



(19)  
 Bundesrepublik Deutschland  
 Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 103 11 089 A1 2004.09.23

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 103 11 089.5  
 (22) Anmeldetag: 13.03.2003  
 (43) Offenlegungstag: 23.09.2004

(51) Int Cl.7: G01N 33/50

(71) Anmelder:  
**Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, DE**

(72) Erfinder:  
**Lehmann, Paul, Dr., 67549 Worms, DE; Röddiger, Ralf, 69517 Gorchheimertal, DE; Klima, Horst, Dr., 82377 Penzberg, DE**

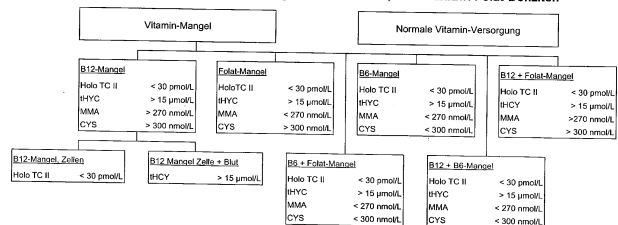
(74) Vertreter:  
**Weickmann & Weickmann, 81679 München**

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Differenzialdiagnostik und Monitoring von Vitamin B12-, Vitamin B6- und Folsäure-Störungen mittels vier unabhängiger Messgrößen**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Vitamin B12-, B6- oder/und Folsäure-Störungen und insbesondere die Differenzialdiagnostik von Vitamin B12-, Vitamin B6- oder/und Folsäure Störungen mittels dreier unabhängiger Messgrößen. Die Differenzialdiagnostik kann zum Nachweis eines Vitamin B12-, Vitamin B6- oder/und Folsäure-Mangels und der Empfehlung der benötigten Therapie sowie zum Monitoring des Therapieverlaufs und des Therapieerfolgs eingesetzt werden.

Differenzialdiagnostik und Monitoring von Vitamin B12, B6- und/oder Folat-Defiziten



## Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Vitamin B12-, Vitamin B6- und/oder Folsäure-Störungen und insbesondere die Differenzialdiagnostik von Vitamin B12-, Vitamin B6- und/oder Folsäure-Störungen mittels drei bzw. vier unabhängiger Messgrößen. Die Differenzialdiagnostik kann zum Nachweis eines Vitamin B12-, Vitamin B6- und/oder Folsäure-Mangels und der Empfehlung der benötigten Therapie sowie zum Monitoring des Therapieverlaufs und des Therapieerfolgs eingesetzt werden.

[0002] Die Vitamine B12, B6 und Folsäure besitzen im menschlichen Organismus als Vorläufersubstanzen zur Bildung von Coenzymen eine große Bedeutung. Sowohl B12- als auch Folsäuremangel kommen sehr häufig vor und können verschiedene Mangelercheinungen bzw. Erkrankungen verursachen und auch einen Risikofaktor für eine Vielzahl von Erkrankungen darstellen. So sind beispielsweise nicht entzündliche, chronische Erkrankungen oft durch einen Mangel an B-Vitaminen (B12, B6, Folsäure) gekennzeichnet.

[0003] Die Aufnahme von Vitamin B12 im menschlichen Organismus erfolgt in der Magenschleimhaut durch Bindung an den sogenannten intrinsic factor, der das Vitamin B12 spezifisch bindet. In gebundener Form gelangt Vitamin B12 ins Ileum, wo es durch Endocytose ins Epitel aufgenommen wird. Im Inneren der Mucosazellen des Ileums wird Vitamin B12 vom intrinsic factor abgespalten und an Transcobalamin II gebunden. Der Komplex aus Transcobalamin II und Vitamin B12 (Holotranscobalamin II, Holo-TC II) verlässt die Zelle und kann im Organismus verteilt werden. Vitamin B12 wird in großem Umfang in der Leber gespeichert (ca. 4 bis 5 g).

[0004] Als Coenzym ist Vitamin B12, zum Teil unter Beteiligung der Folsäure, am Fett-, Kohlenhydrat- und Nucleinsäurestoffwechsel wesentlich beteiligt. Vitamin B12 ist unter anderem unentbehrlich für eine normale Erythropoese und Nervenzellfunktion. Der Stoffwechsel von Vitamin B12 ist eng verbunden mit dem der Folsäure. Beide Vitamine sind in ihrer aktiven Form als Coenzyme in den C1-Stoffwechsel involviert.

[0005] Tetrahydrofolsäure, die als Coenzym wirksame Form der Folsäure, spielt bei der Übertragung von C1-Einheiten eine große Rolle und beeinflusst somit beispielsweise die Nucleinsäuresynthese, den Aminosäurestoffwechsel und die Blutzellbildung.

[0006] Ein Vitamin B12-Mangel kann beispielsweise durch eine Mangelernährung, durch Malabsorption oder durch Defekte bei den Aufnahme- bzw. Transportmechanismen für Vitamin B12 verursacht werden. Allerdings ist erst nach mehreren Jahren mit ernsthaften Mangelercheinungen zu rechnen, da der Körper über eine sehr hohe Speicherkapazität für Vitamin B12 verfügt.

## Stand der Technik

[0007] Nach Herbert (Am. J. Clin. Nutr. 1994; 59 (suppl.): 1213S-22S) lässt sich der Übergang vom normalen Vitamin B12-Status bis zum Vitamin B12-Mangel in vier Stadien unterteilen. Das erste Stadium ist meist durch eine erniedrigte Vitamin B12-Konzentration im Serum gekennzeichnet. Im zweiten Stadium ist bereits eine Depletion mit einer beginnenden Reduzierung der Vitamin B12-Zellspeicher erkennbar, und im dritten Stadium liegt bereits ein biochemischer Vitamin B12-Mangel mit gravierenden Funktionsstörungen wie beispielsweise einer mangelhaften Erythropoese vor. Das vierte Stadium stellt einen klinisch manifesten Vitamin B12-Mangel dar, in dem Anämie und Nervenschädigungen vorliegen können. Je nach Dauer des Mangelzustandes können Schädigungen auftreten, die nicht mehr reversibel sind.

[0008] Ein Vitamin B12-Mangel führt beim Menschen zur perniziösen Anämie, einer Form der megaloblastären Anämie. Weiterhin kann es zur Bildung einer funikulären Myelose, einer schweren Degeneration bestimmter Rückenmarksbezirke kommen. Die hämatologischen Symptome eines Vitamin B12-Mangels gleichen dem eines Folsäuremangels.

[0009] Der Mangel an Folsäure ist, nach dem Mangel an Vitamin B12, der am meisten verbreitete Vitaminmangel. Ursachen für einen Folsäuremangel können beispielsweise eine Mangelernährung, eine Malabsorption, ein erhöhter Bedarf z.B. während einer Schwangerschaft oder Laktation, eine erhöhte Ausscheidung, z.B. während einer Langzeithämodialyse oder Medikamenten-induzierte Störungen sein.

[0010] Eine Schlüsselrolle spielt Tetrahydrofolsäure beispielsweise als Coenzym in der Thymidylatsynthese. Da hierbei auch Vitamin B12 als Coenzym beteiligt ist, kann auch in Folge eines Vitamin B12-Mangels ein funktioneller Folsäuremangel auftreten.

[0011] Im menschlichen Körper sind die Möglichkeiten für Speicherung der Folsäure begrenzt. Die Folsäurespeicher der Leber reichen zur Aufrechterhaltung eines normalen Folsäurespiegels im Serum nur etwa für 3 bis 4 Wochen aus.

[0012] Ein Folsäuremangel führt bei Menschen zur megaloblastären Anämie. Durch die enge Verknüpfung des Folsäurestoffwechsels mit dem Vitamin B12-Stoffwechsel kann die Ursache der Anämie allerdings nicht nur im primären Folsäuremangel, sondern auch in einem durch einen Cobalaminmangel verursachten sekundären Folsäuremangel liegen. Weiterhin besteht bei einem Folsäuremangel während einer Schwangerschaft die Gefahr einer Fehlgeburt bzw. einer Missbildung des Embryos.

[0013] Weiterhin können sich als Folge eines Folsäuremangels Metaboliten des Folsäurestoffwechsels im Organismus akkumulieren. Beispielsweise reichert sich bei einem Folsäuremangel Homocystein im Organismus an, da es nicht zu Methionin methyliert werden kann. Folsäure kann somit als ein Indikator der Methylierung von Homocystein betrachtet werden. Auch bei einem Vitamin B12-Mangel ist die Methylierung von Homocystein zu Methionin eingeschränkt. In beiden Fällen erfolgt eine pathologische Anreicherung von Homocystein im Blut, es kommt zu einer Homocysteinämie. Eine Homocysteinämie stellt eine Prädisposition für verschiedene Erkrankungen dar. So werden beispielsweise arteriosklerotische cardiovaskuläre Erkrankungen, venöse Thrombosen, Schädigungen des Endothels, sowie ein erhöhtes Schlaganfallrisiko mit einer Homocysteinämie in Zusammenhang gebracht. Weiterhin stellt die Homocysteinämie bei Schwangeren einen Risikofaktor für Neuralrohrdefekte und Präeklampsien dar. Auch Störungen des Blutgerinnungssystems sowie die periphere arterielle Verschlusskrankheit werden durch eine Hyperhomocysteinämie begünstigt.

[0014] Homocystein kann auch durch einen Vitamin B6-abhängigen Stoffwechselweg zu Cystein abgebaut werden. Somit sind auch ausreichende Vitamin B6-Spiegel notwendig, um normale Homocysteinspiegel zu erhalten.

[0015] Vitamin B6 besitzt im Eiweißstoffwechsel eine wesentliche Bedeutung. Bei Mangelercheinungen kann es zu verschiedenen Gesundheitsstörungen kommen, beispielsweise zu Hautveränderungen und Störungen des Immun- und Nervensystems.

[0016] Eine Bestimmung des Vitamin B12-, Vitamin B6- bzw. Folsäurestatus erfolgt gegenwärtig, anhand verschiedener biochemischer Parameter. Vitamin B6 kann beispielsweise mittels enzymatischer Assays oder HPLC-Analysen bestimmt werden. Weit verbreitet ist auch die Bestimmung der Vitamin B12- bzw. Folsäure-Konzentration im Serum. Zur Untersuchung eines Folsäure bzw. Vitamin B12-Mangels kann auch eine Messung der Konzentration von Folsäure bzw. Vitamin B12 in den Erythrozyten durchgeführt werden. Allerdings sind diese Messungen in der Handhabung sehr aufwändig.

[0017] Eine weitere Möglichkeit ist die Bestimmung des Blutbildes bzw. ein Markausstrich. Da es aber sowohl bei Cobalamin- als auch bei Folsäuremangel zu einer megaloblastären Anämie kommt, sind Blutbild und Markausstrich bei einem vorliegenden Folsäuremangel oder Vitamin B12-Mangel nicht voneinander zu unterscheiden.

[0018] Im Stand der Technik wird zum Nachweis einer Vitamin B12-Resorptionsstörung und dem sich daraus ergebenden Vitamin B12-Mangels der sogenannte Schilling-Test beschrieben. Hierbei handelt es sich um einen Vitamin B12-Resorptionstest, bei dem die Ausscheidung von oral verabreichtem, radioaktiv markiertem Vitamin B12 im Urin ermittelt wird. Die Durchführung dieses Tests erfordert allerdings den Einsatz von Radioaktivität, der Test ist sehr aufwendig und die Ergebnisse sind oft unzuverlässig.

[0019] Ein weiterer biochemischer Parameter, der zur Bestimmung eines Vitamin B12-Mangels verwendet werden kann, ist die Konzentration von Methylmalonsäure (MMA), die bei einem Mangel an Vitamin B12, sowohl im Serum als auch im Urin ansteigt. Oft tritt schon in frühen Stadien eines Vitamin B12-Mangels eine Erhöhung der MMA-Konzentration auf, allerdings ist die Konzentration an MMA nicht nur mit einem Vitamin B12-Mangel korreliert, sondern kann auch andere Ursachen haben.

[0020] Ein weiterer Indikator für einen Vitamin B12-, B6- und/oder Folsäuremangel ist ein Anstieg der Homocysteinkonzentration im Serum. Da aber sowohl bei Vitamin B12-Mangel als auch bei Folsäuremangel eine Anreicherung von Homocystein im Organismus und somit eine Erhöhung der Serumkonzentration erfolgt, ist dieser Parameter alleine nicht ausreichend, um den vorliegenden Mangel zu spezifizieren.

[0021] Die enge physiologische Verknüpfung von Folsäure und Vitamin B12 sowie Vitamin B6 im Stoffwechsel und die sich daraus ergebenden ähnlichen Symptome bei einem Mangelzustand machen eine eindeutige klare Diagnose sehr schwer. Die aus dem Stand der Technik bekannten Tests zur Bestimmung des Vitamin B12- bzw. Folsäurestatus liefern oft unzuverlässige Ergebnisse und sind meist sehr aufwendig in der Durchführung.

#### Aufgabenstellung

[0022] Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es aus diesem Grund, ein einfaches Verfahren bereitzustellen, das eine zuverlässige Beurteilung des Vitaminstatus von Vitamin B12, Vitamin B6 oder/und Folsäure, insbesondere des intrazellulären Zustandes und zusätzlich eine Differenzierung zwischen einem Vitamin B12-Mangel und einem Folsäuremangel ermöglicht.

[0023] Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zum Nachweis von Vitamin B12-, Vitamin B6- oder/und Folsäurestörungen, umfassend die Bestimmung von

- (i) von Holotranscobalamin II (Holo TC II)
- (ii) von Homocystein (tHCY)
- (iii) von Methylmalonsäure (MMA) und gegebenenfalls
- (iv) von Cystathionin (CYS).

[0024] Die Erfindung betrifft somit die Differenzialdiagnostik von Vitamin B12-, Vitamin B6- oder/und Folsäurestörungen mittels drei bzw. vier unabhängiger Messgrößen. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht somit eine Bewertung des Gesamtzustands der Vitaminversorgung eines Organismus im Hinblick auf die Vitamine B12, B6 und Folsäure.

[0025] Die Messparameter Holotranscobalamin II, Homocystein, Methylmalonsäure und gegebenenfalls Cystathionin werden bevorzugt aus einer Probe bestimmt. Hierbei kann es sich um eine Probe eines Patienten handeln. Die Bestimmung der drei bzw. vier Messparameter kann aus gleichen oder verschiedenen Körperflüssigkeiten erfolgen, beispielsweise aus Blut, Blutfraktionen oder Urin. Bevorzugt erfolgt die Bestimmung aus Serum.

[0026] Der Begriff "Vitamin B12" wird hierin als synonyme Bezeichnung für Cobalamine verwendet und umfasst alle Cobalamine, die eine biologische Wirkung beim Menschen haben, beispielsweise Methylcobalamin oder 5'-Desoxyadenosyl-Cobalamin.

[0027] Der Begriff "Folsäure" wird hierin als eine Sammelbezeichnung für natürlich vorkommende oder synthetische Verbindungen verwendet, die einem Pteridinring, p-Aminobenzoesäure und ein oder mehrere Glutaminsäureresten umfassen. Auch biologisch aktive Formen dieser Verbindungen, wie beispielsweise die Tetrahydrofolsäure, werden vom Begriff "Folsäure" hierin umfasst.

[0028] Erfindungsgemäß wurde überraschend festgestellt, dass durch die Verknüpfung der drei bzw. vier unabhängigen Messgrößen eine schnelle und zuverlässige Aussage über den Vitamin B12-, Vitamin B6- oder/und Folsäurestatus beispielsweise von Patienten erhalten wird. Bevorzugt wird der intrazelluläre Vitamin B12-, Vitamin B6- oder/und Folsäurestatus bestimmt.

[0029] Im Stand der Technik erfolgte eine Bestimmung des Vitamin B12-, B6- bzw. Folsäuremangels meist aus Serum. Allerdings ist die Aussagekraft von Vitamin B12-Konzentrationen im Serum aufgrund einer mangelhaften Sensitivität und Spezifität begrenzt. Normale Serumwerte signalisieren nicht immer eine gute Vitamin B12-Versorgung, und umgekehrt zeigen niedrige Vitamin B12-Konzentrationen im Serum nicht immer einen Vitamin B12-Mangel an.

[0030] Die Folsäurekonzentration im Plasma gibt lediglich einen Hinweis auf die momentane Folsäurebilanz zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Die Folsäurekonzentration im Plasma gibt nicht den Zustand der Folsäurespeicher im Gewebe wieder, sondern unterliegt großen Schwankungen, bedingt durch die tägliche Folsäureaufnahme und zeitliche Veränderungen im Folsäurestoffwechsel.

[0031] Weder die Vitamin B12-Serumkonzentration noch die Folsäureserumkonzentration geben einen verlässlichen Hinweis auf den intrazellulären funktionellen Status dieser Vitamine. Der Status des Zell-Vitamin B12 bzw. der Zellfolsäure, der für eine Beurteilung eines Mangelzustandes essenziell ist, ist nicht notwendigerweise mit den entsprechenden Serumkonzentrationen korreliert. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht nun vorteilhafterweise eine Bestimmung des intrazellulären Vitamin B12, Vitamin B6- und/oder Folsäurezustandes.

[0032] Eine Bestimmung der Serumkonzentrationen von Vitamin B12, Vitamin B6 bzw. Folsäure ist zur Bestimmung des Vitamin B12-, Vitamin B6- und/oder Folsäurestatus gemäß der vorliegenden Erfindung nicht notwendigerweise erforderlich, kann aber optional erfolgen. Hierbei werden die Serumkonzentrationen zusätzlich bestimmt und als Kontrollwerte verwendet.

[0033] Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird eine frühe Diagnose eines Vitamin B6-, Folsäure- oder/und Vitamin B12-Mangels möglich, wobei beispielsweise die Serumkonzentrationen oder das Blutbild noch nicht auf einem Mangelzustand hinweisen. Eine derart frühe Diagnose eines Vitamin B12-Mangels kann beispielsweise deshalb von großer Bedeutung sein, weil ein Vitamin B12-Mangel neuropsychiatrische Erkrankungen verursachen kann, da die Vitamin B12-Speicher im Gehirn sehr klein und schnell erschöpft sind. Neuropsychiatrische Erkrankungen können bei früher Diagnose durch eine Vitamin B12-Supplementation rückgängig gemacht werden, wobei eine Applikation von etwa 1000 µg Vitamin B12/Tag denkbar ist.

[0034] Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt eine Klassifizierung von Vitamin B12-, Vitamin B6- oder/und Folsäurezuständen, insbesondere von Vitamin B12-, Vitamin B6- oder/und Folsäuremängeln. Durch die Verknüpfung der vier unabhängigen Parameter Holotranscobalamin II, Homocystein, Methylmalonsäure und gegebenenfalls Cystathionin ist durch das erfindungsgemäße Verfahren eine routinemäßige Differenzierung zwischen einem normalen Vitamin B12-, Vitamin B6- oder Folsäurestatus und einem Vitamin B12-, Vitamin B6- oder/und Folsäuremangel möglich.

[0035] Diese Differenzierung ist von großer Bedeutung, um eine Fehlbehandlung zu vermeiden. Wird beispielsweise ein Vitamin B12-Mangel mit einer Folsäuresupplementation behandelt, normalisiert sich zwar das Blutbild, der Vitamin B12-Mangel bleibt aber nach wie vor bestehen, wodurch die Gefahr von Folgeerkrankungen wie beispielsweise irreversiblen Nervendegenerationen ebenso bestehen bleibt.

[0036] In einer bevorzugten Ausführungsform wird der mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ermittelte Vitamin B12- und Folsäurezustand in eine der folgenden Gruppen klassifiziert:

- (a) Vitamin B12- und Folsäuremangel
- (b) Vitamin B12-Mangel

- (c) Folsäuremangel
- (d) kein Mangel und gegebenenfalls
- (e) Vitamin B12- oder Vitamin B6-Mangel
- (f) Vitamin B6- und Folsäuremangel oder
- (g) Vitamin B6-Mangel.

[0037] Die Klassifizierung erfolgt durch die Bestimmung der Messgrößen Nolo-transcobalamin II, Homocystein, Methylmalonsäure und gegebenenfalls Cystathionin.

[0038] Geeignete Referenzwerte der Messgröße Homocystein (tHcy) liegen beispielsweise im Bereich von etwa 3 bis 18 µmol/l, bevorzugt etwa 5 bis 15 µmol/l, bevorzugt < etwa 15 µmol/l, besonders bevorzugt < etwa 12 µmol/l, insbesondere etwa 10 µmol/l. Die Messgröße tHcy gibt einen Hinweis auf die Homocystein-Konzentration im Serum. Als Grenzwert kann bei der Messung jeder beliebige Wert innerhalb des Referenzbereichs verwendet werden, beispielsweise 12, 13, 14, 15, 16 oder 17 µmol/l. Bevorzugt wird als Grenzwert etwa 15 µmol/l eingesetzt.

[0039] Die Referenzwerte der Messgröße Holotranscobalamin (Holo TCII) liegen bevorzugt im Bereich von etwa 20 bis 170 pmol/l, bevorzugt etwa 30 bis 160 pmol/l, besonders bevorzugt > etwa 50 pmol/l, insbesondere > etwa 30 pmol/l. Die Messgröße Holo TC II gibt einen Hinweis auf die Homocystein-Konzentration in den Zellen. Als Grenzwert kann bei der Messung jeder beliebige Wert innerhalb des Referenzbereichs verwendet werden, beispielsweise 28, 29, 30, 31 oder 32 pmol/l. Bevorzugt wird als Grenzwert der Messung 30 pmol/l verwendet.

[0040] Geeignete Referenzwerte der Messgröße Methylmalonsäure (MMA) liegen im Bereich von etwa 60 bis 280 mmol/l, bevorzugt etwa 70 bis 270 mmol/l, insbesondere < etwa 270 mmol/l. Die Messgröße MMA ist ein Indikator für B6- und B12-Konzentrationen. Als Grenzwert kann bei der Messung jeder beliebige Wert innerhalb des Referenzbereichs verwendet werden, beispielsweise 250, 260, 265, 270, 275 oder 280 mmol/l. Bevorzugt wird als Grenzwert der Messung 270 mmol/l verwendet.

[0041] Die Referenzwerte der Messgrößen Cystathionin liegen im Bereich von etwa 60 bis 310 nmol/l, bevorzugt etwa 65 bis 300 nmol/l, insbesondere < etwa 300 nmol/l. Die Messgrößen Cystathionin gibt einen Hinweis auf die B6-Konzentration. Als Grenzwert kann bei der Messung jeder beliebige Wert innerhalb des Referenzbereichs verwendet werden, beispielsweise 280, 290, 295, 300, 305 oder 310 mmol/l. Bevorzugt wird als Grenzwert bei der Messung 300 mmol/l verwendet.

[0042] Für eine Einklassifizierung in einen Vitamin B12-, Vitamin B6- und/oder Folsäuremangel ergibt sich damit beispielsweise eine wie in der folgenden Tabelle 1 gezeigte Einteilung.

Tabelle 1

	HoloTc II [pmol/l]	Homo- cystein [μmol/l]	Methyl- malon- säure [mmol/l]	Cystathionin [nmol/l]	Kommentar
(a)/ A/E	< 30	> 15	< 270	> 300	Vitamin B12- und Folsäure- mangel
(b)/B	< 30	> 15	> 270	> 300	Vitamin B12-Mangel
(c)/ A-B	< 30	> 15	< 270	> 300	Folsäure- mangel <sup>1)</sup>
(d)/ C/F	> 30	< 15	< 270	< 300	kein Mangel
(e)/	< 30	> 15	< 270	< 300	Vitamin B12- und Vitamin B6- Mangel
(f)/	< 30	> 15	< 270	< 300	Vitamin B6- und Folsäure- mangel <sup>1)</sup>
(g)/D	< 30	> 15	< 270	< 300	Vitamin B6- Mangel

Feld (a)/A ist Summe aus Folsäure- und B12-Mangel Feld (b)/B ist nur B12-Mangel rechnerisch: Folsäure = (Folsäuremangel + B12-Mangel) – B12-Mangel Feld (a)/A – Feld (b)/B Vitamin B12 und B6 werden direkt gemessen, Folsäure kann hier nur errechnet werden.

[0043] Die Auswertung der ermittelten Messgrößen kann bevorzugt computerunterstützt, beispielsweise mittels einer geeigneten Software erfolgen. Weiterhin können die ermittelten Messwerte bevorzugt graphisch in Form von Diagrammen dargestellt werden, um somit eine leichte Zuordnung der Messbereiche zu einer Vitamin B12-, Vitamin B6- oder/und Folsäurestörung zu ermöglichen.

[0044] Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es weiterhin möglich, in Abhängigkeit der bestimmten Vitamin B12-, Vitamin B6- oder/und Folsäurestörung auf einfache Weise die für den jeweiligen Patienten benötigte Therapie vorzugeben. So wird beispielsweise bei Klassifizierung in Gruppe (a) eine Vitamin B12- und Folat-Supplementation, bei Klassifizierung in Gruppe (b) eine Vitamin B12-Supplementation, bei Klassifizierung in Gruppe (c) eine Folat-Supplementation, bei Klassifizierung in Gruppe (d) keine Therapie und gegebenenfalls bei Klassifizierung in Gruppe (e) eine Vitamin B12- und Vitamin B6-Supplementation, bei Klassifizierung in Gruppe (f) eine Vitamin B6- und Folsäure-Supplementation und bei Klassifizierung in Gruppe (g) eine Vitamin B6-Supplementation angezeigt.

[0045] Die Supplementation der Vitamine kann durch jede geeignete Applikationsart erfolgen, bevorzugt erfolgt eine orale Gabe.

[0046] Bei Vitamin B12-Mangel erfolgt eine Gabe von etwa 0,1 bis 3 mg, bevorzugt etwa 0,1 bis 2 mg, mehr bevorzugt etwa 0,1 bis 1 mg und insbesondere etwa 1 mg, beispielsweise 0,9 bis 1,1 mg pro Tag. Ein Folatmangel wird beispielsweise mit etwa 0,1 bis 1,5 mg, bevorzugt etwa 0,1 bis 1,0 mg, insbesondere etwa 0,5 mg, beispielsweise 0,4 bis 0,6 mg pro Tag supplementiert. Wird ein Vitamin B6-Mangel diagnostiziert, kann eine Vitamin B6-Gabe mit einer Dosierung von etwa 1 bis 7 mg, bevorzugt etwa 1 bis 5 mg, insbesondere etwa 5 mg, beispielsweise 4,5 bis 5,5 mg erfolgen.

[0047] Selbstverständlich kann sowohl eine Verabreichung von jeglicher Kombination der Vitamine miteinander als auch jegliche Kombination eines oder mehrerer Vitamine mit weiteren physiologisch verträglichen Stoffen wie beispielsweise Trägerstoffen, Aroma- und Geschmacksstoffen oder anderen pharmazeutisch verwendeten Substanzen erfolgen.

[0048] Neben der Therapie von Vitamin B12-, Vitamin B6- oder/und Folsäurestörungen erlaubt das erfindungsgemäße Verfahren auch die Beobachtung oder/und Überwachung (Monitoring) des Therapieverlaufs bzw. des Therapieerfolgs, um somit eine optimale Verwendung von Vitamin B12-, Vitamin B6- bzw. Folsäurepräparaten (z.B. oralen oder parenteralen Vitamin B12-, Vitamin B6- bzw. Folsäurepräparaten) am einzelnen Patienten sowie eine bezüglich Dosierung sowie Applikationsdauer optimale Medikation zu gewährleisten.

[0049] Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich zur Bestimmung von Vitamin B12-, B6- oder/und Folsäurestörungen eines Patienten. Das Verfahren kann weiterhin zur Bestimmung von chronisch nicht entzündlichen (degenerativen) Erkrankungen, verursacht durch einen Vitamin B12-, B6- oder/und Folsäuremangel verwendet werden, welche beispielsweise durch einen normalen CRP (c-reaktives Protein)-Wert gekennzeichnet sind.

[0050] Weiterhin kann das erfindungsgemäße Verfahren auch mit weiteren Tests gekoppelt werden, z.B. mit Tests für Eisenfunktionsstörungen (vgl. **Fig. 9**). Beispielsweise können Patientenproben von Patienten mit Eisenverteilungsstörungen dem erfindungsgemäßen Verfahren unterzogen werden, um einen möglichen Vitaminmangel festzustellen. Im Fall eines Vitaminmangels würden die betreffenden Patienten dann zunächst keine Erythropoietin-Gabe, sondern lediglich eine Vitamingabe erhalten.

#### Ausführungsbeispiel

[0051] Die vorliegende Erfindung wird weiterhin durch die **Fig. 1** bis **9** sowie Beispiel 1 veranschaulicht.

[0052] In den Figuren und im Beispiel bedeuten die Abkürzungen

Holo TC II Holotranscobalamin II

tHCy total Homocystein

MMA Methylmalonsäure

CYS Cystathionin

SAM S-Adenosylmethionin

Suc-CoA Succinyl-CoA

[0053] **Fig. 1** zeigt ein Schema der Differenzialdiagnostik bzw. des Monitoring von Vitamin B12-, B6- oder/und Folsäuredefiziten.

[0054] Die **Fig. 2** bis **8** zeigen eine schematische Darstellung der Remethylierung und Transsulfurierung von Homocystein im normalen Stoffwechsel ohne Vitamin B6-, B12- oder/und Folsäuremangelzustände sowie bei verschiedenen Vitamin B6-, B12- oder/und Folsäuredefiziten.

[0055] **Fig. 2** zeigt ein Schema der Remethylierung und Transsulfuration von Homocystein im normalen Stoffwechsel.

[0056] **Fig. 3** zeigt ein Schema der Remethylierung und Transsulfuration von Homocystein bei Vitamin B12-Mangel.

[0057] **Fig. 4** zeigt ein Schema der Remethylierung und Transsulfuration von Homocystein bei Folatmangel.

[0058] **Fig. 5** zeigt ein Schema der Remethylierung und Transsulfuration von Homocystein bei Vitamin B12- und Folatmangel.

[0059] **Fig. 6** zeigt ein Schema der Remethylierung und Transsulfuration von Homocystein bei Vitamin B6-Mangel.

[0060] **Fig. 7** zeigt ein Schema der Remethylierung und Transsulfuration von Homocystein bei Vitamin B12- und Vitamin B6-Mangel.

[0061] **Fig. 8** zeigt ein Schema der Remethylierung und Transsulfuration von Homocystein bei Vitamin B6- und Folatmangel.

[0062] In **Fig. 9** ist ein Schema verschiedener möglicher Kombinationen von Tests auf Vitaminmangelkrankungen mit anderen Tests, beispielsweise Test für Eisenfunktionsstörungen. In den Feldern Vitaminmangel/Chronische Erkrankungen bezeichnen die Felder A und E einen Vitamin B12- und Folsäuremangel, die Felder C und F keinen Vitaminmangel, das Feld B einen Vitamin B12-Mangel und das Feld D einen Vitamin B6-Mangel. Folsäure kann aus der Differenz von Feld A – Feld B rechnerisch ermittelt werden.

#### Beispiel 1

##### Vitamin-Substitution bei Hyperhomocysteinämie

[0063] Ein Patient im Alter < 60 Jahre mit nicht chronisch entzündlichen Erkrankungen (CRP > 15 mg/l) und einer Hyperhomocysteinämie (tHCY > 12 µmol/l) wurde über einen Zeitraum von 3 Wochen mit 1 mg Vitamin B12, 1 mg Folat und 5 mg Vitamin B6 oral behandelt. Der anfängliche Wert von t-Homocystein betrug 13,9

µmol/l. Am 21. Tag nach Beginn der Behandlung betrug der t-Homocystein-Wert nur noch 8,9 µmol/l, die Behandlung wurde fortgesetzt, indem die gleichen Menge 2 × pro Woche oral gegeben wurden.

#### Literatur

- (1) Cazzola, M., Mercuriali, F. and Brugnara, C. (1997); Use of Recombinant Human Erythropoietin Outside the Setting of Uremia; Blood 89: 4248-4267;
- (2) Herbert V. Staging vitamin B-12 (cobalamin) status in vegetarians. Am J. Clin Nutr. 1994;59:1213S-22S;
- (3) Bjorkegren K, Svardsudd K., Serum cobalamin, folate, methylmalonic acid and total homocysteine as vitamin B12 and folate tissue deficiency markers amongst elderly Swedes – a population-based study. J. Intern. Med. 2001;249:423-32.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Vitamin B12 oder/und Folsäure-Störungen, umfassend die Bestimmung
  - (i) von Holotranscobalamin II
  - (ii) von Homocystein und
  - (iii) von Methylmalonsäure und gegebenenfalls
  - (iv) von Cystathionin.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine Bestimmung aus Serum durchgeführt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass eine Differenzialdiagnostik durchgeführt wird.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein Nachweis eines Vitamin B12-, Vitamin B6- oder/und Folsäure-Mangels erfolgt.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass ein intrazellulärer Vitamin B12-, Vitamin B6- oder/und Folsäuremangel nachgewiesen wird.
6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Mangel in die folgenden Gruppen klassifiziert wird:
  - (a) Vitamin B12- und Folsäuremangel
  - (b) Vitamin B12-Mangel,
  - (c) Folsäuremangel
  - (d) kein Mangel und gegebenenfalls
  - (e) Vitamin B12- und Vitamin B6-Mangel
  - (f) Vitamin B6- und Folsäuremangel oder
  - (g) Vitamin B6-Mangel.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass durch die Klassifizierung des Mangels eine Vorgabe der benötigten Therapie erfolgt.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass bei Klassifizierung in Gruppe (a) eine Vitamin B12- und Folat-Supplementation, bei Klassifizierung in Gruppe (b) eine Vitamin B12-Supplementation, bei Klassifizierung in Gruppe (c) eine Folat-Supplementation, bei Klassifizierung in Gruppe (d) keine Therapie, bei Klassifizierung in Gruppe (e) eine Vitamin B12- und Vitamin B6-Supplementation, bei Klassifizierung in Gruppe (f) eine Vitamin B6- und Folatsupplementation und bei Klassifizierung in Gruppe (g) eine Vitamin B6-Supplementation angezeigt wird.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Therapieverlauf oder/und der Therapieerfolg beobachtet oder/und überwacht wird.
10. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Bestimmung von chronisch nicht entzündlichen Erkrankungen.
11. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 9 in Kombination mit einem Test zur Be-



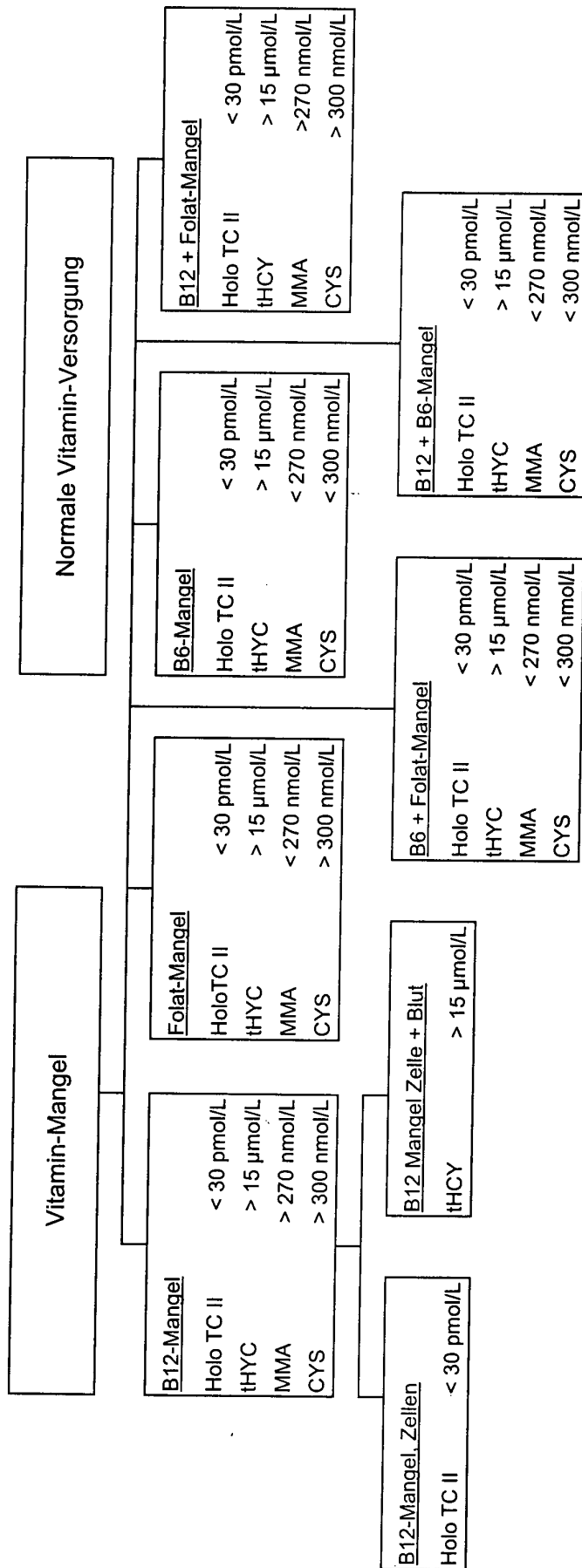
DE 103 11 089 A1 2004.09.23

stimmung von Eisenstoffwechselstörungen.

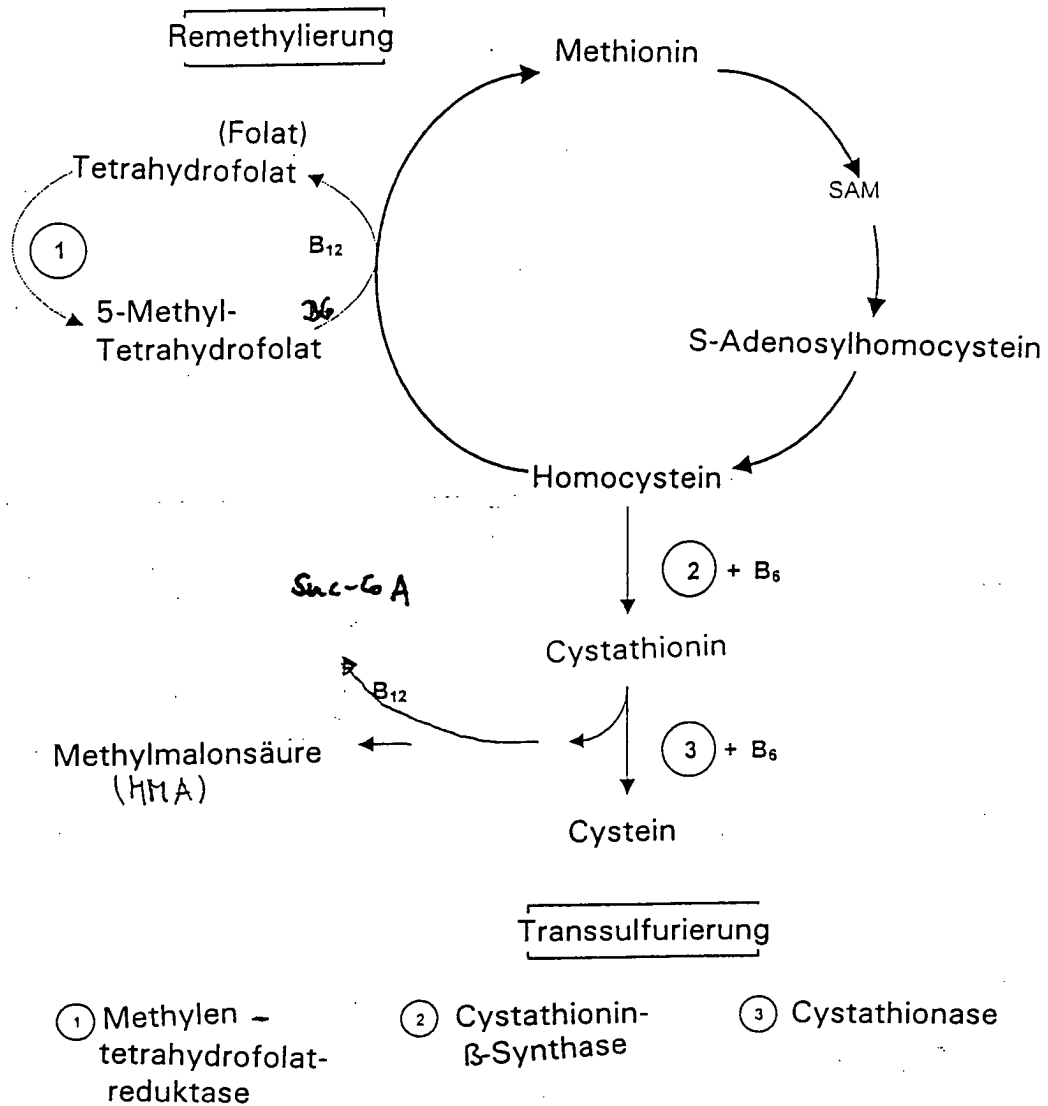
Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

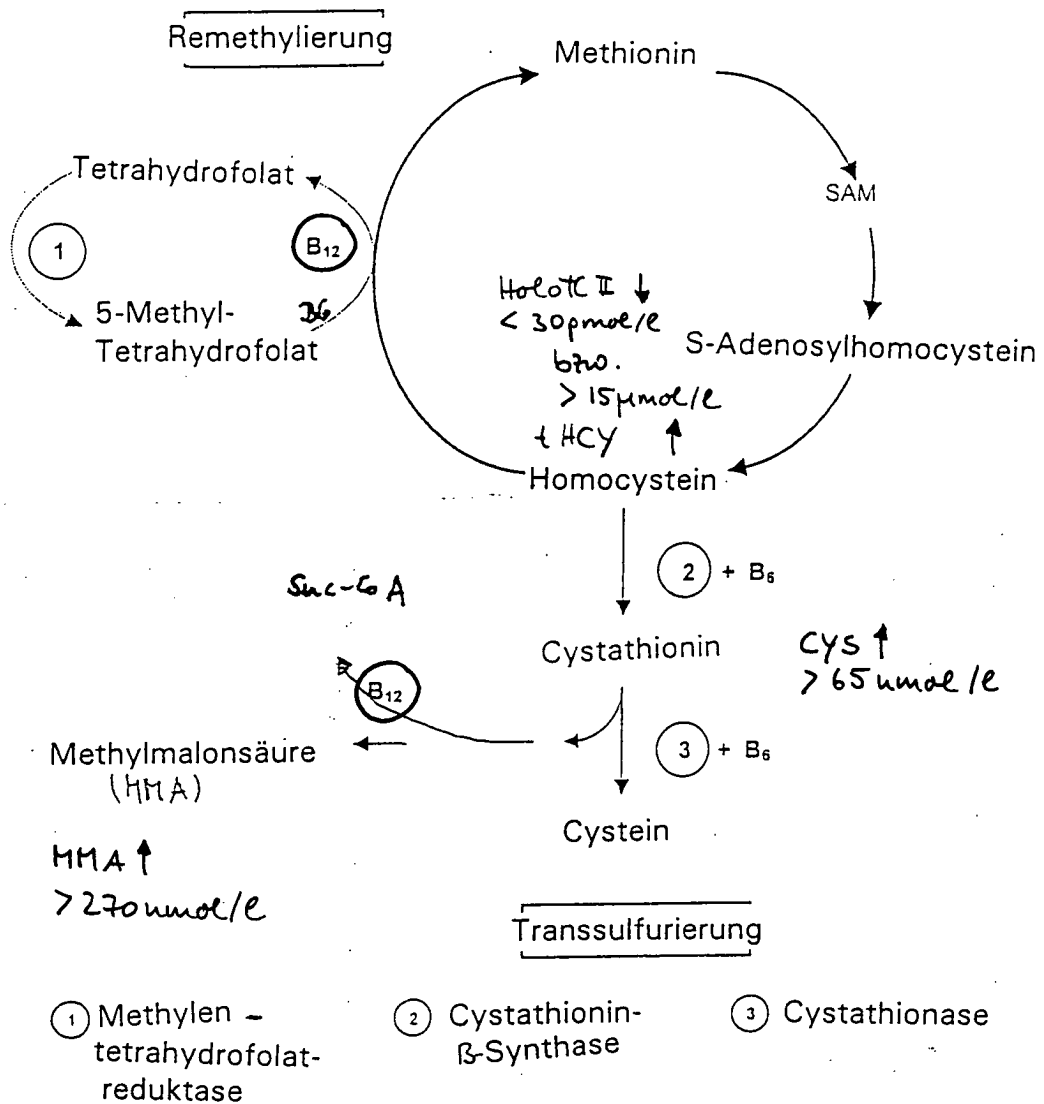
Differentialdiagnostik und Monitoring von Vitamin B12, B6- und/bzw. Folat-Defiziten



Figur 1

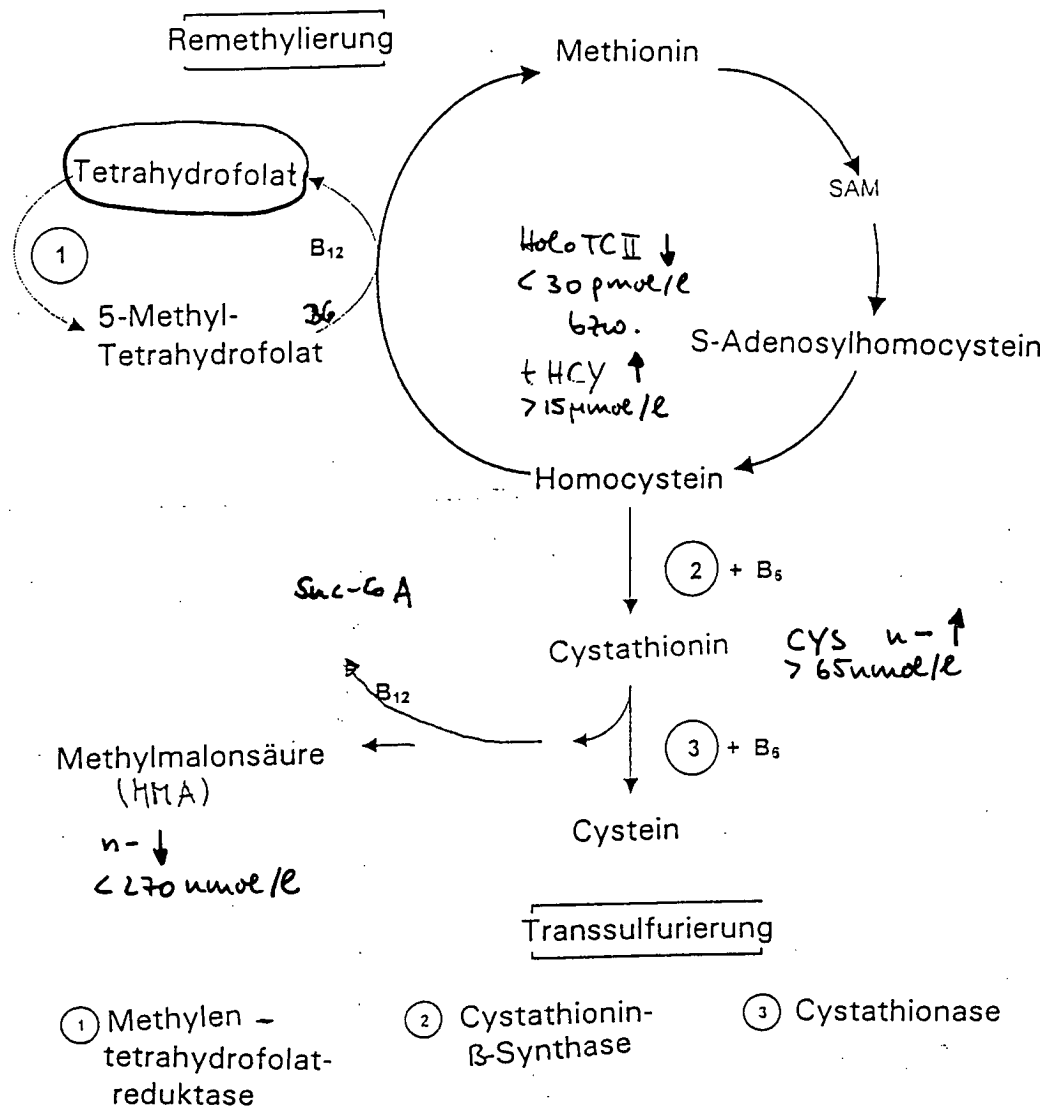


Figur 2



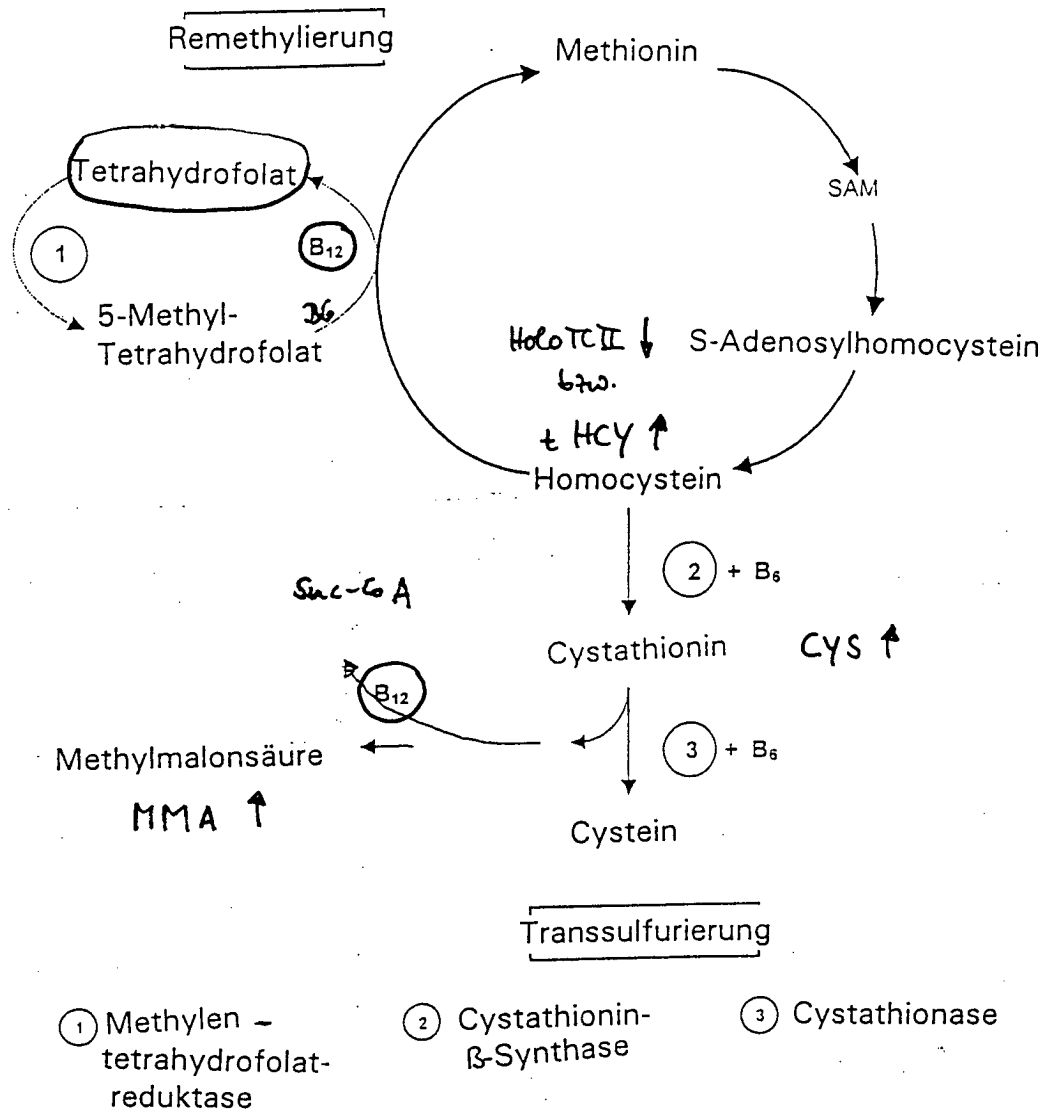
Vitamin B<sub>12</sub>-Mangel

Figur 3



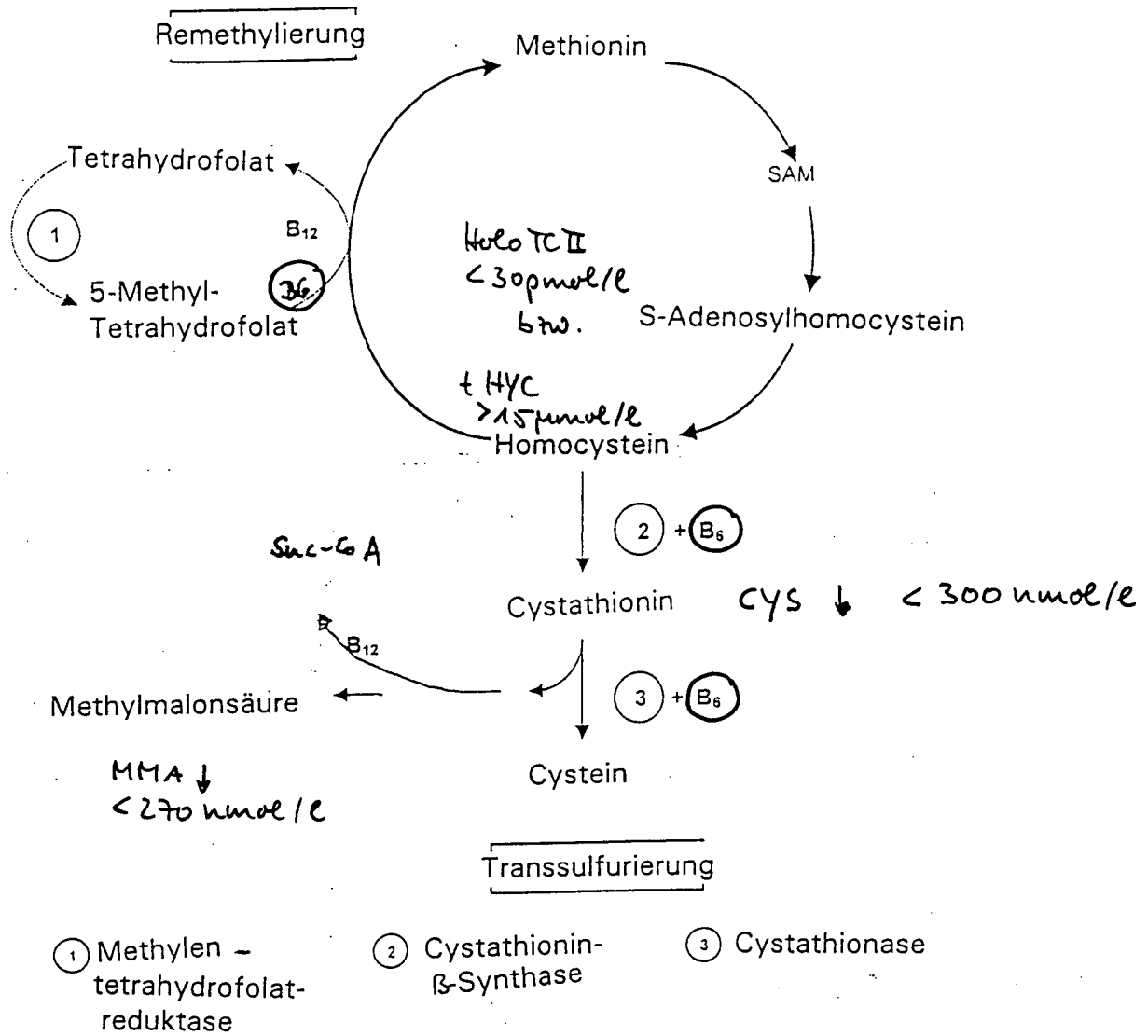
Folat-Mangel

Figur 4



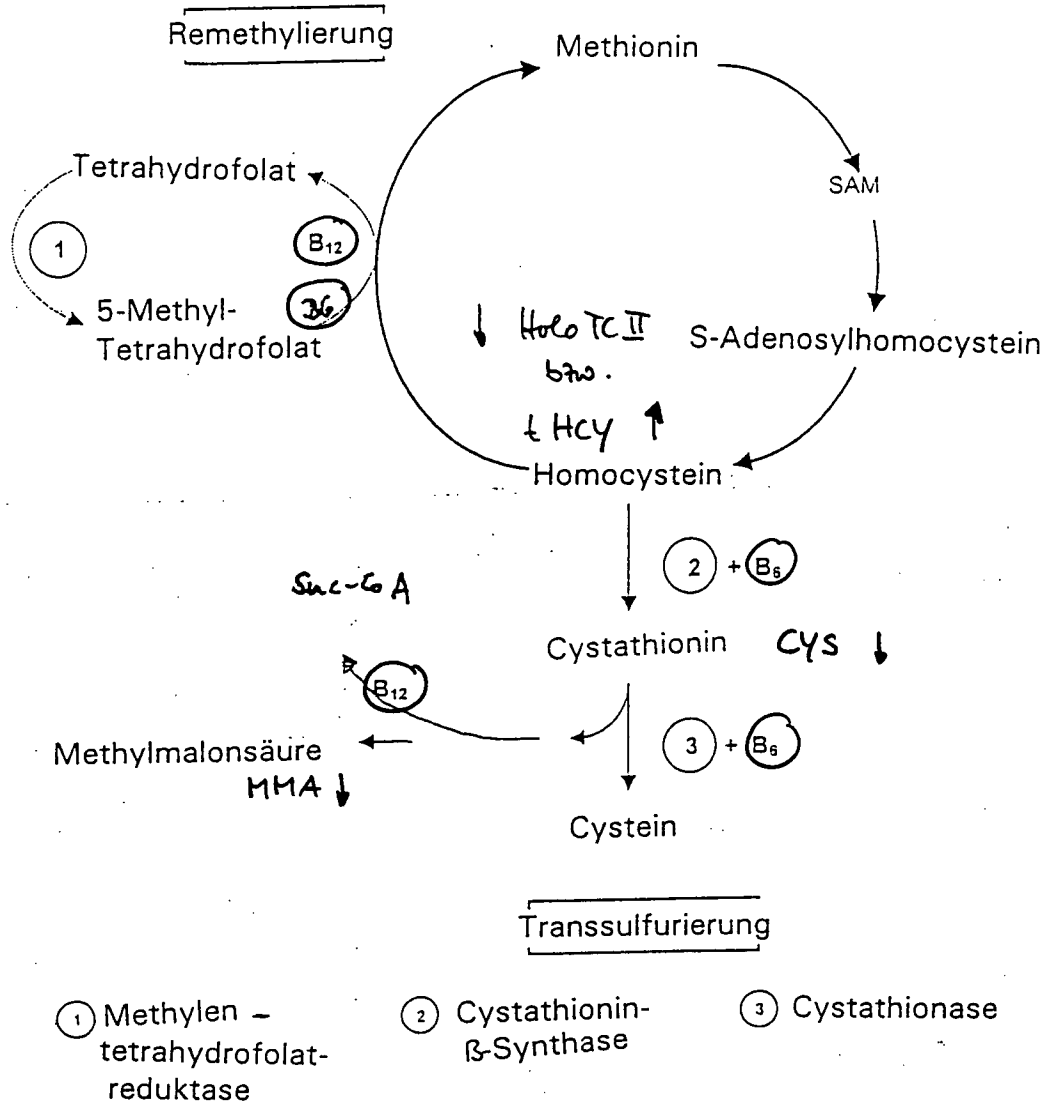
Vitamin B<sub>12</sub>- und Folatmangel

Figur 5



Vitamin B6-Mangel

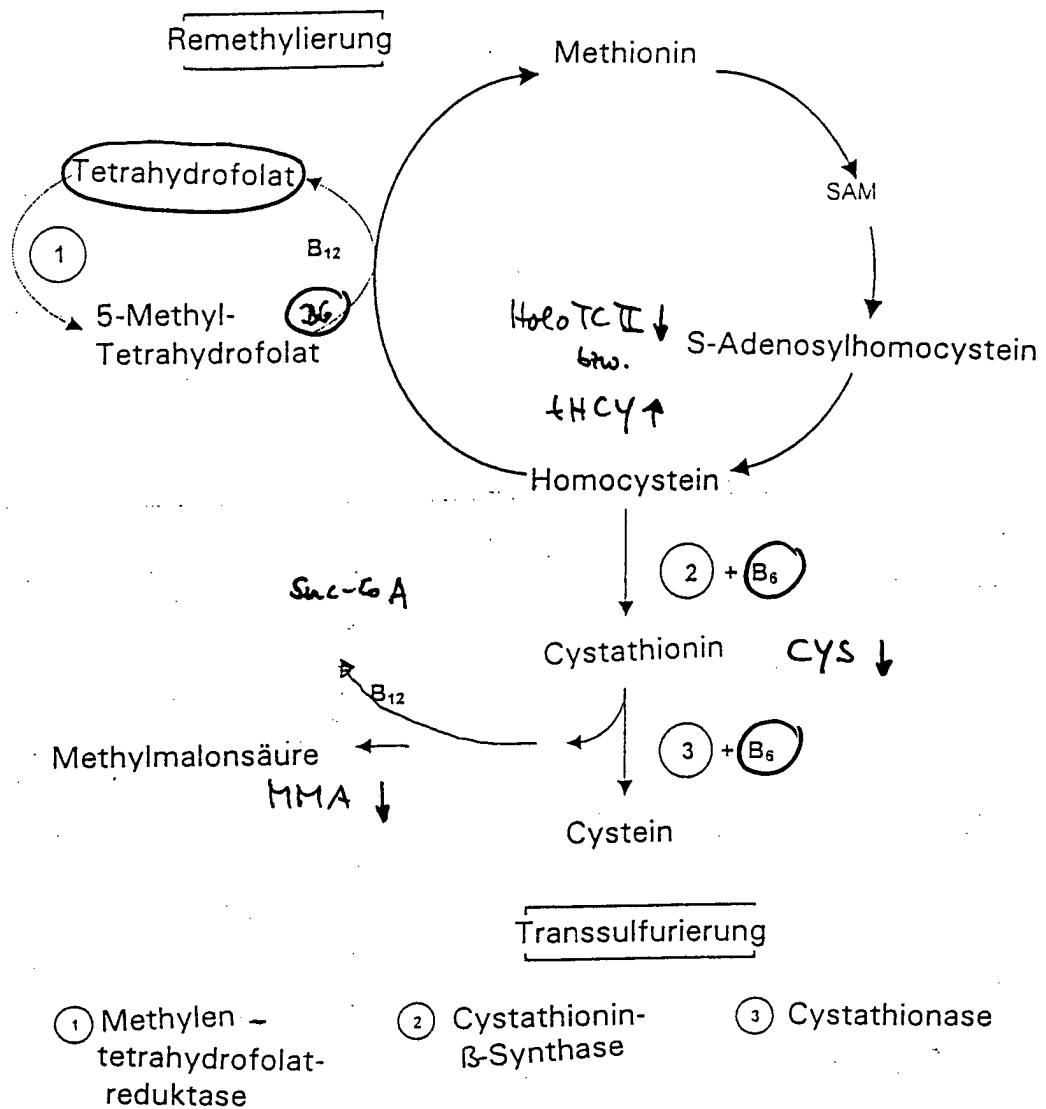
Figur 6



Vitamin B12- und Vitamin B6-Mangel

Figur 7

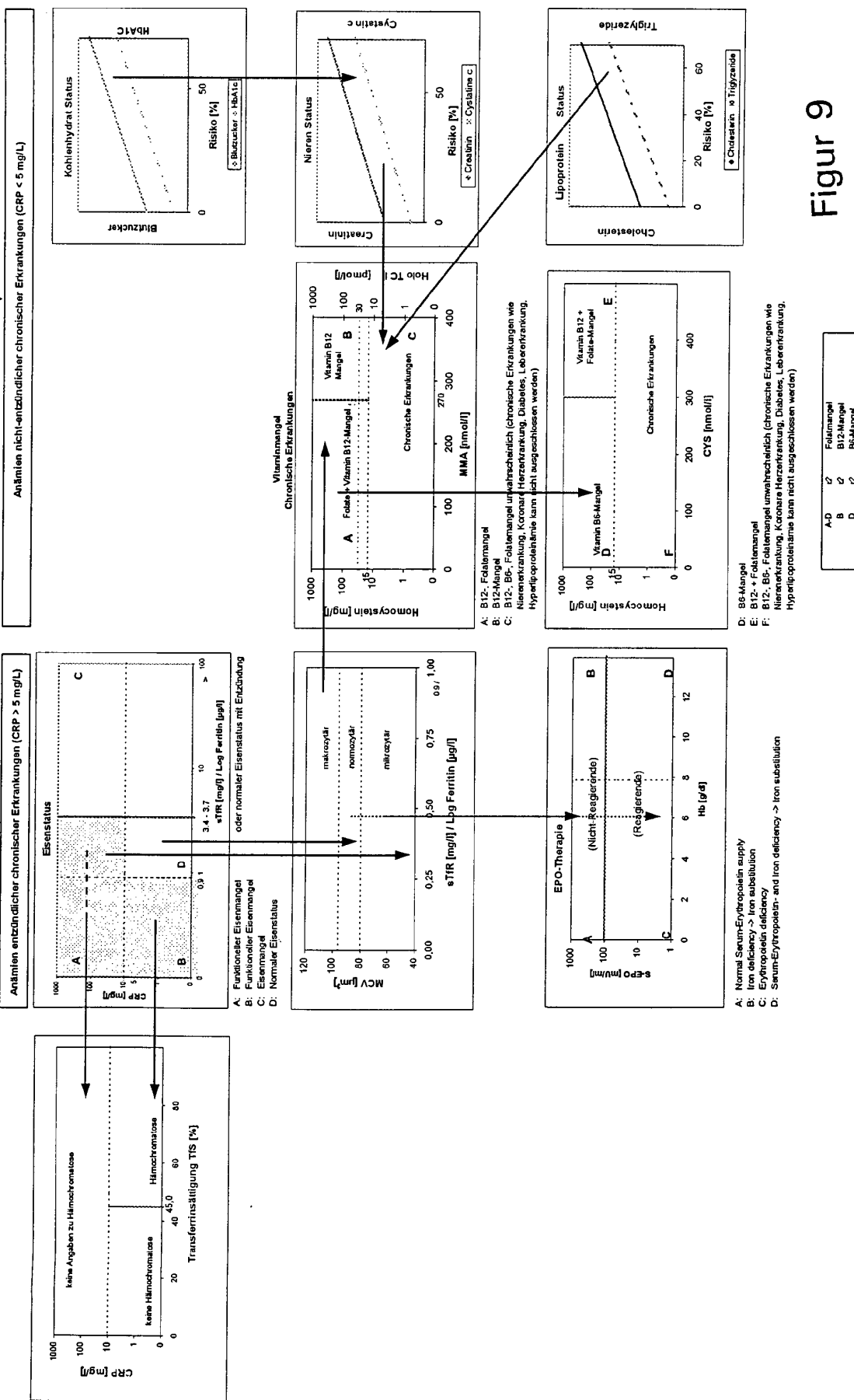




Vitamin B<sub>6</sub>- und Folat-Mangel

Figur 8

**Unterscheidung zwischen Anämien entzündlicher und nicht-entzündlicher (degenerierender) chronischer Erkrankungen**



Figur 9