

(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2017-537303

(P2017-537303A)

(43) 公表日 平成29年12月14日 (2017. 12. 14)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A D	4 B O 1 8
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C O 5 0
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	4 C O 8 6
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	4 C O 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-511906 (P2017-511906)	(71) 出願人	599132904
(86) (22) 出願日	平成27年9月14日 (2015. 9. 14)		ネステク ソシエテ アノニム
(85) 翻訳文提出日	平成29年2月28日 (2017. 2. 28)		スイス国, ブベイ, アブニュー ネスレ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/070916		5 5
(87) 国際公開番号	W02016/041886	(74) 代理人	100088155
(87) 国際公開日	平成28年3月24日 (2016. 3. 24)		弁理士 長谷川 芳樹
(31) 優先権主張番号	14184779.8	(74) 代理人	100107456
(32) 優先日	平成26年9月15日 (2014. 9. 15)		弁理士 池田 成人
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100162352
			弁理士 酒巻 順一郎
		(74) 代理人	100140453
			弁理士 戸津 洋介
		(74) 代理人	100140888
			弁理士 渡辺 欣乃
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ビタミンB 1 2 摂取を判定するための方法

(57) 【要約】

本発明は、対象におけるビタミンB 1 2 の腸管摂取量を測定するための方法に関し、この方法は、対象から単離されたサンプル中のキュバム複合体又はその構成要素の濃度を測定することと、キュバム複合体又はその構成要素の濃度を参照濃度と比較することとを含み、参照濃度と比較したキュバム複合体又はその構成要素の濃度により、ビタミンB 1 2 の腸管摂取量が示される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象におけるビタミン B 1 2 の腸管摂取量を決定するための方法であって、

前記対象から単離されたサンプル中のキュバム複合体又はその構成要素の濃度を決定することと、

前記キュバム複合体又はその構成要素の濃度を参照濃度と比較することとを含み、

前記参照濃度と比較した前記キュバム複合体又はその構成要素の濃度により、ビタミン B 1 2 の腸管摂取量が示される、方法。

【請求項 2】

対象がビタミン B 1 2 の腸管摂取障害を有するかどうかを判定するための方法であって

、

前記対象から単離されたサンプル中のキュバム複合体又はその構成要素の濃度を測定することと、

前記キュバム複合体又はその構成要素の濃度を参照濃度と比較することとを含み、

前記参照濃度と比較した前記キュバム複合体又はその構成要素の濃度により、ビタミン B 1 2 の腸管摂取障害が示される、方法。

【請求項 3】

前記対象由来のサンプル中の前記キュバム複合体又はその構成要素の濃度が前記参照濃度と比較して高いことが、ビタミン B 1 2 の腸管摂取の減少を示す、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記キュバム複合体の前記構成要素が、アムニオンレス及び / 若しくはキュビリン又はその分解生成物である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記キュバム複合体の前記構成要素が、アムニオンレス又はその分解生成物である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記サンプルが血清又は尿サンプルである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法

。

【請求項 7】

前記サンプルが血清サンプルである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記キュバム複合体又はその構成要素の濃度を測定する工程が、フローサイトメトリー、抗体ベースアレイ、酵素結合免疫吸着法 (E L I S A)、非抗体タンパク質足場、ラジオイムノアッセイ (R I A)、ウェスタンブロッティング、アプタマー又は質量分析法を利用する、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記ビタミン B 1 2 の腸管摂取障害がビタミン B 1 2 欠乏症の指標となる、請求項 2 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記ビタミン B 1 2 の腸管摂取障害が、内因子欠乏症、I m e r s l u n d - G r a s b e c k 症候群、巨赤芽球性貧血、悪性貧血、クローン病、炎症性腸疾患、2 型糖尿病、心臓血管疾患、脳卒中、痴呆、認知障害、消化管の一部のバイパス手術及び骨粗鬆症からなる群から選択される疾患又は病態に関連する、請求項 2 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記ビタミン B 1 2 の腸管摂取障害が、加齢性ビタミン B 1 2 欠乏症に関連する、請求項 2 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記ビタミン B 1 2 の腸管摂取障害が、サルコペニア及び / 又はフレイルに関連する、

10

20

30

40

50

請求項 2 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法によって、対象がビタミン B 12 の腸管摂取障害を有するかどうかを判定することを含む、内因子欠乏症、Imerslund - Gräsbeck 症候群、巨赤芽球性貧血、悪性貧血、クローン病、炎症性腸疾患、2 型糖尿病、心臓血管疾患、脳卒中、痴呆、認知障害及び骨粗鬆症からなる群から選択される疾患を診断するための方法。

【請求項 14】

ビタミン B 12 の腸管摂取障害である対象を治療するための方法であって、ビタミン B 12 サプリメントを前記対象に投与することを含み、前記対象は、請求項 2 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法によって、ビタミン B 12 の腸管摂取障害を有することが特定されている、方法。

10

【請求項 15】

請求項 2 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法を実施することを含む、対象のビタミン B 12 欠乏症がビタミン B 12 の食事摂取不足又はビタミン B 12 の腸管吸収障害に起因するのかを判定するための方法。

【請求項 16】

前記対象から単離したサンプル中のビタミン B 12、ホロトランスコバラミン、メチルマロン酸及び / 又はホモシステインの濃度を測定する工程を更に含む、請求項 15 に記載の方法。

20

【請求項 17】

ビタミン B 12 の腸管吸収障害を有すると判定された対象が非経口ビタミン B 12 の補給のために選択される、請求項 15 又は 16 に記載の方法。

【請求項 18】

ビタミン B 12 の食事摂取不足であると判定された対象が経口ビタミン B 12 の補給のために選択される、請求項 15 又は 16 に記載の方法。

【請求項 19】

ビタミン B 12 の腸管摂取障害に起因するビタミン B 12 欠乏症である対象を治療するための方法であって、前記対象に非経口ビタミン B 12 サプリメントを投与することを含み、前記対象は、請求項 15 又は 16 に記載の方法によって、ビタミン B 12 の腸管摂取障害を有することが特定されている、方法。

30

【請求項 20】

ビタミン B 12 の食事摂取不足に起因するビタミン B 12 欠乏症である対象を治療するための方法であって、前記対象に経口ビタミン B 12 サプリメントを投与することを含み、前記対象は、請求項 15 又は 16 に記載の方法によって、ビタミン B 12 の食事摂取不足であることが特定されている、方法。

【請求項 21】

ビタミン B 12 の腸管摂取障害に起因するビタミン B 12 欠乏症である対象であって、請求項 15 又は 16 に記載の方法によってビタミン B 12 の腸管摂取障害を有することが特定されている対象の治療に使用するためのビタミン B 12 サプリメント。

40

【請求項 22】

ビタミン B 12 サプリメントが非経口ビタミン B 12 サプリメントである、請求項 21 に記載の使用のためのビタミン B 12 サプリメント。

【請求項 23】

前記非経口ビタミン B 12 サプリメントが、非経口、舌下、皮下、経皮又は経鼻投与される、請求項 19 に記載の使用又は請求項 22 に記載の使用のためのビタミン B 12 サプリメント。

【請求項 24】

食事摂取不足に起因するビタミン B 12 欠乏症である対象であって、請求項 15 又は 16 に記載の方法によってビタミン B 12 の食事摂取不足であることが特定されている対象

50

の治療に使用するための経口ビタミン B 1 2 サプリメント又はビタミン B 1 2 産生細菌を含むプロバイオティクスサプリメント。

【請求項 2 5】

前記経口ビタミン B 1 2 サプリメントが、ビタミン B 1 2 産生細菌を含むプロバイオティクスサプリメントを含む、食料製品又は食料製品である、請求項 2 0 に記載の方法又は請求項 2 4 に記載の使用。

【請求項 2 6】

ビタミン B 1 2 の腸管摂取量に関するバイオマーカーとしてのキュバム複合体又はその構成要素の使用。

【請求項 2 7】

前記キュバム複合体の前記構成要素が、アムニオンレス及び / 若しくはキュビリン又はその分解生成物である、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記キュバム複合体又はその構成要素若しくはその分解生成物に特異的に結合することができる、抗体。

【請求項 2 9】

前記キュバム複合体の前記構成要素がアムニオンレス又はその分解生成物である、請求項 2 8 に記載の抗体。

【請求項 3 0】

対象におけるビタミン B 1 2 の腸管摂取量を測定するための請求項 2 8 又は 2 9 に記載の抗体の使用であって、好ましくは、前記腸管摂取量が請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の方法によって測定される、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、栄養失調の分野に関する。特に、本発明は、対象におけるビタミン B 1 2 の腸管摂取を判定するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ビタミン B 1 2 又はコバラミンは、コバルト含有水溶性ビタミンの一種であり、ヒト体内では合成できないことから、食物から摂取するか、又は腸内細菌叢により合成されなければならない (Hughes et al. ; Ann Clin Biochem, 2013, 50 (Pt 4) : p. 315 - 29)。ヒト体内におけるビタミン B 1 2 の貯蔵は、いくつかの形態からなり、これらは、不活性であるため活性を得るには変換を要するシアノコバラミン並びにビタミン B 1 2 の代謝活性型誘導体であるメチルコバラミン及びアデノシルコバラミンである。

【0003】

ビタミン B 1 2 は、胃中で食物マトリックスから分離された後、小腸で内因子 (IF) に結合し、そこで、キュビリン (CBN) タンパク質とアムニオンレス (AMN) タンパク質から構成されるキュバムと呼ばれる、特異的なヘテロ二量体膜貫通型受容体を介して吸収される。腸細胞内で、CBN - AMN - IF - B 1 2 複合体は、十分に特定されていない機構によってリソソームで分解され、LMB D 1 タンパク質を介して遊離ビタミン B 1 2 がリソソームから排出される。その後、ビタミン B 1 2 は、少なくとも一部にはMRP 1 トランスポーターを必要とする機構によって、細胞質及び腸細胞の基底外側膜を通して輸送され、血流に入る。

【0004】

ビタミン B 1 2 欠乏症は、遺伝的又は後天的のいずれかに由来し得る。先天的遺伝性ビタミン B 1 2 欠乏症は、遺伝性内因子欠乏を引き起こす内因子の変異、又はImerslund - Grasbeck 症候群 (又は遺伝性巨赤芽球性貧血) を引き起こすキュビリン若しくはアムニオンレスの変異から生じ得る (Aminoff et al. ; Nat

10

20

30

40

50

Genet, 1999, 21(3): p. 309-13)。

【0005】

小児期の最初の数年に臨床的に発現する遺伝性ビタミンB12欠乏症とは対照的に、後天性ビタミンB12欠乏症は、かなり晩年に発現し、極めて多様な原因を有し得る。

【0006】

ビタミンB12の不適切な栄養摂取は、ビタミンB12欠乏症の1つの考えられる原因であり、特に、完全菜食主義者は、食事性ビタミンB12の主な供給源が肉、卵及び乳製品であることから、そのおそれがあるとみなされている。

【0007】

ビタミンB12の吸収が変わることも、ビタミンB12欠乏症の重要な原因である。悪性貧血は、内因子を産生する胃壁細胞が破壊されることによってビタミンB12欠乏症が引き起こされる、自己免疫疾患である。萎縮性胃炎、胃手術、低塩酸症又はプロトンポンプ阻害薬の使用などの胃機能不全もまた、内因子を産生しないことによって、及び/又は胃のpHが適切でないために食物性ビタミンB12を放出することによって、ビタミンB12の吸収低下を誘導し得る。ビタミンB12の吸収不良は、膵酵素分泌の低下がハプトコリン分解に変更を与える慢性膵炎、及びクローン病においても観察される。ビタミンB12の低下状態は、炎症性腸疾患の治療に使用される4-アミノサリチル酸又は2型糖尿病の治療に使用されるメトホルミンなどの広く処方されている薬物での長期治療に由来する副作用として生じることもある(Kozyrakiet al., Biochimie, 2013, 95(5): p. 1002-7)。

10

20

【0008】

いくつかの慢性疾患、特に、心臓血管疾患、脳卒中、痴呆/認知障害又は骨粗鬆症などの疾患に関連して、高齢者集団にて有病率が増加している中等度のビタミンB12欠乏症の新たな証拠が出ている。いくつかの研究はまた、ビタミンB12の変化を加齢に伴う身体機能障害と関連付けている。高齢者集団においては、筋力低下、歩行速度の低下及び機能障害が、ビタミンB12欠乏症又は高濃度のホモシステイン及びメチルマロン酸(ビタミンB12欠乏症の組織中の2つのバイオマーカー)のいずれかと相関することが示されている(Hughes et al., 上掲)。

【0009】

ビタミンB12欠乏症が食事摂取不足に起因するものであるのか、又はビタミンB12の腸管吸収障害に起因するものであるのかを見分けられることが特に重要である。特に、腸管吸収障害を患っている対象にビタミンB12の経口補給を用いることは、欠乏症を治療するのに有効であるとは思われない。また、ビタミンB12欠乏症が食事摂取不足に起因するのであれば、例えば、費用及びコンプライアンスの要因により、経口補給が好ましい。

30

【0010】

ビタミンB12欠乏症の診断については、測定法のゴールドスタンダードが存在せず、これにより、欠乏症の複雑な病因とあいまって、診断遅延が生じることが多い。

【0011】

総コバラミン濃度が第一選択評価として最も広く使用されており、これは、従来の微生物学的アッセイ又はより現代的な競合結合アッセイ、ラジオイムノアッセイ若しくは化学発光アッセイなどの妥当性の確認されたいくつかの分析的方法によって、血清/血漿中で測定することができる。しかしながら、コバラミンアッセイは、ビタミンB12の活性型と不活性型とを区別しないため、干渉を受けやすく、重いビタミンB12欠乏症にもかかわらず、正常値となることがある。

40

【0012】

生物活性ビタミンB12欠乏症を評価するために使用される他の方法は、ホロトランスコバラミン(ビタミンB12がその生物活性血清輸送トランスコバラミンIIに結合したもの)、メチルマロン酸(MMA)(ビタミンB12依存酵素メチルマロニルCoAムターゼの活性低下により蓄積する)及びホモシステイン(ビタミンB12依存酵素メチオニ

50

ンシンターゼの活性低下により蓄積する)の測定であるが、葉酸欠乏症と混同する可能性がある。これらの測定は、いずれの方法も十分な感度及び特異性を単独では有していないため、通常、組み合わせて使用される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

したがって、対象において可能性のあるビタミンB12欠乏症を特定するための代替方法及びアプローチが必要とされている。特に、栄養摂取不足ではなく、腸管吸収障害に起因すると考えられるビタミンB12欠乏症の特定を可能にする方法が有益である。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明者らは、年齢とともにアムニオンレス濃度が血清又は血漿中で増加し、これが総ビタミンB12循環濃度の減少と相関することを見出した。更に、本発明者らはまた、血清中を含む腸以外のサンプル中でキュバム複合体の構成要素を測定することが可能であり、血清中のキュバム複合体の濃度が年齢とともに上昇することも明らかにした。

【0015】

したがって、第1の態様において、本発明は、対象におけるビタミンB12の腸管摂取量を測定するための方法に関し、この方法は、対象から単離されたサンプル中のキュバム複合体又はその構成要素の濃度を測定することと、キュバム複合体又はその構成要素の濃度を参照濃度と比較することとを含み、参照濃度と比較したキュバム複合体又はその構成要素の濃度により、ビタミンB12の腸管摂取量が示される。

【0016】

第2の態様において、本発明は、対象がビタミンB12の腸管摂取障害を有するかどうかを判定するための方法に関し、この方法は対象から単離されたサンプル中のキュバム複合体又はその構成要素の濃度を測定することと、キュバム複合体又はその構成要素の濃度を参照濃度と比較することとを含み、参照濃度と比較したキュバム複合体又はその構成要素の濃度により、ビタミンB12の腸管摂取障害が示される。

【0017】

対象由来のサンプル中のキュバム複合体又はその構成要素の濃度が参照濃度と比較して高いことは、ビタミンB12の腸管摂取の減少を示し得る。

【0018】

キュバム複合体の構成要素は、アムニオンレス及び/若しくはキュビリン又はその分解生成物であってよい。特に、キュバム複合体の構成要素は、アムニオンレス又はその分解生成物であってよい。

【0019】

サンプルは、血清又は尿サンプルであってよい。特に、サンプルは、血清サンプルであってよい。

【0020】

キュバム複合体又はその構成要素の濃度検出は、フローサイトメトリー、抗体ベースアレイ、酵素結合免疫吸着法(ELISA)、非抗体タンパク質足場、ラジオイムノアッセイ(RIA)、ウェスタンブロッティング、アブタマー又は質量分析法を利用することができる。

【0021】

ビタミンB12の腸管摂取障害は、ビタミンB12欠乏症の指標となり得る。

【0022】

ビタミンB12の腸管摂取障害は、内因子欠乏症、Imerslund-Grasbeck症候群、巨赤芽球性貧血、悪性貧血、クローン病、炎症性腸疾患、2型糖尿病、心臓血管疾患、脳卒中、痴呆、認知障害、消化管の一部のバイパス手術及び骨粗鬆症からなる群から選択される疾患に関連し得る。

【0023】

10

20

30

40

50

ビタミン B 1 2 の腸管摂取障害は、加齢性ビタミン B 1 2 欠乏症に関連し得る。ビタミン B 1 2 の腸管摂取障害は、サルコペニア及び / 又はフレイルに関連し得る。

【 0 0 2 4 】

更なる態様において、本発明は、内因子欠乏症、Imerslund - Grasbeck 症候群、巨赤芽球性貧血、悪性貧血、クローン病、炎症性腸疾患、2 型糖尿病、心臓血管疾患、脳卒中、痴呆、認知障害及び骨粗鬆症からなる群から選択される疾患を診断するための方法を提供し、この方法は、本発明の第 2 の態様に定義する方法によって、対象がビタミン B 1 2 の腸管摂取障害を有するかどうかを判定することを含む。

【 0 0 2 5 】

別の態様において、本発明は、ビタミン B 1 2 の腸管摂取障害である対象を治療するための方法に関し、この方法は、ビタミン B 1 2 サプリメントを対象に投与することを含み、この対象は、本発明の第 2 の態様に定義する方法によって、ビタミン B 1 2 の腸管摂取障害を有することが特定されている。

10

【 0 0 2 6 】

更なる態様において、本発明は、対象のビタミン B 1 2 欠乏症が、ビタミン B 1 2 の食事摂取不足又はビタミン B 1 2 の腸管吸収障害に起因するのかを判定するための方法を提供し、この方法は、本発明の第 2 の態様に定義する方法を実施することを含む。

【 0 0 2 7 】

方法は、対象から単離したサンプル中のビタミン B 1 2、ホロトランスコバラミン、メチルマロン酸及び / 又はホモシステインの濃度を測定する工程を更に含み得る。

20

【 0 0 2 8 】

ビタミン B 1 2 の腸管吸収障害を有すると判定された対象がビタミン B 1 2 の補給のために選択され得る。好ましくは、ビタミン B 1 2 の補給は、非経口ビタミン B 1 2 の補給又は腸内で比較的高い効率で吸収される経口ビタミン B 1 2 の補給である。例えば、シアノコバラミン及びメチルコバラミンは、他の経口ビタミン B 1 2 サプリメントと比較して、小腸での吸収効率が相対的に高いことが知られている。

【 0 0 2 9 】

ビタミン B 1 2 の食事摂取不足であると判定された対象が経口ビタミン B 1 2 の補給のために選択され得る。

【 0 0 3 0 】

30

更なる態様において、本発明は、ビタミン B 1 2 の腸管摂取障害に起因するビタミン B 1 2 欠乏症である対象を治療するための方法に関し、この方法は、非経口ビタミン B 1 2 サプリメント又は比較的高い効率で腸から吸収される経口ビタミン B 1 2 サプリメントを対象に投与することを含み、この対象は、本発明の方法によって、ビタミン B 1 2 の腸管摂取障害を有することが特定されている。

【 0 0 3 1 】

別の態様において、本発明は、ビタミン B 1 2 の食事摂取不足に起因するビタミン B 1 2 欠乏症である対象を治療するための方法に関し、この方法は、経口ビタミン B 1 2 サプリメント又はビタミン B 1 2 産生細菌を含むプロバイオティクスサプリメントを対象に投与することを含み、この対象は、本発明の方法によって、ビタミン B 1 2 の食事摂取不足であることが特定されている。

40

【 0 0 3 2 】

別の態様において、本発明は、ビタミン B 1 2 の腸管摂取障害に起因するビタミン B 1 2 欠乏症である対象の治療に使用するためのビタミン B 1 2 サプリメントを提供し、この対象は、本発明の方法によって、ビタミン B 1 2 の腸管摂取障害を有することが特定されている。好ましくは、ビタミン B 1 2 の補給は、非経口ビタミン B 1 2 の補給又は比較的高い効率で腸から吸収される経口ビタミン B 1 2 の補給である。

【 0 0 3 3 】

非経口ビタミン B 1 2 サプリメントは、例えば、非経口、舌下又は経鼻投与により与えられてよい。非経口投与には、例えば、筋肉内、皮下、皮内又は静脈内注射を挙げるこ

50

ができる。

【0034】

別の態様において、本発明は、食事摂取不足に起因するビタミンB12欠乏症である対象の治療に使用するための経口ビタミンB12サプリメント又はビタミンB12産生細菌を含むプロバイオティクスサプリメントを提供し、この対象は、本発明の方法によって、ビタミンB12の食事摂取不足であることが特定されている。

【0035】

経口ビタミンB12サプリメントは、食料製品であってよい。食料製品は、ビタミンB12産生細菌を含むプロバイオティクスサプリメントを含み得る。

【0036】

更なる態様において、本発明は、ビタミンB12の腸管摂取量に関するバイオマーカーとしてのキュバム複合体又はその構成要素の使用に関する。

【0037】

別の態様において、本発明は、ビタミンB12欠乏症の診断に使用するためのキュバム複合体又はその構成要素を提供する。

【0038】

更なる態様において、本発明は、キュバム複合体又はその構成要素若しくはその分解生成物に特異的に結合することができる抗体を提供する。

【0039】

更なる態様において、本発明は、対象におけるビタミンB12の腸管摂取量を測定するための、本明細書に定義する抗体の使用に関し、好ましくは、腸管摂取量は本発明の方法によって測定される。

【0040】

更なる態様において、本発明は、腸管吸収障害に関連するビタミンB12欠乏症を診断するのに使用される、キュバム複合体又はその構成要素に特異的に結合することができる抗体に関する。

【0041】

したがって、本発明は、対象におけるビタミンB12の腸管摂取量を測定するための方法を提供する。本発明はまた、ビタミンB12の腸管吸収障害又は食事摂取不足に関連するビタミンB12欠乏症を患っている個体に対して、ビタミンB12補給の改善された合理的な提供を可能にする。

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】ラット血清中アミノオンレス相対濃度が年齢とともに増加することを示す。Somalogicマルチプレックス技術（三次元DNA配列による特異的タンパク質認識）を様々な年齢のラット血清に適用した。100を超える調節タンパク質中、アミノオンレスが、サルコペニアの発症に対応する18月齢から有意に増加したことが認められた。データを平均値±S.E.M（1群あたりn=10）で示す。* * p値<0.01。

【図2】ビタミンB12血清濃度が年齢とともに減少することを示す。競合結合EIAを用いて、様々な年齢のラット血清中の総ビタミンB12濃度を測定した。ビタミンB12濃度は、8月齢から20月齢まで有意に減少し、20月齢から24月齢の間安定している。データを平均値±S.E.M（1群あたりn=10）で示す。* p値<0.05；* * p値<0.01；* * * p値<0.001。

【図3】腓腹筋量が年齢とともに減少することを示す。様々な年齢のラットから腓腹筋を切開して取り出し、秤量し、各動物の総体重に対して標準化した。18月齢から24月齢の間に漸次的な減少が認められ、24月齢の動物の筋肉重量は8月齢の動物の筋肉重量の半分に相当する。データを平均値±S.E.M（1群あたりn=10）で示す。* p値<0.05；* * p値<0.01；* * * p値<0.001。

【図4】CD320がインピトロでげっ歯類筋管上に発現することを示す。筋管への分化期間中のC2C12細胞上のCD320に関してリアルタイム定量的PCRを実施した（

10

20

30

40

50

D M x は、分化培地中の日数を示す)。データは、H P R T ハウスキーピング遺伝子に対して標準化し、年齢の若い動物と比較した比として示す。データを平均値 ± S . E . M (1 群あたり n = 3) で示す。

【図 5】ヒトアムニオンレスヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す。

【図 6】ヒトキュビリンヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す。

【発明を実施するための形態】

【0043】

本方法は、対象から単離したサンプル中のキュバム複合体又はその構成要素の濃度を測定することを含む。

【0044】

10

キュバム複合体

キュバム複合体は、内因子 (I F) - ビタミン B 1 2 受容体であり、キュビリンとアムニオンレス (A M N) という 2 つのタンパク質のヘテロ二量体膜貫通型受容体である (F y f e e t a l . ; 2 0 0 4 ; B l o o d : 1 0 3 (5)) 。キュバムは、回腸、腎臓及び卵黄嚢を含む、様々な組織上に発現するマルチリガンド受容体複合体である。腎臓の近位尿細管において、キュバムは、糸球体限外濾過液からの様々なタンパク質 (例えば、アルブミン、トランスフェリン、アポリポタンパク質 A - I 及びビタミン D 結合タンパク質) の再吸収に関与し、これによりタンパク尿が減少する。回腸において、唯一知られているキュバムの機能は、輸送タンパク質である I F と複合化した食事性ビタミン B 1 2 の吸収を促進することである (P e d e r s o n e t a l . ; T r a f f i c . M a y 2 0 1 0 ; 1 1 (5) : 7 0 6 - 7 2 0) 。

20

【0045】

先天的遺伝性ビタミン B 1 2 欠乏症は、キュビリン又はアムニオンレスの変異に起因する可能性があり、I m e r s l u n d - G r a s b e c k 症候群を引き起こす。

【0046】

「キュバム複合体の構成要素」は、アムニオンレス又はキュビリンのいずれかであり得る。

【0047】

アムニオンレス

アムニオンレスは、約 4 5 K D a の I 型膜貫通タンパク質であり、キュバム複合体を細胞膜に係留し、C B N - A M N - I F - B 1 2 複合体のエンドサイトーシスを担う。

30

【0048】

アムニオンレスは、その細胞質ドメイン内に、F X N P X F 型の 2 つの推定内在化シグナルを含有し、このシグナルが、D i s a b l e d - 2 (D a b 2) 及び / 又は常染色体劣性高コレステロール血症 (A R H) とおそらく関係することによって、キュバム及びキュバムリガンドの内在化に関して活性となる (P e d e r s o n e t a l . ; T r a f f i c . M a y 2 0 1 0 ; 1 1 (5) : 7 0 6 - 7 2 0) 。

【0049】

図 5 は、配列番号 1 に該当するヒトアムニオンレスヌクレオチド配列及び配列番号 2 に該当するヒトアムニオンレスタンパク質配列 (N C B I 参照配列 : N P _ 1 1 2 2 0 5) を示す。

40

【0050】

アムニオンレスの厳密な配列は、個体間及び種間で変わり得ることが理解されよう。これらのバリエーションは全て、本発明の方法及び使用に包含される。例えば、アムニオンレス配列は、図 5 に示す配列 (配列番号 2) と少なくとも 6 5 、 7 0 、 7 5 、 8 0 、 8 5 、 9 0 、 9 5 、 9 7 又は 9 9 % の同一性を有し得ることが想定され得る。

【0051】

キュビリン

キュビリンは、約 4 6 0 k D a のグリコシル化細胞外タンパク質であり、内因子に対するリガンド結合ドメインを有する (K o z y r a k i e t a l . ; B l o o d . 1 9

50

98 May 15; 91(10): 3593-600)。キュビリン前駆体タンパク質は、トランスゴルジプロテイナーゼのフーリンによるタンパク質分解プロセスを受けて23個のN末端アミノ酸が除去される。

【0052】

キュビリンは、8個の上皮成長因子(EGF)様リピートが続く短いN末端領域と、27個の連続するCUBドメインとで構成される。2つの異なるリガンド結合領域が同定されている。領域1(約71kDa)は、113残基のN末端と、8個の上皮成長因子(EGF)様リピート並びにCUBドメイン1及び2を含み、領域2(約37kDa)は、CUBドメイン6~8を含み、内因子-コバラミン(ビタミンB(12); Cbl)(IF-Cbl)とアルブミンの両方に結合する(Yammani et al.; J Biol Chem. 2001 Nov 30; 276(48): 44777-84)。キュビリンタンパク質は、同定可能な膜貫通領域も、エンドサイトーシスに関する古典的なシグナルも有していない。

10

【0053】

図6は、配列番号3に該当するヒトキュビリンヌクレオチド配列及び配列番号4に該当するヒトキュビリン前駆体タンパク質配列(NCBI参照配列: NP_001072)を示す。

【0054】

ヒトキュビリンmRNA及びタンパク質配列は、それぞれNM_001003148.1及びNP_001003148.1から得られる。

20

【0055】

キュビリンの厳密な配列は、個体間及び種間で変わり得ることが理解されよう。これらのバリエーションは全て、本発明の方法及び使用に包含される。例えば、キュビリン配列は、図6に示すアミノ酸配列(配列番号4)と少なくとも65、70、75、85、90、95、97又は99%の同一性を有し得ることが想定され得る。

【0056】

本方法は、キュバム複合体又はその構成要素を検出することを含み得る。キュバム複合体の構成要素は、完全長の成熟アミノオンレス若しくはキュビリンペプチド又はその分解生成物であってよい。

【0057】

「分解生成物」は、完全長のアミノオンレス又はキュビリンペプチドの少なくとも1、2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90又は95、98又は99%であるペプチドであり得る。

30

【0058】

更なる態様において、本発明は、ビタミンB12の腸管摂取量に関するバイオマーカーとしてのキュバム複合体又はその構成要素若しくはその分解生成物の使用を提供する。

【0059】

ビタミンB12

ビタミンB12(コバラミンとも呼ばれる)は、コバルト含有水溶性ビタミンの一種であり、ヒト体内では合成できないことから、食物から摂取するか、又は腸内細菌叢により合成されなければならない。

40

【0060】

コバラミンは、コバルトイオンの上部軸配位子に応じて、いくつかの化学的形態のビタミンB12を指し得る。これらは、

シアノコバラミン(R = -CN)

ヒドロキソコバラミン(R = -OH)

メチルコバラミン(R = -CH₃)及び

アデノシルコバラミン(R = -Ado)である。

【0061】

したがって、ビタミンB12は、化学的に関連した化合物の種類(ビタマー)を含み、

50

それらの全てがビタミン活性を有する。ビタミン B 1 2 は、コリン環と呼ばれる平面テトラピロール環の中心に位置する、生化学的に珍しいコバルト元素を含有する。ビタミンの基本構造の生合成は、細菌（通常、ヒドロキシコバラミンを産生するもの）によってのみ達成されるが、異なる形態のビタミン間の変換はヒト体内で行うことができる。

【 0 0 6 2 】

ヒト体内におけるビタミン B 1 2 の貯蔵は、いくつかの形態からなり、これらは、不活性であるため活性を得るには変換を要するシアノコバラミン並びにビタミン B 1 2 の代謝活性型誘導体であるメチルコバラミン及びアデノシルコバラミンである。

【 0 0 6 3 】

ビタミン B 1 2 は、胃中で食物マトリックスから分離された後、小腸で内因子（ I F ）に結合し、そこで、キュバム複合体を介して吸収される。腸細胞内で、C B N - A M N - I F - B 1 2 複合体は、十分に特定されていない機構によってリソソームで分解され、L M B D 1 タンパク質を介して遊離ビタミン B 1 2 がリソソームから排出される。その後、ビタミン B 1 2 は、少なくとも一部には M R P 1 トランスポーターを必要とする機構によって、細胞質及び腸細胞の基底外側膜を通して輸送され、血流に入る。

10

【 0 0 6 4 】

血中において、ビタミン B 1 2 は、ビタミン B 1 2 のおよそ 8 0 % を運搬し、組織に生物学的に利用されないハプトコリンと、総ビタミン B 1 2 のおよそ 2 0 % を運搬し、ユビキタスな C D 3 2 0 受容体に結合するか、又は体内の主なビタミン B 1 2 貯蔵部位である肝臓でアシアロ糖タンパク質受容体複合体に結合することによって組織に生物学的に利用されるトランスコバラミンの 2 つの担体タンパク質と結合する。

20

【 0 0 6 5 】

ビタミン B 1 2 は、D N A の合成及び制御、脂肪酸代謝並びにアミノ酸代謝に必要である。

【 0 0 6 6 】

腸管摂取量

「腸管摂取量」は、対象において、腸を介して血液中に吸収される、食事摂取からのビタミン B 1 2 の量を指す。したがって、腸管摂取量は、対象における食事からのビタミン B 1 2 の腸管摂取効率を表し得る。

【 0 0 6 7 】

「腸管摂取障害」は、腸内での食事性ビタミン B 1 2 の摂取が非効率であること又は不十分であることを指し得、例えば、ビタミン B 1 2 の腸管摂取の減少を指し得る。

30

【 0 0 6 8 】

好ましくは、対象は、ビタミン B 1 2 の十分な栄養摂取から必要量のビタミン B 1 2 を吸収していなければ、「ビタミン B 1 2 の腸管摂取障害を有する」。

【 0 0 6 9 】

したがって、ビタミン B 1 2 の腸管摂取障害は、ビタミン B 1 2 欠乏症の一因であるか、又はその原因となる可能性がある。

【 0 0 7 0 】

ビタミン B 1 2 の腸管摂取量は、対照コホートからの参照量と比較することができる。対照群は、ビタミン B 1 2 の腸管摂取障害であると診断されたコホート及びビタミン B 1 2 の腸管摂取障害でないことが前もって判定された対象のコホートから選択することができる。

40

【 0 0 7 1 】

ビタミン B 1 2 欠乏症

米国成人の栄養所要量（ R D A ）は、医学研究所により、食物からの平均吸収が約 5 0 % であることに基つき、1 日あたり 2 . 4 μ g に設定された（ N a t i o n a l A c a d e m y o f S c i e n c e s , I n s t i t u t e o f M e d i c i n e （ 2 0 0 0 ） ; D i e t a r y R e f e r e n c e I n t a k e s f o r T h i a m i n , R i b o f l a v i n , N i a c i n , V i t a m i n B 6 , F o l a t e , V

50

itamin B12, Pantothenic Acid, Biotin and Choline, Chapter 9, pp306 - 56)。1日所要量は体格に応じて変動することが示された。

【0072】

ヒトにおけるビタミンB12欠乏症の見込みは、ビタミンB12の血中濃度に従って次のように定義することができる。148ピコモル/L未満(200ピコグラム/mL未満)は欠乏症のおそれ、148~258ピコモル/L(201~350ピコグラム/mL)は欠乏症の可能性、258ピコモル/L超(350ピコグラム/mL超)は欠乏症の見込みはないことを示す(BMJ, Best Practice, <http://bestpractice.bmj.com/best-practice/monograph/822/basics.html>)。しかしながら、ビタミンB12量並びに活性及び不活性ビタミンB12についての関連合併症を判定するゴールドスタンダードがないことから、血清ビタミンB12のアッセイは、ビタミンB12欠乏症を診断するために、更なる生化学的アッセイ又は主症状に基づいた臨床的評価と組み合わせることが多い。

10

【0073】

ビタミンB12欠乏症の更なる指標を与えるために実施することができる追加のアッセイは、対象から単離したサンプル中のホロトランスコバラミン、メチルマロン酸及び/又はホモシステインの濃度を測定することを含む。

【0074】

ホロトランスコバラミンは、ビタミンB12がその生物活性血清輸送トランスコバラミンIIに結合したものを指す。ホロトランスコバラミン濃度は、市販のアッセイ(例えば、ELISAアッセイ)を用いて測定することができる。ホロトランスコバラミン濃度が低いことは、潜在性ビタミンB12欠乏症に関連する。

20

【0075】

メチルマロン酸(MMA)は、ビタミンB12依存酵素メチルマロニルCoAムターゼの活性低下により蓄積する。したがって、MMA濃度が高いことは、ビタミンB12欠乏症に関連する。

【0076】

ホモシステインは、ビタミンB12依存酵素メチオニンシンターゼの活性低下により蓄積する。ホモシステイン濃度が高いことは、潜在性ビタミンB12欠乏症に関連する。しかしながら、ホモシステイン濃度のアッセイは、葉酸欠乏症と混同する可能性がある。

30

【0077】

ビタミンB12欠乏症の主な症候群は、ビールメル病(悪性貧血)である。これは、骨髓前巨赤芽球症(巨赤芽球性貧血)、胃腸症状及び神経学的症状を伴う貧血によって特徴付けられる。

【0078】

ビタミンB12欠乏症はまた、躁病及び精神障害、疲労、記憶障害、興奮性、鬱病及び人格変化の症状を引き起こすこともある。乳児の場合、症状には、興奮、成長障害、無関心、拒食症及び発達退行が挙げられる。

【0079】

ビタミンB12欠乏症は、多数の病態及び疾患に関連する。したがって、本方法によって測定されるビタミンB12の腸管摂取量は、例えば、内因子欠乏症、Imerslund-Grasbeck症候群、巨赤芽球性貧血、悪性貧血、クローン病、炎症性腸疾患、2型糖尿病、心臓血管疾患、脳卒中、痴呆、認知障害、小腸の一部の胃バイパス及び骨粗鬆症に関連し得る。

40

【0080】

加齢性ビタミンB12欠乏症

高齢者におけるビタミンB12欠乏症はよく認められ(Hughes et al.; Ann Clin Biochem(2013); 50(4); 315 - 29)、ビタミンB12の低下は、心臓血管疾患、認知機能障害、痴呆及び骨粗鬆症を含む多数の加齢性

50

疾患のリスク上昇に関連付けられている。

【0081】

本方法によって判定されるビタミンB12の腸管摂取障害は、加齢性ビタミンB12欠乏症に関連し得る。

【0082】

サルコペニア又はフレイル

加齢に伴う筋肉量及び筋肉機能の損失は、全ての個体において避けられないものであるが、その進行は、遺伝子要因及び身体活動又は栄養摂取などの環境要因に大きく依存する。

【0083】

サルコペニアは、加齢に伴う筋肉量及び筋肉機能の損失が悪化し、生活の質に影響を及ぼす点として定義されている。対照的に、フレイルは、加齢に伴う筋機能不全という別の分類であり、筋肉量ではなく、筋力及び筋機能に基づいている。

【0084】

サルコペニア及びフレイルは、神経筋伝達障害、興奮収縮連関の変化、幹細胞枯渇に関連した再生能の低下、筋線維におけるミトコンドリア代謝及びエネルギー代謝の不全並びに最終的な骨格筋の大理石様脂肪化及び線維化などの病態生理学的変化に関連する多因性症候群である。したがって、これらの症候群の病因は、複雑であり、また十分に解明されていないが、身体活動の低下、タンパク同化ホルモン（アンドロゲン、IGF-1）のホルモン減少及び栄養不良／栄養失調が重要な役割を果たしている。サルコペニア又はフレイル患者において最も広く認められる栄養失調は、ビタミンD濃度の低下である。

【0085】

本方法によって測定されるビタミンB12の腸管摂取量は、サルコペニア及び／又はフレイルに関連し得る。

【0086】

「関連する」という用語は、ビタミンB12欠乏症に関連する疾患（例えば、上に記載するもの）を患っているか、又はそのリスクのある対象におけるビタミンB12の腸管摂取量を測定するために本方法を使用することができることを示すために本明細書にて使用される。

【0087】

本発明は、内因子欠乏症、Imerslund-Grasbeck症候群、巨赤芽球性貧血、悪性貧血、クローン病、炎症性腸疾患、2型糖尿病、心臓血管疾患、脳卒中、痴呆、認知障害及び骨粗鬆症からなる群から選択される疾患を診断するための方法を更に提供し、この方法は、本発明の方法によって、対象がビタミンB12の腸管摂取障害を有するかどうかを判定することを含む。

【0088】

腸管摂取又は食事摂取に関連するビタミンB12欠乏症の判定

更なる態様において、本発明は、対象のビタミンB12欠乏症が、ビタミンB12の食事摂取不足又はビタミンB12の腸管吸収障害に起因するのかを判定するための方法に関し、ビタミンB12の腸管摂取量は本発明の方法に従って測定される。

【0089】

対象は、ビタミンB12不足であり、本発明の方法によって、ビタミンB12の腸管摂取障害を有することが判定された場合に、ビタミンB12の腸管摂取障害に起因するビタミンB12欠乏症であると判定される。

【0090】

対象は、ビタミンB12不足であり、本発明の方法によって、ビタミンB12の腸管摂取障害でないことが判定された場合に、ビタミンB12の食事摂取不足に起因するビタミンB12欠乏症であると判定される。

【0091】

ビタミンB12の腸管吸収障害を有すると判定された対象が非経口ビタミンB12の補

10

20

30

40

50

給のために選択され得る。

【0092】

ビタミンB12の食事摂取不足であると判定された対象が経口ビタミンB12の補給のために選択され得る。

【0093】

方法は、当該技術分野において知られているビタミンB12欠乏症の1つ以上の更なるマーカーレベルを判定する工程を更に含み得る。例えば、方法は、対象から単離したサンプル中のビタミンB12、ホロトランスコバラミン、メチルマロン酸及び/又はホモシステインの濃度を測定する工程を含み得る。

【0094】

好ましくは、追加の測定は、キュバム複合体の構成要素の濃度を測定するために用いたものと同じサンプルを用いて実施される。

【0095】

ビタミンB12補給

本発明は、ビタミンB12の腸管摂取障害である対象を治療するための方法を更に提供し、この方法は、対象にビタミンB12サプリメントを投与することを含み、この対象は、本発明の方法によって、ビタミンB12の腸管摂取障害を有することが特定されている。

【0096】

ビタミンB12サプリメントは、シアノコバラミン、ヒドロキシコバラミン、メチルコバラミン及びアデノシルコバラミンを含む形態で利用可能であり、単独で提供してもよいし、他のサプリメントと組み合わせて提供してもよい。ビタミンB12補給の2つの主な経路は、食物サプリメントからの経口摂取又は非経口注入（主に筋肉内、場合により皮下）である。

【0097】

有利には、ビタミンB12の腸管摂取障害を有することが本発明の方法によって判定された対象は、腸管吸収を必要としないビタミンB12サプリメントで治療される。

【0098】

したがって、ビタミンB12の腸管摂取障害である対象を治療するための本方法は、ビタミンB12の腸管吸収障害を有すると判定された対象を、非経口ビタミンB12サプリメントで治療することを含み得る。

【0099】

本発明は、ビタミンB12の腸管摂取障害に起因するビタミンB12欠乏症である対象を治療するための方法を更に提供し、この方法は、対象に非経口ビタミンB12サプリメントを投与することを含み、この対象は、本発明の方法によって、ビタミンB12の腸管摂取障害を有することが特定されている。

【0100】

非経口ビタミンB12サプリメントは、例えば、非経口、筋肉内、皮下、舌下、経皮又は経鼻投与のためのサプリメントを包含し得る。

【0101】

本方法は、ビタミンB12の腸管吸収障害を有すると判定された対象を、比較的高い効率で腸から吸収される経口ビタミンB12サプリメントで治療することを更に含み得る。例えば、シアノコバラミン及びメチルコバラミンは、他の経口ビタミンB12サプリメントと比較して、小腸内から吸収効率が相対的に高いことが知られている。

【0102】

本発明は、ビタミンB12の食事摂取不足に起因するビタミンB12欠乏症である対象を治療するための方法を更に提供し、この方法は、経口ビタミンB12サプリメント又はビタミンB12産生細菌を含むプロバイオティクスサプリメントを対象に投与することを含み、この対象は、本発明の方法によって、ビタミンB12の食事摂取不足であることが特定されている。

10

20

30

40

50

【0103】

経口補給は、典型的に、1日あたり250 μg ~ 1 mg のビタミンB12を与えることを伴う。

【0104】

本方法は、ビタミンB12産生細菌を含むプロバイオティクスサプリメントを、ビタミンB12の食事摂取不足であると判定された対象に投与することを含み得る。

【0105】

プロバイオティクスサプリメントは、宿主対象の腸内細菌バランスを改善してビタミンB12摂取を高めることによって、宿主対象に有益な影響を与える任意のプロバイオティクス微生物を含むことができる。プロバイオティクス微生物は、ビフィドバクテリウム属、ラクトバチルス属、レンサ球菌属、エンテロコッカス属及びサッカロミセス属又はこれらの混合物からなる群から選択され得る。

10

【0106】

腸内細菌叢の天然成分である特定のプロバイオティクス微生物、例えば、*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*などの乳酸産生細菌がビタミンB12を産生することが知られている(Le Blanc et al.; J App. Micro.; 111(6); (2011)参照)。有利には、プロバイオティクスサプリメントは、その場でビタミンB12を産生する腸内の既存の微生物を強化することができる。

20

【0107】

経口補給は、食料又は飲料製品の形態であってよい。食料又は飲料製品は、ビタミンB12産生細菌又はその場でビタミンB12を産生する腸内の既存の微生物を強化することができる他のプロバイオティクスを含むプロバイオティクスサプリメントを含み得る。

【0108】

典型的には、医師が個々の対象に最も適切であろう実際の用量を決定し、この用量は特定の患者の年齢、体重及び応答に応じて変動する。用量は、活性ビタミンB12の所要量をもたらすのに十分なものである。

【0109】

対象

対象は、ウシ、イヌ、ヤギ、シカ、ウマ、ネコ、ヒト、ヒツジ、ブタ及び霊長類などの哺乳動物を挙げることができるが、これらに限定されない。好ましくは、対象は、ヒトである。様々な実施形態において、対象は、ビタミンB12欠乏症である可能性があるか、その疑いがあるか、又はそのリスクがある。

30

【0110】

対象は、内因子欠乏症、Imerslund-Grasbeck症候群、巨赤芽球性貧血、悪性貧血、クローン病、炎症性腸疾患、2型糖尿病、心臓血管疾患、脳卒中、痴呆、認知障害、消化管の一部のバイパス手術及び骨粗鬆症からなる群から選択される疾患を患っている場合がある。

【0111】

対象は、サルコペニア及び/若しくはフレイルを患っているか、又はそのリスクのある高齢の個体であり得る。

40

【0112】

ビタミンB12補給は、スポーツ栄養補給プログラムの一環として一般に用いられる。本方法は、スポーツ栄養補給プログラムの一環としてのビタミンB12補給の最も効果的な方法を判定するために使用することができる。

【0113】

サンプル

本方法は、対象から得たサンプル中のキュバム複合体又はその構成要素の濃度を測定することを含む。これは、「試験サンプル」と呼ばれることもある。したがって、本方法は、典型的には、ヒト又は動物の身体の外側で、例えば、試験を行う対象から事前に得た体

50

液サンプルに対して行われる。

【0114】

サンプルは、例えば、血清、血漿又は尿サンプルであってよい。

【0115】

好ましくは、サンプルは、血液から得られ、すなわち、サンプルは、全血又は血液フラクションを含む。最も好ましくは、サンプルは、血漿又は血清を含む。

【0116】

血液サンプルを採取し、かつ血液フラクションを分離する技術は当該技術分野において既知である。例えば、静脈血サンプルは、針を使用して患者から採取され、プラスチックチューブ内に堆積されてもよい。採取チューブは、例えば、スプレーコーティングしたシリカ、及び血清分離のためのポリマーゲルを含んでもよい。血清は、室温において、1300RCFで10分間にわたり、遠心分離によって分離され、-80で小さなプラスチックチューブに保存されてもよい。

10

【0117】

参照濃度（量）との比較

本方法は、参照濃度（量）との比較を含む。参照濃度（量）という用語は、「対照濃度（量）」と同義であり、当業者が技術データの正確な解釈を容易にするために使用するデータを広範に含む。

【0118】

試験サンプル中の標的濃度、例えば、対象由来のサンプル中のキュバム複合体又はその構成要素の濃度は、対照群の1つ以上のコホート（集団／群）中の同じ標的のそれぞれの濃度と比較することができる。対照群は、ビタミンB12の腸管摂取障害であると診断されたコホート及びビタミンB12の腸管摂取障害でないことが前もって判定された対象のコホートから選択することができる。

20

【0119】

キュバム複合体又はその構成要素の濃度に関する参照濃度は、好ましくは、試験サンプル中のキュバム複合体又はその構成要素の濃度を特徴付けるのに使用される単位と同じ単位を用いて測定される。したがって、キュバム複合体又はその構成要素の濃度の濃度が、 $\mu\text{mol/l}$ (μM) で示されるキュバム複合体又はその構成要素の単位などの絶対値である場合、参照値もまた、一般集団又は対象の選択対照集団における個体の $\mu\text{mol/l}$ (μM) で示されるキュバム複合体又はその構成要素の単位に基づく。

30

【0120】

更に、参照値は、中央値又は平均値などの1つのカットオフ値であってよい。得られた体液サンプル中のキュバム複合体又はその構成要素の参照値、例えば、平均値濃度、濃度中央値又は「カットオフ」濃度は、一般集団又は選択集団中の個体の大規模サンプルを分析し、陽性判定基準を選択するための予測的中率法又は最適な特異度（最も高い真陰性率）及び感度（最も高い真陽性率）を定義する受信者操作特性曲線などの統計モデルを使用することによって確立することができる。これは、Knapp, R. G., and Miller, M. C. (1992). Clinical Epidemiology and Biostatistics. William and Wilkins, Harua Publishing Co. Malvern, Pa. に記載されているとおりである（この文献を参考として本明細書に援用する）。

40

【0121】

正しい参照値をどのように割り当てるについては、当業者に知られているが、これらは、例えば、性別、人種、遺伝的遺産、健康状態又は年齢に応じて変わる。

【0122】

特に、本発明者らは、キュバム複合体又はその構成要素の濃度が対象の年齢に応じて変動することを明らかにした。そのため、参照濃度は、試験サンプルの年齢と適合させる必要がある。

【0123】

50

特定のサンプル中のキュバム複合体又はその構成要素の濃度に対する対照又は参照濃度は、データベースに保存し、対象に対して実施した方法の結果を解釈するために使用してもよい。

【0124】

本方法は、参照濃度と比較した試験サンプル中のキュバム複合体又はその構成要素の濃度の差異がビタミンB12の腸管摂取量を示すことを提供する。

【0125】

本方法は、参照濃度と比較した試験サンプル中のキュバム複合体又はその構成要素の濃度の差異がビタミンB12の腸管摂取障害を示すことを提供し得る。

【0126】

例えば、試験サンプルで測定された濃度と参照濃度との間の1.1、1.5、2、3、4、5、10、50、100又は1000倍の差異は、ビタミンB12の腸管摂取量の低減を示し得る。

【0127】

特定の実施形態において、試験サンプル中のキュバム複合体又はその構成要素の濃度が参照濃度と比較して高いことは、ビタミンB12の腸管摂取量の減少を示し得る。キュバム複合体又はその構成要素の濃度は、参照濃度と比較して、試験サンプルで1.1、1.5、2、3、4、5、10、50、100又は1000倍大きい場合がある。

【0128】

好ましい実施形態において、対象由来の血清サンプル中のキュバム複合体又はその構成要素の濃度は、参照濃度よりも1.1、1.5、2、3、4、5、10、50、100又は1000倍大きい場合がある。

【0129】

検出方法

キュバム複合体又はその構成要素の濃度は、当該技術分野において知られている種々の好適な方法及び技術を用いて検出することができる。

【0130】

典型的には、サンプル中のキュバム複合体又はその構成要素の濃度及び参照値は、同じ分析方法を用いて測定される。

【0131】

この測定には、ポリペプチド又はその分解生成物の検出が含まれ得る。

【0132】

キュバム複合体又はその構成要素の濃度を測定する工程は、例えば、フローサイトメトリー、抗体ベースアレイ、酵素結合免疫吸着法(ELISA)、非抗体タンパク質足場(例えば、フィブロネクチン足場)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、ウェスタンブロッティング、アプタマー又は質量分析法などの技術を使用して、ポリペプチドを検出することを含み得る。

【0133】

ELISAは、当該技術分野において知られている一般的な方法に従って実施することができる。例えば、ELISAは、サンドイッチ又は競合ELISAであってよい。

【0134】

サンドイッチELISAは、以下の工程を含み得る。

- 既知量の補足抗体が結合した表面(すなわち、マイクロタイタープレートウェル)を調製する

- この表面上のあらゆる非特異的結合部位をブロックする

- キュバム複合体又はその構成要素を含むサンプルをプレートに適用する

- プレートを洗浄して結合していない抗原を除去する

- キュバム複合体又はその構成要素に特異的に結合することができる一次抗体を加え、抗原に結合させる

- 抗体Fc領域に特異的に結合する検出抗体として、酵素結合二次抗体を適用する

10

20

30

40

50

- プレートを洗浄して結合していない抗体 - 酵素複合体を除去した後、化学物質を加えて酵素を色又は蛍光又は電気化学シグナルに変換する

- プレートウェルの吸光度又は蛍光又は電気化学シグナルを測定して抗原の存在及び量を測定する

【0135】

競合E L I S Aは、以下の工程を含み得る。

- キュバム複合体又はその構成要素に特異的に結合する標識抗体をキュバム複合体又はその構成要素を含むサンプルの存在下でインキュベートする

- 次に、この結合した抗体 / 抗原複合体を、抗原を被覆したウェルに加える

- プレートを洗浄することにより、結合していない抗体を除去する

- 酵素が結合した、一次抗体に特異的な二次抗体を加える

- 酵素の基質を加え、酵素とその基質の反応により発色又は蛍光シグナルを発生させる

- シグナルの最終的な飽和を防ぐために反応を停止する

10

【0136】

種々の酵素基質標識が利用可能であり、例えば米国特許第4,275,149号に開示されているものである。酵素は概して、検出することが可能な発色基質の化学的变化に触媒作用を及ぼす。例えば、酵素は基質の色変化に触媒作用を及ぼしてもよいし、又は基質の蛍光若しくは化学発光を変えてもよい。酵素標識の例としては、ペルオキシダーゼ、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ (H R P O)、アルカリホスファターゼ、βガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシダーゼ (例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ)、複素環オキシダーゼ (例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ)、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼなどが挙げられる。抗体に酵素を接合するための技術がよく知られている。

20

【0137】

アプタマーを使用する検出は、以下の工程を含み得る。

- キュバム複合体又は構成要素を特異的に認識するアプタマーについては、標準的な核酸合成技術を用いて合成してもよいし、例えば、試験管内人工進化法 (S E L E X : S y s t e m a t i c E v o l u t i o n o f L i g a n d s b y E x p o n e n t i a l E n r i c h m e n t) 技術を用いて、ランダム配列巨大プールから選択してもよい。

30

- アプタマーをサンプルと混合することにより、アプタマー - タンパク質複合体を形成する

- 非特異的複合体を分離する

- 結合したアプタマーをその標的タンパク質から取り外す

- アプタマーを回収し、例えば、マイクロアレイ又は質量分析技術を用いて測定する。

【0138】

アプタマーは、ステム、ループ、四重鎖、シュードノット、バルジ又はヘアピンの組み合わせを有する独特な三次構造で折り畳まれている一本鎖DNA又はRNA配列であってよい。アプタマーの分子認識は、標的化合物との芳香環のスタッキング、静電及びファンデルワールス相互作用又は水素結合などの分子間相互作用から生じる。加えて、アプタマーとその標的との間の特異的な相互作用は、誘導適合機構によって補完されるため、アプタマーがその標的に対して独特な折り畳み構造を取る必要がある。アプタマーは、色素などの標識分子と連結するように、又は種々の用途のビーズ若しくは基質の表面上に固定化するように修飾され得る。

40

【0139】

アプタマーは、ナノテクノロジー、マイクロアレイ、マイクロ流体、質量分析法及び所与のサンプルを定量化するための他の技術と組み合わせることができる。

【0140】

相同性

50

相同性比較は、目で行うこともできるが、より一般的には、容易に利用できる配列比較プログラムを使用して実施する。これらの市販のコンピュータプログラムにより、2つ以上の配列間の相同性又は同一性のパーセンテージを計算することができる。

【0141】

相同性パーセンテージは、連続的な配列にわたって計算することができる。すなわち、一方の配列を他方の配列とアラインメントし、一方の配列中のそれぞれのアミノ酸を他方の配列中の対応するアミノ酸と一度に1残基ずつ直接比較する。これは、「ギャップなし」アラインメントと呼ばれている。典型的には、こうしたギャップなしアラインメントは、比較的短い残基数に対してのみ行われる。

【0142】

10

これは、極めて単純かつ一貫した方法であるが、例えば、ヌクレオチド配列中の1つの挿入又は欠失により、それ以外の点では同一の配列ペアにおいて、後続するコドンがアラインメントから外れる場合があることを考慮していないため、グローバルアラインメントを実施する場合には、相同性パーセントが大幅に低下する可能性がある。そのため、ほとんどの配列比較法は、全体的な相同性スコアに過度にペナルティを適用することなく、考えられる挿入及び欠失を考慮に入れた最適アラインメントを生成するように設計されている。これは、局所相同性を最大にするように配列アラインメント中に「ギャップ」を挿入することによって達成される。

【0143】

20

しかしながら、これらのより複雑な方法は、同数の同一のアミノ酸に対して、2つの比較配列間の関係性がより高いことを反映している可能な限り少ないギャップを有する配列アラインメントが、多数のギャップを有する配列アラインメントよりも高いスコアを達成するように、アラインメント中に生じる各ギャップに「ギャップペナルティ」を割り当てている。典型的に、ギャップの存在には比較的高いコストを課し、ギャップ中の後続するそれぞれの残基には小さなペナルティを課す「アフィンギャップコスト」が使用される。これは、最も一般的に使用されているギャップスコアリングシステムである。当然のことながら、高いギャップペナルティが、ギャップのより少ない最適化アラインメントを生成する。ほとんどのアラインメントプログラムは、ギャップペナルティを変更することができる。しかしながら、配列比較のためにこのようなソフトウェアを使用する場合、デフォルト値を用いるのが好ましい。例えば、GCG Wisconsin Bestfitパッケージを用いる場合、アミノ酸配列のデフォルトギャップペナルティは、ギャップについては-12であり、各伸長については4である。

30

【0144】

したがって、最大相同性パーセンテージの算出には、まず、ギャップペナルティを考慮した最適アラインメントの生成が必要である。このようなアラインメントを実施するのに適したコンピュータプログラムは、GCG Wisconsin Bestfitパッケージである(University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12:387)。配列比較を行うことができる他のソフトウェアの例には、BLASTパッケージ(Ausubel et al. (1999) 同書18章参照)、FASTA(Atschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 403:410)及びGENEWORKSスイートの比較ツールが挙げられるが、これらに限定されない。BLASTとFASTAは2つともオフライン及びオンライン検索が利用可能である(Ausubel et al. (1999) 同書7-58~7-60頁参照)。しかしながら、いくつかの用途については、GCG Bestfitプログラムを使用するのが好ましい。BLAST2 Sequencesと称する別のツールもまた、タンパク質とヌクレオチド配列の比較に使用できる(FEMS Microbiol. Lett. (1999) 174:247-50; FEMS Microbiol. Lett. (1999) 177:187-8参照)。

40

【0145】

50

最終的な相同性パーセンテージを同一性の点から測定することができるが、アラインメントプロセスそのものは、典型的に、イエスかノーかのペア比較に基づいていない。むしろ、化学的類似性又は進化距離に基づいて、それぞれのペアワイズ比較にスコアを割り当てる、スケール化類似性スコア行列が通常使用される。一般的に使用されるこのような行列の例は、B L O S U M 6 2 行列 (B L A S T プログラムスイートのデフォルト行列) である。G C G W i s c o n s i n プログラムは、通常、パブリックデフォルト値又は提供される場合はカスタムシンボル比較表のいずれかを使用する (更なる詳細についてはユーザマニュアル参照)。いくつかの用途については、G C G パッケージ用のパブリックデフォルト値を用いるか、他のソフトウェアの場合、B L O S U M 6 2 などのデフォルト行列を使用するのが好ましい。

10

【 0 1 4 6 】

ソフトウェアにより最適アラインメントが生成されたら、相同性パーセンテージパーセンテージ、好ましくは配列同一性パーセンテージを算出することができる。典型的に、ソフトウェアは、配列比較の一部としてこれを行い、数値による結果を生成する。

【 0 1 4 7 】

抗体

本発明は、キュバム複合体又はその構成要素若しくはその分解生成物に特異的に結合することができる抗体を提供する。

【 0 1 4 8 】

抗体は、アムニオンレス又はその分解生成物に特異的に結合することができる。

20

【 0 1 4 9 】

「抗体」という用語は、本明細書において、抗体又はその機能性断片を指すために使用される。機能性断片とは、親抗体と同じ抗原標的に結合する能力を保持する、すなわち、キュバム複合体又はその構成要素若しくはその分解生成物に結合する能力を保持する、抗体のいずれかの部分を意味する。

【 0 1 5 0 】

抗体は、キメラ抗体であってもよい。キメラ抗体は、ある種 (例えば、マウス) に由来する抗体可変ドメインを、別の種 (例えば、ヒト) に由来する抗体の定常領域に移植することによって作製することができる。

【 0 1 5 1 】

抗体は、古典的な完全長抗体であってもよい。例えば、抗体は、I g G、I g M 又は I g A 分子であってもよい。

30

【 0 1 5 2 】

抗体は、機能性抗体断片であってもよい。具体的な抗体断片には、(i) V L、V H、C L 及び C H 1 ドメインからなる F a b 断片、(i i) V H 及び C H 1 ドメインからなる F d 断片、(i i i) 単一抗体の V L 及び V H ドメインからなる F v 断片、(i v) 単一可変ドメインからなる d A b 断片、(v) 単離 C D R 領域、(v i) 2 つの連結した F a b 断片を含む二価の断片である F (a b ') 2 断片、(v i i) V H ドメインと V L ドメインとがペプチドリンカーによって連結されており、これにより、2 つのドメインが連係して抗原結合部位を形成することができる、一本鎖 F v 分子 (s c F v)、(v i i i) 二重特異性一本鎖 F v 二量体、並びに (i x) 遺伝子融合によって構築された多価又は多重特異性断片である「ダイアボディ」又は「トリアボディ」が挙げられるが、これらに限定されない。抗体断片は、改変されてもよい。例えば、V H と V L ドメインを連結するジスルフィド架橋の組み込みによって分子を安定化することができる。

40

【 0 1 5 3 】

本明細書に記載する抗体は、多重特異性抗体、とりわけ「ダイアボディ」と呼ばれることもある二重特異性抗体であってもよい。これらは、2 つ (又はそれ以上) の異なる抗原に結合する抗体である。ダイアボディは、当該技術分野において知られている様々な方法で製造することができ、例えば、化学的に又はハイブリッドハイブリドーマから作製することができる。抗体は、ミニボディであってもよい。ミニボディは、C H 3 ドメインに結合

50

した s c F v を含む、最小化した抗体様タンパク質である。場合により、s c F v を F c 領域に結合することができ、ヒンジ領域の一部又は全てを含めてもよい。

【0154】

抗体は、ドメイン抗体（単ドメイン抗体又はナノボディとも呼ばれる）であってもよい。これは、単一単量体の単一可変抗体ドメインを含有する抗体断片である。単ドメイン抗体の例には、ラクダ科動物に本来みられる V H H 断片及び軟骨魚類に本来みられる V N A R 断片が挙げられるが、これらに限定されない。単ドメイン抗体はまた、一般的な I g G 分子から二量体可変ドメインを単量体に分割することによっても生成することができる。

【0155】

抗体は、合成抗体（抗体模倣体とも呼ばれる）であってもよい。抗体模倣体には、A f f i b o d i e s、D A R P i n s、A n t i c a l i n s、A v i m e r s、V e r s a b o d i e s 及び D u o c a l i n s が挙げられるが、これらに限定されない。

【0156】

実施例により本発明を更に説明するが、これらの実施例は、当業者が本発明を実施するのに役立てるために提供することを意味するものであり、本発明の範囲を限定することを決して意図するものではない。

【実施例】

【0157】

（実施例）

実施例 1 - 血清中アムニオンレス濃度の増加と年齢との相関

発明者らは、ラット血清中タンパク質の加齢に伴う変化を特定するために S o m a l o g i c 技術を用いて、ラット血清中アムニオンレス濃度が年齢とともに有意に増加することを見出した（図 1）。

【0158】

競合結合免疫蛍光酵素アッセイを用いてラット血清中のコバラミン濃度を測定したところ、総ビタミン B 1 2 濃度が年齢とともに減少することが示された（図 2）。これは、血清中で測定されたアムニオンレス濃度の増加と一致した。ビタミン B 1 2 の摂取又は吸収が低下した際には、肝臓のビタミン B 1 2 貯蔵が身体その他の部分にビタミン B 1 2 を数週間提供することが知られているが、20ヶ月で生じるビタミン B 1 2 の循環濃度の減少の前に、アムニオンレス濃度が18月齢で増加したという事実は、アムニオンレスの変化が加齢性ビタミン B 1 2 欠乏症の原因となり得ることを示している。

【0159】

実施例 2 - 筋肉量減少に伴うアムニオンレス濃度の変化

ラット血清中のアムニオンレス及びビタミン B 1 2 の変化が18月齢以降に生じることが更に認められ、これは、高齢ラットの後肢筋肉にて観察された筋肉量の減少開始と一致する。これを腓腹筋について図 3 に示した。予備のインビトロ実験では、組織の V i t B 1 2 受容体 C D 3 2 0 が、増殖している前駆細胞上ではなく、分化した筋肉細胞上に発現することが実証された（図 4）。これは、ビタミン B 1 2 が骨格筋に入り、筋肉生理に影響し得ることを示唆している。

【0160】

本明細書にて言及する全ての公開物は、参考として本明細書に援用する。本発明に記載する方法及びシステムの様々な修正及び変更は、本発明の範囲及び主旨から逸脱することなく、当業者には明白であろう。本発明について特に好ましい実施形態に関連して記載してきたが、特許請求する本発明は、このような特定の実施形態に不当に限定されるものではないことを理解すべきである。事実、記載された本発明を実施するための様態の様々な修正は、分子生物学、細胞免疫学又は関連分野の当業者に明らかであり、以下の特許請求の範囲内にあることが意図される。

10

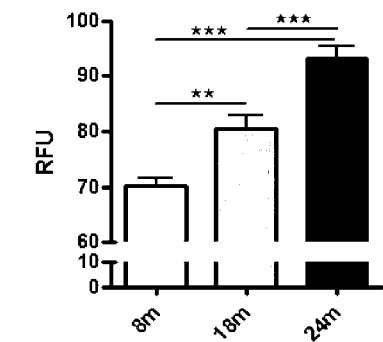
20

30

40

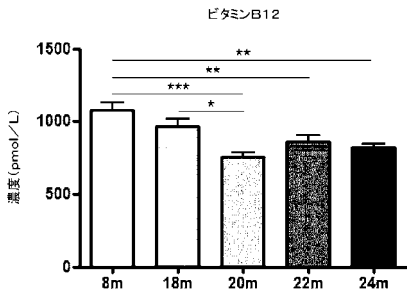
【 図 1 】

FIGURE 1



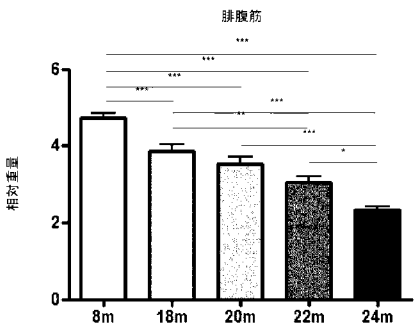
【 図 2 】

FIGURE 2



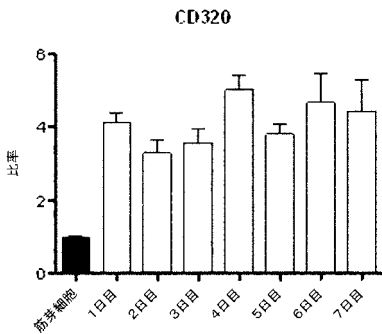
【 図 3 】

FIGURE 3



【 図 4 】

FIGURE 4



【 図 5 】

FIGURE 5

A Human amniotic nucleotide sequence - (SEQ ID NO. 1)

```

atggagctcc tggagcggg cccgctggg ctgacagct ggcagacgac caaggcgctc
120
tccaaactct ggtccccaac cagcagcttc gactctggg ccaactggag ccaagacggc
180
accacgggtg cggcgaggc cgttgagtc ctggcgagga agcagggttc agtctcgtgt
240
caaaagagtc agccgcttc agactatct ctacggctgt atagaggaat cctctcgtct
300
tcaggagcgt gactcgggt ctccagcgt gctccagac tgaactgtgt cggcgcgcaa
360
ctgacgctct tcccgactc tgaactgtc tcccgactg acccgacact gtagcgtctc
420
gggagagagg caccggctgt ctctctgtg gacggcgag gggcgctgt ccccgacgac
480
gaagctctct tcccgactg tgaactgtc cgttgaggc tggcgctgt cgtacgccc
540
gtgctgtccc gacgactct gctctggg cgaagcttc cggcgagga ggaactgtct
600
gtttctctgt gctccggg cggcgagga gctctccg gggcgctgt cgtacgctgt
660
ggcccgagag acggcgag cccgctggg tggctctgg gcaagcgga gggcgagcgt
720
tgactctggt cggcgctgt ccccgctgt cggcgctgt gcccgcagc cgtccgctac
780
ttgagcttc gggcgaggg ggaactgtg gactctgtg gacgctgtg gtgtcgac
840
caaggcgctg tactcgtct ggcgctgtg cggcgcgga taccgacac ctctcgtgt
900
ctgctcagtt acccgctgt ggaactgtg gttcgagag taccgactgt gttccgctgt
960
cgtggcgctg ataccgact cgaactgtg ctggcgaga atggcgcca gacggcgga
1020
ggcgcggtg tggcgctgt cctctgtg gactctgtg aaagcgga ggcctctgtg
1080
gtcccgagag gacactgtg ggaactgtg gacactgtg gggcgactg cggcgctgtg
1140
ctggcgagg gctagcgtg tggcgctgt cttggctgtg tggctctgt gttggcgga
1200
cgtgtgtgt gggcggtg gggcgctgt tggagaggt acaggggtg gggcgctgt
1260
ggagcgcttc tggctctgt ccaacgctgt tggagaggt cggcgctgt ggaactgtc
1320
ctggcgctg gttcgactgt gttcgagag gggcgctgt aaagcgga ccaagctac
1380
tctcgacac ctctctgtg cggcggtg gggcgctgt ga
1440

```

A human amniotic amino acid sequence - NP_112205 (SEQ ID NO. 2)

```

1  mgyllrvllw lqalcitqv sklvptntf dvaanqnr tpcagvafv padkxvllv
61  qeghavsdlm lpldgelvla agafgvsvd ghlidgag pavfdrsfv svdhphlrvs
121  dseapllvfr daervpordh dvffpsaf vlggpaag vrvrsisaf rlftrdella
181  vfiastgrl rihpggalv gpdadpavt ctyrnaqgt caallglr gtrcpaach
241  salrpogggc dlqagvllt tpaflidry xrlidmflg lpyhqlvga vkvprssrl
301  readtetgrv lvenptgtg aglaralla dvanegalg vleatnrgv shwysaaag
361  lagvvaavll lallvlvav pllrgrgrl wrzhaapa gplgrfnrv fvtvtaeelp
421  lprllslvkv aaadstshy vlnflgag aa

```

【 図 6 - 1 】

FIGURE 6

A Human Cubilin nucleotide sequence - (SEQ ID NO. 3)

```

atgataaaca tggcttacc tttctcttg agtttgctta cttattatct atttgctgaa
40
gtaaalggcg aggttgaga acttgagct cagagacaaa aagagacat caatctcca
120
cagactcgaa tggatcgaa gaaagaaat ttggtgttc ttacgggttc tgcataaac
180
atgaacttca agaacgact ctgggaaa atgaactaaa tctcgatgag tctcgatgag
240
tggttaactc aactcagaa aaaaagaaa gatattagag attcaaaaag gactgaact
300
ggctcgcttc aaaaatctc tagtcaac tatcgatla atccaaagt ggttgatct
360
gagaagaat tcaaacgtc gacgacat gttgacaaa agtttgagc gacgaatcc
420
tgcacaaag gtgacacgt cctcaacgtc catgattc ttcttgatc ctgaccca
480
cagtgaaag gtctctctg ctacgctat gttacagat gtagagttta ctgagaaaa
540
ccttgaggt gcaagagtg agggatgtg gttacaaa tggagattta cgttgctac
600
tgcacactg agacagag acccgaggt gactcaaat agagagctg tgaagggg
660
tcgtggagc gctgctaca tggactatg gagatttaa tggagagga agttgagag
720
ccaaagtaa gctgctgtc tgatctggg tggatgttt caacaaag ccttgctgc
780
acgtgagaa gaaagagtg aggtctcgg ccgggacct gttcaaatc tggagaggt
840
tccaacatc aagctcttt ctactggg gctgtccaa caggctgga aggaagaa
900
tatatttag agatataaa tgaatgag ataaataag cggatctgtc ttgactgca
960
ccgttgatg gtgtgaaac acttgaggt tccaagct aggtctgtc accaggtac
1020
caggttgagc gaagagtg cacaacca gacatctgt cagtctaat tggagctgt
1080
cacaagag cctcaatc ctaaatct gttctaat cctcgcac gttctcgg
1140
ggtatactg gaagagttc tgggcaaat ggtgtgtgt agtccgtaa tatttgctc
1200
agctaacct gttcaaatg aaatgact gacatctgt cagtctaat ttgtaagt
1260
gctcaggtt gcaacggtt caactgaa gaaaacatc atgagttt gacgaacc
1320
tgttgagag gagaactgt tgttgatg gttgtctct tcaagtgtg atgcaacgt
1380
ctctgagct aggtctctg tcaagttct cagaggtt gtgaagct cctcagaa
1440
ataaagtaa gttcaact caggagcgt gatgtgtt agttctga ttttaactg
1500
ctctgtgta taaaagta aagtgaaa gctctgga tcaattctc tttctgtg
1560
tgaactca tggagactg tccacagg tttctcgg tttatgtgt agttctct
1620
tcgtcttc aacttgag attttgtg tccagctcc ctaagact cctcagact
1680
gaaagcttc tcaatttc tctattct gaaattaa gaaagggg aggtcttaa
1740
gtgaagtg aaacagag accagagt ggaattac tgaactgt tgaactgt
1800
attaagctc agggactc tggaaact ccccgaaa gaaatgtg cgtgattt
1860
gtaactgt ctaactct gttacatt actttgtt actttgct cggacact
1920
gatgtgca acaaaatta cttcgagt accaggtt cttctgaa cgtcgaact
1980
cttggaat tctgacaa tttctgtc ccaagctcc ctaagact cctcagact
2040
agattcaat tcaatgag cttcgagt agtgacag gttctcaat cactcaata
2100
actcaact cgaattgt accagact accagact accagact accagact
2160
tctgtgagt tctgtggtc tttcaact accagact ggtctaat gtagagac
2220
cccagagag acaataata aatcaact accagact agtgaatg ccaagatg
2280
agttcaata atcaatgt agttgagt gttgaact cactgaaa agttctgtg
2340
accgaaa tctcactc actcaact actcaact cctcgagc gttcaata
2400
gatctgtg tgaagagc tagtctga gctgttat aagtctgt cggagtaa
2460
tcaagag agagagat cgtctgtt tttcttca actgtctc tggagaaa
2520
acgttgat gttacata caggcgaa agttctca tttctctc ctactctc
2580
ttgaaact gaaactgt cactgtga acagattg atgaactgt tagactgt
2640
atttggtt cttctgaaa taaaagat tgggttag ctaactctc atttaata
2700
tctgtgta atttctta gttcaact gttcaact gttcaact gttcaact
2760
tctagctc agttgagc tggagatt gactgtga aaatttca agaatctca
2820
ggagactc agactgtg cttcaaat cttcaact agttatga cttactgtg
2880
catatag tcaaatga atttctta gttcaact gttcaact gttcaact
2940
tctatgta agttgagc gactactg gaagtgtg accagact tgaactct
3000
tttgagat acttgagag gttgagag cttctgaa cagagctg laactgtg
3060
agttggtt agttgagc gttgagag cttctgaa cagagctg laactgtg
3120
gaaactgt cagagagc agttgagc gttctgaa cagagctg laactgtg
3180
tctcaact tctcaact tctcaact agttgagt gactgtgt gactgtgt
3240
agttgagt agttgagt gttgagag cttctgaa cagagctg laactgtg
3300
actatga cagactgt gaaactga gttgagc gttctgaa cagagctg
3360
gaaactgt agttgagc tctcaact cttcaact cttcaact cttcaact
3420
tcaactga agttgagc laactgaa agttgagc gttctgaa cagagctg
3480
tcaactga agttgagc laactgaa agttgagc gttctgaa cagagctg
3540
tcaactga agttgagc laactgaa agttgagc gttctgaa cagagctg
3600

```

【 図 6 - 2 】

```

agcgatttg aactggaat caaagactt cacttgagg atcctcaaa ctgacttta
3660
gatactcgt ctgactgag tggcgagc agaacatc acgctgaa tgaactgtt
3720
gggtatgag aaccctct tactgtct attgagaaa gactgata cactgata
3780
acagagag gtgagagag agtgccttc aggttgat accgagag agtggaaat
3840
gtgtatag tcaatcaac ctatgctgt ctgagagta taggtatct gactcttat
3900
ctgacaaa agtttgagc ctgacatc cgtgacaa cggacacaa gttgactat
3960
acattttg cacttgat gaaacacaa aaagactg ccaagatta ttgagctc
4020
tatgatgac caggagat ggaagctat ttgatgat accgctccc tcaaggagt
4080
actaaagt caagctgta agtgctgt ctacagat ggttggcg cgtgagaaa
4140
gattctgag tgggtgtt ttttctgt ttgttgag agttctgt gctcgagc
4200
tcttgagc gcccgggt ctccaagc tatccaaa aaagagtg tatcgttat
4260
attagagtg acccgagtg tagactgag cttcaactc agactgta ttgatgat
4320
catcaagt gaaactgt ttgttgag actatgag gctcgatt ccaactct
4380
agaatgccc aactgtgac ccaagata cttgagag cactgagct ctccagact
4440
gaaatgag tagaatgt attcaagc gacttgca taagagga agctctaat
4500
gctctgag agaatgct tgaatgtt gttgagtt tccagctg cagtgagag
4560
attactct caaattcac cactcttat agggacaaa cagtgtgt ttgcttat
4620
cggttgagc gaaactgt ttgtctgt aactcaat aggtctgt tgaacaaa
4680
gactctgt tatagagc agtgcctc actcaaaa tggcgctg tgcagagag
4740
tggagagtg agagctgt taccactc gttctctcg gaaagcgt ctcttgga
4800
tctgaagtg cctctctcg aaagagag gctctctg ccaactga gaagctgt
4860
ggagcgaa tctcaact cttactgt agttctct cccagctgt cctcgcaa
4920
tctcaaaa atcgagct cagctgtg attcaagc aactctat aactctat
4980
accctctt ttaacctt tgaactga aaagcaca cgttgagc tgaacttga
5040
gaaatttg atcgagag ccaagagc cctctctcg gctgtgat tgcagccc
5100
agcctctc ctacacat cttaagag gctcgagc tgaattgt ctgactct
5160
agaatgag ctggaggt caaacagc gtaacagc cagttgtg ttgagtgga
5220
agttctac tggtagag catctaac agcctgtg acccgagc ttaacctct
5280
atcgagat gttctgag cttcgagct tccctctg acccgctca gttgcttt
5340
atacttcc acttgagag ctacagag tgaacagag atttgaga gactcgtaa
5400
gaaatgag cggctcaat gttgagag tactgtga actctctc tctcaatt
5460
tctctgag tagactat cttgaggt aaatttat cagtggtt tggagctt
5520
accggttcc atgagact tatgagat attcaact caaattgt ggaactct
5580
ggaagagtg cttctctt ctgctgag aaactcaac aaactcaac ttaacatg
5640
acgtcaatg taaatgac taaatgac atgagagc tcttgagc gacatgaa
5700
gaaatcaaa actgattta tgaactata agatttat aggtctat ctactccc
5760
cgtcaatt gactctag tggtaagg actgaact taaagctat tgaactct
5820
tgaactgt agctctat ctactctg ctactctg ctactctg tgggtgtg
5880
tctctgag cggagagtg accgtgtt cttctctc cgggtctg tgaactgt
6000
aplaalag ttgactgt gttgctac caggtctcg actctagc gaaactca
6060
attctctt tgaactgt actcaagc agctgctg actgaact gttgagag
6120
gagagata ataatgtg ccaagact cagttctt gttgagag gatctgtg
6180
ccactcgt ctactgag gaaagttg atctctgt cttcgagc cagttgaa
6240
agggaggt ctactgag ctctcaag agttgtgt gatttgag tgcagaga
6300
gactctgag cgtccaaa gatccagag actcaaac caactcaac ctgttgtt
6360
cactctctg tcaagagtg ctcaactt gttctcat tgaacagc tttcgatt
6420
caaaagag attctctt caacaggt gattctgt tgaagaa tttctgat
6480
attctgtc caactctg acccgctga gaaatgtg attttgtt cagttcgt
6540
tcaactct tgtctcat ggtatcaa agttgttc agttatit tgaactgt
6600
atctctct tgaactgt actcaagc agctgctg actgaact gttgagag
6660
gagagata ataatgtg ccaagact cagttctt gttgagag gatctgtg
6720
ctactctg gaaactgt cctgaggt ctgagagc caactctgt cgtgagag
6780
actctgag actctgtg ggtcagtt gtaacagc gttctgtg tgcctgag
7000
tgaactgt gattgagc agttgagc agttgagc gttctgtg ggtctgtg
7160
gaaatctt cttctgag actcaagc aaactctg ttaactct gaggctgtg
7220
agactctg cttctgag actcaagc aaactctg ttaactct gaggctgtg
7280
tgaactgt gattgagc agttgagc agttgagc gttctgtg ggtctgtg
7340
gaaatctt cttctgag actcaagc aaactctg ttaactct gaggctgtg
7400
agactctg cttctgag actcaagc aaactctg ttaactct gaggctgtg
7460
cctgagct gattgagc agttgagc agttgagc gttctgtg ggtctgtg
7520
cctgagct gattgagc agttgagc agttgagc gttctgtg ggtctgtg
7580
cctgagct gattgagc agttgagc agttgagc gttctgtg ggtctgtg
7640
cctgagct gattgagc agttgagc agttgagc gttctgtg ggtctgtg
7700
cctgagct gattgagc agttgagc agttgagc gttctgtg ggtctgtg
7760
cctgagct gattgagc agttgagc agttgagc gttctgtg ggtctgtg
7820
cctgagct gattgagc agttgagc agttgagc gttctgtg ggtctgtg
7880
cctgagct gattgagc agttgagc agttgagc gttctgtg ggtctgtg
7940
cctgagct gattgagc agttgagc agttgagc gttctgtg ggtctgtg
8000

```

【 図 6 - 3 】

```

tctataact cagtgaga tgaactgt gttggtct tctcaaat tctcaagga
7740
aatctact ctctgagc tgaagagc agaatatt caagaact gaaagctga
7800
tgaactca gaaactca tgaagagc tctcaact cactcaact tagagattt
7860
tactcaact gaaactca tgaagagc tctcaact cactcaact tagagattt
7920
gagtgagc tgaagagc tgaagagc tgaagagc tgaagagc tgaagagc
7980
ctactctc actctctc actctctc actctctc actctctc actctctc
8040
cactctc actctctc actctctc actctctc actctctc actctctc
8100
cactctc actctctc actctctc actctctc actctctc actctctc
8160
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
8220
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
8280
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
8340
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
8400
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
8460
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
8520
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
8580
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
8640
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
8700
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
8760
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
8820
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
8880
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
8940
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
9000
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
9060
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
9120
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
9180
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
9240
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
9300
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
9360
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
9420
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
9480
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
9540
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
9600
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
9660
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
9720
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
9780
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
9840
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
9900
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
9960
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
10020
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
10080
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
10140
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
10200
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
10260
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
10320
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
10380
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
10440
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
10500
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
10560
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
10620
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
10680
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
10740
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
10800
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
10860
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
10920
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
10980
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
11040
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
11100
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
11160
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
11220
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
11280
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
11340
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
11400
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
11460
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
11520
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
11580
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
11640
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
11700
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
11760
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
11820
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
11880
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
11940
gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca gaaactca
12000

```

【図 6 - 4】

A human cubilin amino acid sequence - NP_001072 (SEQ ID NO. 4)

```

1  mnnmlpflw  elltlllifae  vngeagelel  grqkrslnlq  qprmatern  lvfltgsagn
61  iefrtgslgk  iklnedlase  clhgiqknke  dielkgsal  glpniessai  yqlnslkldl
121  erkfgqigqt  vdkkvcssnp  cngqgtclnl  hdaiffciopp  qwkqplcsad  vneoeiysgt
181  plscnqsgic  vntngayech  cpgetyypac  askyddcsag  avacvhaic  edlnreagae
241  pkyscvdag  wmfcpnsac  tididesatq  ppgcstlvqc  fntagsfygc  aqptqwgng
301  yicedinece  innqccavap  pvecvntps  shocqcpay  qgdgrvtll  dicavsnagc
361  hpdascsstl  gslptclp  gytngyypn  govqlsnicl  shpolngqoi  dtvsgyfoke
421  dsawtgvnct  enlnectlsp  clnqgtcvdq  vdsfscetr  lwtgalcqv  qvcpesiasg
481  ingstfyrsp  dwgyvdmnc  fwlktmngk  vlritfffr  lemdnople  flgrygdats
541  safqigrfgc  slphellase  dnalyfhly  ehlnrgift  vzwetqpec  ggiltgpyys
601  ikespypgny  ppgrdcvwiv  vtspdllvtf  tfgtislehh  ddnkdylei  rdgplygqbl
661  lqfictfsv  pqlgtcpsfa  rihfhsdsqi  sdagthily  tpsdlicqg  nycdpegelf
721  lpelegfth  trqcyvmkg  papeqigif  cbvelqcds  ssqgytevr  peltlgvqg
781  ngtshiksi  tswvwrftk  dsvekaskr  avyqvacgde  ltqegvirep  ffpnvypger
841  torwtihqg  qvillnftv  feiqssahoe  dyveigesse  llsqpenkky  cgdtdpsfit
901  svynflvytf  vkssstenhg  imakfsaedl  acqelitest  gtisqspqpn  vyphgincw
961  hlvqgmhli  hlnfeefile  fhynctndyl  evyddsots  lqrycgksip  paltsagml
1021  mlvfvtdsdl  ayeqfliny  aisaataclq  dyddlgtft  spnfpnypn  nweciyriv
1081  rtgqlavnh  tnfeleaaig  nytdflei  r  dggyekspil  gifygnlpp  tiashankiv
1141  lkfkedqidt  zsgfaaydg  sstqcggnlt  tsagtfiapn  ypmypyhase  cywlksahg
1201  safelrkfah  hlnhpncti  dyfayvqgs  snahlitql  gdekplirs  agdmfikir
1261  tdeagqgrgf  kaeyzqten  vvivnqtvg  lesaigypny  senhcnwti  saictqtny
1321  tflafdiehh  incstydle  ydgprmgry  cgvdlppgs  tssaklqvl  ltdqvgrrk
1381  gfqmqwfvyy  cggelsgat  sfesppfpr  ypnkociay  iztdpgsaiq  lthdfdvry
1441  hrcnfdvle  lyppgdthp  rlasictqgs  penpmqvst  qnelairft  dialngqfn
1501  aawqavqgc  sgifapase  ihapypapy  smtdcswi  rvdnbnvl  nfdldlepe
1561  dscimaydgl  sstnsrlart  cgreqlanp  vssgnslfr  fqsqpsrqr  gfragfrqac
1621  qghltesfd  lvssrfrpan  ypnqncswi  iqagplnhi  tlfthfele  rztccardfv
1681  eildgheda  plrgrycqd  mphiitfas  alclrfvade  slsagvfht  vtaevacqg
1741  tfmaegifn  spqygdpy  vncvsnv  spgnrlqsf  lsfqledsg  cardfevre
1801  gnatghlvgr  ycnsgfpy  ssvghltlv  rfiadgsqg  tqfqtfmki  fgndnvgth
1861  gkvaspfwe  nyphsnysq  tvvnashvv  hgrilemdie  eiqncyydkl  riydpslha
1921  rliqaycgc  tesfstqna  lthfyedes  isqyrllew  fadvdpdgl  ptlpgagcy
1981  flrtgdapgr  lfspgppdy  srwvdcwli  apadtvnl  ilslidshar  coaydelvir
2041  dgdnliaqql  avlqgreip  pirstqymf  irftdsdsv  ragfnasfhk  scqyihadr
2101  giitapkye  typenlncw  hlvqsglti  avhfegfqi  pngdsscnag  dylvlnrpd
2161  icspplpgpp  gnghfcgsha  sstlftsdq  mfvqfisdh  neqgyfkiky  eakalacqgn
2221  vyihdasag  vytpnphhn  yphladcwi  laaspetrig  lqfcdfoie  vtgnctnyl
2281  elrdqvdsla  dilskfrcgs  lpsqswsge  vnylirzdn  spthvqfak  ysaiaoggrv
2341  pggsgvvesi  ghptlpyrd  lfcewhlqgl  shgyltisfe  dflnqssgc  ekdfveiwdn
2401  htagnilrgy  cgnltipsid  tsntavrvf  vtdgsvtas  fclrfesme  ecgdligsf
2461  stflepypn  ppharicsw  zltapegr  lmfnnlila  thpscmehv  ivngirns
2521  pnelkicav  vnselkss  ntksvliftd  gsrpygfta  svtsesdavo  gplnprpeg
2581  nftspgydgv  rnyznlnce  wtslnpagn  ssisihfed  yleshqdqf  dvlefrvgda
2641  dgplmwrclg  pskptlpvi  pysqvvihf  tnervehigf  haksyftdog  qiaqdsqvi
2701  tsnypnayd  slthcssile  apqhtlilt  feddieph  tcawdevtr  ngsspespil
2761  gnycpnagr  litgsendlv  vfnadslq  aggyatwt  qlcgcgpfh  sdngitaph
2821  wpcnfpnsr  cswaithka  khleisfdn  flispdgdy  qnsfvkvag  teevdkaila
2881  tqcgvavpp  vitpantfta  vfqaqapag  gfasfvzrc  gsnftqpsy  iispnypkay
2941  dnmnctyvi  eanplsvll  tfvathlear  savtscvnd  ghliirgyav  mspfatvcg
3001  dwppatila  qvvlntfs  eqitdgfkh  syriiscgy  nfnsglits  payspdygn
3061  dabclytiv  sddkvielf  sdfvvpats  cahdyalaiy  gantsdplg  kfcsakrppn
3121  vksennsmil  vfktdsfqta  kqwknsfrq  lqpcqgqgy  lcgantfas  pdsdngnyd
3181  knlncwiiil  apnvihilt  fntaleas  trqrclydy  klydgdsena  nlaqfcoqst
3241  vspafiasg  fltvgfisd  tlareqfmat  ytlndmpcy  tynaktwpg  lsspsdsbd
3301  vpfactwvi  dapphqvki  twalqltaq  dctqnylql  dappqhqnr  qfcoqrnasa
3361  vpfyysmat  anvifksqv  nrsarmfty  qiadcnrdy  kafqnrlsq  wpdnydnkd

```

【図 6 - 5】

```

3421  ctvtltapgn  htisalfhsa  gienavecn  dflervngn  snspilgkyc  gtllpngvfa
3481  qnnelylrik  sdvtsdgy  eifvtsasp  cgtllydgr  sftspgpyt  ypnntycewv
3541  lvapagrlvt  infyisidd  pgdcvnylt  lydgpnasp  ssgpycgdt  siapfvassa
3601  qvfikfhady  arpsafrlt  wds

```

【配列表】

2017537303000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/070916

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K31/714 G01N33/53 G01N33/82 A61P3/02
ADD.

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)

A61K 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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	H W Baik ET AL: "8:28 Annual Reviews AR085-16 VITAMIN B 12 DEFICIENCY IN THE ELDERLY 18:28 Annual Reviews AR085-16 358 CONTENTS", Annu. Rev. Nutr, 1 January 1999 (1999-01-01), XP055167690, Retrieved from the Internet: URL:http://www.annualreviews.org/doi/pdf/1 0.1146/annurev.nutr.19.1.357 [retrieved on 2015-02-05] abstract	1-27
Y	----- -/--	30

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family 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 application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the 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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 November 2015

Date of mailing of the international search report

17/12/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Wagner, René

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/070916

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	F. NAMOUR ET AL: "Luminal expression of cubilin is impaired in Imerslund-Grasbeck syndrome with compound AMN mutations in intron 3 and exon 7", HAEMATOLOGICA, vol. 96, no. 11, 12 July 2011 (2011-07-12), pages 1715-1719, XP055167704, ISSN: 0390-6078, DOI: 10.3324/haematol.2011.043984 the whole document -----	1-30
X	N.N.: "SEC295Hu 96 Tests Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Amnionless (AMN) Organism Species: Homo sapiens (Human) Instruction manual FOR IN VITRO AND RESEARCH USE ONLY NOT FOR USE IN CLINICAL DIAGNOSTIC PROCEDURES", 1 July 2013 (2013-07-01), XP055167830, Retrieved from the Internet: URL:http://www.uscnk.us/manual/ELISA-Kit-for-Amnionless--AMN--E92295Hu.pdf [retrieved on 2015-02-06] page 1 -----	28,29
Y		30
A	MAJID MORIDANI ET AL: "Laboratory Investigation of Vitamin B₁₂ Deficiency", LABORATORY MEDICINE, vol. 37, no. 3, 15 February 2006 (2006-02-15), pages 166-174, XP055171281, ISSN: 0007-5027, DOI: 10.1309/CVHKLE2R4W68K2NQ -----	1-30

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I	テーマコード (参考)	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	4 H 0 4 5
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	19/10	(2006.01)	A 6 1 P	19/10	
A 6 1 K	31/714	(2006.01)	A 6 1 K	31/714	
A 6 1 K	35/745	(2015.01)	A 6 1 K	35/745	
A 6 1 K	35/747	(2015.01)	A 6 1 K	35/747	
A 6 1 K	35/744	(2015.01)	A 6 1 K	35/744	
A 6 1 K	35/741	(2015.01)	A 6 1 K	35/741	
C 0 7 K	16/44	(2006.01)	C 0 7 K	16/44	
A 2 3 L	33/15	(2016.01)	A 2 3 L	33/15	
A 2 3 L	33/135	(2016.01)	A 2 3 L	33/135	
C 0 7 D	487/22	(2006.01)	C 0 7 D	487/22	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 フェージュ, ジェローム
スイス, シーエイチ - 1 0 2 3 クリシエ, リュー デ アルプ 2 1

(72)発明者 パンネレック, アリス
スイス, シーエイチ - 1 0 0 3 ローザンヌ, リュー デ ランガールリー 4

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA40 CA26 CB03 DA36 FB03
4B018 MD23 MD85 ME14 MF13
4C050 PA03 PA04
4C086 AA01 AA02 DA39 MA01 MA04 MA52 MA55 NA14 ZA15 ZA36
ZA55 ZA68 ZA97 ZC35 ZC41
4C087 AA01 AA02 BC12 BC55 BC56 BC59 BC61 NA14 ZA15 ZA36
ZA55 ZA68 ZA97 ZC35 ZC41
4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 EA50 FA71

专利名称(译)	判断维生素B 12摄入量的方法		
公开(公告)号	JP2017537303A	公开(公告)日	2017-12-14
申请号	JP2017511906	申请日	2015-09-14
[标]申请(专利权)人(译)	雀巢产品技术援助有限公司		
申请(专利权)人(译)	Nesuteku兴业ANONYME		
当前申请(专利权)人(译)	Nesuteku兴业ANONYME		
[标]发明人	フェージュジェローム パンネレックアリス		
发明人	フェージュ, ジェローム パンネレック, アリス		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 A61P43/00 A61P7/06 A61P1/04 A61P3/10 A61P9/00 A61P25/28 A61P19/10 A61K31/714 A61K35/745 A61K35/747 A61K35/744 A61K35/741 C07K16/44 A23L33/15 A23L33/135 C07D487/22		
CPC分类号	A61K31/714 G01N33/6893 G01N33/82 G01N2800/06 A61P1/04 A61P3/02 A61P3/10 A61P7/06 A61P9 /00 A61P19/10 A61P25/28 A61P43/00 A23L33/15 A23L33/30 A23V2002/00 A61K9/0053 A61K35/744 A61K35/745 A61K35/747 A61K36/064 A61K2035/11		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.ZNA.D A61P43/00.111 A61P7/06 A61P1/04 A61P3/10 A61P9/00 A61P25/28 A61P19/10 A61K31/714 A61K35/745 A61K35/747 A61K35/744 A61K35/741 C07K16/44 A23L33/15 A23L33/135 C07D487/22		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/DA36 2G045/FB03 4B018/MD23 4B018 /MD85 4B018/ME14 4B018/MF13 4C050/PA03 4C050/PA04 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/DA39 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/MA52 4C086/MA55 4C086/NA14 4C086/ZA15 4C086/ZA36 4C086 /ZA55 4C086/ZA68 4C086/ZA97 4C086/ZC35 4C086/ZC41 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC12 4C087/BC55 4C087/BC56 4C087/BC59 4C087/BC61 4C087/NA14 4C087/ZA15 4C087/ZA36 4C087 /ZA55 4C087/ZA68 4C087/ZA97 4C087/ZC35 4C087/ZC41 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA71		
代理人(译)	长谷川良树 池田 成人 小泉纯酒卷		
优先权	2014184779 2014-09-15 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

用于确定受试者体内维生素B12的肠摄取水平的方法可以包括：确定在从受试者中分离的样品中的古巴复合物或其组分的水平；并将古巴复合物或其组分的水平与参考水平进行比较；其中所述古巴复合物或其组分的水平与所述参考水平相比指示了维生素B12在肠中的摄取水平。

(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/68 (2006.01)	G O 1 N 33/68	2 G O 4 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	Z N A D 4 B O 1 8
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	I 1 1 4 C O 5 0
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	4 C O 8 6
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	4 C O 8 7

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-511906 (P2017-511906)	(71) 出願人	599132904
(86) (22) 出願日	平成27年9月14日 (2015. 9. 14)		ネステク ソシエテ アノニム
(85) 翻訳文提出日	平成29年2月28日 (2017. 2. 28)		スイス国、ブベイ、アブニユー ネスレ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/070916		5 5
(87) 国際公開番号	W02016/041886	(74) 代理人	100088155
(87) 国際公開日	平成28年3月24日 (2016. 3. 24)		弁理士 長谷川 芳樹
(31) 優先権主張番号	14184779. 8	(74) 代理人	100107456
(32) 優先日	平成26年9月15日 (2014. 9. 15)		弁理士 池田 成人
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100162352
			弁理士 濱巻 順一郎
		(74) 代理人	100140453
			弁理士 戸津 洋介
		(74) 代理人	100140888
			弁理士 渡辺 欣乃
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ビタミンB 1 2 摂取を判定するための方法