をコードする m R N A のレベルがH O S 因子または活性のレベルと逆相関するようにする

ことを含んでなる、方法、

(b) 試料中のヘムオキシゲナーゼ - 1 (H O - 1) サプレッサー (H O S) 因子または活性のレベルを評価する方法であって、

試料を請求項 1 に記載の因子を認識する抗体に暴露し、

免疫複合体を単離して、

この免疫複合体におけるH O S 因子または活性のレベルを測定する

ことを含んでなる、方法、および

(c) 試料中のヘムオキシゲナーゼ - 1 (H O - 1) サプレッサー (H O S) 因子または活性のレベルを評価する方法であって、

試料をレポーター構築物に暴露し、ここでこのレポーター構築物がH O - 1 プロモーター領域とレポーター遺伝子とを含んでなり、このレポーター遺伝子が検出可能なレポーター活性を有するタンパク質をコードしてなり、

レポーター活性のレベルを測定し、

レポーター活性のレベルをレポーター活性の相当する対照レベルと比較することにより、レポーター活性のレベルがH O S 因子または活性のレベルと逆相関するようにする

ことを含んでなる、方法；

前記H O S 活性またはH O S 因子のレベルを、相当する対照試料中の相当するH O S 活性またはH O S 因子の対照レベルと比較し、ここで前記対照試料が候補化合物に暴露していないH O S 活性を含んでなることが知られている試料を含んでなる、方法。

【請求項 2 1】

患者から得た組織または体液中のヘムオキシゲナーゼ - 1 (H O - 1) サプレッサー (H O S) 活性のレベルを測定する手段と、

前記H O S 活性を相当する対照組織または体液中の相当するH O S 活性の確立された標準と比較する使用説明書

とを含んでなる、市販パッケージ。

【請求項 2 2】

患者の痴呆性疾患を評価する方法で使用するための、請求項 2 1 に記載の市販パッケージ。

【請求項 2 3】

患者の痴呆性疾患を治療する方法であって、

ヘムオキシゲナーゼ - 1 (H O - 1) m R N A 、タンパク質または活性のレベルを痴呆性疾患の治療に有効な量で増減することによって痴呆性疾患を緩解する化合物を患者に投与することを含んでなり、ヘムオキシゲナーゼ - 1 (H O - 1) m R N A 、H O - 1 タンパク質、H O - 1 活性、H O - 1 サプレッサー (H O S) 因子、およびH O S 活性のいずれ

10

20

30

40

50

か1個のレベルを増減することによって痴呆性疾患を緩解することを特徴とする、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の背景】

発明の分野

本明細書に開示の一部として引用されている本発明者の関係した米国特許第6,210,895号明細書(2001年4月3日)は、アルツハイマー病(AD)および加齢に伴う認識低下(AACD)のような痴呆性疾患を予測し、診断し、および/または予知する方法に関する。本発明は、アルツハイマー病(AD)および加齢に伴う認識低下(AACD)または軽度認識障害(MCI)のような痴呆性疾患を予測し、診断し、予知し、および/または治療するための改良方法、並びにこれらの疾患の原因および進行の研究を容易にする方法および試薬に関する。

10

【0002】

背景技術

アルツハイマー病(AD)は、痴呆を引き起こす神経変性疾患である。「アルツハイマー病(Alzheimer Disease)」および「Alzheimer病(Alzheimer's Disease)」という用語はいずれも当該技術分野で用いられており、これらの用語は同等であり、本明細書および他の文献において互換的に用いられている。ADの最初の検出から終結までの期間は、数年から15年までの範囲であり、この期間中に患者は精神的機能および肉体的機能の制御を両方とも進行的に喪失する可能性がある。この疾患の進行には、かなりの変動がある。患者の多くでは徐々に容赦ない進行が見られるが(一年に30点のFolsteinミニメンタル・ステート・スコア(Folstein mini-mental state score)に対して平均3~4点を喪失する)、ADの症例の約30%ではHaxby et al. (1992)(この文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される)に記載されているように、長期間の安定な初期プラトー期が数年にわたって続くことが見られる。患者のサブグループでは、Mann et al. (1992)(この文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される)に記載されているように、電撃的な速やかに進行する悪化過程が数年にわたって続くことが見られる。他の患者(コーホートの約10%)では、Grossi et al. (1988)(この文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される)に記載されているように、進行速度が遅く年毎に極僅かの減退しか示さない。この不均一性の病理学的、化学的および分子的基礎は、解明されないままである。ADの進行の変わりやすさを見分けることは、重要な臨床的洞察力であり、「非定型的」症例によって示される診断上の困難を説明することができる。

20

30

【0003】

ADの開始を予測しまたはその進行を観察する試みは、限定的にしか成功していない。ある症例では、この疾患の家族性発現があるが、AD疾患の大半は非家族性であると思われる。最近まで(下記参照)この疾患の単純な遺伝子マーカーは決定されていなかった。多くの研究はタンパク質 - アミロイドに集中しており、その沈着がAD患者の脳に見られている。

40

【0004】

しかしながら、近年、本発明者らの関係した米国特許第6,210,895号明細書(2001年4月3日)および公表文献(Schipper et al., 2000)(いずれの文献の内容も、その開示の一部として本明細書に引用される)に記載されているように、本発明者らは、AD、AACD/MCI、および関連神経疾患の予測、診断および予知に有用な診断法を考案した。この診断法は、ADに罹っている患者ではそのリンパ球および血漿中のヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)濃度がかなり低く、従って、そのリンパ球中のHO-1をコードするリボヌクレオチド配列の濃度がかなり低いという測定結果に基づいている。

【0005】

50

HO-1 : ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) は、脳および他の組織でヘムのビリベルジンへの速やかな分解を触媒する酵素である。熱ショックタンパク質スーパーファミリーのこの32 kDaの構成部分は、そのプロモーター領域に熱ショック成分を含み、酸化ストレス、金属イオン、アミノ酸類似体、スルフヒドリル剤、および高体温に应答して速やかにアップレギュレーションを受ける。酸化ストレスに应答して、HO-1の誘導により、ヘムのような酸化促進剤金属ポルフィリンをフリーラジカル掃去能を有する胆汁色素(ビリベルジン、ビリルビン)に分解することによって細胞を保護することができる。ヘムおよび他の細胞内第一鉄キレート化合物は、過酸化水素細胞毒性の高いヒドロキシルラジカルに転換することができる。

【0006】

レーザー走査共焦点顕微鏡法と共に免疫染色法を用いて、AD被験者由来の死後の海馬および側頭皮質のニューロンおよび星状細胞において強いHO-1免疫反応性を観察した。ところが、Schipper et al. (1995) (この文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される)に記載されているように、年齢および死後期間が一致した対照標本の海馬および側頭皮質では中性HO-1染色はかすかであるかまたは存在しなかった。更に、AD標本における神経原繊維もつれおよび老人斑に対するHO-1の同時局在化が一貫していることも示されている。最後に、SDS-PAGE後のAD側頭皮質および海馬由来のタンパク質抽出物のウェスタンブロット法により、HO-1に相当する明確な32 kDaバンドが観察されたが、対照HO-1バンドはかすかであるかまたは見られなかった。これらの結果は、HO-1が対照脳に比較してAD海馬のニューロンおよび星状細胞および大脳皮質でかなり過剰発現することを示しており、ADに冒された組織が慢性的な酸化ストレスを受けているという主張を支持している。

【0007】

AACD/MCI : AACDおよびMCIは、痴呆には達しない認識低下を経験している個人を同定するのに用いられる用語である。これらの用語は同等であり、MCIの方がより最近になって採用された用語であり、本明細書を通じて互換的に用いられる。この診断法の基準(世界保険機構)を満たすには、漸進的であり且つ少なくとも6ヶ月間存在する認識機能の低下の個人または家族による報告が必要である。認識領域の全域で困難があることがあり(大半の症例では記憶が損なわれているが)、これらは定量的認識評価についての異常な挙動によって支持され、年齢および教育標準が相対的に健康な個人について利用し得る者でなければならない(すなわち、患者をその年齢の正常な被験者と比較する)。挙動は、これらの試験についての適当な個体群についての平均値を下回る少なくとも1SDでなければならない。痴呆、または有意な抑鬱または薬物効果がないことがある。大脳の認識障害を引き起こすことが知られている大脳または全身的疾患または症状がないことがある。本発明者らの経験では、臨床的痴呆評価尺度でCDR-5(「痴呆の疑いがある」と分類され且つこれらの例外に見合う総ての患者は、AACD/MCIについての基準にも合う。アルツハイマー病患者の約1/3は、Haxby et al. (1992) (上記文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される)によって記載されているように、一層包括的な認識低下の前に散在性記憶欠損の明確に定義し得る期間を有していた。記憶以外の他の領域を考察するAACD/MCI基準を用いると、同定可能な前兆を有する割合は高くなると思われる。幸運なことには、総てのAACD/MCI患者が減退するとは思われない。有意な数のこれらの被験者が、試験では安定で非進行性の記憶欠損を示すと思われる。

【0008】

関連疾患 : HO-1濃度の測定により、同様な症状を有する他の痴呆性疾患を容易に予測し、診断しまたは予知し、および/またはこれらの疾患をADと区別することもできる。このような他の疾患としては、痴呆を伴うパーキンソン病、進行性核上麻痺、血管性(すなわち、多重梗塞性)痴呆、レヴィー(Lewy)体痴呆、ハンチントン(Huntington)病、ダウン(Down)症候群、正常圧水頭症、皮質基底核神経節変性症(corticobasal ganglionic degeneration)、多系統

10

20

30

40

50

萎縮症 (multisystem atrophy)、頭部外傷、神経梅毒、クロイツフェルト・ヤコブ (Creutzfeldt-Jacob) 病、および他のプリオン疾患、HIV および他の脳炎、および甲状腺機能低下症およびビタミン B12 欠損症のような代謝性疾患が挙げられる。この方法を、鬱病の「疑似痴呆」をアルツハイマー病と区別するのに用いることもできる。

【0009】

HO-1 レベルと AD との関係が決定されることにより、この分野において著しい前進が見られ、極めて早期に予測し、診断し、AD と他の痴呆性疾患を予知するのに用いることができる。しかしながら、早期診断、並びに治療方法および試薬または物質、AD および他の痴呆性疾患の研究の方法および試薬を提供するには、正常対疾病状態における HOS-1 発現を制御する (複数の) 因子および (複数の) 機構を同定することが必要である。更に、AD 患者における HO-1 の減少または存在しないことは試験が陰性であることを示しており、特に診断目的には、疾病の陽性指示薬、すなわち (存在しないことよりも) 存在が疾病と相関する因子を有することが望ましい。更に、HO-1 発現の減少は AD および他の痴呆性疾患の原因よりは効果を表すことがあり、従ってこれらの疾患の開始および進行において積極的な要因の役割を有する成分および事象を同定するには、正常対疾病状態における HOS-1 発現を制御する (複数の) 因子および (複数の) 機構も必要である。

10

【0010】

【発明の概要】

本発明の目的は、AD および他の痴呆性疾患を予測し、診断し、予知し、および/または治療するための改良法、並びにこれらの疾患の原因および進行の研究を促進するための方法および試薬を提供することである。

20

【0011】

有利なことには、本発明の態様では、AD および他の痴呆性疾患の予測、診断または予知に用いられる容易に投与される血液または脳脊髄液試験が提供される。

【0012】

本発明の一側面は、ヘムオキシゲナーゼ-1 サプレッサー (HOS) 因子であって、ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) のレベルの増加を減衰させる因子である。一態様では、このような増加は、HO-1 のレベルを増加させることができる実験薬品または処理への暴露に応答して起こる。例えば、このような実験薬品または処理は、酸化ストレス、金属イオン、アミノ酸類似体、スルフヒドリル剤 (例えば、システアミン、ホモシステイン)、インターロイキン-1、腫瘍壊死因子 (TNF-) および高体温のいずれか1つ以上への暴露を含んでなる。

30

【0013】

本発明のもう一つの側面は、患者から得た組織または体液中のヘムオキシゲナーゼ-1 サプレッサー (HOS) 因子または活性のレベルを測定し、前記の HOS 因子または活性のレベルを、少なくとも1名の対照者から得た相当する組織または体液の HOS 因子または活性の相当するレベルと比較することを含んでなる、患者の痴呆性疾患を評価する方法であって、前記の HOS 因子または活性のレベルが、少なくとも1名の対照者から得た上記組織または体液中の相当する HOS 因子または活性のレベルより高いときには、上記患者が痴呆性疾患に罹っており、上記方法は痴呆性疾患の開始の予測、診断または予知に用いられることを特徴とするものである。

40

【0014】

本発明のもう一つの側面は、痴呆性疾患に罹っている患者において、HO-1 依存性の痴呆性疾患と HO-1 非依存性の痴呆性疾患とを区別する診断方法であって、痴呆性疾患に罹っている患者から得た組織または体液中のヘムオキシゲナーゼ-1 サプレッサー (HOS) 因子または活性のレベルを測定し、前記の HOS 因子または活性のレベルを少なくとも1名の対照者から得た相当する組織または体液の HOS 因子または活性の相当するレベルと比較することを含んでなり、前記の HOS 因子または活性のレベルが少なくとも1名

50

の対照者から得た上記組織または体液中の相当するレベルより高いときには、前記患者が H O - 1 依存性痴呆性疾患に罹っており、前記 H O S 因子または活性のレベルが少なくとも 1 名の対照者から得た上記組織または体液中の相当するレベルと有意差がないときには、患者は H O - 1 非依存性痴呆性疾患に罹っていることを特徴とするものである。

【 0 0 1 5 】

一態様では、本発明のもう一つの側面は、患者における他の痴呆性疾患と鬱病の疑似痴呆とを区別する方法であって、患者から得た組織または体液中のヘムオキシゲナーゼ - 1 サプレッサー (H O S) 因子または活性のレベルを測定し、上記の H O S 因子または活性のレベルを少なくとも 1 名の対照者から得た相当する組織または体液の H O S 因子または活性の相当するレベルと比較することを含んでなり、前記 H O S 因子または活性のレベルが少なくとも 1 名の対照者から得た上記組織または体液中の相当するレベルより高いときには、患者が鬱病の疑似痴呆以外の痴呆性疾患に罹っており、このような方法を用いて鬱病の疑似痴呆を他の痴呆性疾患と区別することを特徴とするものである。

10

【 0 0 1 6 】

上記の方法を用いて評価される痴呆性疾患としては、アルツハイマー病、加齢に伴う認識低下、軽度認識障害、痴呆を伴うパーキンソン病、進行性核上麻痺、血管性 (すなわち、多重梗塞性) 痴呆、レヴィー体痴呆、ハンチントン病、ダウン症候群、正常圧水頭症、皮質基底核神経節変性症、多系統萎縮症、頭部外傷、神経梅毒、クロイツフェルト・ヤコブ病および他のプリオン疾患、H I V および他の脳炎、および甲状腺機能低下症およびビタミン B 1 2 欠損症のような代謝性疾患が挙げられるが、これらに限定されない。更に、上記したように、これらの方法は、鬱病の「疑似痴呆」をアルツハイマー病と区別するのにも用いることができる。

20

【 0 0 1 7 】

上記の組織または体液の例としては、血液、血漿、リンパ球、脳脊髄液、尿、唾液、上皮、および繊維芽細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 1 8 】

上記の対照組織または体液は、例えば、少なくとも 1 名の正常な年齢の一致する対照者、または別の時期の、一態様では初期の、患者から得ることができる。

【 0 0 1 9 】

更にもう一つの態様は、試料中のヘムオキシゲナーゼ - 1 (H O - 1) サプレッサー (H O S) 因子または活性のレベルを評価する方法であって、試料を細胞培養物に暴露し、細胞培養物を H O - 1 タンパク質または H O - 1 をコードする m R N A のレベルを増加させることができる実験薬品または処理に暴露し、H O - 1 タンパク質または H O - 1 をコードする m R N A のレベルを測定し、前記の H O - 1 タンパク質または H O - 1 をコードする m R N A のレベルを相当する H O - 1 タンパク質または H O - 1 をコードする m R N A の対照レベルと比較することを含んでなり、これにより、上記の H O - 1 タンパク質または H O - 1 をコードする m R N A が H O S 因子または活性のレベルと逆相関するようにするものである。

30

【 0 0 2 0 】

本発明は、痴呆性疾患の患者由来の試料中のヘムオキシゲナーゼ - 1 (H O - 1) サプレッサー (H O S) 因子と推定されるもの、並びに H O S 活性を含んでなる部分精製された画分、および相当する H O S 因子と推定されるものが存在することの証拠も提供する。

40

【 0 0 2 1 】

従って、本発明のもう一つの側面は、試料中のヘムオキシゲナーゼ - 1 (H O - 1) サプレッサー (H O S) 因子または活性のレベルを評価する方法であって、試料を細胞培養物に暴露し、細胞培養物を H O - 1 タンパク質または H O - 1 をコードする m R N A のレベルを増加させることができる実験薬品または処理に暴露し、H O - 1 タンパク質または H O - 1 をコードする m R N A のレベルを測定し、前記の H O - 1 タンパク質または H O - 1 をコードする m R N A のレベルを相当する H O - 1 タンパク質または H O - 1 をコードする m R N A の対照レベルと比較することを含んでなり、これによって、前記の H O - 1 タ

50

ンパク質またはH O - 1をコードするm R N AのレベルはH O S 因子または活性のレベルと逆相関するようにするものである。

【 0 0 2 2 】

上記の相当するH O - 1タンパク質またはm R N Aのレベルは、例えば、前記実験薬品または処理に暴露したが、前記実験薬品または処理に暴露する前に前記試料へは暴露していない相当する細胞培養物中のH O - 1タンパク質またはm R N Aのレベルを評価することによって得ることができる。

【 0 0 2 3 】

本発明のもう一つの側面は、H O S 因子を認識するポリクローナルおよびモノクローナル抗体、並びに後者のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞である。

10

【 0 0 2 4 】

本発明の更にもう一つの側面は、試料中のヘムオキシゲナーゼ - 1 (H O - 1) サプレッサー (H O S) 因子または活性のレベルを評価する方法であって、前記試料をH O S 因子を認識する抗体に暴露し、免疫複合体を単離し、免疫複合体中のH O S 因子または活性のレベルを測定することを含んでなる方法である。

【 0 0 2 5 】

H O S はH O - 1 m R N A およびタンパク質のレベルに影響するので、本発明は、適当なレポーター遺伝子に操作可能に結合したH O - 1 遺伝子の (複数の) 転写調節要素 (例えば、プロモーター領域) を含んでなるレポーター構築物を用いてH O S 活性または因子のレベルを評価する方法をも意図している。

20

【 0 0 2 6 】

従って、本発明のもう一つの側面は、試料中のヘムオキシゲナーゼ - 1 (H O - 1) サプレッサー (H O S) 活性のレベルを評価する方法であって、試料をレポーター構築物に暴露し、ここでこのレポーター構築物はH O - 1 プロモーター領域とレポーター遺伝子とを含んでなり、このレポーター遺伝子は検出可能なレポーター活性を有するタンパク質をコードしてなり、レポーター活性のレベルを測定し、レポーター活性の上記レベルを上記レポーター活性の相当する対照レベルと比較することを含んでなり、これにより、上記レポーター活性がH O S 因子または活性のレベルと逆相関するようにする、方法である。

【 0 0 2 7 】

上記のレポーター活性の対照レベルは、例えば、試料に暴露されていない相当するレポーター構築物によって産生されるレポーター活性を測定することによって得ることができる。

30

【 0 0 2 8 】

本発明のH O S 活性は、A D および他の痴呆性疾患の開始および進行に關与する他の因子および機構の解明に用いることもできる。これらの因子および機構は治療薬および方法を生じることができ、並びにA D および他の痴呆性疾患の開始および進行に關与する分子的事象の本発明者らの理解に寄与することができる。

【 0 0 2 9 】

従って、本発明のもう一つの側面は、H O S 活性またはH O S 因子の阻害剤または活性剤の存在について候補化合物をスクリーニングする方法であって、候補化合物を、H O S 活性またはH O S 因子を含んでなることが知られている試料に暴露して ; H O S 活性またはH O S 因子のレベルを、下記 (a) ~ (c) からなる群より選択される方法を用いて評価し :

40

(a) 試料中でヘムオキシゲナーゼ - 1 (H O - 1) サプレッサー (H O S) 因子または活性のレベルを評価する方法であって、試料を細胞培養物に暴露し、この細胞培養物を、H O - 1 をコードするm R N A のレベルを増加させることができる実験薬品または処理に暴露し、H O - 1 タンパク質またはH O - 1 をコードするm R N A のレベルを測定し、前記のH O - 1 タンパク質またはH O - 1 をコードするm R N A のレベルを、相当するH O - 1 タンパク質またはH O - 1 をコードするm R N A の対照レベルと比較することを含んでなり、これにより、上記H O - 1 タンパク質またはH O - 1 をコードするm R N A の

50

レベルがHOS因子または活性のレベルと逆相関するようにする方法、

(b) 試料中でヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)サブレッサー(HOS)因子または活性のレベルを評価する方法であって、試料をHOS因子を認識する抗体に暴露し、免疫複合体を単離して、免疫複合体中のHOS因子または活性のレベルを測定することを含んでなる方法、および

(c) 試料中のヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)サブレッサー(HOS)因子または活性のレベルを評価する方法であって、試料をレポーター構築物に暴露し、ここでこのレポーター構築物がHO-1プロモーター領域とレポーター遺伝子とを含んでなり、このレポーター遺伝子が検出可能なレポーター活性を有するタンパク質をコードしてなり、レポーター活性のレベルを測定し、レポーター活性のレベルをレポーター活性の相当する対照レベルと比較することを含んでなり、これにより、レポーター活性がHOS因子または活性のレベルと逆相関するようにする方法；

前記HOS活性またはHOS因子のレベルを、相当する対照試料中の相当するHOS活性またはHOS因子の対照レベルと比較し、ここで前記対照試料は候補化合物に暴露されていないHOS活性を含んでなることが知られている試料を含んでなる、方法である。

【0030】

本発明のもう一つの側面は、患者から得た組織または体液中のヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)サブレッサー(HOS)因子または活性のレベルを測定する手段と、前記のHOS因子または活性のレベルを相当する対照組織または体液中の相当するHOS活性の確立された標準と比較するための使用説明書とを含んでなる市販パッケージである。このような対照組織または体液は、例えば、少なくとも1名の正常な年齢の合った対照者から、または別の時期の、一様では、初期の患者から得ることができる。

【0031】

HO-1 mRNA、タンパク質および/または活性、並びにHOS因子および/または活性のレベルは痴呆性疾患の患者で変更することができるので、HOS因子またはHOS活性の阻害剤または活性剤は、痴呆性疾患の治療に用いることができる有望な物質または化合物である。

【0032】

従って、本発明のもう一つの側面は、痴呆性疾患の治療用の化合物であって、ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)mRNA、タンパク質または活性のレベルを増減することによって痴呆性疾患を緩解する化合物である。

【0033】

本発明のもう一つの側面は、痴呆性疾患の治療用の化合物であって、ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)サブレッサー(HOS)因子または活性のレベルを増減することによって痴呆性疾患を緩解する化合物である。

【0034】

本発明のもう一つの側面は、痴呆性疾患治療用の医薬組成物であって、前記物質または化合物を適当な薬学上許容可能な希釈剤またはキャリアーと混合してなる医薬組成物である。

【0035】

本発明の更にもう一つの側面は、患者の痴呆性疾患の治療方法であって、上記患者に前記化合物または医薬組成物を痴呆性疾患の治療に有効な量で投与することを含んでなり、これにより、ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)mRNA、タンパク質または活性のレベルを増減することによって痴呆性疾患を緩解する方法である。

【0036】

本発明の更にもう一つの側面は、患者の痴呆性疾患の治療方法であって、患者に前記化合物または医薬組成物を痴呆性疾患の治療に有効な量で投与することを含んでなり、これにより、ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)サブレッサー(HOS)因子または活性のレベルを増減することによって痴呆性疾患を緩解する方法である。

【0037】

本発明の更にもう一つの側面は、痴呆性疾患の治療の目的での、前記化合物または医薬組成物の使用である。

【0038】

本発明の更にもう一つの側面は、活性医薬成分としての前記化合物または医薬組成物と、痴呆性疾患の治療においてこれを用いるための使用説明書とを含む市販パッケージである。

【0039】

上記の物質または化合物、組成物、方法および市販用包装商品は、アルツハイマー病、加齢に伴う認識低下、軽度認識障害、痴呆を伴うパーキンソン病、進行性上核麻痺、血管性（多重梗塞性）痴呆、レヴィー体痴呆、ハンチントン病、ダウン症候群、正常圧水頭症、皮質基底核神経節変性症、多系統萎縮症、頭部外傷、脳梅毒、クロイツフェルト・ヤコブ病および他のプリオン疾患、HIVおよび他の脳炎、および甲状腺機能低下症およびビタミンB12欠損症のような代謝障害からなる群から選択される痴呆性疾患の治療に用いることができる。

10

【0040】

【発明の具体的説明】

本発明者は、AD、AACD/MCI、および関連神経疾患の予測、診断および予知に有用な改良診断法、並びにAD、AACD/MCI、および関連神経疾患の治療および検討に有用な方法および試薬を考え出した。これらの方法は、AD患者がヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) の発現を有意に抑制する活性および相当する因子をその血漿中に有していることを見出したことに基づいている。このHO-1 サプレッサー活性は、ADまたは他の痴呆性疾患の患者由来の組織または体液と共に予備インキュベーションした適当な細胞培養物系で適当な実験薬品または処理への暴露に反応してHO-1 をコードするヌクレオチド配列の濃度のアップレギュレーションができないことによって評価される。このサプレッサー活性および相当する因子は、それぞれHO-1 サプレッサー (HOS) 活性および因子と表される。

20

【0041】

本発明者は、AD患者並びに他の痴呆性疾患に罹っている可能性がある患者由来の組織または体液に含まれるが、正常な年齢の一致した対照被験者では見られない活性、すなわちHOS活性を同定した。この活性は、これらの患者から得られる組織または体液中で検出することができる。適当な組織または体液の例としては、患者由来の血液、血漿、リンパ球、脳脊髄液、尿、唾液、上皮（例えば、皮膚の上皮）、および繊維芽細胞系が挙げられる。

30

【0042】

本発明の側面は、HOS活性であり、HO-1発現のアップレギュレーションを抑制する活性である。このようなアップレギュレーションは、例えば、HOS活性の非存在下で、HO-1タンパク質またはHO-1 mRNAの増加によって検出されるようにHO-1発現を増加することができる実験薬品または処理に暴露することによって生じる。ADの患者並びに他の痴呆性疾患に罹っている可能性がある患者では、HOS活性はHO-1の発現を抑制するが、これは、正常な年齢の合った対照被験者のリンパ球および恐らくは他の神経以外の組織または体液で有意な高レベルで発現される。

40

【0043】

本発明のもう一つの側面は、試料中でHOS活性を評価する方法である。適当な試料の可能な供給源の例としては、組織および体液、例えば、患者由来の血液、血漿、リンパ球、脳脊髄液、尿、唾液、上皮、および繊維芽細胞系、またはこれらの試料由来の画分が挙げられる。このアッセイは、試験を行う試料をある実験薬品または処理への暴露に反応してHO-1発現を誘導することができる細胞培養物に暴露することを含む。このような細胞培養物の一例はラットのアストログリア細胞培養物であるが、多くの他の有用な可能性が存在する。このような実験薬品または処理への暴露の例としては、酸化ストレス、金属イオン、アミノ酸類似体、スルフヒドリル剤、インターロイキン-1、腫瘍壊死因子-

50

(TNF- α)、および高体温への暴露が挙げられる。適当なスルフヒドリル試薬の例としては、システアミンおよびホモシステインが挙げられるが、これらに限定されない。このような実験薬品または処理への暴露の後に、HO-1タンパク質またはHO-1 mRNAのレベルを適当な方法を用いて検出することができる。HO-1のレベルは、例えば、イムノアッセイによって検出することができる。HO-1 mRNAのレベルは、例えば、適当な(複数の)プローブを用いるノーザンブロット分析によって検出することができる。一層大きな感受性のHO-1 mRNAの検出は、例えば、Abraham (1998) および Mawal et al. (2000) (これらの文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される)に記載の逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を用いて行うことができる。この活性分析法を、多数の試料を同時に、あるいは適当な整列形態で、あるいはその工程の幾つかまたは総てを(例えば、ロボット工学によって)自動的に実行して分析する目的で大規模レベルに適合させることができる。

10

20

30

40

50

【0044】

もう一つの可能性は、HOS活性を評価するためのレポーターに基づく分析法の開発であることがある。このような分析法は、例えば、適当なレポーター遺伝子に操作可能に結合した、すなわち適当なレポーター遺伝子の発現を調節することができるHO-1遺伝子の5'未翻訳プロモーター領域のような転写調節要素を含んでなる適当なレポーター構築物の調製を含むことがある。このような構築物は、HO-1遺伝子の3'未翻訳領域、または適当な3'配列をも含んでなることができる。もう一つの態様では、この構築物は、HO-1遺伝子のオープンリーディングフレームないに適当なレポーター遺伝子のインフレーム融合を含んでなることができる。このレポーター遺伝子はそれ自体を選択して、例えば、その遺伝子産物の存在および/または活性の検出によってその発現の検出を容易にすることができる。検出可能なシグナルを提供する多くのこのような適当なレポーターを用いることができる。このクラスでの最も好ましい態様は好都合に検出することができるシグナルを提供するものであり、例えば、分光光度法によって検出することができる。適当なレポーター遺伝子の例としては、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質、アルカリホスファターゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼなどをコードするものが挙げられる。このようなレポーター構築物は、上記のようにHO-1発現を増加することができる実験薬品または処理への暴露にตอบสนองしてレポーター遺伝子の発現のレベルを増加することができる適当な系に導入することができる。このような分析法は、上記のような考えられる限りの大規模な高処理量の自動化形態に適合させることもでき、そのレポーター成分の存在により一層好都合に検出される。

【0045】

上記のようなHOS活性の評価方法を用いて、本発明者は、試料中のHOS活性のレベルが試料の希釈増大と共に減少することを測定し、HOS活性は相当するHOS因子の存在に起因することを示した。同じ分析法を用いて、本発明者は、試験を行う試料の予備加熱によってHOS活性が排除されることを測定し、HOS活性がタンパク質またはタンパク質の複合体に起因することを示した。本発明者の知識によれば、等質コルチコイドは唯一のHO-1発現の既知サプレッサーであるので(Lavrovsky et al., 1996; Deramaudt et al., 1999)、タンパク質様HOS因子の発見は新規である。本発明者は、更に、コルチゾール濃度が正常試料と比較してADまたはMCI試料では増加せず、従って、ADおよびMCI試料におけるHO-1発現の抑制は等質コルチコイドに起因するものではなく、むしろ(非等質コルチコイド)HOS因子の活性の結果であることを示した。

【0046】

本発明者は、1または複数回のクロマトグラフィー法を連続的に用いてHOS活性、従ってHOS因子の部分精製を行った。適当なクロマトグラフィー法の一例は、ヘパリン-アガロースマトリックスまたはコンカナバリンA(Con-A)アガロースマトリックスを用いるアフィニティークロマトグラフィー、またはSuperose(商品名)-12マトリックスを用いるゲル濾過クロマトグラフィーである。本発明者は、更に、ヘパリン-

アガロース、コンカナバリン A (Con - A) アガロースおよび Superose (商品名) - 12 クロマトグラフィーを連続して用いて HOS 因子の精製を行い、更に、HOS 因子がタンパク質またはタンパク質の複合体を含んでなり、且つ Con - A マトリックスへの結合に基づいて、糖タンパク質、一態様ではマンノタンパク質を含んでなると示されることを示した。これは、HOS 活性および相当する HOS 因子が様々なクロマトグラフィー法を用いて一層高度の精製形態で得られることを示している。このような精製を、例えば、図 11 に示すが、ここで HOS 活性のピークは試料中のほとんどのタンパク質より後に溶出し、従って、Superose (商品名) - 12 カラムは HOS 因子含有試料からほとんどのタンパク質を除去したことを示唆している。既知のタンパク質分子量標準を用いるカラムの較正 (図 12) では、HOS 因子が近似分子量が 80 ~ 100 kDa であり、一態様では、分子量が約 90 kDa のタンパク質またはタンパク質の複合体であることを示唆している。従って、これらのデータは、更に HOS 因子がタンパク質様分子であることを支持している。本発明者は、HOS 因子および関連の HOS 活性が長期間の保存中安定であることも示した。

10

【0047】

従って、本発明は、上記のように HOS 因子も提供する。

【0048】

本発明者は、更に、AD と正常血漿はいずれも酸化促進剤、例えばメナジオンに対して同等なレベルの HO - 1 mRNA 応答の部分的抑制を示すので、HOS 活性が単純な酸化防止剤の挙動によるものではないことも示した。更に、典型的な用量の酸化防止剤は HO - 1 mRNA 発現の誘導に全く影響せず、複数の高用量の酸化防止剤の暴露は部分的抑制を生じるのみである。

20

【0049】

本発明のもう一つの側面は、AD、AACD/MCI、および関連神経疾患の予測、診断および予知に有用である可能性のある改良された診断法である。この診断法は、例えば上記の分析法を用いて患者から得た組織または体液中の HOS 活性を検出することに基づいている。HOS 活性の存在が患者における HO - 1 発現の減少に先行するので、この診断法により AD、AACD/MCI、および関連神経疾患を更に早期に診断することができる。更に、HOS 因子または活性の免疫検出により (下記参照)、Abraham (1998) および Mawal et al. (2000) (これら文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される) に記載のノーザンブロット分析または逆転写酵素 - ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法のような方法を用いる HO - 1 発現の減少の検出に関して改良診断法を得ることができる。更に、HOS 活性の存在と疾患状態の相関は、診断についての肯定的な試験を表している。これは、上記の痴呆性疾患の一つに罹っている患者での HO - 1 発現の減少または非存在に基づいた診断に用いられる消極的試験より望ましい。

30

【0050】

当該技術分野では、ある種の痴呆性疾患、例えば AD が HO - 1 レベルの変化と相関するが、他のものは相関しないことが知られている。このような痴呆性疾患は、HO - 1 依存性および HO - 1 独立として分類することができる。本明細書に記載されているように、このような HO - 1 レベルの変化は HOS 因子または活性のレベルの変化の結果である。従って、本発明は、更に HO - 1 タンパク質、HO - 1 mRNA、HOS 因子、または HOS 活性のレベルが有意に変化する痴呆性疾患、すなわち HO - 1 依存性の痴呆性疾患を、HO - 1 タンパク質、HO - 1 mRNA、HOS 因子、または HOS 活性のレベルが余り有意に変化しない痴呆性疾患、すなわち HO - 1 独立の痴呆性疾患と区別するための方法、試薬、化合物および市販パッケージにも関する。本明細書で用いられる「有意に」という用語は、当該技術分野で知られているように、レベルが実験誤差の範囲を超えて対照レベルから変化することを意味する。

40

【0051】

本発明の HOS 活性は、AD および他の痴呆性疾患の治療のための治療薬および方法を開

50

発するのに用いることもできる。HOS活性の出現は疾患状態の存在と相関するので、HOS活性およびHOS因子はADおよび他の痴呆性疾患の開始および/または進行を引き起こす役割を果たすことが期待される。従って、HOS活性を阻害または活性化する因子または機構の同定を利用して、ADおよび他の痴呆性疾患の治療のための治療薬および方法を開発することができる。HOS活性の増加がADおよび他の痴呆性疾患を開始および/または進行させる事象である場合には、HOS活性の阻害剤が治療能力を有することが期待される。逆に、HOS活性の活性剤はADおよび他の痴呆性疾患の開始および/または進行を引き起こす上流薬品であることが期待されており、これにより更に早期の改良診断法を得ることができる。更に、HOS活性に影響する総ての因子により、ADおよび他の痴呆性疾患の開始および/または進行の機構が一層よく理解され、究極的には改良治療法および薬剤の開発に寄与することとなる。更に、HO-1 mRNA、タンパク質および活性のレベルに影響する他の因子も上記と同様に本発明で有用であり、従って本発明のもう一つの側面である。

10

【0052】

従って、本発明のもう一つの側面は、HOS活性を阻害または増加すると推定される化合物を同定するためのHOS活性に基づいたスクリーニング法を提供することである。このようなスクリーニングは、例えば上記のHOS活性分析法を用いて行うことができ、大規模且つあるいは自動化形態に適合させることができる。このような方法は、既知のHOS活性を含む資料を試験を行う化合物に暴露した後、存在するHOS活性のレベルを測定し、次にこれを試験を行う化合物に暴露しなかった対照試料と比較することを含んでなることがある。高処理量の自動化形態では、このスクリーニング法を用いて、多数の化合物を含むライブラリーをHOS活性についての効果を迅速に分析することができる。一態様では、このようなライブラリーの例としては、組合せ合成によって調製した化学ライブラリーが挙げられる。

20

【0053】

例えば、ヘパリン-アガロースおよび/またはCon-Aアガロースおよび/またはSuperose(商品名)-12カラムクロマトグラフィーから得たHOS因子およびHOS活性を含んでなる部分精製した画分を用いて、小型哺乳類、例えば、マウスまたはウサギを免疫し、この活性を認識する抗体を生じさせることができる。一態様では、上記の画分は、逐次的ヘパリン-アガロース、Con-AアガロースおよびSuperose(商品名)-12カラムクロマトグラフィーから得られる。従って、本発明のもう一つの側面では、本発明のHOS因子を認識する抗体を提供する。

30

【0054】

本発明の抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体である。抗体は、組換え体、例えばキメラ(例えば、ヒトの定常領域と会合したネズミ起源の可変領域によって構成された)、ヒューマニズド(humanized)(動物、例えばネズミ起源の超可変領域と一緒にしたヒト免疫グロブリン定常主鎖)、および/または一本鎖であることができる。ポリクローナルおよびモノクローナル抗体は、いずれも免疫グロブリン断片の形態、例えばF(ab)₂、FabまたはFab断片であることができる。本発明の抗体は、任意のイソタイプのもの、例えばIgGまたはIgAであり、ポリクローナル抗体は単一イソタイプまたはイソタイプの混合物である。

40

【0055】

本発明のHOS因子に対する抗体は、哺乳類をHOS因子を含んでなる部分精製画分で免疫することによって生成する。一態様では、上記画分は逐次的ヘパリン-アガロース、Con-AアガロースおよびSuperose(商品名)-12カラムクロマトグラフィーから得られる。このような抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体であることができる。ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を産生する方法は、当該技術分野で周知である。総説については、Harlow and Lane(1988)およびYelton et al.(1981)を参照されたい(これら文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される)。モノクローナル抗体については、Kohler a

50

nd Milstein (1975)を参照されたい(これら文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される)。

【0056】

本発明のHOS因子を含んでなる部分精製画分に生じる本発明の抗体を、標準的免疫学的分析法、例えばウェスタンブロット分析、ドットブロット分析法、またはELISA(例えば、Coligan et al. (1994)を参照)を用いて産生し、同定する(この文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される)。これらの抗体は、組織または体液のような試料中のHOS因子および活性の存在を検出するための診断法に用いられる。これらの抗体は、本発明のHOS因子および活性を含んでなる精製画分を得るためのアフィニティークロマトグラフィーにも用いられる。

10

【0057】

従って、本発明のもう一つの側面では、

(i) 組織または体液中のHOS因子および活性の存在を検出するための試薬、および
(ii) 組織または体液を本発明の抗体と接触させて免疫複合体が形成されるようにすることによって、およびこのような複合体を検出して、試料または試料が由来する生物におけるHOS因子および活性の存在を示すことによって、組織または体液中のHOS因子および活性の存在を検出するための診断法

が提供される。

【0058】

当業者であれば、免疫複合体が試料の一成分と抗体との間に形成され、未結合材料は複合体を検出する前に除去されることを容易に理解されるであろう。本発明の抗体は、HOS活性の存在について例えば血液、血漿、リンパ球、脳脊髄液、尿、唾液、上皮、および繊維芽細胞のような試料のスクリーニングに用いられることが分かる。

20

【0059】

診断用途については、試薬(すなわち、本発明の抗体)は、チューブ、ビーズ、またはこの分野で用いられる任意の他の通常の支持体のような固形支持体上で自由状態であるかまたは固定されている。固定は、直接または間接的手段を用いて行う。直接的手段としては、受動吸着(非共有結合)または支持体と試薬との間の共有結合が挙げられる。「間接的手段」とは、試薬と相互作用する抗試薬化合物を最初に固形支持体に結合させることを意味する。間接的手段では、リガンド-受容体系を用いることもでき、例えばビタミンのような分子を試薬にグラフトさせ、相当する受容体を固相に上に固定する。これは、ビオチン-ストレプトアビジン系によって示される。あるいは、ペプチドの尾を試薬に化学的にまたは遺伝子工学によって添加し、グラフトまたは融合した生成物をペプチド尾の受動吸着または共有結合によって固定する。

30

【0060】

このような診断薬は、使用説明書も含んでなるキットに含まれることがある。この試薬に、そのターゲットに結合するときに試薬を検出することができる検出手段が標識される。検出手段は、フルオレセインイソシアネートまたはフルオレセインイソチオシアネートのような蛍光剤、または西洋ワサビペルオキシダーゼまたはルシフェラーゼまたはアルカリホスファターゼのような酵素、または ^{125}I または ^{51}Cr のような放射性元素である

40

【0061】

従って、本発明のもう一つの側面では、組織または体液から本発明のHOS因子を精製する方法であって、組織または体液との抗体に基づくアフィニティークロマトグラフィーを行うことを含んでおり、抗体が本発明の抗体である方法が提供される。

【0062】

本発明の精製方法で用いるには、抗体はポリクローナルまたはモノクローナル抗体であり、好ましくはIgG型のものである。精製IgGは、標準的方法(例えば、Coligan et al. (1994)を参照されたい。この文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される)を用いて抗血清から調製される。通常のクロマトグラフィー支

50

持体並びに抗体をグラフトするための標準的方法は、例えば Harlow and Lane (1988) (この文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される) に記載されており、下記に概略を述べる。

【0063】

簡単に説明すれば、ADに罹っている患者由来の血漿のような組織または体液を、好ましくは緩衝液に溶解して、好ましくは組織または体液を希釈するのに用いた緩衝液で平衡にしたクロマトグラフィー材料に加え、本発明のHOS因子(すなわち、抗原)が材料に吸着できるようにする。クロマトグラフィー材料、例えば本発明の抗体にカップリングしたゲルまたは樹脂は、パッチ形態またはカラムである。未結合成分を洗浄により除去した後、抗原を、グリシン緩衝液、またはカオトロピック剤、例えばグアニジンHC1、または高塩濃度(例えば、3M MgCl₂)を含む緩衝液のような適当な溶出緩衝液で溶出する。溶出画分を回収し、抗原の存在を、例えば280nmの吸光度を測定することによって検出する。

10

【0064】

本発明のもう一つの側面は、診断画像形成法であって、生物学的系に本発明の抗体を導入して、これを適当な検出系と共に用いてHOS因子または活性が存在するかまたは存在しない部分を同定することを含んでなる方法である。

【0065】

【実指例】

下記の例は、本発明の方法を説明するために提供されるのであり、本発明の範囲を制限することを意味するものではない。

20

【0066】

例1: AD患者由来の血漿におけるHOS活性の存在の測定

全血を、正常な高齢(N1, N2)被験者または確実に散在性ADに罹っている患者(AD1, AD2)からヘパリン処理した試験管に集めた。これを、次にFicoll Paque(商品名)密度グラディエント上に重層し、1800rpmで20分間遠心分離した。次に、最上部の血漿層を集め、下記に記載するラットアストログリア細胞とインキュベーションする目的で貯蔵した。リンパ球画分を集めて、下記に記載するノーザンブロット法のmRNAの単離に使用した。

【0067】

リンパ球HO-1 mRNAレベルの測定

リンパ球画分は、上記のように全血をFicoll Paque(商品名)グラディエント上で差次的遠心分離によって得た。細胞質RNAは、Chomezynski et al. (1997) (この文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される) に記載されているように、酸性グアニジニウムチオシアネート-フェノール-クロロホルム抽出法を用いてリンパ球から単離した。6µgのRNAを変性し、1%アガロース/ホルムアルデヒドゲル上で電気泳動によって粒度分離した。RNAの完全性は、臭化エチジウム染色によって確かめた。RNAをHybond-N(商品名)濾紙上に移し、紫外光線によって2分間膜に共役的に架橋した。ハイブリダイゼーションプローブ(HO-1; 1.0kb)は、Feinberg et al. (1984) (上記文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される) に記載されているように、ランダムプライマー-DNA標識系(Random Primer DNA Labelling System)を用いてランダムプライマー法によって調製した。プレハイブリダイゼーションは、脱イオン化したホルムアミド、5xDenhardt試薬、6xSSPEおよび0.5%SDSを含む緩衝液中で42°Cで12時間行った。ハイブリダイゼーション緩衝液は、Noonberg et al. (1994) (この文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される) に記載されているように、5xDenhardt試薬を含まないプレハイブリダイゼーション緩衝液と³²Pを標識した変性DNAプローブからなった。RNAの等荷重は、(ハウスキーピング)遺伝子、グリセロアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(GAPDH)についてのcDNAとハイブリダイゼーションするこ

30

40

50

とによって確かめた。総ての洗浄は、緊縮条件下で行った(1×SSCおよび0.2% SDS、室温45分間、および0.4×SSCおよび0.2% SDS、65-15分間)。cDNAプローブとのRNAハイブリダイゼーションは、Church et al. (1984) (この文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される)に記載されているように、-80℃で強化スクリーンを用いるオートラジオグラフィによって可視化した。

【0068】

本発明者らの関係した米国特許第6,210,895号明細書(2001年4月13日)および公表文献(Schipper et al., 2000) (いずれの文献の内容も、その開示の一部として本明細書に引用される)に記載され、図1のパネルAに反復されているように、正常被験者N1およびN2から単離したリンパ球は有意なレベルのHO-1 mRNAを示すが(レーン1および2)、AD患者AD1およびAD2から単離したリンパ球では検出されない(レーン3および4)。

10

【0069】

ラットアストログリア細胞のシステアミン(CSH)処理してHO-1発現の誘導による血漿HOS活性の分析

脳細胞培養: ラットアストログリア細胞は、下記のようにSchipper et al. (1999) (上記文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される)に記載の方法で調製した。

妊娠したSprague-Dawleyラットは、Charles River Breeding Farmsから得た。一次中性細胞培養物は、Chopra et al., (1997) (この文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される)に以前に記載されているように、大脳組織または体液の機械酵素的解離によって1日齢新生児から調製した。細胞を、HamのF-12、および10mM HEPES、5%熱不活性化ウマ血清、5%熱不活性化ウシ胎児血清、およびペニシリン/ストレプトマイシン(それぞれ、50U/mlおよび50μg/ml)を補足した高グルコースDMEM(50:50容積/容積)で増殖させた。細胞を、75cm²の組織または体液培養フラスコで1×10⁶個の細胞/mlの密度で培養した。培養物を加湿した95%空気/5%CO₂中で37℃で6時間インキュベーションし、この間に新たな培地に交換しながら培養物を激しく20~30回振盪し、アストログリア細胞単層から付着している乏突起膠細胞および小膠細胞を除去した。次に、培養物を上記の条件下で6日間インキュベーションし、この間の単層を構成する細胞の>98%は、Chopra et al. (1995) (この文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される)に記載されているように、星状細胞特異的マーカーグリア細胞繊維性酸性タンパク質についての免疫組織化学的標識によって測定されるように、アストログリア細胞であった。これらのアストログリア細胞培養物を様々な条件下で増殖させ、様々な処理(下記参照)を施した後、mRNAをSchipper et al. (1999) (この文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される)に記載されているように、HO-1 mRNAレベルのノーザンプロット分析の目的で下記のようにして単離した。

20

30

【0070】

RNA単離およびノーザンプロット分析: 培養した星状細胞をゴム製ポリスマンを用いて集め、細胞質RNAをChomczynski and Sacchi (1987) (この文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される)に記載されているように、酸性グアニジニウムチオシアネート/フェノール/クロロホルム抽出法を用いて単離した。10μgのRNAを変性し、1%アガロース/ホルムアルデヒドゲル上で電気泳動によって粒度分離した。RNA保全性は、臭化エチジウム染色によって確かめた。RNAをHybond-N濾紙に移し、紫外光線によって2分間膜に共有的に架橋した。ハイブリダイゼーションプローブ(HO-1; 1.0kb)は、Feinberg and Vogelstein (1984) (この文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される)に記載されているように、ランダムプライマーDNA標識系を用いるランダ

40

50

ムプライマーによって生成した二本鎖DNAプローブによって調製した。プレハイブリダイゼーションは、ホルムアミド-脱イオン化5×Denhardt試薬、6×食塩-リン酸ナトリウム-EDTA、および0.5%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を含む緩衝液中、42℃で12時間行った。ハイブリダイゼーション緩衝液は、Noonberg et al. (1994) (この文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される)に記載されているように、5×Denhardt試薬を含まないプレハイブリダイゼーション緩衝液と³²P標識した変性DNAプローブからなっていた。RNAの等荷重は、(ハウスキープ)遺伝子、グリセロアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(GAPDH)、または18S mRNAについてのcDNAとハイブリダイゼーションすることによって確かめた。総ての洗浄は、緊縮条件下で行った(1×食塩水-クエン酸ナトリウム(SSC)および0.2%SDS、室温45分間、および0.4×SSCおよび0.2%SDS、65℃15分間、および0.1×SSCおよび0.2%SDS、65℃15分間)。cDNAプローブとのRNAハイブリダイゼーションは、Church et al. (1984) (この文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される)に記載されているように、-80℃で強化スクリーンを用いるオートラジオグラフィによって可視化した。オートラジオグラフ上の生成バンドを、ホスホイメジャーS1デンストメーターを用いて分析した。デンストメトリーダーを、HO-1 mRNAシグナル対対照GAPDHまたは18S mRNAシグナルの比を計算することによって規格化した。

10

【0071】

20

図1, パネルA: 2名の正常な高齢者(N1, N2)および2名の確実に散在性ADに罹っている患者(AD1, AD2)由来のリンパ球HO-1 mRNA (および対照GAPDH mRNA)のノーザンプロット法。本発明者らの関連米国特許第6,210,895号明細書(2001年4月13日)および公表文献(Schipper et al., 2000) (これら文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される)に記載されているように、リンパ球HO-1 mRNAバンドは対照(レーン1および2)では視認することができ、AD被験者では検出されず(レーン3および4)、後者にHOS活性があることを示唆している。

【0072】

上記の方法を用いて、様々な条件下で増殖させ且つ様々な処理を施したラットアストログリア細胞のHO-1 mRNAレベルのノーザンプロット分析を行い、その結果を図1のパネルBおよびCに示している。

30

パネルB: 標準培地で6日間増殖した対照(抗原投与していない)ラットアストログリア細胞は、HO-1 mRNAバンドをほとんどまたは全く示さない(レーン5~7)。システアミン(CSH)処理(880 μM×6時間)により、これらの細胞に明確なHO-1 mRNAバンドが誘導される(レーン8~10)。ラットアストログリア細胞を上記の同じ2名の正常被験者(N1, N2; レーン11~12)および2名のAD患者(AD1, AD2; レーン13~14)由来の血漿と共に24時間インキュベーションしても、ベースラインHO-1 mRNAレベルには感知し得る影響は見られない。

パネルC: 2名の正常被験者(レーン15~24)由来の血漿とは対照的に、2名のAD患者由来の未希釈血漿は、CSHに対するラットアストログリア細胞HO-1 mRNA応答を著しく抑制する(レーン25~27; 30~32)。AD血漿を希釈すると(標準培地中1:9; 「10%」)、CSHによって誘導されるHO-1 mRNA発現に対するその阻害効果が大幅に減少する(レーン28~29; 33~34)。従って、AD患者の血漿にはHOS活性があり、これは正常被験者の血漿にあり且つ関連血漿試料と共にインキュベーションしCSH処理を施したラットアストログリア細胞中のHO-1 mRNAレベルの測定によって評価することができる。

40

【0073】

例2: 正常な若年対照者(NYC)、正常な高齢対照者(NEC)、軽度の認識障害(MCI)および散在性アルツハイマー病(AD)の人口統計およびHOS活性

50

結果は、図2に表の形式で示している。標準培地で増殖したCSH処理したアストログリア細胞と比較したCSHによって誘導される(880 μM × 6時間)グリアHO-1 mRNAバンド(ノーザンブロット法)のヒト血漿中で24時間インキュベーションによる抑制; 0 = 0 ~ 25%抑制, 1 = 26 ~ 50%抑制, 2 = 51 ~ 75%抑制, 3 = 76 ~ 100%抑制。HOS = HOS活性; MMSE = Folsteinのミニメンタルステート試験得点(Minimental State Exam Score); コルチゾール = 血漿コルチゾール濃度(nモル/リットル)。AD薬 = Alzheimer病の治療に用いたコリンエステラーゼ。E400およびE800 = それぞれ、400および800単位のビタミンE; C500 = 500mgビタミンC。HOS活性を、例1に記載の方法で評価した。コルチゾール濃度の測定は、RIAの競合的結合原理に基づいたGamma Coat [I-125] Cortisol Radioimmunoassay (RIA) Kitを用いて行った。

10

【0074】

例3: 正常対照者、軽度認識障害(MCI)および散在性アルツハイマー病(AD)患者のHOS活性

結果を図3に示す。HOS活性 = 標準培地で増殖したCSH処理アストログリア細胞と比較したCSHによって誘導される(880 μM × 6時間)グリアHO-1 mRNAバンド(ノーザンブロット法)のヒト血漿中での24時間インキュベーションによる抑制率(四分位数)。HOS活性は、例1に記載の方法で評価した。

【0075】

例4: 正常対照(NC)、軽度認識障害(MCI)および散在性アルツハイマー病(AD)被験者における血漿コルチゾール濃度(平均値 ± SD)

結果を図4に示す。パネルAは、NC、MCIおよびAD被験者の血漿コルチゾール濃度の平均値(±SD)を示す。() = 群当たりの症例数。群間の差は統計学的に有意ではない(1方向ANOVA)。MCI(パネルB)およびAD(パネルC)群の血漿コルチゾール濃度とHOS活性の相関は有意ではない(線形回帰分析)。等質コルチコイドは既知のHO-1遺伝子サプレッサーであるが、これらのデータはMCIおよびAD血漿中のHOS活性に関与しない。

20

【0076】

例5: 試料保管時間および酸化防止剤の血漿HOS活性に対する効果

結果を図5に示す。HOS活性は、例1に記載の方法で評価した。C = 対照(未処理)アストログリア細胞培養物、CSH = システアミン処理したアストログリア細胞培養物、AD = アルツハイマー、MCI = 軽度認識障害、NEC = 正常な高齢対照者、N = 酸化防止剤に対する正常対照者。プロテアーゼ阻害薬(Complete Protease Inhibitor Cocktail, カタログ番号1836153, Roche, マンハイム)を総ての血漿試料に加えた後、凍結した。HOS活性は、-85で保存したADおよびMCI血漿試料で15ヶ月まで保持される。正常対照者では、AD患者に普通に投与される用量のビタミンEである低用量のビタミンE(400U/日)では、CSH(N1)に対するアストログリア細胞HO-1 mRNA応答に影響しない。正常者では、極めて高用量の酸化防止剤に多数回暴露されると、CSHに対するグリアHO-1 mRNA応答が部分的に減衰する(N2, N3)。

30

40

【0077】

例6: HOS活性に対する血漿希釈の効果

血漿HOS活性は、例1に記載されているように処理したラットアストログリア細胞中のHO-1 mRNAレベルの測定によって評価した。この場合に、血漿希釈の効果を、図6に記載の方法で検討した。

【0078】

レーン1: 標準培地で増殖した抗原未投与のラット星状細胞では、HO-1 mRNAが存在しない。

レーン2: システアミン(CSH; 880 μM × 6時間)は標準培地で増殖した培養ア

50

ストログリア細胞中に強いHO-1 mRNAバンドを誘導する。

レーン3: Alzheimer (AD) 血漿 (A: 患者1; B: 患者2) 中で増殖した抗原未投与の星状細胞では、HO-1 mRNAバンドが存在しない。

レーン4~6: 未希釈のAD血漿は、培養アストログリア細胞中でCSHに対するHO-1 mRNA応答を著しく抑制する(強力なHOS活性が存在)。

CSHに対するグリアHO-1 mRNA応答は、標準培地を用いるAD血漿の希釈度の増加と共に前進的に増加する(HOS活性の排除)(レーン7~15)。

【0079】

図6のパネルAおよびパネルBは、2名の異なるAD患者(A: 患者1; B: 患者2)から得た血漿を用いて得たデータを表す。上記し且つ図6にも示しているように、標準培地で増殖した未処理ラットアストログリア細胞は、ほとんどまたは全く検出可能なHO-1 mRNAを示さないが(レーン1)、HO-1発現はCSH処理により有意に増加する(レーン2)。CSH処理の非存在下では、AD血漿とインキュベーションしたラットアストログリア細胞は、例1にも記載されているように検出可能なHO-1 mRNAを示さない(レーン3)。未希釈のAD血漿(「100%」)とインキュベーションしたラットアストログリア細胞のCSH処理では、未希釈AD血漿に存在する強力なHOS活性によりHO-1発現の有意な誘導を誘導することができなかった(レーン4~6)。しかしながら、ラットアストログリア細胞のCSHに対する応答は、標準培地を用いるAD血漿の希釈度の増加と共に前進的に増加する(HOS活性の排除)(レーン7~15)。従って、AD血漿には、血漿濃度がHOS活性と相関するHOS因子が存在すると思われる。

【0080】

例7: HOS活性に対する熱処理の効果

血漿HOS活性を、例1に記載されているように、処理したラットアストログリア細胞中のHO-1 mRNAレベルを測定することによって評価した。この場合には、図7に示すようにAD血漿の予備的熱処理の効果を検討した。

【0081】

上記のように、標準培地で増殖したまたはヒト血漿(正常[NEC]被験者またはAD患者由来)に暴露した対照ラットアストログリア細胞は、CSH処理の非存在下でのノーザンプロット分析によりほとんどまたは全くHO-1 mRNAを示さない(レーン1, 5, 7および10)。標準培地で増殖したアストログリア細胞のCSH処理(880 μM × 6時間)では、強力なHO-1 mRNAシグナルが観察される(レーン2)。また、上記のように、CSH処理に応答するHO-1発現は、AD血漿中で24時間インキュベーションしたアストログリア細胞では有意に減衰する(レーン3および4)。しかしながら、この減衰は、ラットアストログリア細胞とインキュベーションする前にAD血漿を加熱するときには(100、10分間)最早観察されず、このAD血漿の予備的加熱の結果、レーン6で見られた強いHO-1 mRNAシグナルにおいて観察されるように、HOS活性は排除されることを示している。ラットアストログリア細胞を未処理または予備加熱した正常血漿と共にCSH処理すると、いずれの場合にもHOS活性は存在しないので、強力なHO-1 mRNAシグナルが観察される(レーン8および9)。従って、これらのデータは、AD血漿中のHOS活性がタンパク質によって伝達されることを示している。

【0082】

例8: ヘパリン-アガロースアフィニティークロマトグラフィーによるHOS因子の部分精製

1名の正常被験者(NEC)および1名のAD患者(AD)由来の血漿に、下記のように、Sasaki et al. (1987) (この文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される)に記載されているように、ヘパリン-アガロースカラム上でアフィニティー精製を施した。

【0083】

ヘパリン-アガロースカラムに装填するための血漿調製物:

NECおよびAD血漿試験管を、4 で融解した。次に、試料を、ヘパリン-アガロース

10

20

30

40

50

カラム装填緩衝液 [H A L B : 2 0 m M H e p e s (S I G M A C h e m i c a l C o . , セントルイス, ミシガン, 米国, カタログ番号 H - 4 0 3 4) p H 7 . 2 , 1 5 0 m M N a C l , プロテアーゼ阻害剤錠剤 (R o c h e D i a g n o s t i c s , ラヴァル, ケベック州, カナダ, カタログ番号 1 8 7 3 5 8 0)] に対して 2 時間緩やかに攪拌しながら透析した。次に、試料を 1 5 , 0 0 0 g 、 4 で 2 0 分間遠心分離し、上清を集めた。

【 0 0 8 4 】

ヘパリン - アガロースアフィニティーカラムクロマトグラフィー :

ヘパリン - アガロースカラム (1 c m x 2 c m ; S I G M A C h e m i c a l C o . , セントルイス, ミシガン, 米国, カタログ番号 H - 0 4 0 2) を H A L B 2 0 m l で予備洗浄した。血漿上清をカラムに装填した。カラムを H A L B 4 ~ 6 容で洗浄し、1 m l 画分を集めた。タンパク質を含むフロースルー画分をプールした。カラムを溶出緩衝液 [E B : 2 0 m M H e p e s p H 7 . 2 , 1 M N a C l , プロテアーゼ阻害剤] で溶出し、タンパク質を含む 1 m l 溶出物をプールし、H A L B に対して 2 ~ 4 時間透析した。

10

【 0 0 8 5 】

ラットアストログリア細胞 / H O S 活性の評価のためのタンパク質 (例えば、血漿またはカラム画分) は、下記のように S a s a k i e t a l . (1 9 8 7) (この文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される) に記載の方法で調製した。

【 0 0 8 6 】

培地を、集密星状細胞単層を含む 7 0 m l , 2 5 c m ² フラスコから取り出した (培養 7 ~ 1 0 日) 。それぞれの個別フラスコに、N E C および A D 血漿 1 . 4 m l を加えた。それぞれの個別フラスコに、N E C または A D 被験者由来のヘパリンアガロースフロースルー画分を完全 D M E M 培地 0 . 6 m l と共に加えた。それぞれの個別のフラスコに、N E C または A D 被験者由来のヘパリンアガロース溶出物約 1 . 4 m l (0 . 5 m g タンパク質) を完全 D M E M 培地 0 . 6 m l と共に加えた。

20

【 0 0 8 7 】

次に、様々な試料を、例 1 に記載の方法で H O S 活性について評価した。簡単に説明すれば、溶出物試料をラットアストログリア細胞と共にインキュベーションした後、これに C S H 処理を施した。続いて、H O - 1 m R N A のレベルを決定するため、m R N A 単離およびノーザンブロット分析を行い、図 9 に示される結果を得た。

30

【 0 0 8 8 】

図 8 : パネル A : H O - 1 m R N A のノーザンブロット分析。

パネル B : 対照 G A P D H m R N A 。

1 名の N E C および A D 患者由来の血漿をヘパリン - アガロースカラム上でアフィニティー精製し、高塩溶液を用いて回収した溶出物を透析した。C S H 処理を行わない場合には、N E C または A D 血漿由来のヘパリン溶出物と共に 2 4 時間予備インキュベーションした対照ラットアストログリア細胞は、これらの試料に相当する H O - 1 m R N A バンドが比較的弱いことによって観察されるように、H O - 1 発現は増加しなかった (レーン 1 および 4) 。N E C 血漿由来のヘパリン溶出物とインキュベーションしたラットアストログリア細胞の C S H 処理 (8 8 0 μ M C S H x 6 時間) では、強力な H O - 1 m R N A バンドによって見られるように H O - 1 発現が誘導される (レーン 2 および 3) 。逆に、C S H 処理に応答する H O - 1 m R N A バンドの増加は、A D 患者の血漿由来のヘパリン溶出物画分と 2 4 時間インキュベーションしたラットアストログリア細胞では見られなかった。これらのデータは、A D 患者の血漿に H O S 因子が存在するが、正常 (N E C) 被験者では存在しないことを支持しており、この因子がヘパリン - アガロースアフィニティーカラムに結合することを示唆している。

40

【 0 0 8 9 】

例 9 : コンカナバリン A (C o n - A) アガロースアフィニティーカラムによるヘパリンアガロース溶出物の一層の H O S 精製

50

ヘパリンアガロースカラム溶出物(図8に記載)を、装填緩衝液である150mM NaCl、1mM MgCl₂、1mM MnCl₂、1mM CaCl₂およびComplete(商品名)EDTA不含プロテアーゼ阻害剤カクテルを含む50mM Hepes, pH7.2に対して4で4時間透析した。透析生成物を、Con-Aアガロースカラムに装填した。カラムを、4ベッド容積の装填緩衝液で洗浄した。HOS画分を、0.2M-D-メチルマンノピラノシドを含む装填緩衝液で溶出した。溶出物を装填緩衝液に対して透析した。HOSバイオアッセイ(880μMCSH×6時間に対するグリアHO-1mRNA応答)を、例1および図1に記載の方法で行った。結果を図9に示す。グリアHO-1mRNAバンドは、CSHに暴露しなかった総ての標本で弱かった。対照アストログリア細胞培養物(標準培地で増殖)およびNEC血漿で24時間インキュベーションした星状細胞では、CSHに対するHO-1mRNA応答が見られた。対照的に、CSHに対するHO-1mRNA応答は、(i)AD全血、(ii)ヘパリン-ConAクロマトグラフィー前の透析AD血漿、および(iii)AD血漿由来のヘパリンアガロース-ConA溶出物中で24時間インキュベーションした星状細胞では、著しく抑制された。これらのデータは、AD血漿HOS因子がConAカラムに結合し、従って恐らく糖タンパク質であることを示唆している。

10

【0090】

例10: 4個のプールしたAD血漿試料(出発材料29cc)由来のヘパリン-コンコナバリンA溶出物のSuperose(商品名)12HRFPLCカラム状での一層のHOS精製

20

結果を、図10-12に示す。ヘパリンアガロース-ConAアガロースで精製したAD血漿(1ml)を、150mM NaClおよびComplete(商品名)EDTA不含プロテアーゼ阻害剤カクテル(1錠/100ml;カタログ番号1873580,ロット61320101;Roche Diagnostics,ケベック,カナダ)を含む20mM Hepes, pH7.2に対して4で4時間透析した。透析画分を、Superose(商品名)12HRFPLC1cm直径のカラム(カタログ番号18735807-0538-01,ロット8283034)[Amersham Pharmacia Biotech, Inc. Quebec Canada]に装填した。HOS活性を、例1および図1に記載の方法でそれぞれの画分でバイオアッセイによって測定した。図10に示されるように、画分番号20~22では、強いHOS活性が見られた。

30

【0091】

図11: 図10に記載のプールしたAD血漿試料由来のSuperose(商品名)12HRFPLCカラム画分における相対タンパク質濃度。フロースルーのそれぞれ0.5ml画分を集め、吸光度(O.D.)を分光光度計によって280nmで測定した。O.D.対画分番号のグラフをプロットする。矢印は、強いHOS活性を示す画分(番号20~22)におけるタンパク質濃度を表している。

【0092】

図12: 標準タンパク質混合物を用いるSuperose(商品名)12HRFPLC1cm直径のカラム(カタログ番号17-0538-01,ロット番号8283034)[Amersham Pharmacia Biotech, Inc Quebec Canada]の機能試験からクロマトグラム。血漿試料は、図10に記載した同じプールAD血漿に由来した。フロースルーのそれぞれ0.5ml画分を集め、吸光度を280nmで測定した。それぞれのタンパク質標準についてのピーク分子量対画分番号のグラフを、プロットした。既知分子量を有する標準の溶出プロフィールに基づいて、HOS陽性画分(番号20~22)の分子量は約90kDaと計算される。

40

【0093】

例11: 多重刺激による星状細胞HO-1mRNA誘導に対するNECおよびAD血漿の効果

HOSバイオアッセイは、例1および図1に記載の方法で行った。HO-1mRNA(上部)およびそれぞれのGAPDHmRNA(下部)を、図13に示す。AD血漿は、CS

50

H (880 μ M)、インターロイキン-1 (IL-1 50および100 ng/ml)、およびホモシステイン (HC200 μ M) に対するHO-1 mRNA応答を強力に抑制した。NEC血漿は、これらの刺激にも拘わらずHOS活性を示さなかった。AD血漿は腫瘍壊死因子- (TNF-50および100 ng/ml) に対するHO-1 mRNA応答を完全に抑制し、NEC血漿はこれを部分的に抑制した。ADおよびNEC血漿は、メナジオン (Mena 100 μ M) に対するグリアHO-1 mRNA応答の部分的および同等の抑制を示した。これらのデータは、次のことを示唆している。すなわち、A) AD血漿中のHOSタンパク質はアストログリア細胞HO-1 mRNAの多重インデューサーに対して活性である。、B) AD血漿中のHOS活性がTNF- 投与にも拘わらず特に強力であることを示している。TNF- に対する部分的HOS活性はNEC血漿中で生じるので、ADとNECの間のHOSタンパク質発現の差は定性的よりは定量的であるといえることができる。C) 単純な酸化防止剤の挙動では、AD血漿中のHOS活性が説明されないが、ADおよびNEC血漿はいずれも酸化促進剤であるメナジオンに対するグリアHO-1 mRNA応答を部分的且つ同等に抑制するからである。

10

【0094】

上記の例は、HOS活性を検出するための試験法の応用を説明している。更に、上例は、組織または体液試料として血漿を用いる試験法を説明している。この方法は、血液、脳脊髄液、尿、唾液、上皮のような他の組織または体液、および患者由来の繊維芽細胞系にも応用することができる。

【0095】

この試験は、ある期間にわたる特定の患者におけるHOS活性のレベルを比較し、または患者のHOS活性のレベルを正常対照個体群の相当するレベルと比較するのに応用することができる。

20

【0096】

上記の例は、糖タンパク質であり、一態様では80~100 kDaの範囲の近似的分子量を有し、一態様では分子量が約90 kDaであるマンノタンパク質であり、且つ糖質コルチコイドではないHOS因子の存在も説明している。

【0097】

参考文献

Abraham, N.G. (1998) Quantitation of heme oxygenase (HO-1) copies in human tissue or body fluids by competitive RT/PCR, in *Methods in Molecular Biology*, vol. 108: *Free Radical and Antioxidant Protocols* (Armstrong, D., ed.), pp. 199-209, Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Coligan J.E., et al., (1994) *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.

Chomczynski P. and Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. *Analytical Biochem.* 162:156-159.

10

Chopra, V.S., et al. (1995) Differential effects of cysteamine on heat shock protein induction and cytoplasmic granulation in astrocytes and glioma cells. *Mol. Brain Res.* 31:173-184.

Chopra, V.S., et al. (1997) A cellular stress model for the differential expression of glial lysosomal cathepsins in the aging nervous system. *Exp. Neurol.* 147:221-228.

20

Church G.M. and Gilbert W. (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1991-1995.

Deramaudt, T.B., et al. (1999) Negative regulation of human heme oxygenase in microvessel endothelial cells by dexamethasone. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222:185-193.

Feinberg AP and Vogelstein B. (1984) A Technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochem.* 137:266-267.

30

Grossi, D., et al. (1988) *Senile dementias. II International Symposium* (pp. 97-99). Paris: John Libbey Eurotext.

Harlow, E. and Lane, D (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

40

Haxby J.V., et al. (1992) Individual trajectories of cognitive decline in patients with dementia of the Alzheimer type. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 14:575-592.

Kohler G. and Milstein C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497.

Lavrovsky, Y., et al. (1996) Downregulation of the human heme oxygenase gene by glucocorticoids and identification of 56b regulatory elements. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 218:759-765. 10

Mann, U., et al. (1992) Heterogeneity in Alzheimer's disease: Progression rate segregated by distinct neuropsychological and cerebral metabolic profiles. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 55:956-959.

Mawal, Y., et al. (2000) RT-PCR confirmation of suppressed HO-1 mRNA levels in Alzheimer lymphocytes. Abstract to be presented at the 1st International Symposium on HO/CO, July 14-17, 2000. 20

Noonberg S.B., et al. (1994) Detection of triplex-forming RNA oligonucleotides by triplex blotting. *BioTechniques* 16:1070-1072.

Sasaki, H., et al., (1987) Improved method for the immobilization of heparin. *J. Chromatog.* 400:123-132.

Schipper H.M., et al. (1995). Expression of heme oxygenase-1 in the senescent and Alzheimer-diseased brain. *Ann. Neurol.* 37:758-768. 30

Schipper H.M., et al. (1999) Mitochondrial iron sequestration in dopamine-challenged astroglia: role of heme oxygenase-1 and the permeability transition pore. *J. Neurochem.* 72:1802-1811.

Schipper H.M., et al. (2000) Evaluation of Heme Oxygenase-1 as a Systemic Biological Marker in AD. *Neurology* 54:1297-1304. 40

Yelton D.E. and Scharff M.D. (1981) Monoclonal Antibodies: a powerful new tool in biology and medicine. Ann. Rev. Biochem. 50:657-680.

10

【図面の簡単な説明】

【図 1】

例 1 に記載されている通りの、散在性 AD における循環 HO - 1 サプレッサー (HOS) 因子の存在に影響を与える HO - 1 mRNA のノーザンプロット分析。RNA 装填の均一性を確保する目的で用いる対照 GAPDH バンドを HO - 1 バンドの下に示す。

【図 2】

例 2 に記載されている通りの、正常若年対照 (NYC)、正常高齢対照 (NEC)、軽度認識障害 (MCI)、および散在性アルツハイマー病 (AD) 被験者における人口統計学および HOS 活性の検討の結果を表にまとめたもの。標準培地で増殖した CSH 処理した星状細胞に対する CSH によって誘導される (880 μ M \times 6 時間) グリア HO - 1 mRNA バンド (ノーザンプロット分析) のヒト血漿中での 24 時間インキュベーションによる抑制; 0 = 0 ~ 25% 抑制、1 = 26 ~ 50% 抑制、2 = 51 ~ 75% 抑制、3 = 76 ~ 100% 抑制。HOS = HOS 活性; MMSE = Folstein ミニメンタルステートスコア (Folstein mini-mental state score); コルチゾール = 血漿コルチゾール濃度 (nMol/L); AD 薬 = Alzheimer 病の治療に用いるコリンエステラーゼ阻害剤; E400 および E800 = それぞれ、400 および 800 単位のビタミン E; C500 = 500 mg ビタミン C。

20

【図 3】

正常対照 (NC)、軽度認識障害 (MCI) および散在性アルツハイマー病 (AD) 被験者における HOS 活性をグラフに表したもの。HOS 活性 = 例 3 に記載の、標準培地で増殖した CSH 処理した星状細胞に対する CSH によって誘導した (880 μ M \times 6 時間) グリア HO - 1 mRNA バンド (ノーザンプロット分析) のヒト血漿中での 24 時間インキュベーション抑制率 (四分位数)。

30

【図 4】

例 4 に記載されている通りの、正常対照 (NC)、軽度認識障害 (MCI) および散在性アルツハイマー病 (AD) 被験者 (パネル A) における血漿コルチゾール濃度 (平均値 \pm SD) の分析。() = 群当たりの症例数。群間の差は、統計学的に有意ではない (一方向 ANOVA)。MCI (パネル B) および AD (パネル C) 群における血漿コルチゾール濃度と HOS 活性との相関は有意ではない (線形回帰分析)。

40

【図 5】

例 8 に記載されている通りの、血漿 HOS 活性に対する試料保管時間と酸化防止剤暴露の効果を示す HO - 1 mRNA のノーザンプロット分析。C = 対照 (未処理) 星状細胞培養物、CSH = システアミン処理した星状細胞培養物、AD = アルツハイマー、MCI = 軽度認識障害、NEC = 正常高齢対照、N = 酸化防止剤に対する正常被験者。対照 GAPDH バンドを、図 1 に記載されているように用いる。

【図 6】

例 6 に記載されている通りの、HOS 活性についての血漿希釈度の効果を示す HO - 1 mRNA のノーザンプロット分析。

50

【図 7】

例 7 に記載されている通りの、HOS 活性に対する熱処理の効果を示す HO - 1 mRNA のノーザンブロット分析。対照 GAPDH バンドを、図 1 に記載されているように用いる。

【図 8】

例 8 に記載されている通りの、ヘパリン - アガロースクロマトグラフィーによる HOS 因子の部分精製を示す HO - 1 mRNA のノーザンブロット分析。対照 GAPDH バンドを、図 1 に記載されているように用いる。

【図 9】

例 9 に記載されている通りの、コンカナバリン A (Con - A) アガロースアフィニティーカラムクロマトグラフィーによるヘパリンアガロース溶出物の一層の HOS 精製を示す HO - 1 mRNA のノーザンブロット分析。対照 GAPDH バンドを、図 1 に記載されているように用いる。 10

【図 10】

例 10 に記載されている通りの、Superose (商品名) 12 HR FPLC カラム上での 4 個のプールした AD 血漿試料由来のヘパリンアガロース - コンカナバリン A 溶出物の一層の HOS 精製を示す HO - 1 mRNA のノーザンブロット分析。対照 GAPDH バンドを、図 1 に記載されているように用いる。

【図 11】

例 10 に記載されている通りの、図 10 に記載のプールした AD 血漿試料由来の Superose (商品名) 12 HR FPLC カラム画分における相対タンパク質濃度をグラフにまとめたもの。矢印は、強い HOS 活性を示す画分 (番号 20 ~ 22) におけるタンパク質濃度を表している。 20

【図 12】

例 10 に記載されている通りの、標準タンパク質混合物を用いる Superose (商品名) 12 HR FPLC の 1 cm 直径のカラム (カタログ番号 17 - 0538 - 01, ロット番号 8283034) [Amersham Pharmacia Biotech, Inc Quebec Canada] の機能試験からのクロマトグラムの結果。

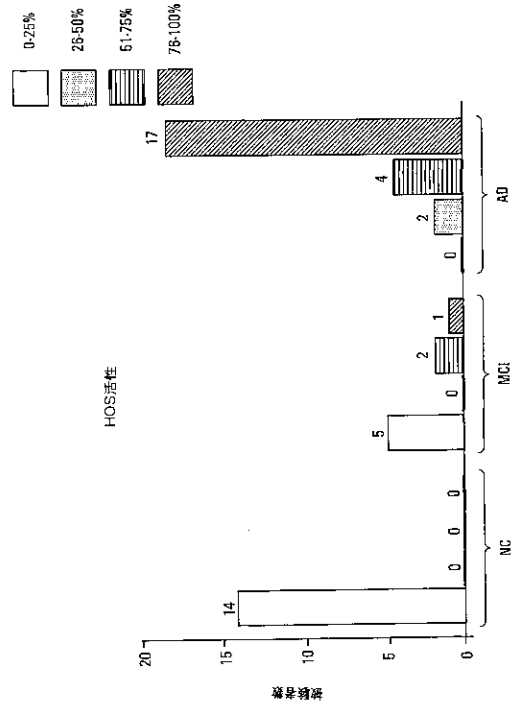
【図 13】

多重刺激による星状細胞 HO - 1 mRNA 誘導に対する NEC および AD 血漿の効果を示す HO - 1 mRNA のノーザンブロット分析。HOS バイオアッセイは、図 1 に記載されている通りに行った。HO - 1 mRNA (上部) およびそれぞれの GAPDH mRNA (下部) についてのノーザンブロット分析を示す。対照 GAPDH バンドを、図 1 に記載されている通りに用いる。 30

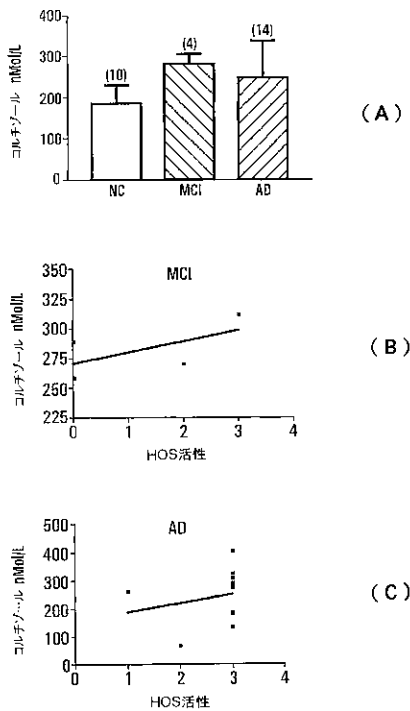
【 図 2 】

患者	診断	HOS	年齢	MMSE	性別	AD薬	酸化防止剤	コレチゾール
295	NYC	0	42	30	F	なし	なし	215
296	NYC	0	56	28	F	なし	なし	163
297	NYC	0	25	30	M	なし	なし	234
298	NYC	0	35	30	F	なし	なし	183
299	NYC	0	40	30	F	なし	なし	121
300	NYC	0	47	30	F	なし	なし	245
301	NYC	0	39	30	F	なし	なし	
302	NYC	0	29	30	F	なし	なし	
319	NEC	0	67	28	M	なし	なし	176
325	NEC	0	66	29	F	なし	なし	
333	NEC	0	89	29	M	なし	なし	129
345	NEC	0	71	28	F	なし	なし	225
346	NEC	0	83	29	M	なし	なし	163
731	NEC	0	92	29	F	なし	なし	
335	MCI	2	79	29	M	なし	なし	270
337	MCI	0	56	30	M	なし	なし	
344	MCI	2	80	28	M	なし	なし	
351	MCI	0	79	28	M	なし	E800, C500	259
352	MCI	0	71	25	F	なし	なし	
354	MCI	0	72	29	M	なし	なし	
355	MCI	0	79	28	M	なし	E400, C500	289
472	MCI	3	82	27	F	なし	なし	312
293	AD	3	66	13	F	ARICEPT	なし	
304	AD	3	70	26	M	ARICEPT	なし	
305	AD	3	60	17	M	ARICEPT	なし	
306	AD	3	83	19	F	なし	なし	
307	AD	3	68	21	F	なし	なし	292
310	AD	3	55	19	F	ARICEPT	なし	136
312	AD	3	81	28	M	なし	なし	285
316	AD	3	78	28	M	ARICEPT	なし	184
322	AD	3	66	13	F	ARICEPT	なし	
328	AD	3	77	25	M	ARICEPT	なし	69
330	AD	3	77	21	M	なし	なし	407
336	AD	3	81	23	M	なし	なし	278
342	AD	1	84	27	F	なし	なし	
343	AD	3	87	20	F	ARICEPT	なし	187
347	AD	1	71	19	F	ARICEPT	なし	265
355	AD	3	76	24	M	ARICEPT	E400	135
356	AD	3	83	23	F	なし	なし	274
359	AD	3	66	21	F	ARICEPT	E800	325
360	AD	3	82	20	M	なし	なし	311
475	AD	3	62	29	M	ARICEPT	C500	292
714	AD	2	70	24	F	なし	なし	
730	AD	2	81	24	M	なし	なし	
294	AD	3	80	25	M	ARICEPT	なし	

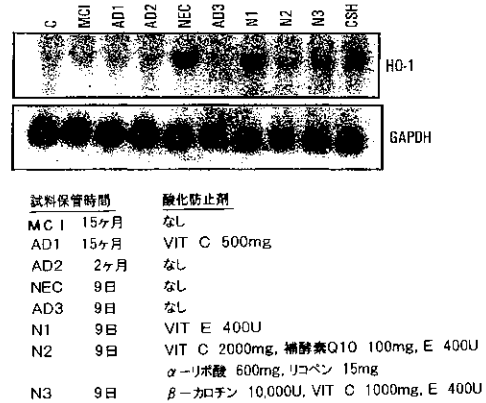
【 図 3 】



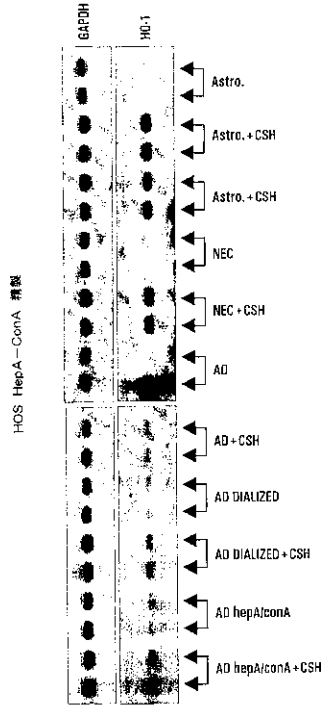
【 図 4 】



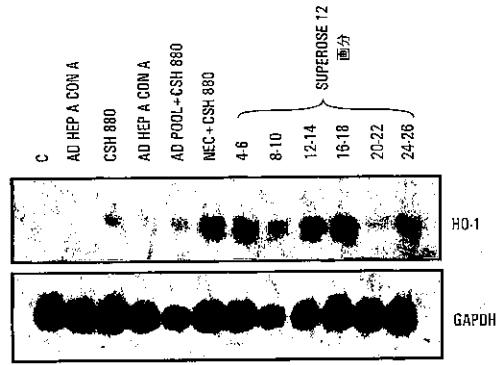
【 図 5 】



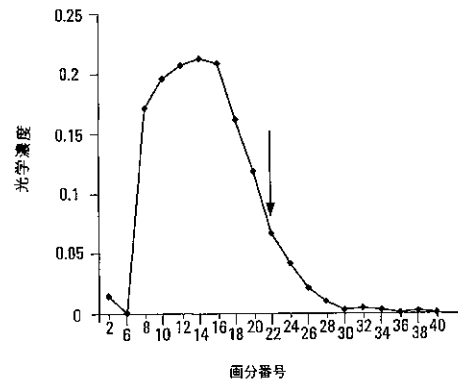
【 図 9 】



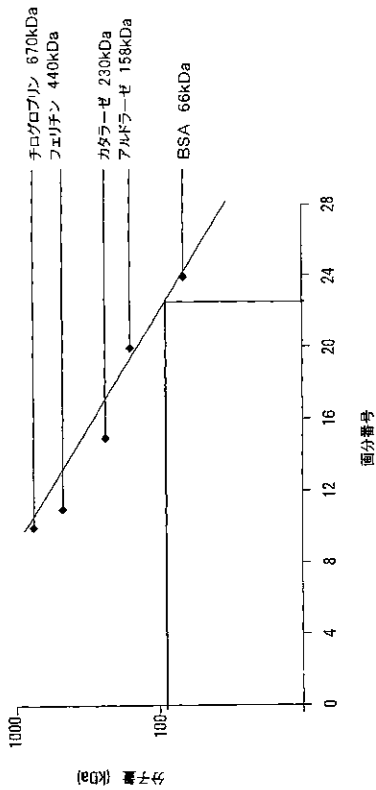
【 図 10 】



【 図 11 】



【 図 12 】



【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
31 January 2002 (31.01.2002)

PCT

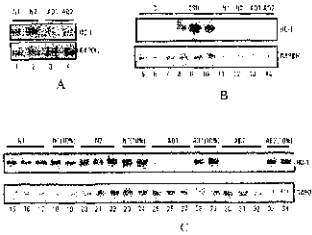
(10) International Publication Number
WO 02/08449 A2

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/00
- (21) International Application Number: PCT/CA01/01066
- (22) International Filing Date: 25 July 2001 (25.07.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (36) Priority Data: 60/229,815 25 July 2000 (25.07.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): THE SIR MORTIMER B. DAVIS - JEWISH GENERAL HOSPITAL, [CA/CA]; Lady Davis Institute for Medical Research, 3755 chemin de la Côte Ste Catherine, Montreal, Quebec H3T 1E2 (CA)
- (71) Applicant and (72) Inventor: SCHUPPER, Hyman, M. [CA/CA]; 5785 Einstein, Montreal, Quebec H4W 2Y9 (CA)
- (74) Agents: MORROW, Joy, D. et al., Smart & Biggar, P.O. Box 2999, Station D, 500-55 Metcalfe Street, Ottawa, Ontario K1P 5Y6 (CA)
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NI, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published: without international search report and to be republished upon receipt of that report

[Continued on next page]

(54) Title: I10-1 SUPPRESSOR AS A DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC TEST FOR DEMENTING DISEASES



WO 02/08449 A2

(57) Abstract: The invention relates to an improved method for predicting the onset of, diagnosing, prognosticating and/or treating dementing diseases. The method comprises determining the level of heme oxygenase-1 suppressor (HO-1) activity and/or factor in tissue or body fluid obtained from a patient, and comparing said level with the corresponding level of HO-1 activity and/or factor in corresponding tissue or body fluid obtained from at least one control person. The tissue or body fluid is suitably blood, plasma, lymphocytes, cerebrospinal fluid, urine, saliva, epithelium or fibroblasts. The method is useful where the dementing disease is any of Alzheimer Disease, Age-Associated Cognitive Decline, Mild Cognitive Impairment, Parkinson disease with dementia, Progressive Supranuclear Palsy, Vascular (i.e. multi-infarct) Dementia, Lewy Body Dementia, Huntington's Disease, Down's syndrome, normal pressure hydrocephalus, corticobasal ganglionic degeneration, multisystem atrophy, head trauma, neurosyphilis, Creutzfeldt-Jacob disease and other prion diseases, HIV and other encephalitides, and metabolic disorders such as hypothyroidism and vitamin B12 deficiency. The method may also prove useful in differentiating the "pseudodementia" of depression from Alzheimer disease.

WO 02/08449 A2



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 02/08449

PCT/CA01/01066

1

**HO-1 SUPPRESSOR AS A DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC
TEST FOR DEMENTING DISEASES****FIELD OF THE INVENTION**

Applicant's related US Patent No. 6,210,895 (April 3,
5 2001), herein incorporated by reference, relates to a method
for predicting, diagnosing, and/or prognosticating dementing
diseases such as Alzheimer Disease (AD) and Age-Associated
Cognitive Decline (AACD). The invention relates to improved
methods for predicting, diagnosing, prognosticating and/or
10 treating dementing diseases such as Alzheimer Disease (AD) and
Age-Associated Cognitive Decline (AACD) or Mild Cognitive
Impairment (MCI) as well as methods and reagents to facilitate
the study of the cause and progression of these diseases.

BACKGROUND OF THE INVENTION

15 Alzheimer Disease (AD) is a neurodegenerative disease
which causes dementia. The terms "Alzheimer Disease" and
"Alzheimer's Disease" are both utilized in the art, these terms
being equivalent and are used interchangeably here and
elsewhere. The period from first detection of AD to
20 termination can range from a few years to 15 years, during
which time the patient progressively suffers loss of both
mental function and control of bodily functions. There is
significant variability in the progress of the disease. While
the majority of patients have a gradual, inexorable progression
25 (losing on average 3 to 4 points on the 30 point Folstein
mini-mental state score annually), approximately 30% of AD
cases have a prolonged stable initial plateau phase lasting
several years, as described in Haxby *et al.* (1992), herein
incorporated by reference. A subgroup of patients has a
30 fulminant, rapidly progressive downhill course over several
years, as described in Mann *et al.* (1992), herein incorporated
by reference. Other patients (about 10% of cohorts) remain
slowly progressive, showing only gradual decline from year to
year, as described in Grossi *et al.* (1988), herein incorporated
35 by reference. The pathological, chemical and molecular bases
of this heterogeneity remain undetermined. Recognition of the

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

2

variability of AD progression represents an important clinical insight, and may explain the diagnostic difficulties presented by "atypical" cases.

Attempts at predicting the onset of AD or monitoring its progression have met with limited success. While in certain cases, there is a familial manifestation of the disease, it appears that the majority of AD cases are non-familial, and until recently (see below), no simple genetic marker for the disease had been determined. Much research has focused on the protein beta-amyloid, deposits of which are found in the brains of AD victims.

However, recently, as described in our related US Patent (No. 6,210,895; April 3, 2001) and publication (Schipper et al., 2000), both herein incorporated by reference, we have devised a diagnostic method, useful in the prediction, diagnosis, and prognostication of AD, AACD/MCI, and related neurological diseases. This diagnostic method is based on the determination that patients suffering from AD have a significantly lower concentration of heme oxygenase-1 (HO-1) in their lymphocytes and plasma, and, accordingly, a significantly lower concentration of ribonucleotide sequences encoding HO-1 in their lymphocytes.

HO-1: Heme oxygenase-1 (HO-1) is an enzyme that catalyses the rapid degradation of heme to biliverdin in brain and other tissues. This 32 kDa member of the heat shock protein superfamily contains a heat-shock element in its promoter region and is rapidly up regulated in response to oxidative stress, metal ions, amino acid analogues, sulfhydryl agents, and hyperthermia. In response to oxidative stress, induction of HO-1 may result in protection of cells by catabolizing pro-oxidant metalloporphyrins, such as heme, into bile pigments (biliverdin, bilirubin), with free radical scavenging capabilities. Heme and other intracellular ferrous iron chelates are capable of converting hydrogen peroxide to the highly cytotoxic hydroxyl radical.

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

3

Using immunostaining techniques in conjunction with laser scanning confocal microscopy, intense HO-1 immunoreactivity in neurons and astrocytes of post-mortem hippocampus and temporal cortex derived from AD subjects has been observed, whereas neural HO-1 staining was faint or non-existent in the hippocampus and temporal cortex of control specimens matched for age and post-mortem interval, as noted in Schipper et al. (1995), herein incorporated by reference. Furthermore, consistent co-localization of HO-1 to neurofibrillary tangles and senile plaques in the AD specimens has been demonstrated. Finally, robust 32 kDa bands corresponding to HO-1 were observed by Western blotting of protein extracts derived from AD temporal cortex and hippocampus after SDS-PAGE, whereas control HO-1 bands were faint or absent. These results indicate that HO-1 is significantly over-expressed in neurons and astrocytes of AD hippocampus and cerebral cortex relative to control brains and support the contention that AD-affected tissues are experiencing chronic oxidative stress.

AACD/MCI: AACD and MCI are terms used to identify individuals who experience a cognitive decline that falls short of dementia. These terms are equivalent, MCI being a more recently adopted term, and are used interchangeably throughout this application. Satisfaction of criteria (World Health Organization) for this diagnosis requires a report by the individual or family of a decline in cognitive function, which is gradual, and present at least 6 months. There may be difficulties across any cognitive domains (although memory is impaired in the vast majority of cases), and these must be supported by abnormal performance on quantitative cognitive assessments for which age and education norms are available for relatively healthy individuals (ie., the patient is compared to normal subjects his/her own age). Performance must be at least 1 SD below the mean value for the appropriate population on such tests. Neither dementia, nor significant depression or drug effects may be present. No cerebral or systemic disease or condition known to cause cerebral cognitive dysfunction may be present. In Applicant's experience, all patients who were

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

4

classified as CDR.5 ("questionable dementia") on the Clinical Dementia rating scale and who met these exclusions, also met the criteria for AACD/MCI. About 1/3 of Alzheimer's patients have had a clearly definable period of isolated memory deficit
5 which preceded their more global cognitive decline, as noted by Baxby et al. (1992), herein incorporated by reference. Using AACD/MCI criteria which look at other domains in addition to memory, the percentage with an identifiable prodrome is likely higher. Fortunately, not all AACD/MCI individuals seem to
10 decline. It appears that a significant number of these subjects show a stable, non-progressive memory deficit on testing.

Related Disorders: Determining HO-1 concentration can also assist in predicting, diagnosing, or prognosticating other
15 dementing diseases having similar manifestations and/or in distinguishing such diseases from AD. Such other diseases include Parkinson disease with dementia, Progressive Supranuclear Palsy, Vascular (i.e. multi-infarct) Dementia, Lewy Body Dementia, Huntington's Disease, Down's syndrome,
20 normal pressure hydrocephalus, corticobasal ganglionic degeneration, multisystem atrophy, head trauma, neurosyphilis, Creutzfeld-Jacob disease and other prion diseases, HIV and other encephalitides, and metabolic disorders such as
25 hypothyroidism and vitamin B12 deficiency. The method may also prove useful in differentiating the "pseudodementia" of depression from Alzheimer disease.

The determination of a relationship between HO-1 levels and AD represents a very significant advance in this field, and may be utilized for the development of methods of
30 predicting, diagnosing in its very early stage, and prognosticating AD and other dementing diseases. However, identification of the factor(s) and mechanism(s) which control HO-1 expression in the normal versus the diseased state are
35 needed, to provide even earlier diagnosis, as well as therapeutic methods and reagents or substances, and methods and reagents for the study of AD and other dementing diseases. In addition, the reduction or absence of HO-1 in patients suffering from AD represents a negative test, and, particularly

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

5

for the purposes of diagnosis, it would be more desirable to have a positive indicator of disease, i.e. a factor whose presence (rather than absence) correlates with disease. Further, the decrease in HO-1 expression may represent an effect, rather than a cause of AD and other dementing diseases, therefore the identification of factor(s) and mechanism(s) which control HO-1 expression in the normal versus the diseased state are also needed to identify components and events which have an active causative role in the onset and progression of these diseases.

SUMMARY OF THE INVENTION

It is a goal of the present invention to provide improved methods for predicting, diagnosing, prognosticating and/or treating AD and other dementing diseases, as well as methods and reagents to facilitate the study of the cause and progression of these diseases.

Advantageously, embodiments of this invention provide an easily administered blood or cerebrospinal fluid test which is used to predict, diagnose, or prognosticate AD and other dementing diseases.

One aspect of the present invention is a heme oxygenase-1 suppressor (HOS) factor, wherein said factor attenuates the increase in the level of heme oxygenase-1 (HO-1). In an embodiment, such an increase occurs in response to exposure to an experimental agent or treatment which is capable of increasing the level of HO-1. For example, such experimental agents or treatments comprise exposure to any one or more of oxidative stress, metal ions, amino acid analogues, sulfhydryl agents (e.g., cysteamine, homocysteine), interleukin-1 β , tumour necrosis factor- α (TNF- α) and hyperthermia.

Another aspect of the present invention is a method for assessing dementing diseases in a patient which comprises: determining the level of heme oxygenase-1 suppressor (HOS) factor or activity, in tissue or a body fluid obtained from a patient; and comparing said level of HOS factor or activity

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

6

with the corresponding level of HOS factor or activity in corresponding tissue or body fluid obtained from at least one control person, whereby if said level of HOS factor or activity is greater than said corresponding level of HOS factor or activity in said tissue or body fluid obtained from at least one control person then said patient suffers from a dementing disease; wherein such method is used to predict the onset of, diagnose, or prognosticate dementing diseases.

Yet another aspect of the present invention is a diagnostic method for differentiating, in a patient suffering from a dementing disease, between a dementing disease which is HO-1-dependent and a dementing disease which is HO-1-independent, said method comprising: determining the level of heme oxygenase-1 suppressor (HOS) factor or activity, in tissue or a body fluid obtained from a patient suffering from a dementing disease; and comparing said level of HOS factor or activity with the corresponding level of HOS factor or activity in corresponding tissue or body fluid obtained from at least one control person, whereby if said level of HOS factor or activity differs significantly from said corresponding level of HOS factor or activity in said tissue or body fluid obtained from at least one control person then said patient suffers from a dementing disease which is HO-1-dependent, and if said level of HOS factor or activity does not differ significantly from said corresponding level of HOS factor or activity in said tissue or body fluid obtained from at least one control person then said patient suffers from a dementing disease which is HO-1-independent.

In an embodiment, another aspect of the present invention is a method for differentiating the pseudodementia of depression from other dementing diseases in a patient which comprises: determining the level of heme oxygenase-1 suppressor (HOS) factor or activity, in tissue or body fluid obtained from a patient; and comparing said level of HOS factor or activity with the corresponding level of HOS factor or activity in corresponding tissue or body fluid obtained from at least one control person; whereby if said level of HOS factor or activity is greater than said corresponding level of HOS

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

7

factor or activity in said corresponding tissue or body fluid obtained from at least one control person then said patient suffers from a dementing disease other than the pseudodementia of depression; wherein such method is used to differentiate
5 the pseudodementia of depression from other dementing diseases.

The dementing diseases assessed using the methods described above include, but are not limited to, Alzheimer Disease, Age-Associated Cognitive Decline, Mild Cognitive Impairment, Parkinson disease with dementia, Progressive
10 Supranuclear Palsy, Vascular (i.e. multi-infarct) Dementia, Lewy Body Dementia, Huntington's Disease, Down's syndrome, normal pressure hydrocephalus, corticobasal ganglionic degeneration, multisystem atrophy, head trauma, neurosyphilis, Creutzfeldt-Jacob disease and other prion diseases, HIV and
15 other encephalitides, and metabolic disorders such as hypothyroidism and vitamin B12 deficiency. Further, as noted above, the methods may also prove useful in differentiating the "pseudodementia" of depression from Alzheimer disease.

Examples of the above mentioned tissue or body fluids
20 include, but are not limited to, blood, plasma, lymphocytes, cerebrospinal fluid, urine, saliva, epithelia, and fibroblasts.

The above-mentioned control tissue or body fluid, for example, may be obtained from at least one normal age-matched control person or from the patient at another time, in an
25 embodiment, at an earlier time.

Yet another aspect of the present invention is a method for assaying the level of heme oxygenase-1 (HO-1) suppressor (HOS) factor or activity in a sample which comprises: exposing the sample to a cell culture; subjecting
30 the cell culture to exposure to an experimental agent or treatment which may increase the level of HO-1 protein or mRNA encoding HO-1; determining the level of HO-1 protein or mRNA encoding HO-1; and comparing said level of HO-1 protein or mRNA encoding HO-1 with a corresponding control level of HO-1
35 protein or mRNA encoding HO-1;

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

8

whereby the level of said HO-1 protein or mRNA encoding HO-1 inversely correlates with the level of HOS factor or activity.

The present invention also provides evidence for the existence of a putative heme oxygenase-1 (HO-1) suppressor (HOS) factor in the samples derived from a patient suffering a dementing disease, as well as a partially purified fraction comprising HOS activity and a corresponding putative HOS factor.

Accordingly, a further aspect of the present invention is a method for assaying the level of heme oxygenase-1 (HO-1) suppressor (HOS) factor or activity in a sample which comprises: exposing the sample to a cell culture; subjecting the cell culture to exposure to an experimental agent or treatment which may increase the level of HO-1 protein or mRNA encoding HO-1; determining the level of HO-1 protein or mRNA encoding HO-1; and comparing said level of HO-1 protein or mRNA encoding HO-1 with a corresponding control level of HO-1 protein or mRNA encoding HO-1; whereby the level of said HO-1 protein or mRNA encoding HO-1 inversely correlates with the level of HOS factor or activity.

The above-mentioned corresponding control level of HO-1 protein or mRNA may be obtained, for example, by assaying the level of HO-1 protein or mRNA in a corresponding cell culture which has been subjected to exposure to the above-mentioned experimental agent or treatment, but has not been exposed to the above-mentioned sample prior to exposure to the above-mentioned experimental agent or treatment.

Additional aspects of the present invention are polyclonal and monoclonal antibodies which recognize the HOS factor, as well as hybridoma cells which produce the latter monoclonal antibodies.

Yet a further aspect of the present invention is a method for assaying the level of heme oxygenase-1 (HO-1) suppressor (HOS) factor or activity in a sample comprising: exposing said sample to an antibody which recognizes the HOS

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

9

factor; isolating immune complexes; and determining the level of HOS factor or activity in the immune complex.

Since HOS affects the levels of HO-1 mRNA and protein, therefore the invention also contemplates a method for assaying the level of HOS activity or factor using a reporter construct comprising transcriptional regulatory element(s) (e.g., a promoter region) of the HO-1 gene operably linked to a suitable reporter gene.

Accordingly, a further aspect of the present invention is a method for assaying the level of heme oxygenase-1 (HO-1) suppressor (HOS) activity in a sample comprising: exposing said sample to a reporter construct, wherein said reporter construct comprises the HO-1 promoter region and a reporter gene, wherein said reporter gene encodes a protein which possesses a detectable reporter activity; determining the level of said reporter activity, and comparing said level of said reporter activity with a corresponding control level of said reporter activity; whereby the level of said reporter activity inversely correlates with the level of HOS factor or activity.

The above-mentioned control level of reporter activity may be obtained, for example, by measuring the reporter activity produced by a corresponding reporter construct that has not been exposed to the above-mentioned sample.

The HOS activity of the present invention may also be used for the elucidation of other factors and mechanisms involved in the onset and progression of AD and other dementing diseases. These factors and mechanisms may yield therapeutic agents and methods, as well as contribute to our understanding of the molecular events which are involved in the onset and progression of AD and other dementing diseases.

Therefore, a further aspect of the present invention is a method for screening a candidate compound for the presence of an inhibitor or activator of HOS activity or HOS factor comprising: exposing said candidate compound to a sample known

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

10

to comprise HOS activity or HOS factor; assaying the level of HOS activity or HOS factor using a method selected from the group consisting of: (a) a method for assaying the level of heme oxygenase-1 (HO-1) suppressor (HOS) factor or activity in a sample which comprises: exposing the sample to a cell culture; subjecting the cell culture to exposure to an experimental agent or treatment which may increase the level of mRNA encoding HO-1; determining the level of HO-1 protein or mRNA encoding HO-1; and comparing said level of HO-1 protein or mRNA encoding HO-1 with a corresponding control level of HO-1 protein or mRNA encoding HO-1; whereby the level of said HO-1 protein or mRNA encoding HO-1 inversely correlates with the level of HOS factor or activity; (b) a method for assaying the level of heme oxygenase-1 (HO-1) suppressor (HOS) factor or activity in a sample comprising: exposing said sample to an antibody which recognizes the HOS factor; isolating immune complexes; and determining the level of HOS factor or activity in the immune complex; and (c) a method for assaying the level of heme oxygenase-1 (HO-1) suppressor (HOS) factor or activity in a sample comprising: exposing said sample to a reporter construct, wherein said reporter construct comprises the HO-1 promoter region and a reporter gene, wherein said reporter gene encodes a protein which possesses a detectable reporter activity; and determining the level of said reporter activity; and comparing said level of said reporter activity with a corresponding control level of said reporter activity; whereby the level of said reporter activity inversely correlates with the level of HOS factor or activity; and comparing said level of HOS activity or HOS factor with a corresponding control level of HOS activity or HOS factor in a corresponding control sample, wherein said control sample comprises said sample known to comprise HOS activity that has not been exposed to said candidate compound.

A further aspect of the present invention is a commercial package comprising means for determining the level of heme oxygenase-1 (HO-1) suppressor (HOS) factor or activity, in tissue or body fluid obtained from a patient, and instructions for comparing said level of HOS factor or activity

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

11

With an established standard of the corresponding HOS activity in corresponding control tissue or body fluid. Such control tissue or body fluid, for example, may be obtained from at least one normal age-matched control person or from the patient
5 at another time, in an embodiment, at an earlier time.

Since levels of HO-1 mRNA, protein and/or activity as well as HOS factor and/or activity may be altered in patients suffering from a dementing disease, inhibitors or activators of HOS factor or HOS activity represent potential substances or
10 compounds which may be utilized for the treatment of a dementing disease.

Accordingly, a further aspect of the present invention is a compound for the treatment of a dementing disease, wherein the compound alleviates the dementing disease
15 by increasing or decreasing the level of heme oxygenase-1 (HO-1) mRNA, protein or activity.

A further aspect of the present invention is a compound for the treatment of a dementing disease, wherein the compound alleviates the dementing disease by increasing or
20 decreasing the level of heme oxygenase-1 (HO-1) suppressor (HOS) factor or activity.

Yet a further aspect of the present invention is a pharmaceutical composition for the treatment of a dementing disease which comprises the substance or compound described
25 above in admixture with a suitable pharmaceutically acceptable diluent or carrier.

Yet a further aspect of the present invention is a method of treating a dementing disease in a patient, comprising administering to said patient the compound or pharmaceutical
30 composition described above in an amount effective to treat a dementing disease, wherein said method results in the alleviation of the dementing disease by increasing or decreasing the level of heme oxygenase-1 (HO-1) mRNA, protein or activity.

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

12

Yet a further aspect of the present invention is a method of treating a dementing disease in a patient, comprising administering to said patient the compound or pharmaceutical composition described above in an amount effective to treat a dementing disease, wherein said method results in the alleviation of the dementing disease by increasing or decreasing the level of heme oxygenase-1 (HO-1) suppressor (ROS) factor or activity.

Yet a further aspect of the present invention is a use of the above-mentioned compound or pharmaceutical composition for the treatment of a dementing disease.

Yet a further aspect of the present invention is a commercial package containing as an active pharmaceutical ingredient the compound or pharmaceutical composition described above together with instructions for its use in the treatment of a dementing disease.

The substance or compound, composition, method and commercial package noted above may, for example, be utilized for the treatment of a dementing disease selected from the group consisting of Alzheimer Disease, Age-Associated Cognitive Decline, Mild Cognitive Impairment, Parkinson disease with dementia, Progressive Supranuclear Palsy, Vascular (i.e. multi-infarct) Dementia, Lewy Body Dementia, Huntington's Disease, Down's syndrome, normal pressure hydrocephalus, corticobasal ganglionic degeneration, multisystem atrophy, head trauma, neurosyphilis, Creutzfeld-Jacob disease and other prion diseases, HIV and other encephalitides, and metabolic disorders such as hypothyroidism and vitamin B12 deficiency.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 is a Northern analysis of HO-1 mRNA implicating the presence of a circulating HO-1 suppressor (ROS) factor in sporadic AD, as described in Example 1. Control GAPDH bands used to ensure uniformity of RNA loading are depicted below the HO-1 bands.

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

13

Figure 2 depicts tabular results of studies of demographics and HOS activity in normal young control (NYC), normal elderly control (NEC), mild cognitive impairment (MCI) and sporadic Alzheimer disease (AD) subjects, as described in Example 2. Suppression by 24h incubation in human plasma of CSH-induced ($880\mu\text{M} \times 6 \text{ h}$) glial HO-1 mRNA band (Northern blot) relative to CSH-treated astrocytes grown in standard culture media; 0=0-25% suppression, 1=26-50% suppression, 2=51-75% suppression, 3=76-100% suppression. HOS = HOS activity; MMSE = Folstein Mini-mental State Exam Score; Cortisol = Plasma cortisol levels (nMol/L); AD Meds = cholinesterase inhibitors used for treatment of Alzheimer disease; E400 and E800 = 400 and 800 units vitamin E, respectively; C500 = 500 mg vitamin C.

Figure 3 depicts graphical results of HOS activity in normal control (NC), mild cognitive impairment (MCI) and sporadic Alzheimer disease (AD) subjects. HOS activity=percentage suppression (quartiles) by 24h incubation in human plasma of CSH-induced ($880\mu\text{M} \times 6 \text{ h}$) glial HO-1 mRNA band (Northern blot) relative to CSH-treated astrocytes grown in standard culture media, as described in Example 3.

Figure 4 depicts analysis of plasma cortisol levels (mean \pm SD) in normal control (NC), mild cognitive impairment (MCI) and sporadic Alzheimer disease (AD) subjects (panel A), as described in Example 4. ()=number of cases per group. Differences between groups are not statistically significant (1-way ANOVA). Correlation between plasma cortisol levels and HOS activity in the MCI (panel B) and AD (panel C) groups is not significant (linear regression analysis).

Figure 5 is a Northern analysis of HO-1 mRNA demonstrating the effects of sample storage time and antioxidant exposure on plasma HOS activity, as described in Example 8. C=Control (untreated) astrocyte cultures, CSH=cysteamine-treated astrocyte culture, AD=Alzheimer, MCI=Mild Cognitive Impairment, NEC=normal elderly control, N=normal subject on antioxidants. Control GAPDH bands are used as noted in Figure 1.

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

14

Figure 6 is a Northern analysis of HO-1 mRNA demonstrating the effects of plasma dilution on HOS activity, as described in Example 6.

Figure 7 is a Northern analysis of HO-1 mRNA demonstrating the effect of heat treatment on HOS activity, as described in Example 7. Control GAPDH bands are used as noted in Figure 1.

Figure 8 is a Northern analysis of HO-1 mRNA demonstrating the partial purification of HOS factor by heparin-agarose chromatography, as described in Example 8. Control GAPDH bands are used as noted in Figure 1.

Figure 9 is a Northern analysis of HO-1 mRNA demonstrating further HOS purification of the heparin agarose eluate by Concanavalin-A (Con-A) Agarose affinity column chromatography, as described in Example 9. Control GAPDH bands are used as noted in Figure 1.

Figure 10 is a Northern analysis of HO-1 mRNA demonstrating further HOS purification of the heparin agarose-concanavalin A eluate derived from 4 pooled AD plasma samples (29 cc starting material) on a Superose™ 12 HR FPLC Column, as described in Example 10. Control GAPDH bands are used as noted in Figure 1.

Figure 11 presents graphical results of relative protein concentrations in Superose™ 12 HR FPLC Column fractions derived from pooled AD plasma samples described in Fig. 10, as described in Example 10. Arrow denotes protein concentration in fraction (number 20-22) exhibiting robust HOS activity.

Figure 12 depicts results of a chromatogram from a function test of Superose™ 12 HR FPLC 1-cm diameter column (Catl. # 17-0538-01, Lot # 8283034) [Amersham Pharmacia Biotech, Inc Quebec Canada] using standard protein mixtures, as described in Example 10.

Figure 13 is a Northern analysis of HO-1 mRNA demonstrating the effects of NEC and AD plasma on astrocyte HO-

WO 02/08449

PCT/CA01/010866

15

HO-1 mRNA induction by multiple stimuli. The HOS bioassay was performed as described for Figure 1. Northern blots for HO-1 mRNA (top) and respective GAPDH mRNA (bottom) are shown. Control GAPDH bands are used as noted in Figure 1.

5 **DESCRIPTION OF THE EMBODIMENTS OF THE INVENTION**

Applicant has devised an improved diagnostic method, useful in the prediction, diagnosis, and prognostication of AD, AACD/MCI, and related neurological diseases, as well as methods and reagents which are useful in the treatment and study of AD, AACD/MCI, and related neurological diseases. These methods are based on the discovery that patients suffering from AD have an activity and corresponding factor in their plasma which significantly suppresses the expression of heme oxygenase-1 (HO-1). This HO-1 suppressor activity is assayed via the inability to upregulate the concentration of nucleotide sequences encoding HO-1, in response to exposure to a suitable experimental agent or treatment, in a suitable cell culture system pre-incubated with a tissue or body fluid derived from patients suffering from AD or other dementing diseases. This suppressor activity and corresponding factor shall be referred to as HO-1 suppressor (HOS) activity and factor, respectively.

Applicant has identified an activity, namely HOS activity, which is present in tissue or body fluids derived from patients suffering from AD as well as possibly those suffering from other dementing diseases, but is absent in normal age-matched control subjects. This activity may be detected in a tissue or body fluid obtained from these patients. Examples of possible sources of suitable tissue or body fluids include blood, plasma, lymphocytes, cerebrospinal fluid, urine, saliva, epithelia (such as skin epithelia) and fibroblast cell lines derived from patients.

An aspect of the invention is a HOS activity, which is an activity that suppresses the upregulation of HO-1 expression. Such upregulation occurs, for example, following exposure to an experimental agent or treatment which is, in the absence of HOS activity, capable of increasing HO-1 expression,

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

16

as detected by increases in HO-1 protein or HO-1 mRNA. In patients suffering from AD, as well as possibly those suffering from other dementing diseases, HOS activity suppresses the expression of HO-1, which is expressed at significantly higher levels in lymphocytes and possibly other non-neural tissue or body fluids in normal aged-matched control subjects.

A further aspect of the invention is a method of assaying HOS activity in a sample. Examples of possible sources of suitable samples include tissues and body fluids such as, for example, blood, plasma, lymphocytes, cerebrospinal fluid, urine, saliva, epithelia and fibroblast cell lines derived from patients, or fractions derived from these samples. The assay involves exposing the sample to be tested to a cell culture that is capable of undergoing an induction in HO-1 expression in response to exposure to a certain experimental agent or treatment. An example of such a cell culture is a rat astroglial culture, however, many other useful possibilities exist. Examples of such exposure to an experimental agent or treatment include exposure to oxidative stress, metal ions, amino acid analogues, sulfhydryl agents, interleukin-1 β , tumour necrosis factor- α (TNF- α) and hyperthermia. Examples of suitable sulfhydryl reagents include, but are not limited to, cysteamine and homocysteine. Following such exposure to an experimental agent or treatment, the level of HO-1 protein or HO-1 mRNA may be detected using suitable methods. The level of HO-1 may for example be detected by an immunoassay. The level of HO-1 mRNA may for example be detected by Northern analysis using an appropriate probe(s). Detection of HO-1 mRNA of greater sensitivity may be achieved for example using the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) method, described in Abraham (1998) and Mawal *et al.* (2000), both herein incorporated by reference. The activity assay may be adapted to a large scale level for analyzing a large number of samples simultaneously, possibly in a suitable array format, possibly with the automated execution (e.g., by robotics) of some or all of the steps therein.

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

17

A further possibility may be the development of a reporter-based assay for assaying HOS activity. Such an assay may involve the preparation of a suitable reporter construct, e.g. comprising a transcriptional regulatory element, such as the 5' untranslated promoter region, of the HO-1 gene, operably linked to a suitable reporter gene, i.e., capable of regulating the expression of a suitable reporter gene. Such a construct may additionally comprise the 3' untranslated region of the HO-1 gene or another suitable 3' sequence. In another embodiment, the construct may comprise an in frame fusion of a suitable reporter gene within the open reading frame of the HO-1 gene. The reporter gene may be chosen as such to facilitate the detection of its expression, e.g. by the detection of the presence and/or activity of its gene product. Many such suitable reporters may be used, which provide detectable signals. Most preferred embodiments in this class are those that provide a conveniently detectable signal, which may be detected by, for example, spectroscopic methods. Examples of suitable reporter genes include those encoding luciferase, beta-galactosidase, green fluorescent protein, alkaline phosphatase, chloramphenicol acetyltransferase, as well as others. Such a reporter construct may be introduced into a suitable system capable of exhibiting an increase in the level of expression of the reporter gene in response to exposure to an experimental agent or treatment which is capable of increasing HO-1 expression as noted above. Such an assay would also be adaptable to a possible large scale, high-throughput, automated format as noted above, and would allow more convenient detection due to the presence of its reporter component.

Using methods of assaying HOS activity as described above, applicant has determined that the level of HOS activity in a sample decreases with the increasing dilution of the sample, suggesting that HOS activity is attributed to the presence of a corresponding HOS factor. Using the same assay methods, applicant has further determined that pre-heating the sample to be tested abrogates HOS activity, suggesting that HOS activity is attributed to a protein or complex of proteins.

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

18

Since, to applicant's knowledge, glucocorticoids are the only known suppressors of HO-1 expression (Lavrovsky *et al.*, 1996; Deramaudt *et al.*, 1999), the discovery of a protein-like HOS factor is novel. Applicant has further demonstrated that

5 cortisol levels are not increased in AD or MCI samples with respect to normal samples, thus demonstrating that suppression of HO-1 expression in AD and MCI samples is not attributed to glucocorticoids, but rather, is a result of the activity of a (non-glucocorticoid) HOS factor.

10 Applicant has accomplished a partial purification of HOS activity and therefore HOS factor using one or multiple chromatographic methods in sequential fashion. An example of a suitable chromatographic method is affinity chromatography using a heparin-agarose matrix or a concanavallin-A (Con-A) agarose matrix or gel filtration chromatography using for

15 example a Superose™-12 matrix. Applicant has accomplished further purification of HOS factor using heparin-agarose, concanavallin-A (Con-A) agarose and Superose™-12 chromatography, in sequence, further suggesting that HOS factor

20 comprises a protein or complex of proteins, and, based on binding to the Con-A matrix, likely comprises a glycoprotein, in an embodiment, a mannoprotein. This suggests that HOS activity and the corresponding HOS factor may be obtained in a more highly purified form using various chromatographic

25 methods. Such purification is for example shown in Figure 11, where the peak of HOS activity elutes later than most of the protein in the sample, thus indicating that the Superose™-12 column has removed the majority of protein contaminants from the HOS factor-containing sample. Calibration of the column

30 using known protein molecular weight standards (Figure 12) indicates that HOS factor is a protein or complex of proteins having an approximate molecular weight in the range of 80-100 kDa, in an embodiment, having a molecular weight of approximately 90 kDa. These data thus provide further support

35 that HOS factor is a protein-like molecule. Applicant has further shown that HOS factor and associated HOS activity are stable during prolonged storage.

WO 02/08449

PCT/CA01/01866

19

Accordingly, the invention further provides a HOS factor, as described above.

Applicant has further demonstrated that HOS activity is not due to simple antioxidant behaviour, since both AD and normal plasma exhibit equivalent levels of partial suppression of the HO-1 mRNA response to a pro-oxidant, for example, menadione. Further, typical doses of antioxidants have no effect on the induction of HO-1 mRNA expression, and exposure of multiple, high dose, antioxidants only results in partial suppression.

A further aspect of the present invention is an improved diagnostic method, potentially useful in the prediction, diagnosis, and prognostication of AD, AACD/MCI, and related neurological diseases. This diagnostic method is based on the detection of HOS activity, using for example the assay methods described above, in a tissue or body fluid obtained from a patient. Because the presence of HOS activity precedes any decrease in HO-1 expression in a patient, this diagnostic method provides an even earlier diagnosis of AD, AACD/MCI, and related neurological diseases. In addition, the immunodetection of HOS factor or activity (see below) may provide an improved method of diagnosis over the detection of decreases in HO-1 expression using methods such as Northern analysis or the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) method, described in Abraham (1998) and Mawal et al. (2000), both herein incorporated by reference. Further, the correlation of the presence of HOS activity with the disease state represents a positive test for diagnosis. This is more desirable than a negative test, used for diagnosis based on the reduction or absence of HO-1 expression in a patient suffering from one of the dementing diseases described above.

It is known in the art that certain dementing diseases, for example, AD, correlate with changes in HO-1 levels while others do not. Such dementing diseases may be categorized as HO-1-dependent and HO-1-independent. As described in the instant application, such changes in HO-1 levels are a result of changes in the levels of HOS factor or

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

20

activity. Therefore, the invention further relates to methods, reagents, compounds and commercial packages to differentiate a dementing disease which exhibits a significantly altered level of HO-1 protein, HO-1 mRNA, HOS factor, or HOS activity, i.e., an HO-1-dependent dementing disease, from a dementing disease which does not exhibit such a significantly altered level of HO-1 protein, HO-1 mRNA, HOS factor, or HOS activity, i.e., an HO-1-independent dementing disease. The term "significantly" as used here means that the levels are altered from control levels beyond the range of experimental error, as known in the art.

The HOS activity of the present invention may also be used to develop therapeutic agents and methods for the treatment of AD and other dementing diseases. Since the appearance of HOS activity correlates with the presence of the disease state, the HOS activity and HOS factor is expected to play a causative role in the onset and/or progression of AD and other dementing diseases. Therefore, identification of factors or mechanisms which inhibit or activate HOS activity may be utilized for the development of therapeutic agents and methods for the treatment of AD and other dementing diseases. If an increase in HOS activity is a causative event in the onset and/or progression of AD and other dementing diseases, an inhibitor of HOS activity is expected to have therapeutic potential. Conversely, an activator of HOS activity is expected to represent an upstream causative agent of the onset and/or progression of AD and other dementing diseases, which may provide even earlier and improved methods of diagnosis. Further, all factors which effect HOS activity will lead to a better understanding of the mechanisms of the onset and/or progression of AD and other dementing diseases, and ultimately contribute to the development of improved therapeutic methods and agents. In addition, other factors which affect levels of HO-1 mRNA, protein and activity are also useful to the invention, similar to the above, and are thus a further aspect of the invention.

Accordingly, it is a further aspect of the present invention to provide a HOS activity-based screening method to

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

21

identify putative compounds which either inhibit or augment HOS activity. Such screening may be performed using for example the HOS activity assays described above, and may be adapted to a large scale, and possibly automated format. Such a method
5 may comprise exposing a known HOS activity-containing sample to the compound to be tested, and subsequently determining the level of HOS activity present, which is then compared to a control sample that was not exposed to the compound to be tested. In a high-throughput, automated format, this screening
10 method may be used for the rapid analysis of libraries containing a large number of compounds for their effects on HOS activity. In an embodiment, examples of such libraries include chemical libraries prepared by combinatorial synthesis.

The partially purified fraction comprising HOS factor
15 and HOS activity, obtained, for example, from heparin-agarose and/or Con-A agarose and/or Superose™-12 column chromatography, may be used to immunize a small mammal, e.g., a mouse or a rabbit, in order to raise antibodies which recognize this activity. In an embodiment the above mentioned fraction is
20 obtained from sequential heparin-agarose, Con-A agarose and Superose™-12 column chromatography. Accordingly, a further aspect of the invention provides an antibody that recognizes the HOS factor of the invention.

An antibody of the invention is either polyclonal or
25 monoclonal. Antibodies may be recombinant, e.g., chimeric (e.g., constituted by a variable region of murine origin associated with a human constant region), humanized (a human immunoglobulin constant backbone together with hypervariable region of animal, e.g., murine, origin), and/or single chain.
30 Both polyclonal and monoclonal antibodies may also be in the form of immunoglobulin fragments, e.g., F(ab)'₂, Fab or Fab' fragments. The antibodies of the invention are of any isotype, e.g., IgG or IgA, and polyclonal antibodies are of a single isotype or a mixture of isotypes.

35 Antibodies against the HOS factor of the present invention are generated by immunization of a mammal with a partially purified fraction comprising HOS factor. In an

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

22

embodiment the above mentioned fraction is obtained from sequential heparin-agarose, Con-A agarose and Superose™-12 column chromatography. Such antibodies may be polyclonal or monoclonal. Methods to produce polyclonal or monoclonal antibodies are well known in the art. For a review, see Harlow and Lane (1988) and Yelton *et al.* (1981), both of which are herein incorporated by reference. For monoclonal antibodies, see Kohler and Milstein (1975), herein incorporated by reference.

10 The antibodies of the invention, which are raised to a partially purified fraction comprising HOS factor of the invention, are produced and identified using standard immunological assays, *e.g.*, Western blot analysis, dot blot assay, or ELISA (see, *e.g.*, Coligan *et al.* (1994), herein incorporated by reference). The antibodies are used in diagnostic methods to detect the presence of a HOS factor and activity in a sample, such as a tissue or body fluid. The antibodies are also used in affinity chromatography for obtaining a purified fraction comprising the HOS factor and activity of the invention.

Accordingly, a further aspect of the invention provides (i) a reagent for detecting the presence of HOS factor and activity in a tissue or body fluid; and (ii) a diagnostic method for detecting the presence of HOS factor and activity in a tissue or body fluid, by contacting the tissue or body fluid with an antibody of the invention, such that an immune complex is formed, and by detecting such complex to indicate the presence of HOS factor and activity in the sample or the organism from which the sample is derived.

30 Those skilled in the art will readily understand that the immune complex is formed between a component of the sample and the antibody, and that any unbound material is removed prior to detecting the complex. It is understood that an antibody of the invention is used for screening a sample, such as, for example, blood, plasma, lymphocytes, cerebrospinal fluid, urine, saliva, epithelia and fibroblasts, for the presence of HOS activity.

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

23

For diagnostic applications, the reagent (i.e., the antibody of the invention) is either in a free state or immobilized on a solid support, such as a tube, a bead, or any other conventional support used in the field. Immobilization is achieved using direct or indirect means. Direct means include passive adsorption (non-covalent binding) or covalent binding between the support and the reagent. By "indirect means" is meant that an anti-reagent compound that interacts with a reagent is first attached to the solid support.

Indirect means may also employ a ligand-receptor system, for example, where a molecule such as a vitamin is grafted onto the reagent and the corresponding receptor immobilized on the solid phase. This is illustrated by the biotin-streptavidin system. Alternatively, a peptide tail is added chemically or by genetic engineering to the reagent and the grafted or fused product immobilized by passive adsorption or covalent linkage of the peptide tail.

Such diagnostic agents may be included in a kit which also comprises instructions for use. The reagent is labeled with a detection means which allows for the detection of the reagent when it is bound to its target. The detection means may be a fluorescent agent such as fluorescein isocyanate or fluorescein isothiocyanate, or an enzyme such as horse radish peroxidase or luciferase or alkaline phosphatase, or a radioactive element such as ^{125}I or ^{51}Cr .

Accordingly, a further aspect of the invention provides a process for purifying, from a tissue or body fluid, the HCS factor of the invention, which involves carrying out antibody-based affinity chromatography with the tissue or body fluid, wherein the antibody is an antibody of the invention.

For use in a purification process of the invention, the antibody is either polyclonal or monoclonal, and preferably is of the IgG type. Purified IgGs are prepared from an antiserum using standard methods (see, e.g., Coligan et al. (1994), herein incorporated by reference). Conventional chromatography supports, as well as standard methods for

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

24

grafting antibodies, are described in, e.g., Harlow and Lane (1988), herein incorporated by reference, and outlined below.

Briefly, a tissue or body fluid, such as plasma from a patient suffering from AD, preferably in a buffer solution, is applied to a chromatography material, preferably equilibrated with the buffer used to dilute the tissue or body fluid so that the HOS factor of the invention (i.e., the antigen) is allowed to adsorb onto the material. The chromatography material, such as a gel or a resin coupled to an antibody of the invention, is in either a batch form or a column. The unbound components are washed off and the antigen is then eluted with an appropriate elution buffer, such as a glycine buffer or a buffer containing a chaotropic agent, e.g., guanidine HCl, or high salt concentration (e.g., 3 M MgCl₂). Eluted fractions are recovered and the presence of the antigen is detected, e.g., by measuring the absorbance at 280 nm.

A further aspect of the present invention is a diagnostic imaging method, which comprises introducing into a biological system, an antibody of the invention, which is used in conjunction with an appropriate detection system to identify areas where HOS factor or activity is present or absent.

The following examples are provided in order to illustrate the methods of the present invention and are not meant to limit the scope of the invention.

Example 1: Determination of the presence of HOS activity in plasma derived from AD patients

Whole blood is collected from normal elderly (N1, N2) subjects or patients with probable sporadic AD (AD1, AD2) in heparinized tubes. This is then layered over a Ficoll Paque™ density gradient and centrifuged at 1800 rpm for 20 minutes. The top plasma layer is then collected and saved for incubation with rat astroglia as described below. The lymphocyte fractions are collected and used for the isolation of mRNA for Northern analysis as described below.

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

25

Determination of lymphocyte HO-1 mRNA levels:

Lymphocyte fractions were obtained by differential centrifugation of whole blood on Ficoll Paque™ gradients as described above. Cytoplasmic RNA was isolated from the

5 lymphocytes using an acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction method, as described by Chomezynski et al. (1997), herein incorporated by reference. Six micrograms of RNA was denatured and size-separated by electrophoresis on 1% agarose/formaldehyde gels. RNA integrity

10 was confirmed by ethidium bromide staining. The RNA was transferred onto Hybond-N™ filter paper and covalently cross-linked to the membrane by UV light for two minutes. The hybridization probe (HO-1; 1.0kb) was prepared by random priming using the Random Primer DNA Labelling System, as

15 described by Feinberg et al. (1984), herein incorporated by reference. Prehybridization was performed for 12 hours at 42°C in a buffer containing formamide deionized, 5 x Denhardt's reagent, 6 x SSPE and 0.5% SDS. The hybridization buffer consisted of the prehybridization buffer without 5 x Denhardt's

20 reagent, and ³²P-labelled denatured DNA probe, as described in Noonberg et al. (1994), herein incorporated by reference. Equal loading of RNA was confirmed by hybridization with a cDNA for the (housekeeping) gene, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). All washes were performed under

25 stringent conditions (1 x SSC and 0.2% SDS for 45 minutes at room temperature, 0.4 x SSC and 0.2% SDS for 15 minutes at 65°C). The RNA hybridizing with cDNA probes was visualized by autoradiography using an intensifying screen at -80°C, as described in Church et al. (1984), herein incorporated by

30 reference.

As noted in our related US Patent (No. 6,210,895; April 13, 2001) and publication (Schipper et al., 2000), both herein incorporated by reference, and as reiterated in Panel A of Figure 1, lymphocytes isolated from normal subjects N1 and

35 N2 exhibit significant levels of HO-1 mRNA (lanes 1 and 2), which is not detectable in lymphocytes isolated from AD patients AD1 and AD2 (lanes 3 and 4).

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

26

Assay of plasma HOS activity via the induction of HO-1 expression upon cysteamine (CSH) treatment of rat astroglia:

Brain cell cultures: Rat astroglia were prepared as described in Schipper *et al.* (1999), herein incorporated by reference, as follows:

Pregnant Sprague-Dawley rats were obtained from Charles River Breeding Farms. Primary neural cell cultures were prepared from 1-day old neonates by mechanoenzymatic dissociation of cerebral tissue or body fluid as previously described by Chopra *et al.*, (1997), herein incorporated by reference. Cells were grown in Ham's F-12 and high-glucose DMEM (50:50 vol/vol) supplemented with 10 mM HEPES, 5% heat-inactivated horse serum, 5% heat-inactivated fetal bovine serum, and penicillin/streptomycin (50 U/ml and 50 µg/ml, respectively). The cells were plated in 75-cm² tissue or body fluid culture flasks at a density of 1×10^6 cells/ml. Cultures were incubated at 37°C in humidified 95% air/5% CO₂ for 6h, at which time they were vigorously shaken 20-30 times with replacement of fresh medium to remove adherent oligodendroglia and microglia from the astrocytic monolayers. The cultures were then incubated under the above-mentioned conditions for 6 days, at which time >98% of the cells composing the monolayer were astroglia, as determined by immunohistochemical labeling for the astrocyte-specific marker glial fibrillary acidic protein, as described by Chopra *et al.* (1995), herein incorporated by reference. These astroglia cultures were grown under different conditions and subjected to different treatments (see below), and subsequently mRNA was isolated for Northern analysis of HO-1 mRNA levels as described in Schipper *et al.* (1999), herein incorporated by reference, as follows:

RNA isolation and Northern analysis: Cultured astrocytes were harvested using a rubber policeman, and cytoplasmic RNA was isolated using an acid guanidinium thiocyanate/phenol/chloroform extraction method, as described by Chomczynski and Sacchi (1987), herein incorporated by reference. Ten micrograms of RNA was denatured and size-

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

27

separated by electrophoresis on 1% agarose/formaldehyde gels. RNA integrity was confirmed by ethidium bromide staining. The RNA was transferred onto Hybond-N⁺ filter paper and covalently cross-linked to the membrane by UV light for 2 min. The hybridization probe (HO-1; 1.0 kb) was prepared by random primer-generated double-strand DNA probes using the random primer DNA labeling system, as described by Feinberg and Vogelstein (1984), herein incorporated by reference. Prehybridization was performed for 12 h at 42°C in a buffer containing formamide-deionized, 5X Denhardt's reagent, 6X saline-sodium phosphate-EDTA, and 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS). The hybridization buffer consisted of the prehybridization buffer without 5X Denhardt's reagent and ³²P-labeled denatured DNA probe, as described by Noonberg *et al.* (1994), herein incorporated by reference. Equal loading of RNA was confirmed by hybridization with a cDNA for the (housekeeping) gene, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), or 18S mRNA. All washes were performed under stringent conditions [1X saline-sodium citrate (SSC) and 0.2% SDS for 45 min at room temperature, 0.4X SSC and 0.2% SDS for 15 min at 65°C, and 0.1X SSC and 0.2% SDS for 15 min at 65°C]. The RNA hybridizing with cDNA probes was SDS for 15 min at 65°C, and 0.1X SSC and 0.2% SDS for 15 min at 65°C]. The RNA hybridizing with cDNA probes was visualized by autoradiography using an intensifying screen at -80°C, as described by Church and Gilbert (1984), herein incorporated by reference. Resulting bands on the autoradiograph were analyzed using a phosphorimager 31 densitometer. Densitometry data were normalized by calculating the ratios of the HO-1 mRNA signals to control GAPDH or 18S mRNA signals.

Figure 1, panel A: Northern blot of lymphocyte HO-1 mRNA (and control GAPDH mRNA) derived from 2 normal elderly individuals (N1, N2) and 2 patients with probable sporadic AD AD1, AD2). As noted in our related US Patent (No. 6,210,895; April 13, 2001) and publication (Schipper *et al.*, 2000), both herein incorporated by reference, lymphocyte HO-1 mRNA bands are visible in the controls (lanes 1 and 2), and not detectable

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

28

(lanes 3 and 4) in the AD subjects, indicating the presence of HOS activity in the latter.

Using the methods described above, Northern analysis of HO-1 mRNA levels of rat astroglia grown under different conditions and subjected to different treatments was performed, the results of which are shown in panels B and C of Figure 1. Panel B: Control (unchallenged) rat astroglia grown in standard culture media for 6 days exhibit faint or no HO-1 mRNA bands (lanes 5-7). Cysteamine (CSH) treatment (880 μ M x 6hr) induces robust HO-1 mRNA bands in these cells (lanes 8-10). Twenty-four hour incubation of the rat astroglia with the plasma derived from the same 2 normal subjects (N1, N2; lanes 11-12) and the 2 AD patients (AD1, AD2; lanes 13-14) noted above (see panel A) has no appreciable affect on baseline HO-1 mRNA levels. Panel C: In contrast to plasma derived from the 2 normal subjects (lanes 15-24), undiluted plasma from the 2 AD patients markedly suppresses the rat astroglial HO-1 mRNA response to CSH (lanes 25-27; 30-32). Dilution of the AD plasma (1:9 in standard culture media; "10%") greatly diminishes its inhibitory effect on CSH-induced HO-1 mRNA expression (lanes 28-29; 33-34). Therefore, there exists in the plasma of AD patients an HOS activity, which is not present in the plasma of normal subjects, and which is assayable by the determination of HO-1 mRNA levels in rat astroglia incubated with the relevant plasma sample and subjected to CSH treatment.

Example 2: Demographics and HOS activity in normal young control (NYC), normal elderly control (NEC), mild cognitive impairment (MCI) and sporadic Alzheimer disease (AD) subjects.

Results are shown in tabular form in Figure 2. Suppression by 24h incubation in human plasma of CSH-induced (880 μ M x 6 h) glial HO-1 mRNA band (Northern blot) relative to CSH-treated astrocytes grown in standard culture media; 0=0-25% suppression, 1=26-50% suppression, 2=51-75% suppression, 3=76-100% suppression. HOS = HOS activity; MMSE = Folstein Minimal State Exam Score; Cortisol = Plasma cortisol levels (nMol/L). AD Meds = cholinesterase inhibitors used for treatment of Alzheimer disease. E400 and E800 = 400 and 800

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

29

units vitamin E, respectively; C500 = 500 mg vitamin C. HOS activity was assayed as described in Example 1. Measurement of cortisol levels were performed using the GammaCoat [I-125] Cortisol Radioimmunoassay (RIA) Kit based on the competitive binding principles of RIA.

Example 3: HOS activity in normal control (NC), mild cognitive impairment (MCI) and sporadic Alzheimer disease (AD) subjects.

Results are shown in Figure 3. HOS activity = percentage suppression (quartiles) by 24h incubation in human plasma of CSH-induced (880 μ M x 6 h) glial HO-1 mRNA band (Northern blot) relative to CSH-treated astrocytes grown in standard culture media. HOS activity was assayed as described in Example 1.

Example 4: Plasma cortisol levels (mean \pm SD) in normal control (NC), mild cognitive impairment (MCI) and sporadic Alzheimer disease (AD) subjects.

Results are shown in Figure 4. Panel A shows mean (\pm SD) plasma cortisol levels of NC, MCI and AD subjects. () = number of cases per group. Differences between groups are not statistically significant (1-way ANOVA). Correlations between plasma cortisol levels and HOS activity in the MCI (panel B) and AD (panel C) groups are not significant (linear regression analysis). Although glucocorticoids are known suppressors of the HO-1 gene, these data indicate that elevated cortisol levels are not responsible for HOS activity in the MCI and AD plasma.

Example 5: Effects of sample storage time and antioxidant exposure on plasma HOS activity.

Results are shown in Figure 5. HOS activity was assayed as described in Example 1. C = Control (untreated) astrocyte cultures, CSH = cysteamine-treated astrocyte culture, AD = Alzheimer, MCI = Mild Cognitive Impairment, NEC = normal elderly control, N = normal subject on antioxidants. Protease inhibitors (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Cat. # 1836153, Roche, Mannheim) were added to all plasma samples

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

30

prior to freezing. HOS activity is retained in AD and MCI plasma samples stored at -85°C for up to 15 months. In normal subjects, low-dose vitamin E (400U/day), a dose of vitamin E commonly taken by AD patients, does not affect the astrocyte HO-1 mRNA response to CSH (N1). In normal individuals, exposure to multiple, very high-dose antioxidants partially attenuates the glial HO-1 mRNA response to CSH (N2, N3).

Example 6: Effects of plasma dilution on HOS activity

Plasma HOS activity was assayed via the determination of HO-1 mRNA levels in treated rat astroglia as described in Example 1. In this case, the effects of plasma dilution were examined, as documented in Figure 6.

Lane 1: Absence of HO-1 mRNA in unchallenged rat astrocytes grown in standard culture media. Lane 2: Cysteamine (CSH; $880\mu\text{M}$ x 6h) induces strong HO-1 mRNA bands in cultured astroglia grown in standard media. Lane 3: Absence of HO-1 mRNA bands in unchallenged astrocytes grown in Alzheimer (AD) plasma (A: patient 1; B: patient 2). Lanes 4-6: undiluted AD plasma markedly suppresses the HO-1 mRNA response to CSH in cultured astroglia (intense HOS activity present). The glial HO-1 mRNA response to CSH progressively increases (abrogation of HOS activity) with increasing dilutions of AD plasma using standard media (lanes 7-15).

Panel A and panel B of Figure 6 represent data obtained using plasma obtained from two different AD patients (A: patient 1; B: patient 2). As noted above and shown again in Figure 6, untreated rat astroglia grown in standard culture media exhibit little or no detectable HO-1 mRNA (lane 1), however, HO-1 expression increases significantly upon CSH treatment (lane 2). In the absence of CSH treatment, rat astroglia incubated with AD plasma show no detectable HO-1 mRNA (lane 3), also as noted in Example 1. CSH treatment of rat astroglia incubated with undiluted AD plasma ("100%") failed to induce any significant induction of HO-1 expression (lanes 4-6), due to the intense HOS activity present in the undiluted AD plasma. However, the rat astroglial response to CSH

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

31

progressively increases (abrogation of HOS activity) with increasing dilutions of the AD plasma using standard media (lanes 7-15). Therefore, there appears to exist in AD plasma a HOS factor whose plasma concentration correlates with HOS activity.

Example 7: Effect of heat treatment on HOS activity

Plasma HOS activity was assayed via the determination of HO-1 mRNA levels in treated rat astroglia as described in Example 1. In this case, the effects of prior heat treatment of AD plasma were examined, as documented in Figure 7.

As noted above, control rat astroglia grown in standard media or exposed to human plasma (from normal (NEC) subjects or AD patients) exhibit little or no HO-1 mRNA via Northern analysis in the absence of CSH treatment (lanes 1, 5, 7 and 10). CSH treatment (880 μ M CSH x 6h) of astroglia grown in standard media results in the observation of an intense HO-1 mRNA signal (lane 2). Also as noted above, this induction of HO-1 expression in response to CSH treatment is significantly attenuated in astroglia incubated in AD plasma for 24 h (lanes 3 and 4). However, this attenuation is no longer observed when the AD plasma is heated (100°C for 10 min.) prior to incubation with rat astroglia, indicating that as a result of this pre-heating AD plasma HOS activity is abrogated, as observed in the robust HO-1 mRNA signal seen in lane 6. CSH treatment of rat astroglia with normal plasma either untreated or pre-heated results in a robust observed HO-1 mRNA signal, since HOS activity is absent in either case (lanes 8 and 9). Therefore, these data indicate that HOS activity in AD plasma is mediated by a protein.

Example 8: Partial purification of HOS factor by heparin-agarose affinity column chromatography

Plasma from one normal subject (NEC) and one AD patient (AD) was subjected to affinity purification on a heparin-agarose column as described in Sasaki et al. (1987), herein incorporated by reference, as follows:

WO 02/08449

PCT/CA01/01866

32

Plasma preparation for loading onto Heparin Agarose

column: The NEC and AD plasma tubes were thawed at 4°C. The samples were then dialyzed against Heparin Agarose column loading buffer [HALB: 20 mM Hepes (SIGMA Chemical Co., Saint Louis, MI, USA, Cat# H-4034) pH 7.2, 150 mM NaCl, protease inhibitor tablet (Roche Diagnostics, Laval, QC, CANADA Cat# 1 873 580)] for 2h with gentle stirring. The samples were then centrifuged at 15,000 g at 4°C for 20 minutes and supernatants collected.

10 Heparin Agarose affinity column chromatography: The Heparin Agarose column (1 cm X 2 cm; SIGMA Chemical Co., Saint Louis, MI, USA, Cat# H-0402) was prewashed with 20 ml of HALB. Plasma supernatants were loaded on the column. The column was washed with 4-6 volumes of HALB and 1 ml fractions
15 collected. The flow-through fractions containing protein were pooled. The column was eluted with elution buffer [EB: 20 mM Hepes pH 7.2, 1 M NaCl, protease inhibitor] and 1 ml eluates containing proteins were pooled and dialyzed against HALB for 2-4h.

20 The preparation of protein (e.g. plasma or column fractions) for the rat astroglia/HOS activity assay was performed as described in Sasaki et al. (1987), herein incorporated by reference, as follows:

Media was removed from 70 ml, 25 cm² flasks containing
25 confluent astrocyte monolayer (7-10 days in culture). To each individual flask, 1.4 ml of NEC or AD plasma was added. To each individual flask, approximately 1.4 ml (10 mg protein based on the Bradford BioRad Protein assay kit using BSA as control) of the Heparin Agarose flow-through fraction derived
30 from NEC or AD subjects was added with 0.6 ml of complete DMEM medium. To each individual flask, approximately 1.4 ml (0.5 mg protein) of the Heparin Agarose eluate fractions derived from NEC or AD subjects was added with 0.6 ml of complete DMEM medium.

35 Subsequently, the various samples were assayed for HOS activity as described in Example 1. Briefly, the eluate

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

33

samples were incubated with rat astroglia, which were then subjected to CSH treatment. Subsequent mRNA isolation and Northern analysis to determine the level of HO-1 mRNA was performed, with the results shown in Figure 8.

5 Figure 8: Panel A: Northern blots of HO-1 mRNA. Panel B:
Control GAPDH mRNA. Plasma from one NEC and one AD patient
was affinity purified on a heparin-agarose column and the
eluate, collected using a high salt solution, was dialyzed. In
the absence of CSH treatment, control rat astroglia pre-
10 incubated with heparin eluates from NEC or AD plasma for 24h
did not exhibit an increase in HO-1 expression, as observed by
the relatively faint HO-1 mRNA bands which correspond to these
samples (lanes 1 and 4). CSH treatment (880 μ M CSH x 6h) of
rat astroglia incubated with the heparin eluate from NEC plasma
15 results in an induction of HO-1 expression, as observed by
intense HO-1 mRNA bands (lanes 2 and 3). Conversely, no
augmentation of HO-1 mRNA bands in response to CSH treatment
was observed in rat astroglia incubated for 24h with the
heparin eluate fraction derived from the plasma of the AD
20 patient. These data support the presence of a HOS factor in
the plasma of AD patients, but not normal (NEC) subjects, and
indicate that the factor binds to heparin-agarose affinity
columns.

25 **Example 9: Further HOS purification of heparin agarose eluate
by Concanavalin-A (Con-A) Agarose affinity column
chromatography.**

Heparin Agarose column eluate (as described in Fig.
8) was dialyzed against loading buffer: 50 mM Hepes, pH 7.2
containing 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂ and
30 Complete™ EDTA-free Protease inhibitor cocktail for 4 h at 4 °C.
The dialysate was loaded onto Con-A Agarose column. The column
was washed with four bed volumes of loading buffer. The HOS
fraction was eluted with loading buffer containing 0.2M α -D-
methyl mannopyranoside. The eluate was dialyzed against loading
35 buffer. The HOS bioassay (glial HO-1 mRNA response to 880 μ M CSH
x 6 h) was performed as described in Example 1 and Figure 1.
Results are shown in figure 9. Glial HO-1 mRNA bands were

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

34

faint in all specimens not exposed to CSH. Robust HO-1 mRNA responses to CSH were observed in control astroglial cultures (grown in standard culture media) and astrocytes incubated for 24 hours in NEC plasma. In contrast, HO-1 mRNA responses to CSH were markedly suppressed in astrocytes incubated for 24 hours in (i) whole AD plasma, (ii) dialyzed AD plasma prior to heparin-ConA chromatography and (iii) heparin Agarose-ConA eluate derived from AD plasma. These data indicate that the AD plasma HOS factor binds to ConA columns and is therefore likely a glycoprotein.

Example 10: Further HOS purification of heparin agarose-concanavalin A eluate derived from 4 pooled AD plasma samples (29 cc starting material) on Superose™ 12 HR FPLC Column.

Results are shown in Figures 10 to 12. Heparin Agarose - ConA Agarose purified AD plasma (1-ml) was dialyzed against 20 mM Hepes, pH 7.2 containing 150 mM NaCl and Complete™ EDTA-free Protease inhibitor cocktail (1 tablet/100-ml; Catl. # 1873580, Lot 61320101; Roche Diagnostics, Quebec, Canada) for four hours at 4 °C. The dialyzed fraction was loaded on Superose™ 12 HR FPLC 1-cm diameter column (Catl. # 17-0538-01, Lot # 8283034) [Amersham Pharmacia Biotech, Inc Quebec Canada]. HOS activity was measured by bioassay in each fraction as described in Example 1 and Figure 1. As shown in Figure 10, robust HOS activity was observed in fraction number 20-22.

Figure 11: Relative protein concentrations in Superose™ 12 HR FPLC Column fractions derived from pooled AD plasma samples described in Fig. 10. Each 0.5-ml fraction of the flow-through was collected and absorbance (O.D.) measured at 280 nm by spectrophotometer. A graph of O.D. versus fraction number is plotted. Arrow denotes protein concentration in fraction (number 20-22) exhibiting robust HOS activity (Figure 11).

Figure 12: A chromatogram from a function test of Superose™ 12 HR FPLC 1-cm diameter column (Catl. # 17-0538-01, Lot # 8283034) [Amersham Pharmacia Biotech, Inc Quebec Canada] using standard protein mixtures. Plasma samples were derived

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

35

from the same pooled AD plasmas described in Fig. 10. Each 0.5-ml fraction of the flow-through was collected and absorbance measured at 280 nm. A graph of peak molecular weight for each protein standard versus fraction number was plotted. Based on the elution profile of standards with known molecular weight, the molecular weight of the HOS-positive fraction (number 20-22) is estimated at approximately 90 kDa.

Example 11: Effects of NEC and AD plasma on astrocyte HO-1 mRNA induction by multiple stimuli.

The HOS bioassay was performed as described in Example 1 and Figure 1. Northern blots for HO-1 mRNA (top) and respective GAPDH mRNA (bottom) are shown in Figure 13. AD plasma strongly suppressed the HO-1 mRNA response to CSH (880 μ M), interleukin-1 β (Il-1 β 50 and 100 ng/ml), and homocysteine (HC 200 μ M). NEC plasma showed no HOS activity in the face of these stimuli. AD plasma completely suppressed, whereas NEC plasma partially suppressed, the HO-1 mRNA response to tumour necrosis factor- α (TNF- α 50 and 100 ng/ml). AD and NEC plasma exhibited partial and equal suppression of the glial HO-1 mRNA response to menadione (Mena 100 μ M). These data indicate that: A) The HOS protein in AD plasma is active against multiple inducers of astroglial HO-1 mRNA. B) HOS activity in AD plasma is particularly potent in the face of TNF- α challenge. Since partial HOS activity against TNF- α also occurs in NEC plasma, differences in HOS protein expression between AD and NEC may be quantitative rather than qualitative. C) Simple antioxidant behaviour does not account for HOS activity in AD plasma because both AD and NEC plasma exhibit partial and equal suppression of the glial HO-1 mRNA response to the pro-oxidant, menadione.

The above examples illustrate application of the testing method to detect HOS activity. Further, the above examples illustrate the testing method using plasma as the tissue or body fluid sample. The method can also be applied to other tissue or body fluids such as blood, cerebrospinal fluid,

WO 02/08449

PCT/CA01/01866

36

urine, saliva, epithelia and to fibroblast cell lines derived from patients.

The test can be applied to compare the level of HOS activity in a specific patient over a period of time, or to
5 compare the level of HOS activity in a patient with the corresponding level in a normal control population.

The above examples further demonstrate the presence of a HOS factor which is a glycoprotein, in an embodiment a
mannoprotein, having an approximate molecular weight in the
10 range of 80-100 kDa, in an embodiment having a molecular weight of approximately 90 kDa, and which is not a glucocorticoid.

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

37

REFERENCES

- Abraham, N.G. (1998) Quantitation of heme oxygenase (HO-1) copies in human tissue or body fluids by competitive RT/PCR, in *Methods in Molecular Biology*, vol. 108: *Free Radical and Antioxidant Protocols* (Armstrong, D., ed.), pp. 199-209, Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Coligan J.E., et al., (1994) *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.
- Chomczynski P. and Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. *Analytical Biochem.* 162:156-159.
- Chopra, V.S., et al. (1995) Differential effects of cysteamine on heat shock protein induction and cytoplasmic granulation in astrocytes and glioma cells. *Mol. Brain Res.* 31:173-184.
- Chopra, V.S., et al. (1997) A cellular stress model for the differential expression of glial lysosomal cathepsins in the aging nervous system. *Exp. Neurol.* 147:221-228.
- Church G.M. and Gilbert W. (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1991-1995.
- Deramaudt, T.B., et al. (1999) Negative regulation of human heme oxygenase in microvessel endothelial cells by dexamethasone. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222:185-193.
- Feinberg AP and Vogelstein B. (1984) A Technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochem.* 137:266-267.
- Grossi, D., et al. (1988) Senile dementias. II International Symposium (pp. 97-99). Paris: John Libbey Eurotext.
- Harlow, E. and Lane, D (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

38

Haxby J.V., et al. (1992) Individual trajectories of cognitive decline in patients with dementia of the Alzheimer type. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 14:575-592.

5 Kohler G. and Milstein C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497.

Lavrovsky, Y., et al. (1996) Downregulation of the human heme oxygenase gene by glucocorticoids and identification of 56b regulatory elements. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*
10 218:759-765.

Mann, U., et al. (1992) Heterogeneity in Alzheimer's disease: Progression rate segregated by distinct neuropsychological and cerebral metabolic profiles. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 55:956-959.

15 Mawal, Y., et al. (2000) RT-PCR confirmation of suppressed HO-1 mRNA levels in Alzheimer lymphocytes. Abstract to be presented at the 1st International Symposium on HO/CO, July 14-17, 2000.

Nonberg S.B., et al. (1994) Detection of triplex-forming RNA oligonucleotides by triplex blotting. *BioTechniques* 16:1070-1072.

Sasaki, H., et al., (1987) Improved method for the immobilization of heparin. *J. Chromatog.* 400:123-132.

25 Schipper H.M., et al. (1995). Expression of heme oxygenase-1 in the senescent and Alzheimer-diseased brain. *Ann. Neurol.* 37:758-768.

Schipper H.M., et al. (1999) Mitochondrial iron sequestration in dopamine-challenged astroglia: role of heme oxygenase-1 and the permeability transition pore. *J. Neurochem.* 72:1802-1811.
30

Schipper H.M., et al. (2000) Evaluation of Heme Oxygenase-1 as a Systemic Biological Marker in AD. *Neurology* 54:1297-1304.

WO 02/08449

PCT/CA01/01866

39

Yelton D.E. and Scharff M.D. (1981) Monoclonal
Antibodies: a powerful new tool in biology and medicine. *Ann.*
Rev. Biochem. 50:657-680.

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

40

CLAIMS:

1. A heme oxygenase-1 suppressor (HOS) factor, wherein said factor attenuates the increase in the level of heme oxygenase-1 (HO-1).
- 5 2. The factor of claim 1, wherein said attenuation occurs in response to exposure to an experimental agent or treatment which is capable of increasing the level of HO-1.
3. The factor of claim 1, wherein the factor comprises a protein.
- 10 4. The factor of claim 2, wherein the exposure to an experimental agent or treatment comprises exposure to any one or more of oxidative stress, metal ions, amino acid analogues, sulfhydryl agents, interleukin-1 β , tumour necrosis factor- α (TNF- α) and hyperthermia.
- 15 5. The factor of claim 4, wherein the sulfhydryl agent is selected from the group consisting of cysteamine and homocysteine.
6. The factor of claim 5, wherein the sulfhydryl agent is cysteamine.
- 20 7. A method for assessing dementing diseases in a patient which comprises:
 - determining the level of heme oxygenase-1 suppressor (HOS) factor or activity, in tissue or a body fluid obtained from a patient; and
 - 25 comparing said level of HOS factor or activity with the corresponding level of HOS factor or activity in corresponding tissue or body fluid obtained from at least one control person, whereby if said level of HOS factor or activity is greater than said corresponding level of HOS factor or
 - 30 activity in said tissue or body fluid obtained from at least one control person then said patient suffers from a dementing disease;

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

41

wherein such method is used to predict the onset of, diagnose, or prognosticate dementing diseases.

8. A diagnostic method for differentiating, in a patient suffering from a dementing disease, between a dementing disease which is HO-1-dependent and a dementing disease which is HO-1-independent, said method comprising:

determining the level of heme oxygenase-1 suppressor (HOS) factor or activity, in tissue or a body fluid obtained from a patient suffering from a dementing disease; and

10 comparing said level of HOS factor or activity with the corresponding level of HOS factor or activity in corresponding tissue or body fluid obtained from at least one control person,

whereby if said level of HOS factor or activity differs significantly from said corresponding level of HOS factor or activity in said tissue or body fluid obtained from at least one control person then said patient suffers from a dementing disease which is HO-1-dependent, and if said level of HOS factor or activity does not differ significantly from said corresponding level of HOS factor or activity in said tissue or body fluid obtained from at least one control person then said patient suffers from a dementing disease which is HO-1-independent.

9. The method according to claim 7 wherein the tissue or body fluid is selected from blood, plasma, lymphocytes, cerebrospinal fluid, urine, saliva, epithelia and fibroblasts.

10. The method according to claim 8 wherein the tissue or body fluid is selected from blood, plasma, lymphocytes, cerebrospinal fluid, urine, saliva, epithelia and fibroblasts.

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

42

11. The method according to claim 7 wherein the dementing disease is selected from the group consisting of Alzheimer Disease, Age-Associated Cognitive Decline, Mild Cognitive Impairment, Parkinson disease with dementia, Progressive
5 Supranuclear Palsy, Vascular (i.e. multi-infarct) Dementia, Lewy Body Dementia, Huntington's Disease, Down's syndrome, normal pressure hydrocephalus, corticobasal ganglionic degeneration, multisystem atrophy, head trauma, neurosyphilis, Creutzfeld-Jacob disease and other prion diseases, HIV and
10 other encephalitides, and metabolic disorders such as hypothyroidism and vitamin B12 deficiency.
12. The method of claim 7 wherein the control person is a normal age-matched person.
13. The method of claim 7 wherein the method is used to
15 prognosticate dementing diseases and wherein the control person is the patient from whom the corresponding tissue or body fluid was obtained at another time.
14. The method according to claim 8 wherein the HO-1-dependent dementing disease is Alzheimer Disease.
- 20 15. The method of claim 8 wherein the control person is a normal age-matched person.
16. The method of claim 8 wherein the control person is the patient from whom the corresponding tissue or body fluid was obtained at another time.
- 25 17. A method for assaying the level of heme oxygenase-1 (HO-1) suppressor (HOS) factor or activity in a sample which comprises:
- exposing the sample to a cell culture;
 - subjecting the cell culture to exposure to an
30 experimental agent or treatment which may increase the level of HO-1 protein or mRNA encoding HO-1;
 - determining the level of HO-1 protein or mRNA encoding HO-1; and

WO 02/08449

PCT/CA01/01866

43

comparing said level of HO-1 protein or mRNA encoding HO-1 with a corresponding control level of HO-1 protein or mRNA encoding HO-1;

5 whereby the level of said HO-1 protein or mRNA encoding HO-1 inversely correlates with the level of HOS factor or activity.

18. A method for assaying the level of heme oxygenase-1 (HO-1) suppressor (HOS) factor or activity in a sample comprising:

10 exposing said sample to an antibody which recognizes the factor of claim 1;

isolating immune complexes; and

determining the level of HOS factor or activity in the immune complex.

15 19. A method for assaying the level of heme oxygenase-1 (HO-1) suppressor (HOS) factor or activity in a sample comprising:

20 exposing said sample to a reporter construct, wherein said reporter construct comprises the HO-1 promoter region and a reporter gene, wherein said reporter gene encodes a protein which possesses a detectable reporter activity;

determining the level of said reporter activity; and

comparing said level of said reporter activity with a corresponding control level of said reporter activity;

25 whereby the level of said reporter activity inversely correlates with the level of HOS factor or activity.

20. A method for screening a candidate compound for the presence of an inhibitor or activator of HOS activity or HOS factor comprising:

30 exposing said candidate compound to a sample known to comprise HOS activity or HOS factor;

WO 02/08449

PCT/CA01/01866

44

assaying the level of HOS activity or HOS factor
using a method selected from the group consisting of:

(a) a method for assaying the level of heme
oxygenase-1 (HO-1) suppressor (HOS) factor or activity in a
5 sample which comprises:

exposing the sample to a cell culture;

subjecting the cell culture to exposure to an
experimental agent or treatment which may increase the level of
mRNA encoding HO-1;

10 determining the level of HO-1 protein or mRNA
encoding HO-1; and

comparing said level of HO-1 protein or mRNA encoding
HO-1 with a corresponding control level of HO-1 protein or mRNA
encoding HO-1;

15 whereby the level of said HO-1 protein or mRNA
encoding HO-1 inversely correlates with the level of HOS factor
or activity;

(b) a method for assaying the level of heme
oxygenase-1 (HO-1) suppressor (HOS) factor or activity in a
20 sample comprising:

exposing said sample to an antibody which recognizes
the factor of claim 1;

isolating immune complexes; and

25 determining the level of HOS factor or activity in
the immune complex; and

(c) a method for assaying the level of heme
oxygenase-1 (HO-1) suppressor (HOS) factor or activity in a
sample comprising:

30 exposing said sample to a reporter construct, wherein
said reporter construct comprises the HO-1 promoter region and

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

45

a reporter gene, wherein said reporter gene encodes a protein which possesses a detectable reporter activity; and

determining the level of said reporter activity; and

5 comparing said level of said reporter activity with a corresponding control level of said reporter activity;

whereby the level of said reporter activity inversely correlates with the level of HOS factor or activity;

and comparing said level of HOS activity or HOS factor with a corresponding control level of HOS activity or
10 HOS factor in a corresponding control sample, wherein said control sample comprises said sample known to comprise HOS activity that has not been exposed to said candidate compound.

21. A commercial package comprising means for determining the level of heme oxygenase-1 (HO-1) suppressor (HOS) activity, in tissue or body fluid obtained from a patient, and
15 instructions for comparing said level of HOS activity with an established standard of the corresponding HOS activity in corresponding control tissue or body fluid.

22. The commercial package of claim 21 for use in a
20 method for assessing dementing diseases in a patient.

23. A method of treating a dementing disease in a patient, comprising administering to said patient a compound which alleviates the dementing disease by increasing or decreasing the level of heme oxygenase-1 (HO-1) mRNA, protein
25 or activity, in an amount effective to treat a dementing disease, wherein said method results in the alleviation of the dementing disease by increasing or decreasing the level of any one or heme oxygenase-1 (HO-1) mRNA, HO-1 protein, HO-1 activity, HO-1 suppressor (HOS) factor, and HOS activity.

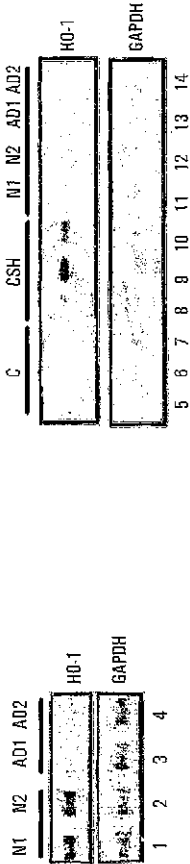


FIG. 1A

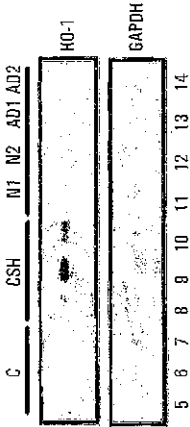


FIG. 1B

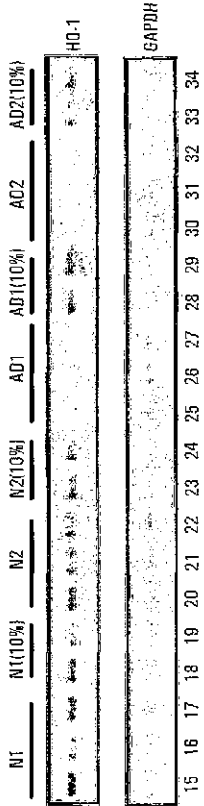


FIG. 1C

WO 02/08449

PCT/CA01/01066

2/13

PATIENT	DIAGNOSIS	HQS	AGE	MMSE	SEX	AD MEDS	ANTIOX.	CORTISOL
295	NYC	0	42	30	F	NONE	NONE	215
296	NYC	0	56	28	F	NONE	NONE	163
297	NYC	0	25	30	M	NONE	NONE	234
298	NYC	0	35	30	F	NONE	NONE	183
299	NYC	0	40	30	F	NONE	NONE	121
300	NYC	0	47	30	F	NONE	NONE	245
301	NYC	0	39	30	F	NONE	NONE	
302	NYC	0	29	30	F	NONE	NONE	
319	NEC	0	67	28	M	NONE	NONE	176
325	NEC	0	66	29	F	NONE	NONE	
333	NEC	0	89	29	M	NONE	NONE	129
345	NEC	0	71	28	F	NONE	NONE	225
346	NEC	0	83	29	M	NONE	NONE	163
731	NEC	0	92	29	F	NONE	NONE	
335	MCI	2	79	29	M	NONE	NONE	270
337	MCI	0	56	30	M	NONE	NONE	
344	MCI	2	80	28	M	NONE	NONE	
351	MCI	0	79	28	M	NONE	E800,C500	259
352	MCI	0	71	25	F	NONE	NONE	
354	MCI	0	72	29	M	NONE	NONE	
358	MCI	0	79	28	M	NONE	E400,C500	289
472	MCI	3	82	27	F	NONE	NONE	312
293	AD	3	66	13	F	ARICEPT	NONE	
304	AD	3	70	26	M	ARICEPT	NONE	
305	AD	3	60	17	M	ARICEPT	NONE	
306	AD	3	83	19	F	NONE	NONE	
307	AD	3	68	21	F	NONE	NONE	292
310	AD	3	55	19	F	ARICEPT	NONE	136
312	AD	3	81	28	M	NONE	NONE	285
316	AD	3	78	28	M	ARICEPT	NONE	184
322	AD	2	68	13	F	ARICEPT	NONE	
328	AD	2	77	25	M	ARICEPT	NONE	89
330	AD	3	77	21	M	NONE	NONE	407
336	AD	3	81	23	M	NONE	NONE	278
342	AD	1	84	27	F	NONE	NONE	
343	AD	3	87	20	F	ARICEPT	NONE	187
347	AD	1	71	19	F	ARICEPT	NONE	265
355	AD	3	76	24	M	ARICEPT	E400	135
356	AD	3	83	23	F	NONE	NONE	274
359	AD	3	66	21	F	ARICEPT	E800	325
360	AD	3	82	20	M	NONE	NONE	311
475	AD	3	62	29	M	ARICEPT	C500	292
714	AD	2	70	24	F	NONE	NONE	
730	AD	2	81	24	M	NONE	NONE	
294	AD	3	80	25	M	ARICEPT	NONE	

FIG. 2

WO 02/08449

PCT/CA01/01866

3/13

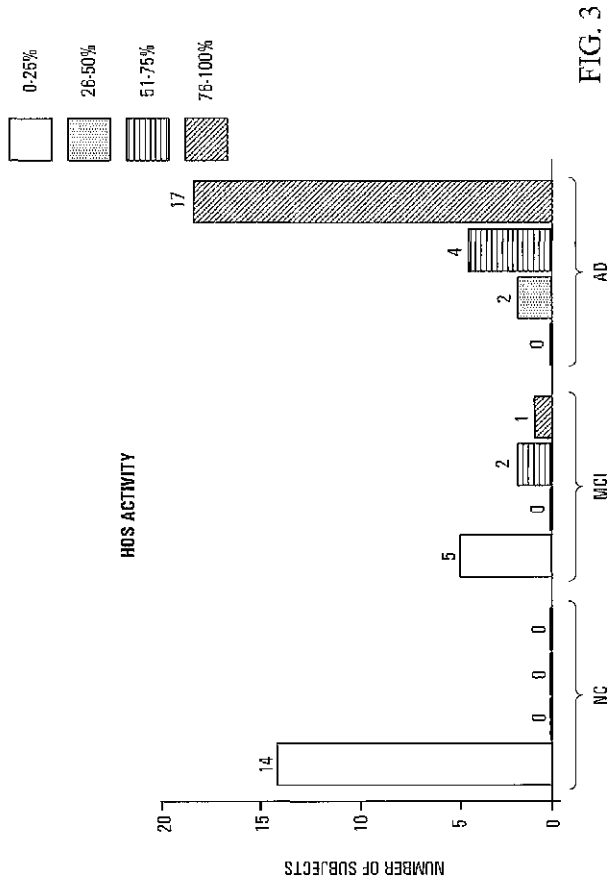


FIG. 3

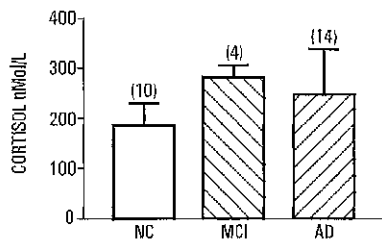


FIG. 4A

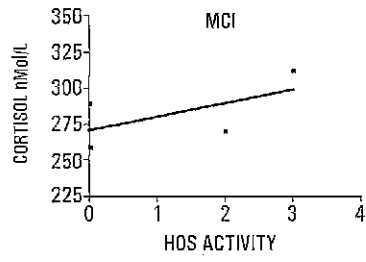


FIG. 4B

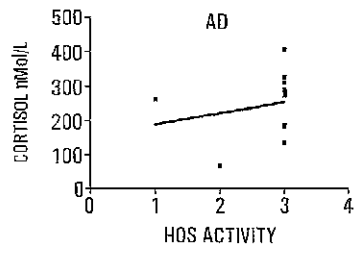


FIG. 4C

WO 02/08449

PCT/CA01/01866

5/13

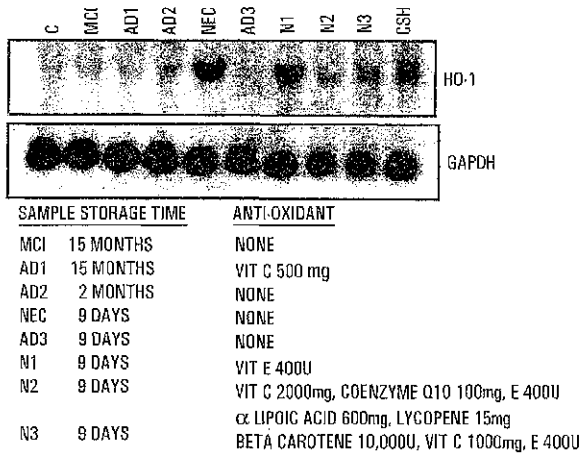


FIG. 5

6/13

FIG. 6A

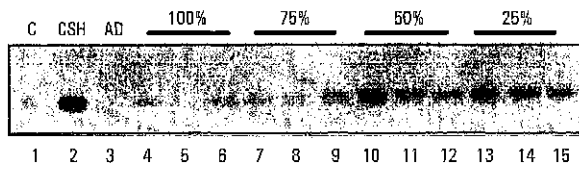
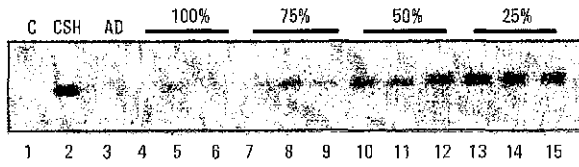


FIG. 6B

WO 02/08449

PCT/CA01/01866

7/13

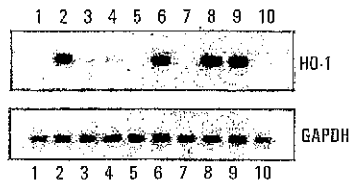


FIG. 7

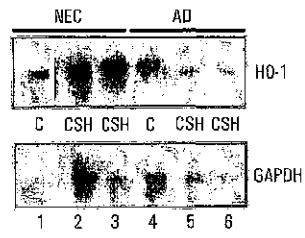


FIG. 8

9/13

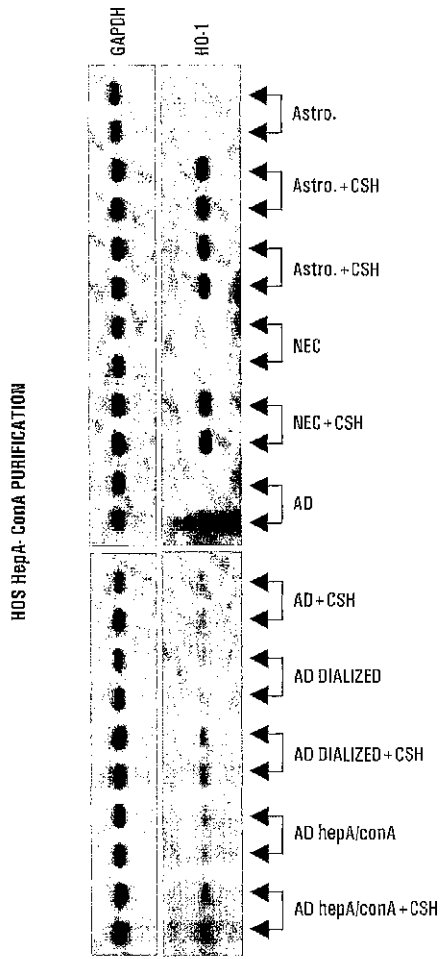


FIG. 9

10/13

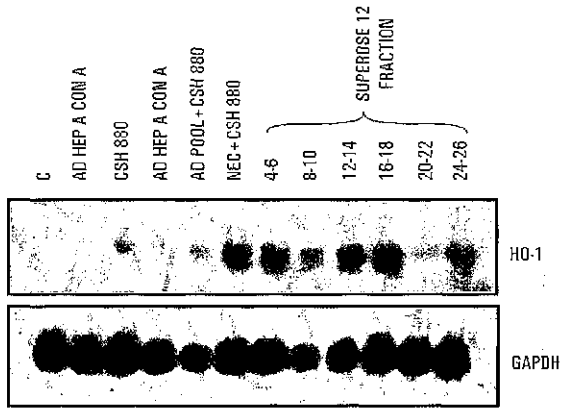


FIG. 10

WO 02/08449

PCT/CA01/01866

11/13

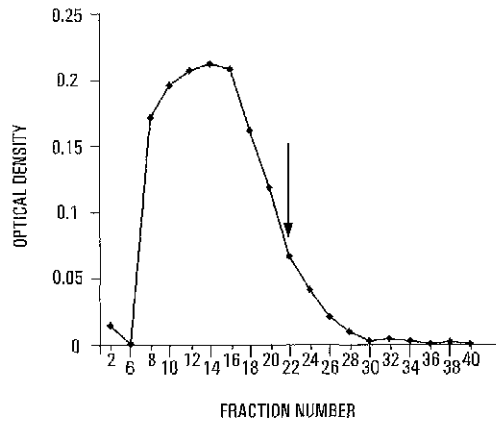


FIG. 11

12/13

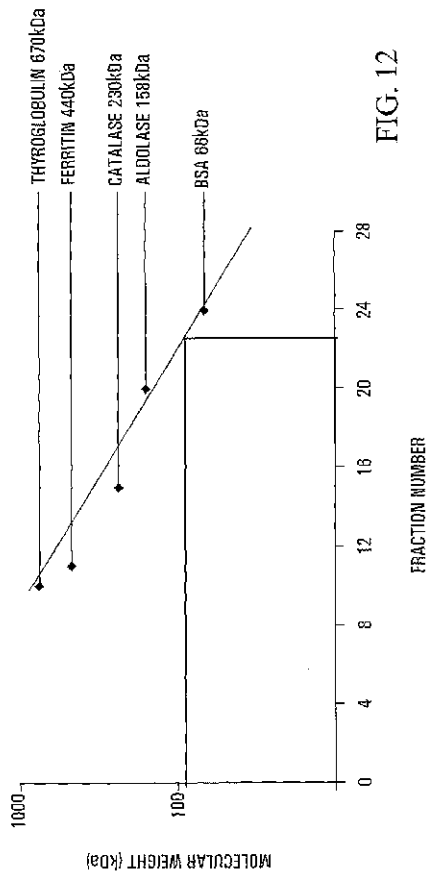


FIG. 12

13/13

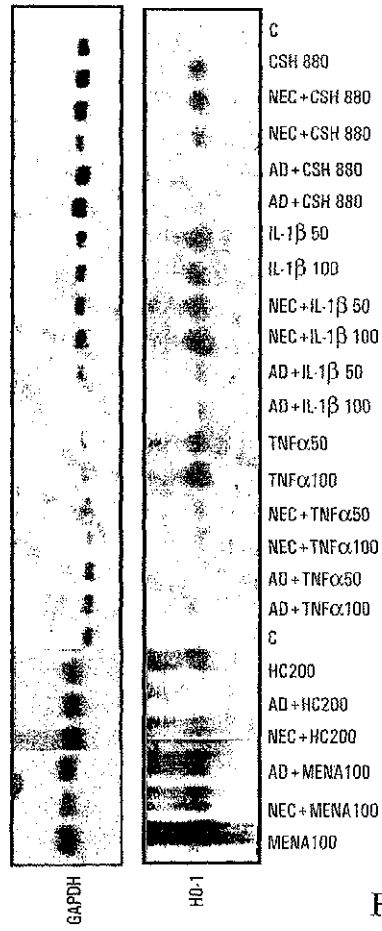


FIG. 13

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



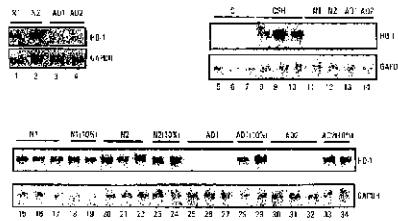
(43) International Publication Date
31 January 2002 (31.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/008449 A3

- (51) International Patent Classification: C07K 14/47, G01N 33/50, 33/55, 33/56, C12P 7/00
- (21) International Application Number: PCT/CA01/01066
- (22) International Filing Date: 25 July 2001 (25.07.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/270,813 25 July 2000 (25.07.2000) US
- (71) Applicant for all designated States except U.S.: THE SIR MORITZ B. DAVIS - JEWISH GENERAL HOSPITAL (CA), A. Lady Davis Institute for Medical Research, 3755 Avenue de la Côte-St-Catherine, Montreal, Quebec H3T 1E2 (CA).
- (72) Inventor: SCHUPFER, Hyman, M. (CA/CA); 2785 Lincoln, Montreal, Quebec H4W 2Y9 (CA).
- (74) Agents: MORROW, Joy, D. et al.; Smart & Biggar, P.O. Box 2090, Station D, 200 55 Metcalfe Street, Ottawa, Ontario K1P 5Y6 (CA).
- (81) Designated States (internationally): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, ID, 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, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TH, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (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, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 6 September 2002

(54) Title: HD 1 SUPPRESSOR AS A DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC TEST FOR DEMENTING DISEASES



WO 02/008449 A3

(57) Abstract: The invention relates to an improved method for predicting the onset of, classifying, prognosticating and/or treating dementing diseases. The method comprises determining the level of human cysteine-1 suppressor (HD1) activity and/or factor in tissue or body fluid obtained from a patient, and comparing said level with the corresponding level of HD1 activity and/or factor in corresponding tissue or body fluid obtained from at least one control person. The tissue or body fluid is suitably blood, plasma, lymphocytes, cerebrospinal fluid, urine, saliva, epithelia or fibroblasts. The method is useful where the dementing disease is any of Alzheimer's Disease, Age-Associated Cognitive Decline, Mild Cognitive Impairment, Parkinson disease with dementia, Progressive Supranuclear Palsy, Vascular (i.e. multi-infarct) Dementia, Lewy Body Dementia, Huntington's Disease, Down's syndrome, normal pressure hydrocephalus, corticobasal ganglionic degeneration, tau-tau system atrophy, frontal lobe neurodegeneration, Creutzfeldt-Jacob disease and other prion diseases, HIV and other encephalopathies, and metabolic disorders such as hypohyalinemia and vitamin B12 deficiency. The method may also prove useful in differentiating the "pseudodementia" of depression from Alzheimer disease.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/CA 01/01066
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/47 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/56 C12P21/00		
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 C07K 601N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, MEDLINE, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Category of document, with indication, where appropriate, of the relevant class(es)	Relevant to class No.
X	SCHIPPER H M ET AL: "Evaluation of heme oxygenase-1 as a systemic biological marker of sporadic AD." NEUROLOGY, vol. 54, no. 6, 28 March 2000 (2000-03-28), pages 1297-1304, XP001064649 ISSN: 0028-3878 cited in the application	7-19
Y	---	23
-/-		
<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 clearly in the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *I* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimant		
†† document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the practice or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document included in the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
18 April 2002		08/05/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 1661 Patentstr. 2 CH - 2000 CH Thurgau Tel. (+31-70) 340-2340, Te. 31 651 6000 Fax (+31-70) 340-2370		Authorized officer Aslund, J

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/CA 01/01066
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TAKAHASHI KAZUHIRO ET AL: "Suppression of heme oxygenase-1 mRNA expression by Interferon-gamma in human glioblastoma cells." JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, vol. 72, no. 6, June 1999 (1999-06), pages 2356-2361, XP001064601 ISSN: 0022-3042 figure 3	1-6, 17, 18, 20-22
Y	---	23
X	MASUYA YOSHIRO ET AL: "Involvement of the tyrosine phosphorylation pathway in induction of human heme oxygenase-1 by hemin, sodium arsenite, and cadmium chloride." JOURNAL OF BIOCHEMISTRY (TOKYO), vol. 124, no. 3, 1998, pages 628-633, XP001064627 ISSN: 0021-924X the whole document	1, 2, 4-6, 17, 20-22
Y	---	23
X	FUJIWARA NORIKO ET AL: "Quinazoline derivatives suppress nitric oxide production by macrophages through inhibition of NOS II gene expression." FEBS LETTERS, vol. 395, no. 2-3, 1996, pages 299-303, XP002194853 ISSN: 0014-5793 figure 6	1, 2, 4-6, 17, 20-22
Y	---	23
X	KUTTY R KRISHNAN ET AL: "Induction of heme oxygenase 1 in the retina by intense visible light: Suppression by the antioxidant dimethylthiourea." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 92, no. 4, 1995, pages 1177-1181, XP002194854 1995 ISSN: 0027-8424 figure 3	1, 2, 4-6, 17, 20-22
Y	---	23
X	IHARA N ET AL: "Developmental changes of gene expression in heme metabolic enzymes in rat placenta" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 439, no. 1-2, 13 November 1998 (1998-11-13), pages 163-167, XP004258650 ISSN: 0014-5793 figure 5	1, 2, 4-6, 17, 20-22
Y	---	23
	---	---

File H, T02642-0 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/CA 01/01066

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Classification of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SUZUKI HIDEAKI ET AL: "Heme oxygenase-1 gene induction as an intrinsic regulation against delayed cerebral vasospasm in rats." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 104, no. 1, July 1999 (1999-07), pages 59-66, XP002194855 ISSN: 0021-9738 figure 3	1,2,4-6, 17,20-22
Y	---	23
X	NUMAZAWA SATOSHI ET AL: "Cooperative induction of c-Fos and heme oxygenase gene products under oxidative stress in human fibroblastic cells." EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, vol. 237, no. 2, 15 December 1997 (1997-12-15), pages 434-444, XP002194856 ISSN: 0014-4827 the whole document	1,2,4-6, 17,20-22
Y	---	23
X	DE 42 13 497 A (MAX DELBRUECK CENTRUM) 28 October 1993 (1993-10-28) the whole document	17,18
X	TAKAHASHI S ET AL: "Positive and negative regulation of the human heme oxygenase-1 gene expression in cultured cells" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. GENE STRUCTURE AND EXPRESSION, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1447, no. 2-3, 28 October 1999 (1999-10-28), pages 231-235, XP004275497 ISSN: 0167-4781 the whole document	19
X, P	MAWAL YOGESH R ET AL: "RT-PCR demonstration of suppressed lymphocyte HO-1 mRNA levels in AD and MCI." NEUROLOGY, vol. 56, no. 8 Supplement 3, 24 April 2001 (2001-04-24), pages A341-A342, XP001064856 53rd Annual Meeting of the American Academy of Neurology, Philadelphia, PA, USA; May 05-11, 2001 ISSN: 0028-3878 the whole document	7-22

Form PCT/CA 01/01066 (part 1 of 2) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

1 # International Application No
PCT/CA 01/01066

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 4213497 A	28-10-1993	DE 4213497 A1	28-10-1993

From PCT/IS6010 (patent family annex) July 1992

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/14	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 25/16	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/15	C 1 2 Q 1/68	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 33/566	

(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, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(71) 出願人 503034445
 ハイマン、エム・シパー
 HYMAN M. SCHIPPER
 カナダ国ケベック州、モントリオール、アインスタイン、5785

(74) 代理人 100075812
 弁理士 吉武 賢次

(74) 代理人 100091487
 弁理士 中村 行孝

(74) 代理人 100094640
 弁理士 紺野 昭男

(74) 代理人 100107342
 弁理士 横田 修孝

(74) 代理人 100111730
 弁理士 伊藤 武泰

(72) 発明者 ハイマン、エム・シパー
 カナダ国ケベック州、モントリオール、アインスタイン、5785

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02
 4B063 QA08 QA13 QQ08 QQ43 QQ53 QR32 QR36 QR55 QR62 QR77
 QS25 QS34 QX02 QX07
 4C084 AA17 NA14 ZA022 ZA152 ZA162 ZA892 ZB332 ZB352 ZC062 ZC202
 ZC242 ZC552
 4H045 AA10 AA30 BA10 BA53 CA45 DA55 EA21 EA50 FA74 GA26

【要約の続き】

をアルツハイマー病から区別するのに有用であることを立証することもできる。

专利名称(译)	HO-1抑制剂作为痴呆疾病的诊断和预后测试		
公开(公告)号	JP2004504366A	公开(公告)日	2004-02-12
申请号	JP2002513931	申请日	2001-07-25
[标]申请(专利权)人(译)	SIR MORTIMER乙DAVIS犹太医院GEN 海曼EM比肩 HYMAN M SCHIPPER		
申请(专利权)人(译)	的, 先生, 天敏, 蜂戴维斯 - 菊愿望, 总医院 海曼, EM.SIPAR		
[标]发明人	ハイマンエムシパー		
发明人	ハイマン、エム.シパー		
IPC分类号	G01N33/50 A61K45/00 A61P3/02 A61P5/14 A61P17/02 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P31/04 A61P31/18 A61P43/00 C07K2/00 C07K14/47 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33 /68		
CPC分类号	A61P3/02 A61P5/14 A61P17/02 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P31/04 A61P31/18 A61P43/00 C07K2/00 G01N33/6896		
FI分类号	C07K14/47 A61K45/00 A61P3/02.104 A61P5/14 A61P17/02 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P31/04 A61P31/18 A61P43/00.111 C12Q1/68.A C12Q1/68.Z G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33 /53.D G01N33/53.M G01N33/566		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045 /DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 4B063/QA08 4B063/QA13 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063 /QX02 4B063/QX07 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA152 4C084/ZA162 4C084 /ZA892 4C084/ZB332 4C084/ZB352 4C084/ZC062 4C084/ZC202 4C084/ZC242 4C084/ZC552 4H045 /AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA53 4H045/CA45 4H045/DA55 4H045/EA21 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	耀希达凯贤治 中村KoTakashi		
优先权	60/220813 2000-07-25 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于预测, 诊断或预测痴呆症发作的改进方法。该方法确定从患者获得的组织或流体中血红素加氧酶-1抑制剂 (HOS) 活性和/或因子的水平, 该水平由所述HOS因子或至少一种对照的活性的水平确定。与相应的HOS活性水平和/或所获得的相应组织或体液中的因子进行比较。合适的组织或体液是血液, 血浆, 淋巴细胞, 脑脊髓液, 尿液, 唾液, 上皮或成纤维细胞。在这种方法中, 与痴呆症有关的疾病包括阿尔茨海默氏病, 随着年龄增长的认知能力下降, 轻度认知障碍, 患有痴呆症的帕金森氏病, 进行性核上性麻痹, 血管性痴呆 (即多发性脑梗塞), 路易体痴呆, 亨廷顿氏病, 唐氏综合症, 正常压力脑积水, 皮质基底神经节变性, 多系统萎缩, 头部受伤, 梅毒, 克雅氏病和其他病毒性疾病, HIV等脑炎, 以及对于代谢紊乱 (例如甲状腺功能减退症和维生素B12缺乏症) 的情况都非常有用。该方法还可以证明在区分抑郁症的“假性痴呆”和阿尔茨海默氏病中非常有用。

