

(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2004-502940

(P2004-502940A)

(43) 公表日 平成16年1月29日(2004.1.29)

(51) Int. Cl.⁷

G 0 1 N 33/53

F I

G O 1 N 33/53

S

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2002-508085 (P2002-508085)	(71) 出願人	501029515 アクシス-シールド・エーエスエー
(86) (22) 出願日	平成13年5月22日 (2001.5.22)		ノルウェー王国、エヌ-0510 オスロ
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月6日 (2003.1.6)		ー、ウルベンベイエン 87
(86) 国際出願番号	PCT/GB2001/002306	(74) 代理人	110000040
(87) 国際公開番号	W02002/003074		特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ
(87) 国際公開日	平成14年1月10日 (2002.1.10)	(72) 発明者	アーニング、ラース
(31) 優先権主張番号	0016460.8		ノルウェー、エヌ-0510 オスロー、
(32) 優先日	平成12年7月4日 (2000.7.4)		ウルベンベイエン 87、アクシス-シールド・エーエスエー内
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ホロトランスコバラミン I I に基づくアルツハイマー病の診断方法

(57) 【要約】

本発明は、アルツハイマー病のための治療的または予知的なアッセイ方法を提供する。本発明の方法は、体液サンプルまたはそれに由来する試験用サンプルをホロトランスコバラミン I I について分析することを含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アルツハイマー病のための診断的 (diagnostic) または予知的 (prognostic) アッセイ方法であり、体液サンプルまたはそれに由来する試験用サンプルをホロトランスコバラミン II について分析する (assaying) ことを含む方法。

【請求項 2】

前記体液サンプルが血液サンプルである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記試験用サンプルが血清サンプルである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記体液または試験用サンプルを、全ビタミン B₁₂ についても分析する請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

前記体液または試験用サンプルを、全ホモシステインについても分析する請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

前記体液または試験用サンプルを、葉酸 (folate) についても分析する請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

血清中のホロトランスコバラミン II 濃度 70 pM 以下がアルツハイマー病を示すと分類する請求項 1 から 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

請求項 1 から 7 のいずれかに記載の方法を行なうために使用するアッセイ用キット (assay kit) であり、前記キットが、トランスコバラミン II またはホロトランスコバラミン II の固定化された (immobilized) または固定化可能な (immobilizable) 特異的結合リガンド (specific binding ligand) と、任意に、濃度が分かっているホロトランスコバラミン II 溶液と、任意に、ビタミン B₁₂ をホロトランスコバラミン II から放出 (release) させるための放出剤 (release agent) と、任意に、標識されたりガンドと、そして、アルツハイマー病 (Alzheimer's Disease) またはアルツハイマー病の程度 (Alzheimer's Disease severity) を年齢の関数として示すホロトランスコバラミン II 濃度の閾値 (threshold) のカリブレーター (calibrator) を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、アルツハイマー病の診断 (diagnosis) または予知 (prognosis) のためのアッセイ方法に関し、より詳しくは、体液中のホロトランスコバラミン II (ホロTCII) の定量 (determination) に関係するアッセイと、そのようなアッセイ方法に使用するためのアッセイ用キット (assay kits) とに関する。

【0002】

アルツハイマー病 (AD) は、老人の認識力欠如 (cognitive loss) の最も一般的な原因であり、二番目に一般的な原因は、複合性痴呆症 (mixed dementia) すなわち AD 病理と脳梗塞との組み合わせである。AD は、神経変性疾患であり、ニューロンの消失 (neuronal loss)、神経原線維濃縮体 (neurofibrillary tangles) およびアミロイド堆積物 (老人斑) の形成を含む神経病理学的特徴により特徴付けられる。AD は、複合性疾患であり、完全に進行するまでに、個々の段階的な変化 (cascade of gradual changes)

10

20

30

40

50

をしばしば10以上必要とするため、それが診断を困難にしている。脳組織を顕微鏡で検査できるような解剖によってのみ、確実な診断をすることが可能である。通常、生きている患者におけるADの診断は、身体歴(medical history)、身体検査(physical examination)および認識力試験(cognitive tests)に基づいている。

【0003】

ADは、通常、65歳を超える年齢の人々を冒す(affects)が、40歳より若い年齢の人々を冒すこともできる。その罹患率(prevalence)は、65歳では約2%であるが、年齢とともに着実に増大し、80歳では約20%となる。

【0004】

ADのリスクファクター(risk factors)として証明されているのは年齢と遺伝のみであるが、いくつかの疫学的研究は、高血圧および糖尿病を含む血管の因子がAD発展のリスクに影響する可能性があることを支持している(Hachinski and Munoz, Ann. N.Y. Acad. Sci. 826: 1-6, (1997)を参照)。ADにおいて発見される毛細血管異常は、増大したレベルの血漿中ホモシステインに対する慢性被ばく(chronic exposure)により引き起こされる可能性があり、さらに、血漿中ホモシステインのレベル増大は、葉酸(folate)およびコバラミンまたはビタミンB12(VB12)の軽度の欠乏(moderate deficiencies)に起因することが支持されている(Regland et al Dementia, 1: 272-277 (1990) および McCaddon et al., Int J Geriatr Psychiatry, 13: 235-239 (1998)を参照)。

【0005】

VB12は、水溶性ビタミンであり、食物中に見られるビタミンB複合体の一部を形成し、そして、細胞の増殖および代謝に不可欠な必須ビタミンである。その核となる分子は、中心のコバルト原子を包囲する四つのピロールユニットのコリン環からなる。VB12は、動物または植物により合成できない唯一のビタミンであり、腸内で食物から吸収されなければならない。それは、しかしながら、肝臓に貯蔵することができる。それは、微生物、特に嫌気性菌および酵母により合成される。

【0006】

VB12は、in vivoでは、(i)分子内転移、例えば、L-メチルマロニルCoAからスクシニルCoAの形成、(ii)メチル化、例えば、ホモシステインのメチル化によるメチオニンの形成、および(iii)ある種の微生物におけるリボヌクレオチドからデオキシリボヌクレオチドへの還元、の三つの型の反応を触媒する補酵素(コエンザイム)およびVB12酵素として機能する。哺乳類では、上記(i)および(ii)として特に述べた二つの酵素反応のみが、VB12を補酵素として要求することが知られている。

【0007】

消化のプロセスでは、ハプトコリン(haptocorrin)と呼ばれる唾液中のタンパク質が、消化管上部(upper gastrointestinal tract)内でVB12に結合して複合体を形成し、それは胃を通過する。ハプトコリンは、以後HCと呼ぶ(この技術分野では、R-バインダーとして、または、集合名詞的にトランスコバラミンIおよびIIIとして呼ぶこともある)。膵酵素(pancreatic enzymes)は、VB12-ハプトコリン(ホロHC)複合体を回腸内で消化し、VB12を解放し、それは次に胃粘膜(gastric mucosa)から分泌される内因子(intrinsic factor)と呼ばれるタンパク質と結合し、さらにまた複合体を形成する。

【0008】

VB12-内因子複合体は、末端回腸の中で特異的レセプターと結合し、その後、放出因子(releasing factor)により分離され、そして、VB12は、回腸の

10

20

30

40

50

膜を通過し、血流 (b l o o d s t r e a m) 内に活性状態で (a c t i v e l y) 輸送される。

【 0 0 0 9 】

V B 1 2 は、フリーの形態では、感知できるほどの量は体内を循環しない。おそらく、99% 程度の V B 1 2 は、トランスコバラミンタンパク質 (T C I I 、 I I および I I I) またはアルブミンのうち的一种と結合している。

【 0 0 1 0 】

V B 1 2 を標的組織に輸送する原因であると信じられているタンパク質は、トランスコバラミン I I (T C I I) という重要な少量のタンパク質 (c r i t i c a l t r a c e p r o t e i n) であり、それなしでは V B 1 2 は細胞膜を通過できない。この重要な代謝機能にも関わらず、血清中の V B 1 2 のうち約 6 ~ 2 5 % のみが T C I I に結合し、そして、大部分は H C により運び去られてしまう。T C I I は、4 5 k D a の 1 本鎖ポリペプチド (s i n g l e c h a i n p o l y p e p t i d e) であり、最初に血清、精液 (s e m i n a l f l u i d) および脳脊髄液 (c e r e b r o - s p i n a l f l u i d) の中に発見された。V B 1 2 に結合した T C I I (すなわちホ口 T C I I) は、細胞膜上で特異的レセプターに結合し、そして、いったん結合すると、前記ホ口 T C I I 錯体は、飲作用 (p i n o c y t o s i s) により細胞内に取り込まれる。

10

【 0 0 1 1 】

T C I I は、肝臓、脈管内皮 (v a s c u l a r e n d o t h e l i u m) 、腸細胞 (e n t e r o c y t e s) 、大食細胞 (m a c r o p h a g e s) 、および繊維芽細胞 (f i b r o b l a s t s) で合成され、そして、大部分は、アポ T C I I として、すなわち V B 1 2 との結合を欠いたまま循環する。それは、およそ 9 0 分間の短い半減期を有する。

20

【 0 0 1 2 】

V B 1 2 は食物から吸収する必要があるが、胃機能の障害 (i m p a i r e d g a s t r i c f u n c t i o n) を引き起こすあらゆる症状、例えば、胃腸炎 (g a s t r o e n t e r i t i s) 、または胃萎縮 (g a s t r i c a t r o p h y) を引き起こす症状、または、機能性ハプトコリン、内因子、放出因子、T C I I もしくは T C I I レセプターの生産不能は、V B 1 2 の摂取障害およびその結果としての欠乏を引き起こす可能性がある。

30

【 0 0 1 3 】

人口における一定のサブグループ、例えば、老人、妊婦、慢性または急性の胃腸疾患を持つ患者、特定の自己免疫性疾患を病んでいる患者、悪性貧血の家族歴を持つ患者、およびエイズの罹患者は、特に V B 1 2 が欠乏する傾向にある。

【 0 0 1 4 】

V B 1 2 欠乏の臨床的発現 (c l i n i c a l m a n i f e s t a t i o n s) は、多様でありかつ多数であるが、主として (p r i m a r i l y) 、貧血、巨赤芽球における造血 (m e g a l o b l a s t i c h a e m a t o p o i e s i s) 、ならびに、神経系統 (n e r v o u s s y s t e m) の機能のおよび構造的疾患に関係する。

40

【 0 0 1 5 】

分子レベルでは、V B 1 2 欠乏は、テトラヒドロ葉酸 (t e t r a - h y d r o f o l a t e) および S - アデノシルメチオニンのレベル減少と、メチルマロン酸、メチルテトラヒドロ葉酸およびホモシステインのレベル増加とにつながる。生理学的レベルでは、それは、潜在的に不可逆な神経損傷および/または激しい貧血につながる。V B 1 2 欠乏に起因するニューロパシー (n e u r o p a t h y) は、アルツハイマー型老年痴呆 (s e n i l e d e m e n t i a o f A l z h e i m e r - t y p e) を持つ患者に観測されると同様の診療的徴候 (c l i n i c a l s y m p t o m s) を与える。それゆえに、痴呆病 (d e m e n t i n g i l l n e s s e s) を持つ患者の全血清中 V B 1 2 レベルを測定することが一般的である。

【 0 0 1 6 】

50

いくつかの研究により、ADを持つ患者では全血清中VB12レベルが低いことが発見され (Cole and Prchal, Age Ageing 13: 101 - 105 (1984) および Clarke et al., Arch. Neurol 55: 1449 - 1455 (1998) 参照)、その他の研究においては顕著な違いは見られなかった (Crystal et al., J. Am. Geriatr Soc. 42: 933 - 936 (1994), Basun et al., J. Am Geriatr Soc. 42: 132 - 136 (1994) および Joosten et al., J. Gerontol 52: M76 - M79 (1997) 参照)。ADとVB12欠乏との関連の問題については多くの議論が存在する。

【0017】

ホロTCII欠乏は、VB12欠乏を示すものとして認識され (例えば、老人および同様にAD罹患者に対して)、そして、このゆえに、VB12欠乏を打ち消す栄養療法 (nutritional therapy) が信頼できることの指標として認識されてきたが、ホロTCII欠乏がそのようにADの指標であることの示唆はこれまでなかった。

【0018】

我々は、ADであると確認された患者のホロTCIIの合計 (count) が、同年齢の健康なボランティア、すなわち一致対照群 (matched control group) と比較して顕著に低く、そして、ADとホロTCII減少との間の相関は、ADと全血清中VB12または全ホモシステイン減少との間のどのような相関よりもさらに顕著であることを発見した。

【0019】

それゆえ、一つの側面から見ると、本発明は、アルツハイマー病のための診断的 (diagnostic) または予知的 (prognostic) アッセイ方法であり、体液サンプルまたはそれに由来する試験用サンプルを、ホロトランスコバラミンIIについて、予備定量した閾値 (pre-determined threshold value) により定量したホロトランスコバラミンIIレベルとの比較により分析する (assaying) ことと、前記分析の結果がアルツハイマー病を示すか示さないか決めることとを含む方法を提供する。

【0020】

ホロTCIIを分析する (assaying) 方法は公知であり、そして、例えば、WO 00/17659、米国特許第4680273号明細書、Herbert et al. Am. J. Hematol. 34: 132 - 139 (1990)、Wickramasinghe et al. J. Clin. Pathol. 46: 537 - 539 (1993)、Carmel Am. J. Clin. Pathol. 62: 367 - 372 (1974)、Herzlich et al. Lab. Invest. 58: 332 - 337 (1988)、Vu et al. Am. J. Hematol. 42: 202 - 211 (1993)、Lindemans et al. Clin. Chim. Acta 132: 53 - 61 (1983)、Kapel et al. Clin. Chim. Acta 172: 297 - 310 (1988)、Benhayoun et al. Acta Haematol. 89: 195 - 199 (1993)、Toft et al. Scan. J. Clin. Lab. Invest. 54: 62 (1994) および Kuemmerle et al. Clin. Chim. 38: 2073 - 2077 (1992) に記述されており、それらの内容は、参照することにより本明細書内に組み込まれる。これらの技術の中で、好ましくは、Kuemmerleらの技術 (上記) を、そして、より好ましくは、WO 00/17659の技術を、本発明のアッセイ方法に使用することができる。

【0021】

本発明の方法に使用する体液サンプルは、ホロTCIIを標準的に含む任意のヒト体液が可能であるが、例えば精液または脳脊髄液であり、しかしながら、好ましくは血液である。より好ましくは、本発明の方法で分析する (assayed) サンプルは、血液由来サ

10

20

30

40

50

ンプルであり、例えば血漿、または、特に一層好ましくは、血清サンプルである。そのようなサンプルは、ADを有する疑いがある患者から、もしくはADを有すると確認された患者から採取しても良いし、または、一般の高齢患者から、日常の検査 (screening) またはヘルスチェック (health check) の一環として採取しても良い。

【0022】

本発明の方法を用いてホ口TCIIを分析することは、試験したサンプル中またはその由来する体液、例えば血液、血漿もしくは最適には血清中のホ口TCIIの、定性的、半定量的または定量的表示 (indication) の生成 (generation) に関係していても良い。前記サンプルは、本発明のアッセイ方法に使用するに先立ち処理しても良く、例えば、緩衝液 (buffer) またはその他の水性媒体を加えて希釈しても良いし、そして、解析 (analysis) に先立ち、例えば冷蔵 (chilling) または冷凍 (freezing) することにより貯蔵する (stored) または保存しても (preserved) 良い。

10

【0023】

ホ口TCII濃度 (例えばpM濃度) の絶対値 (absolute value) の定量 (determination) は、ADの存在またはその程度を示すに足る一またはそれ以上の予備定量した (predetermined) 閾値よりも前記ホ口TCIIが上か下かを単に示すのみで充分なことが望ましいが、そのことが必須でなくても良い。前記方法は、しかしながら、一般的には、対照グループについて定量したホ口TCII値に対する検量 (calibration) を必要とする。前記対照グループとは、特に、同年代の健康な人々の対照グループであり、そして、好ましくは、さらに、AD罹患者と確認された同年代の者たちである。そのように、前記方法は、さらに、分析した (assayed) ホ口TCII値を、そのように予備定量した検量値 (calibration values) と比較し、前記試料の源である人を、おそらく (probably) ADを有するかまたは有しないものとして、またはADを進行の特定段階で有するものとして、分類する (categorise) かまたは段階付ける (stage) ステップに関係する。典型的には、高齢患者 (例えば、60歳、特に70歳を超える年齢) の血清中ホ口TCII濃度は、70pM以下、特に60pM以下であればADを示すに足る。

20

【0024】

本発明の方法では、前記サンプルは、さらに全VB12についても、任意にホモシステインについても、そして任意に葉酸 (folate) についても分析する (assayed) ことが好ましい。

30

【0025】

さらなる側面から見ると、本発明は、さらに、前記本発明による方法を行なうために使用するアッセイ用キット (assay kit) であり、前記キットが、TCIIまたはホ口TCIIの固定化された (immobilized) または固定化可能な (immobilizable) 特異的結合リガンド (specific binding ligand) と、好ましくは、濃度が分かっているホ口TCII溶液、そしてより好ましくは、一定範囲の (range of) ホ口TCII濃度を有するそのような溶液のセットと、任意に、VB12をホ口TCIIから放出 (release) させるための放出剤 (release agent) と、任意に、標識されたりガンドと、そして、ADまたはADの程度 (AD severity) を年齢の関数として示すホ口TCII濃度の閾値 (threshold) のカリブレーター (calibrator) を含むキットを提供する。

40

【0026】

典型的には、0 ~ 200 pmol/l のホ口TCII含有量を有する検量サンプル (calibration samples) を使用すれば良い。その中での参考範囲 (re

50

ference range) としては、ホ口TCII値は一般的には30~160 pmo1/lであろうことが分かっている。

【0027】

前記カリプレターのみを除いたそのようなアッセイ用キットが、WO 00/17659に記述されている。

【0028】

ここで、下記の非限定的な実施例を参照しながら本発明をさらに記述する。

【0029】

【実施例】

ホ口TCII、全血清中ビタミンB12 (tVB12)、および全ホモシステイン (tHCy) レベルは、(i)アルツハイマー型痴呆と確認された20人の人々、および(ii)同年代の20人の健康なボランティア(一致対照)から採取した血清サンプルを用いて測定した。 10

【0030】

ホ口TCII濃度はHoloTC-RIAにより定量した。HoloTC-RIAは、ノルウェー国オスローのアクシス・シールド・エーエスエー (Axis-Shield ASA, Oslo, Norway) から入手可能であり、そしてWO 00/17659中に記述されているホ口TCII測定システムである。

【0031】

結果は、平均値および確率比(odds-ratios)の両方について解析した。確率比は、以下のようにして計算した。すなわち、前記アルツハイマーグループにおける「正常から外れた」値の患者数(cases)/全患者数を、前記対照グループにおける同様の比率で割った。1よりも大きい値は、リスク(risk)が存在し得ることを示す。ホ口TCIIについては35 pMを切り捨て値(cut-off)として用い、そして、tVB12については150 pMを用いた。それぞれ35および150 pMよりも上の値は、正常範囲内であるとみなした。tHCyについては、15 μMよりも下の値は正常範囲内と判断した。 20

【0032】

その結果を、下記の表中で述べる。

【0033】

【表1】

パラメータ	グループ	全数	平均	有意性*	患者数 (Cases)	確率比
ホ口TC	対照	20	83 pM	P<0.005	1	—
	AD ^{&}	20	52 pM		5	5.0
tVB12	対照	20	263 pM	P<0.4	2	—
	AD	20	296 pM		1	0.5
tHCy	対照	13	13.4 μM	P<0.3	4	—
	AD	17	15.2 μM		8	1.5

*マン~ホイットニー、[&]AD, アルツハイマー病

【0034】

血清中ホ口TCIIレベルは、アルツハイマー型痴呆と確認された患者では顕著に低く、平均値は顕著に低く、そして、確率比は疾患グループでは5倍に増加していた。

【0035】

30

40

50

血清中 tH C y レベルは患者グループ (p a t i e n t g r o u p) においてより高く、アルバイト (a l b e i t) では顕著ではなく、そして、さらに、確率比は 1 . 5 であった。tH C y において有意性が得られなかった理由は、ホロ T C I I 以外に葉酸およびビタミン B 6 レベルならびに腎臓の状態 (k i d n e y s t a t u s) 等もまた tH C y 濃度に影響するという要因に基づくと見て間違いないと思われる。

【 0 0 3 6 】

t V B 1 2 は、疾患グループでは幾分高かったが、アルバイトでは顕著ではなく、その所見は確率比においても見られ、確率比は 1 . 0 よりも小さかった。

【国際公開パンフレット】

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

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

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/03074 A1

- (51) International Patent Classification: G01N 33/82
- (21) International Application Number: PCT/GB91/02306
- (22) International Filing Date: 22 May 2001 (22.05.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
0016100.8 4 July 2000 (04.07.2000) GB
- (71) Applicant *for all designated States except US*:
AXIS-SHIELD ASA (NO/NO); Ulvenveien 87, N-0510 Oslo (NO).
- (71) Applicant *for GB only*: COCKBAIN, Julian (GB/GB);
Flat 4, 83 Linden Gardens, London W2 4EU (GB).
- (72) Inventor: and
(75) Inventor/Applicant *for US only*: ÖRNING, Lars
[SE/NO]; Axis-Shield ASA, Ulvenveien 87, N-0510 Oslo
(NO).
- (74) Agents: COCKBAIN, Julian et al.; Frank B. Dahn & Co.,
179 Queen Victoria Street, London EC4V 4EL (GB).
- (81) Designated States *(national)*: AH, AG, AI, AM, AU, AT
(utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, CZ (utility model), DE, DE
(utility model), DK, DK (utility model), DM, DZ, EC, EE,
EE (utility model), ES, FI, FI (utility model), GB, GD, GE,
GH, GM, GR, 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, NA, NZ, PL, PL, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SK (utility model), SL, TL, TM, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GL, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, UZ, UG, ZW); Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, UJ, TM); European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BI, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NH, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guide-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette*



WO 02/03074 A1

(54) Title: DIAGNOSTIC METHOD FOR ALZHEIMER'S DISEASE BASED ON HOLO-TRANSCOBALAMIN II

(57) Abstract: The invention provides a diagnostic or prognostic assay method for Alzheimer's Disease which method comprises assaying a body fluid sample or a test sample derived therefrom for holo transcobalamin II.

WO 02/03074

PCT/GB01/02306

- 1 -

DIAGNOSTIC METHOD FOR ALZHEIMER'S DISEASE BASED ON HOLO-TRANSCOBALAMIN II

The present invention relates to an assay method for diagnosis or prognosis of Alzheimer's Disease, more particularly an assay involving the determination of holo-transcobalamin II (holoTCYII) in a body fluid, and to assay kits for use in such assay methods.

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause for cognitive loss in older adults, the second most common being mixed dementia, a combination of AD pathology and cerebral infarcts. AD is a neurodegenerative disorder characterized by neuropathological features including neuronal loss, the formation of neurofibrillary tangles, and amyloid deposits (senile plaques). AD is a complex disorder and the cascade of gradual changes, which often take more than a decade to fully develop, makes it difficult to diagnose. Certain diagnosis can only be made at autopsy when brain tissue can be examined under microscope. Usually, diagnosis of AD in the living patient is based on medical history, physical examination, and cognitive tests.

AD usually affects people older than the age of 65, but can affect also those younger than 40 years. At age 65 the prevalence is about 2% which rises steadily with age to about 20% at the age of 80.

Although only age and heredity are proven risk factors for AD, several epidemiological studies have suggested vascular factors, including hypertension and diabetes may influence the risk of developing AD (see Kachinski and Muncz, Ann. N.Y. Acad Sci 826: 1-6, (1997)). It has been suggested that the microvascular abnormalities found in AD could be brought about by chronic exposure to elevated levels of plasma homocysteine, in its turn caused by moderate deficiencies in folate and cobalamin or Vitamin B12

WO 02/03074

PCT/GB01/02306

- 2 -

(VB12) (see Regland et al Dementia, 1: 272-277 (1990) and McCaddon et al., Int J Geriatr Psychiatry, 13: 235-239 (1998)).

VB12 is a water soluble vitamin which forms part of the vitamin B complex found in foods and is an essential vitamin necessary for cell proliferation and metabolism. The core molecule consists of a corrin ring of four pyrrole units which surround the central cobalt atom. VB12 is the only vitamin which cannot be synthesised by animals or plants and must be absorbed from food in the gut. It can however be stored in the liver. It is synthesised by micro-organisms, in particular by anaerobic bacteria and yeasts.

VB12 functions *in vivo* as a co-enzyme and VB12 enzymes catalyse three types of reaction; (i) intramolecular rearrangements, for example, the formation of succinyl CoA from L-methylmalonyl CoA, (ii) methylations, for example, the formation of methionine by methylation of homocysteine and (iii) reduction of ribonucleotides to deoxyribonucleotides in some micro-organisms. In mammals, only two enzymic reactions, those specifically mentioned in (i) and (ii) above are known to require VB12 as a co-enzyme.

In the process of digestion, a salivary protein called haptocorrin, hereinafter referred to as HC (which is also referred to in the art as R-binder or transcobalamins I and III collectively) binds VB12 in the upper gastrointestinal tract forming a complex which passes through the stomach. Pancreatic enzymes digest the VB12-haptocorrin (holo-HC) complex in the ileum, liberating VB12 which is then bound to a protein called intrinsic factor, which is secreted by the gastric mucosa, to form a further complex. The VB12-intrinsic factor complex binds to a specific receptor in the lining of the terminal ileum, whereupon it is dissociated by a releasing factor and the VB12 transported actively across the membrane of the ileum

WO 02/03074

PCT/GB01/02306

- 3 -

into the blood stream.

VB12 does not circulate in the body in a free form in an appreciable amount. Probably 99% or so of VB12 is bound by one of the transcobalamin proteins (TC I, II and III) or albumin.

The protein believed to be responsible for transporting VB12 to target tissues is transcobalamin II (TC II), a critical trace protein without which VB12 cannot cross cell membranes. Despite this important metabolic function only about 5-25% of VB12 in the serum is bound to TC II and most is carried by HC. TC II is a single chain polypeptide of 45 kDa found primarily in serum, seminal fluid and cerebro-spinal fluid. VB12 bound TC II (i.e. holo-TC II), attaches to specific receptors on cell membranes and once bound, the holo-TC II complex is taken into cells by pinocytosis.

TC II is synthesised by the liver, vascular endothelium, enterocytes, macrophages and fibroblasts and circulates predominantly as apo-TC II, i.e. lacking bound VB12. It has a short half life of approximately 90 minutes.

Since VB12 must be absorbed from food, any conditions which result in impaired gastric function, for example, gastroenteritis or conditions resulting in gastric atrophy, or an inability to produce functional haptocorrin, intrinsic factor, releasing factor, TC II or TC II receptors, can result in impaired uptake of VB12 and resultant deficiency.

Certain population sub-groups, for example the aged, pregnant women, patients with chronic or acute gastrointestinal disease, those suffering from certain autoimmune diseases, those with a family history of pernicious anaemia and AIDS sufferers, are particularly prone to VB12 deficiency.

The clinical manifestations of VB12 deficiency are varied and numerous but primarily involve, anaemia, megaloblastic haematopoiesis and functional and

- 4 -

structural disorders of the nervous system.

At the molecular level, VB12 deficiency leads to decreased levels of tetra-hydrofolate and S-adenosyl methionine and increased levels of methyl-malonic acid, methyl-tetra-hydrofolate, and homocysteine. At the physiological level, it leads to potentially irreversible nerve damage and/or severe anaemia. The neuropathy arising from VB12 deficiency gives clinical symptoms similar to those observed for patients with senile dementia of Alzheimer-type. Therefore it is common to measure the total serum VB12 level in patients with dementing illnesses.

Some studies have found lower concentrations of total serum VB12 in patients with AD (see Cole and Prchal, *Age Ageing* **13**: 101-105 (1984) and Clarke et al., *Arch. Neurol* **55**: 1449-1455 (1998)), others have seen no significant difference (see Crystal et al., *J. Am. Geriatr Soc.* **42**: 933-936 (1994), Basun et al., *J. Am Geriatr Soc.* **42**: 132-136 (1994) and Joosten et al., *J. Gerontol* **52**: M76-M79 (1997)). Much controversy exists on the subject of the association of AD with VB12 deficiency.

While holoTCII deficiency has been acknowledged as indicative of VB12 deficiency (e.g. in the elderly and even for AD sufferers) and hence as an indicator that nutritional therapy to counteract the VB12 deficiency is desirable, there has been no suggestion that holoTCII deficiency is an indicator for AD as such.

We have now found that there is a significantly lower holoTCII count for patients with confirmed AD as compared to healthy volunteers of the same age, i.e. a matched control group, and that the correlation between AD and reduced holoTCII is more significant than any correlations between AD and reduced total serum VB12 or total homocysteine.

Viewed from one aspect therefore the present invention provides a diagnostic or prognostic assay

WO 02/03074

PCT/GB01/02306

- 5 -

method for Alzheimer's Disease which method comprises assaying a body fluid sample or a test sample derived therefrom for holo transcobalamin II, comparing the holo-transcobalamin II level determined with a pre-determined threshold value and assigning the assay result as indicative or non-indicative of Alzheimer's disease.

Methods of assaying for holo TCII are known and are described for example in WO 00/17659, US-A-4680273, Herbert et al. Am. J. Hematol. 34: 132-139 (1990), Wickramasinghe et al. J. Clin. Pathol. 46: 537-539 (1993), Carmel Am. J. Clin. Pathol. 62: 367-372 (1974), Herzlich et al. Lab. Invest. 58: 332-337 (1988), Vu et al. Am. J. Hematol. 42: 202-211 (1993), Lindemans et al. Clin. Chim. Acta 132: 53-61 (1983), Kapel et al. Clin. Chim. Acta 172: 297-310 (1988), Benhayoun et al. Acta Haematol. 62: 195-199 (1993), Toft et al. Scan. J. Clin. Lab. Invest. 54: 62 (1994) and Kuemmerle et al. Clin. Chim. 38: 2073-2077 (1992), the contents of which are hereby incorporated by reference. These techniques, preferably that of Kuemmerle et al. (supra) and more preferably that of WO 00/17659, may be used in the assay method of the present invention.

The body fluid sample used in the method of the invention may be any human body fluid that normally contains holoTCII, e.g. seminal fluid or cerebrospinal fluid; however it is preferably a blood sample. More preferably the sample assayed in the method of the invention is a blood derived sample, e.g. a plasma or more particularly a serum sample. Such samples may be taken from patients suspected of having AD or confirmed as having AD or may be taken from patients, generally elderly patients, as part of a routine screening or health check.

Assaying for holoTCII using the method of the invention may involve generation of a qualitative, semi-quantitative or quantitative indication of holoTCII in

WO 02/03074

PCT/GB01/02306

- 6 -

the sample tested or in the body fluid it is derived from, e.g. in blood, plasma or most especially serum. The sample may be treated prior to being used in the assay method of the invention, for example it may be diluted by adding a buffer or other aqueous medium and may be stored or preserved for example by chilling or freezing prior to analysis.

Determination of an absolute value of concentration (e.g. in pM concentration) of holoTCII is desirable but may not be necessary as it may be sufficient simply to indicate whether the holoTCII, concentration is above or below one or more predetermined threshold values indicative of presence or severity of AD. The method will however generally require calibration against holoTCII values determined for control groups, in particular control groups of healthy people of the same age range and preferably also confirmed AD sufferers of the same age range. The method may thus also involve the step of comparing the assayed holoTCII value with such predetermined calibration values so as to categorise or stage the human source of the sample as probably having or not having AD or as having AD at a particular stage of development. Typically a holoTCII serum concentration in elderly patients (e.g. aged over 60, more particularly 70) of below 70 pM, more particularly below 60 pM may be indicative of AD.

In the method of the invention, the sample is preferably also assayed for total VB12, optionally also for total homocysteine and optionally also for folate.

Viewed from a further aspect the invention also provides an assay kit for use in the performance of a method according to the invention, said kit comprising an immobilized or immobilizable specific binding ligand for TCII or holo-TCII;

preferably a holo-TCII solution of known concentration and more preferably a set of such solutions having a range of holo-TCII concentrations;

WO 02/03074

PCT/GB01/02306

- 7 -

optionally, a release agent to release VB12 from holo-TCII;

optionally a labelled ligand; and

a calibrator for threshold holoTCII concentration indicative of AD or AD severity as a function of age.

Typically, calibration samples having holo-TCII contents of 0 to 200 pmol/l will be used. The reference range within which the value for holoTCII will generally be found is 30 to 160 pmol/l.

Such assay kits, omitting only the calibrator, are described in WO 00/17659.

The invention will now be described further with reference to the following non-limiting Example.

EXAMPLE

HoloTCII, total serum vitamin B12 (tVB12), and total homocysteine (Hcy) levels were measured in serum samples taken from (i) 20 persons with confirmed Alzheimer-type dementia and (ii) 20 healthy volunteers of the same age group (matched controls).

HoloTCII concentrations were determined by HoloTC-RIA, a system for measuring holoTCII available from Axis-Shield ASA, Oslo, Norway and described in WO 00/17659.

Results were analyzed both with respect to mean values and odds-ratios. Odds ratios were calculated as follows: cases with "out of normal" values/total cases of the Alzheimer group divided with the same ratio for the control group. A value greater than one (1) indicates that a risk may exist. For holoTCII, 35 pM was used as cut-off and for tVB12, 150 pM. Values above 35 and 150 pM, respectively, were considered as being within the normal range. For tHCY, values below 15 μ M were deemed within normal range.

The results are set out in the table below.

WO 02/03074

PCT/GB01/02306

- 8 -

Parameter	Group	Total	Mean	Significance*	Cases	Odds ratio
HoloTC	control	20	83 pM		1	-
	AD ¹	20	52 pM	P<0.005	5	5.0
tVB12	control	20	263 pM		2	-
	AD	20	296 pM	P<0.4	1	0.5
tHCy	control	13	13.4 μM		4	-
	AD	17	15.2 μM	P<0.3	8	1.5

*Mann-Whitney; ¹AD, Alzheimer's disease

Serum holoTCII levels were significantly lower in patients with confirmed Alzheimer type dementia; the mean value was significantly lower and the odds ratio was 5 fold increased in the disease group.

Serum tHCy levels were higher in the patient group, albeit not significantly, and also had an odds ratio of 1.5. The reason for tHCy not obtaining significance is most likely is due to factors other than holoTCII that also influence tHCy concentrations, such as folate and vitamin B6 levels and kidney status.

tVB12 was somewhat higher in the disease group, albeit not significantly, a finding also seen in the odds ratio, which was less than 1.0.

WO 02/03074

PCT/GB01/02306

- 9 -

Claims

1. A diagnostic or prognostic assay method for Alzheimer's Disease which method comprises assaying a body fluid sample or a test sample derived therefrom for holo-transcobalamin II.
2. A method as claimed in claim 1 wherein said body fluid sample is a blood sample.
3. A method as claimed in claim 1 wherein said test sample is a serum sample.
4. A method as claimed in any one of claims 1 to 3 wherein said body fluid or test sample is also assayed for total vitamin B₁₂.
5. A method as claimed in any one of claims 1 to 4 wherein said body fluid or test sample is also assayed for total homocysteine.
6. A method as claimed in any one of claims 1 to 5 wherein said body fluid or test sample is also assayed for folate.
7. A method as claimed in any one of claims 1 to 6 wherein a serum concentration of holo-transcobalamin II of below 70 pM is classed as indicative of Alzheimer's Disease.
8. An assay kit for use in the performance of the method of any one of claims 1 to 7, said kit comprising:
 - an immobilized or immobilizable specific binding ligand for transcobalamin II or holo-transcobalamin II;
 - optionally, a holo-transcobalamin II solution of known concentration;
 - optionally, a release agent to release vitamin B₁₂

WO 02/03074

PCT/GB01/02306

- 10 -

from holo-transcobalamin II;
optionally a labelled ligand; and
a calibrator for threshold holo-transcobalamin II
concentration indicative of Alzheimer's Disease or
Alzheimer's Disease severity as a function of age.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 01/02306
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/82		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAD, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 17659 A (COCKBAIN JULIAN ;ORNING LARS (NO); AXIS SHIELD ASA (NO); SUNDREHAG) 30 March 2000 (2000-03-30) cited in the application	8
A	the whole document	1-7
Y	CLARKE ROBERT ET AL: "Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease." ARCHIVES OF NEUROLOGY, vol. 55, no. 11, November 1998 (1998-11), pages 1449-1455, XP001024463 ISSN: 0003-9942 cited in the application	1-7
	the whole document	
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another invention or other special reasons (see Appendix) *O* document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed ** document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of making of the international search report
11 December 2001		18/12/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office P.O. 29116 Patentkanal 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340 2040, Tx. 31 651 020 01, Fax (+31-70) 340 3078		Authorized officer Pellegrini, P

Form PCT/GB/210 (September 2001) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
Pv.1/GB 01/02306

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KRISTENSEN MARIANNE O ET AL: "Serum cobalamin and methylmalonic acid in Alzheimer dementia." ACTA NEUROLOGICA SCANDINAVICA, vol. 87, no. 6, 1993, pages 475-481, XP001024491 ISSN: 0001-6314 abstract	1-7
Y	US 4 680 273 A (HERBERT VICTOR) 14 July 1987 (1987-07-14) the whole document	1-7
A	BASUM HANS ET AL: "Cobalamin levels are not reduced in Alzheimer's disease: Results from a population-based study." JOURNAL OF THE AMERICAN GERIATRICS SOCIETY, vol. 42, no. 2, 1994, pages 132-136, XP001024490 ISSN: 0002-8614 abstract	1-8

Form PCT/ISA/210 (specification of second search) (July 2002)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No.
PCT/JP01/02306

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0017659 A	30-03-2000	AU 6102699 A	10-04-2000
		BR 9913770 A	05-06-2001
		CN 1324480 T	28-11-2001
		EP 1114323 A1	11-07-2001
		WO 0017659 A1	30-03-2000
		NO 20011353 A	11-05-2001
US 4680273 A	14-07-1987	NONE	

*Annex PCT/ISA(210) (patent family annex) (July 1979)

フロントページの続き

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

专利名称(译)	基于holo transcobalamin II诊断阿尔茨海默病的方法		
公开(公告)号	JP2004502940A	公开(公告)日	2004-01-29
申请号	JP2002508085	申请日	2001-05-22
[标]申请(专利权)人(译)	阿克西斯 - 希尔德公司		
申请(专利权)人(译)	轴 - 盾Eesue		
[标]发明人	アーニングラズ		
发明人	アーニング、ラズ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68 G01N33/82		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N33/82 G01N2800/2821		
FI分类号	G01N33/53.S		
优先权	2000016460 2000-07-04 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了阿尔茨海默病的治疗或预后测定方法。本发明的方法包括分析体液样品或由其衍生的测试样品用于全反式钴胺素II。

		特許公開番号 (P2004-502940A) (43) 公表日 平成16年1月29日(2004.1.29)
(51) Int. Cl. 7	F I	テーマコード(参考)
G01N 33/53	G01N 33/53	S
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 23 頁)		
(21) 出願番号 (86) (22) 出願日 (85) 翻訳文提出日 (86) 国際出願番号 (87) 国際公開番号 (87) 国際公開日 (31) 優先権主張番号 (32) 優先日 (33) 優先権主張国	特許2002-508085 (P2002-508085) 平成13年5月22日(2001.5.22) 平成15年1月6日(2003.1.6) PCT/GB2001/002306 W02002/003074 平成14年1月10日(2002.1.10) 0016460.8 平成12年7月4日(2000.7.4) イギリス(GB)	(71) 出願人 501029515 アクシス・シールド・エスエー ノルウェー王国、エヌー0510 オスロ ー、ウルベンベイエン 87 (74) 代理人 110000040 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ (72) 発明者 アーニング、ラズ ノルウェー、エヌー0510 オスロー、 ウルベンベイエン 87、アクシス・シ ールド・エスエー内
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 ホロトランスコバリンIIに基いたアルツハイマー病の診断方法		