

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2001-975**
 (22) Přihlášeno: **20.09.1999**
 (30) Právo přednosti: **18.09.1998 GB 1998/9820473**
 (40) Zveřejněno: **14.11.2001**
(Věstník č. 11/2001)
 (47) Uděleno: **12.07.2007**
 (24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **22.08.2007**
(Věstník č. 34/2007)
 (86) PCT číslo: **PCT/GB1999/003127**
 (87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2000/017659**

(11) Číslo dokumentu:

298 310

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/82 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
US 4680273.

(73) Majitel patentu:
AXIS-SHIELD ASA, Oslo, NO

(72) Původce:
Sundrehagen Erling, Oslo, NO
Orning Lars, Oslo, NO

(74) Zástupce:
JUDr. Zdeňka Korejzová, Spálená 29, Praha 1, 11000

(54) Název vynálezu:
**Způsob stanovení kobalaminu, kit pro
provádění způsobu a použití holo-TC II**

(57) Anotace:
Způsob stanovení kobalaminu navázaného na transkobalamin II (TC II) v tělesném vzorku, při kterém se bezbuněčný vzorek tělesné kapaliny přivede do kontaktu s imobilizovaným kobalaminem nebo jeho analogem nebo fragmentem, který selektivně váže apoformy TC II a haptokorin, a potom se tento vzorek uvede do kontaktu s imobilizovaným nebo imobilizovatelným specifickým vazebným ligandem pro TC II nebo TC II navázaným na kobalamin neboli holo-TC II, frakce navázaná na ligand se oddělí od frakce nenavázané na ligand a měří se obsah holo-TC II nebo kobalaminu navázaného na TC II ve vzorku. Kit obsahuje imobilizovaný kobalamin nebo jeho analog nebo fragment, který selektivně váže apoformy TC II a haptokorin a imobilizovaný nebo imobilizovatelný specifický vazebný ligand pro TC II nebo holo-TC II.

CZ 298310 B6

Způsob stanovení kobalaminu, kit pro provádění způsobu a použití holo- TC IIOblast techniky

5

Předkládaný vynález se týká testovacích metod pro stanovení kobalaminu nebo vitamínu B₁₂ v tělesné tekutině a zvláště testovacích metod pro metabolicky aktivní zásobu kobalaminu.

10

Dosavadní stav techniky

Kobalamin nebo vitamin B₁₂ je vitamin rozpustný ve vodě, který tvoří část komplexu vitaminů B, které se nacházejí v potravinách. Jádro molekuly se skládá z korinového kruhu složeného ze čtyř pyrrolových jednotek, které obklopují nezbytný atom kobaltu. Kobalamin je jediný vitamin, který nemohou syntetizovat zvířata ani rostliny a musí být absorbován z potravy ve střevě. Může však být uchováván v játrech. Je syntetizován mikroorganismy, zvláště anaerobními bakteriemi a kvasinkami.

Kobalamin funguje *in vivo* jako koenzym a kobalaminové enzymy katalyzují tři typy reakcí: (i) intramolekulární přeuspořádání, například tvorba sukcinyl CoA z L-methylmalonyl CoA, (ii) methylace, například tvorba methioninu methylací homocysteinu a (iii) redukce ribonukleotidů na deoxyribonukleotidy v některých mikroorganismech. U savců jsou známy pouze dvě enzymatické reakce vyžadující kobalamin jako koenzym, a to reakce konkrétně uvedené v částech (i) a (ii) výše.

25

Při procesu trávení váže protein slin nazývaný haptokorin, dále označovaný jako HC (který se také v oboru označuje jako látka vázající R, neboli R-binder nebo souhrnně transkobalaminy I a III) kobalamin v horním gastrointestinálním traktu za vytvoření komplexu, který prochází přes žaludek. Pankreatické enzymy štěpí komplex kobalamin-haptokorin (holo-HC) v ileu, přičemž je uvolňován kobalamin, který se potom váže na protein nazývaný „vnitřní (intrinsic) faktor“, který je sekrenován žaludeční sliznicí, za vytvoření dalšího komplexu. Komplex kobalamin – vnitřní faktor se váže na specifický receptor ve výstelce terminálního ilea a potom je štěpen uvolňujícím faktorem (releasing factor) a kobalamin je aktivně transportován přes membránu ilea do krevního oběhu.

35

Kobalamin necirkuluje v těle ve významném množství ve volné formě. Pravděpodobně přibližně 99 % kobalaminu je vázáno jedním z transkobalaminových proteinů (TC I–III) nebo albuminem.

Protein, o kterém se předpokládá, že je odpovědný za transport kobalaminu do cílových tkání, se transkobalamin II (TC II), kritický stopový protein, bez kterého nemůže kobalamin procházet buněčnými membránami. Přes tuto důležitou metabolickou funkci je pouze přibližně 6 až 25 % kobalaminu v séru navázáno na TC II, a většina je přenášena HC. TC II je jednořetězcový polypeptid s molekulovou hmotností 45 kDa (45 000), který se primárně nalézá v séru, semenné kapalině a cerebrospinální tekutině. Kobalamin navázaný na TC II nebo holo-TC II, se váže na specifické receptory na buněčných membránách, a jakmile je navázán, komplex holo-TC II se do buněk převádí mechanismem pinocytózy.

45

TC II je syntetizován v játrech, cévním endotheliu, enterocytech, makrofázích a fibroblastech a cirkuluje převážně ve formě apo-TC II, tj. bez navázaného kobalaminu. Má kratší poločas, přibližně 90 min.

50

S TC II je spojena pouze méně než jedna čtvrtina celkového kobalaminu v plazmě. Zbytek je navázán na jiné transkobalaminy nebo albumin, jak bylo uvedeno výše.

Protože kobalamin musí být absorbován z potravy, jakýkoli stav, jehož důsledkem je například nesprávná žaludeční funkce, gastroenteritida nebo stavy vedoucí k atrofii žaludku, nebo neschopnost produkovat funkční haptokorin, vnitřní faktor, uvolňující (releasing) faktor, TC II nebo receptory TC II, může vést k nesprávnému příjmu kobalaminu a k jeho deficitu.

Některé populační podskupiny, například starší osoby, těhotné ženy, pacienti s chronickým nebo akutním gastrointestinálním onemocněním, osoby trpící určitými autoimunitními onemocněními, osoby s rodinnou historií perniciózní anemie a osoby trpící AIDS, jsou k deficitu kobalaminu zvláště náchylné.

Klinické projevy deficitu kobalaminu jsou různé a početné, ale primárně zahrnují anemii, megaloblastickou hematopoézu a funkční a strukturní poruchy nervového systému. Přibližně 60 % jednotlivců, u kterých je deficit kobalaminu diagnostikován, je anemických, ale u mnoha jsou jedinými pozorovanými klinickými příznaky neurologické projevy. Přibližně 10 % pacientů má psychiatrické příznaky a přibližně 40 % má jak neurologické, tak i psychiatrické příznaky.

Časná diagnóza deficitu kobalaminu je klíčová pro zajištění dobré prognózy pro pacienty, protože některé z projevů deficitu kobalaminu, zvláště neuropsychiatrické projevy, jsou ireverzibilní, jestliže nejsou rychle detekovány a léčeny kobalaminovou terapií.

Proto je žádoucí přesně zjistit hladinu kobalaminu u jednotlivce rychlým a účinným způsobem, s cílem zjistit, zda může jedinec trpět deficitem kobalaminu nebo ne.

Měření celkové koncentrace kobalaminu v plazmě, tj. kobalaminu (a látek podobných kobalaminu) navázaného na některý z transkobalaminových (TC) proteinů I, II a III, již bylo ve snaze zjistit deficit kobalaminu používáno. Tento způsob vede k široké distribuci koncentrací u populace, která je považována za normální a tím se získá široké referenční rozmezí. U jednotlivce však je rozmezí dostupného kobalaminu považované pro tohoto jednotlivce za normální velmi úzké. Bylo pozorováno, že i když se u jednotlivce posunula koncentrace metabolicky aktivního kobalaminu mimo jeho vlastní referenční rozmezí, celková hladina kobalaminu zůstává v rozmezí, které je považováno pro populaci za normální. Za těchto podmínek může zůstat deficit kobalaminu nedetekován. Taková nespolehlivá metoda je jasně nežádoucí a je dobře zjištěno, že taková měření kobalaminu v séru nebo plazmě mají nízkou diagnostickou citlivost a specifitu.

Pro měření koncentrace kobalaminu v plazmě byly vyvinuty a používány mikrobiální testy zahrnující mikroorganismy, jejichž růst je závislý na kobalaminu, avšak navíc k obtížím při odhadování vhodného referenčního rozmezí vyžadují tyto metody extrakci a konverzi kobalaminu, která je velmi časově náročná, obtížná a zcela nevhodná pro rychlé laboratorní vyšetření.

Alternativní metody pro zjišťování deficitu kobalaminu zahrnují měření akumulace metabolitů v plazmě, které vyžadují pro svou konverzi kobalamin. Hodnoty methylmalonátu v plazmě a homocysteinu v plazmě se u jednotlivců s deficitem kobalaminu zvyšují (Chanarin, *The megaloblastic anaemia*; London, Blackwell Scientific Publications, 1991) a tyto látky jsou proto dobrými zástupci molekul vhodných pro korelaci s deficitem vitamínu B₁₂. Ukázalo se však, že metody založené na zjišťování homocysteinu jsou komplikované, nepraktické a mají špatnou specifitu a citlivost. I když metody založené na měření methylmalonátu jsou přesné a spolehlivé, jsou nákladné a vyžadují analýzu kombinací plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie, a jsou tedy drahé a opět nevhodné pro rutinní klinický screening (Nexo a další (1994) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 54: 61 – 76).

Bylo také navrhováno, že spolehlivý klinický ukazatel deficitu kobalaminu může být měření kobalaminu navázaného na TC II jako protiklad celkové koncentrace kobalaminu v plazmě (Herbert a další (1990) *Am. J. Hematol.* 34: 132 – 139; Wickramasinghe a Fida (1993) *J. Clin. Pathol.* 46: 537 – 539; patent US 4 680 273). Tyto snahy o stanovení koncentrace holo-TC II však byly

dosud většinou nepřímé, tedy odhadující koncentraci holo-TC II jako rozdíl mezi celkovou koncentrací kobalaminu v plazmě a koncentrací kobalaminu v plazmě zbavené TC II.

Toto odstraňování TC II se může provádět adsorpcí na síran amonný (Carmel (1974) *Am. J. Clin. Pathol.* 62: 367 – 372), mikročástice silikagelu (Herzlich & Hubert (1988) *Lab. Invest.* 58: 332 – 337; Wickramasinghe & Fida (1993) *J. Clin. Pathol.* 46: 537 – 539), mikrojemné sklo (Vu a další (1993) *Am. J. Hematol.* 42: 202 – 211) nebo imobilizované polyklonální protilátky anti-TC II (Lindemans a další (1983) *Clin. Chim. Acta* 132: 53 – 61). Koncentrace kobalaminu v celkové plazmě a frakci zbavené TC II se provádí metodami dobře známými v oboru, jako jsou radioaktivně nebo enzymaticky značené imunologické testy. Tyto metody jsou nevhodné pro rutinní automatizovaný i neautomatizovaný screening, protože jsou složité a časově náročné, a protože nízký stupeň specifity použitých adsorpčních materiálů vede k nedostatečné separaci holo-TC II a holo-HC, což má za následek nadhodnocení holo-TC II. Variace od šarže k šarži adsorpčního materiálu zavádí další chyby, a co je nejdůležitější, odečítání jednoho velkého objemu od dalšího velkého objemu vede k nepřijatelným nepřesnostem a nespolehlivosti.

Další pokusy o stanovení TC II zahrnovaly separaci TC II od dalších složek séra, včetně TC I a TC III, založenou na lipofilním charakteru TC II. Tak například Kapel a další (1988) *Clin. Chim. Acta* 172: 297 – 310, Benhayoun a další (1993) *Acta Haematol.* 89: 195 – 199 a Toft a další (1994) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 54: 62 popisují metody pro separaci TC II od jiných transkobalaminů s použitím materiálu heparin-sepharose, silikagelu, popřípadě celulózy. Tyto metody však mají stejné nevýhody jako nepřímé metody, protože jsou založeny na stejných adsorpčních materiálech. Rovněž nízká koncentrace holo-TC II v plazmě způsobuje nevhodnost těchto metod pro kombinaci s existujícími metodami kvantitativního stanovení kobalaminu. Normální rozmezí koncentrací holo-TC II je 35 až 160 pM a jako ukazatelé deficitu kobalaminu jsou obecně považovány již hodnoty nižší než 35 pM. Uváděná analytická citlivost většiny rutinních metod pro stanovení kobalaminu v plazmě je přibližně 40 pM, ale v praxi je často mnohem vyšší, typicky v okolí 90 pM. Proto jsou normální plazmatické koncentrace holo-TC II nižší než mezi citlivostí nebo v blízkosti této meze pro rutinní metody pro kvantifikaci kobalaminu.

Nejpřesnější současná metoda pro zjišťování kobalaminu navázaného na TC II zahrnuje adsorpci TC II na oxid křemičitý a potom testování navázané frakce na obsah kobalaminu s použitím buď imunologického testu, jak je například popsán v Kuemmerle a další (1992) *Clin. Chem.* 38/10: 2073 – 2077, nebo mikrobiologického testu, který zřejmě poskytuje nejlepší výsledky. Tato metoda vyžaduje pro provedení pouze dvacetí analýz celý pracovní den. Je velmi nákladná a nepraktická a špatně se hodí pro rutinní klinická diagnostická laboratorní vyšetření.

Existují tedy velká potřeba zlepšených metod pro testování hladiny metabolicky aktivního kobalaminu v tělesné tekutině, s ohledem na korelaci hladiny kobalaminu s pravděpodobností deficitu kobalaminu, které jsou použitelné v rutinních klinických diagnostických aplikacích.

Podstata vynálezu

Vynález poskytuje způsob stanovení kobalaminu navázaného na transkobalamin II (TC II) v tělesném vzorku, při kterém se bezbuněčný vzorek tělesné kapaliny přivede do kontaktu s imobilizovaným kobalaminem nebo jeho analogem nebo fragmentem, který selektivně váže apoformy TC II a haptokorin, a potom se tento vzorek uvede do kontaktu s imobilizovaným nebo imobilizovatelným specifickým vazebným ligandem pro TC II nebo pro TC II navázaný na kobalamin neboli holo-TC II, frakce navázaná na ligand se oddělí od frakce nenavázané na ligand a měří se obsah holo-TC II nebo kobalaminu navázaného na TC II ve vzorku.

Pod specifickým vazebným ligandem se míní ligand, který se váže na TC II (tj. apo-TC II a holo-TC II) nebo holo-TC II působením specifické chemické struktury nebo konformace a nejen jednoduše působením všeobecných fyzikálně chemických vlastností (jako je lipofilnost), které

mohou být společné mnoha složkám vzorku tělesné tekutiny. Vazebná afinita a specifická ligan-
dů vhodných pro použití v předkládané metodě s výhodou umožňuje trojnásobné, výhodněji pěti-
násobné a ještě výhodněji desetinásobné a nejvýhodněji více než desetinásobné zakoncentrování
5 TC II nebo holo-TC II ve vzorku, a tím je taková metoda schopna poskytnout přesné a spolehlivé
hodnoty pro holo-TC II v dolní hranici normálního rozmezí holo-TC II a také v subnormální
oblasti. Tato separace a zakoncentrování cílových molekul není běžnými existujícími metodami,
které nejsou schopny účinně separovat TC II nebo holo-TC II od HC nebo holo-HC, možná.
Schopnost zakoncentrovat TC II nebo holo-TC II alespoň trojnásobně umožňuje použití automa-
tického analytického vybavení při provádění testu. Bez takového kroku zakoncentrování bude
10 množství analytu přítomné ve vzorku pravděpodobně nižší než dolní detekční limit. Takové auto-
matické analytické zařízení typicky vyžaduje pro svůj provoz mezi 40 a 100 μ l vzorku v celko-
vém objemu typicky 150 μ l nebo vyšším. Analyt s nízkou koncentrací se tedy pro analýzu ještě
dále ředí. Použitím testovací metody podle vynálezu je však analyt zakoncentrován alespoň
trojnásobně. Protože použití takového automatického analytického zařízení typicky zahrnuje roz-
15 mezí 100 až 700 pM s dolním limitem citlivosti přibližně 40 pM, ale praktickým dolním limitem
přibližně 90 pM, pětinásobné zakoncentrování umožňuje měření holo-TC II již v koncentraci do
18 pM a desetinásobné zakoncentrování umožní měření až do koncentrace 9 pM holo-TC II.
Protože předkládaný vynález umožňuje zakoncentrování více než desetinásobné, odborník v obo-
ru snadno porozumí míru zvýšení citlivosti za získání velmi výkonné analytické metody. Schop-
20 nost zakoncentrování analytu takovým způsobem, že je umožněna jeho analýza těmito automati-
zovanými postupy, je důležitou výhodou předkládané testovací metody.

Bude vytvořeno s výhodou od 600 μ l výchozího vzorku tělesné kapaliny, objemu až do 150 μ l,
výhodněji až do 100 μ l a nejvýhodněji méně než 60 μ l, který může být analyzován, popřípadě
25 s použitím automatických postupů. Při způsobu podle vynálezu může být použit jakýkoli ligand,
který se specificky váže na TC II, buď jako zachycující, koncentrující a separující ligand nebo
detekční ligand, a v závislosti na konkrétním provedení vynálezu se může vázat na TC II jak
v apoformě, tak i holoformě, nebo se může specificky nebo přednostně vázat na holoformu.
Ligand, který se váže na TC II, bude s výhodou vykazovat vysoký stupeň selektivity a specifity
30 vzhledem k TC II a bude mít s výhodou nízkou, nebo výhodněji v podstatě žádnou afinitu
k jiným proteinům TC, tj. TC I nebo III, jak v apoformě, tak i holoformě, nebo jakémukoli
jinému proteinu vázajícímu kobalamin. Jestliže ligand vázající TC II je ligand specificky vázající
holo-TC II, dalším požadavkem je, aby vykazoval nízkou nebo s výhodou žádnou aktivitu vzhle-
dem k apo-TC II.

Ligand vázající TC II nebo holo-TC II bude obecně buď protilátka, nebo fragment protilátky
nebo sloučenina s afinitou pro TC II nebo holo-TC II, jako je receptor na povrchu buňky,
polypeptid nebo oligopeptid, malá organická molekula apod. Dalšími vazebnými ligandy mohou
být specifické vázající se sloučeniny vybrané ze sbírky kombinační chemie nebo sbírky prezen-
40 tované fágem nebo specificky se vázající sekvence DNA nebo RNA.

Jestliže je vazebným ligandem protilátka, může být polyklonální, ale s výhodou bude monoklo-
nální. Monoklonální protilátky mohou být vytvářeny s mnohem vyšší specifitou a stejnorodostí
než polyklonální protilátky, což snižuje zkříženou reaktivitu s jinými složkami tělesné tekutiny,
45 zvláště jinými transkobalaminami, a kde je to vhodné, alternativní konformací, tj. apoformou cílo-
vého analytu. Stejnorodost a reprodukovatelnost poskytovaná monoklonálními protilátkami
vzhledem k polyklonálním protilátkám zajišťuje vyšší přesnost, která je klíčová pro jakýkoli test,
při kterém má analyt tak nízkou koncentraci. Alternativně může být ligandem fragment proti-
látky, například F(ab), F(ab')₂ nebo F(v) fragment. Protilátky nebo fragmenty protilátek mohou
50 být monovalentní nebo divalentní a mohou být produkovány hybridomovou technologií nebo
mohou být syntetického původu, a mohou být vytvářeny technologií rekombinantní DNA nebo
chemickou syntézou. Mohou být například používány jednořetězcové protilátky a jiné deriváty
protilátek, nebo látky, které je napodobují. Protilátka může být podle potřeby vytvořena nebo
směrována proti jakémukoli epitopu, složce nebo struktuře proteinu TC II nebo holo-TC II.

55

Vhodné protilátky pro použití jako vazebné ligandy v rámci předkládaného vynálezu se popisují například v Quadros a další (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222: 149 – 154; McLean a další (1997) *Blood* 89(1): 235 – 242.

- 5 Podobně mohou být použity receptorové molekuly schopné vázat apo a holoformy TC II, nebo preferenčně nebo specificky vázat formu holo-TC II. Vhodné receptory jsou receptory pro TC II nebo holo-TC II navázané na povrch buněk nebo membránu, a zkřížená druhová reaktivita znamená, že mohou být použity receptorové molekuly z jakéhokoli savčího druhu, i když s výhodou pocházející z těchto receptorů člověka nebo skotu. I když jsou molekuly receptorů s výhodou izolovány v relativně purifikované formě, možné je také použití buněčných membrán nebo smíšených membránových frakcí obsahujících receptory, s výhodou v koncentrované formě. Tyto receptory nebo membrány s obsahem receptorů nebo membránové frakce s obsahem receptorů mohou být výhodně izolovány z buněk ledviny, placenty nebo tumoru. Jako zdroj těchto receptorů by obecně neměly být použity buňky z tkáňových kultur. Buňky z tkáňových kultur však mohou být použity jako zdroj haptokorinových receptorů.

- Membránová frakce obohacená o receptor TC II může být získána podle popisu v Seligman a další, *J. Biol. Chem.* 253: 1766 – 1772 (1978) a Nexø a další, *Biochem. Biophys. Act.* 628: 190 – 200 (1980). Tkáň, například lidská placenta nebo králičí ledvina, se v podstatě nakrájí na malé kousky a homogenizuje se v tris pufru, pH 7,4, obsahujícím 0,15M NaCl a 10 mM EDTA, potom se provede centrifugace při 25 000 x g 30 min. Pro odstranění zbytkové krve se ještě alespoň jednou opakuje proces homogenizace/centrifugace. Tato membránová frakce se dále extrahuje detergentem, například Ammonyx-LO, Triton X-100 nebo Chapso, a vyčeti centrifugací při 100 000 x g 30 min při 4 °C. Supernatant se použije jako zdroj pro receptor TC II.

- Jako příklad vhodné receptorové molekuly, která se preferenčně váže na komplex holo-TC II, je možno uvést jednořetězcový glykoprotein s molekulovou hmotností 62 kDa (62 000), který existuje jako nekovalentní homodimer, a nachází se na buněčném povrchu všech tkání (Rothenberg & Quadros (1996) *Balliere's Clinical Haematology* 8(3) 499 – 514; WO 96/085150). Další protein vhodný pro použití v testovací metodě podle vynálezu je protein gp300, membránový protein umožňující endocytózu s molekulovou hmotností 600 kDa (600 000), který je exprimován v absorptivních epitheliálních buňkách, například v buňkách ledvinových proximálních tubulů, jak se popisuje v Moestrup a další (1996) *Proceedings National Academy Science* 93: 8613 – 8617. Tento receptor je receptor LDL a váže jak apo, tak i holoformy TC II. Jestliže se použije receptor buněčného povrchu, může být imobilizován konjugací k povrchu, například kuličkám nebo vrstvě, nebo může být alternativně frakce buněčné membrány obsahující receptory upravena do váčků nebo vrstev, které na povrchu vystavují receptory.

- Jestliže je ligand imobilizovaný, může být imobilizován například na povrchu pevné látky, například filtračního filmu nebo vrstvy, nebo v záhybu nebo trubici, i když zvláště výhodná je imobilizace na částicích, například mikrokuličkách, které vyrábí firma Dyno Industrier ASA, Norsko. Tyto částice mohou být porézní nebo neporézní, a v případě potřeby mohou být opatřeny prostředky, které umožňují jejich oddělení, například zahrnutím částic s magnetickou odezvou, například superparamagnetických krystalů oxidu železa. Tyto mikrokuličky reagující na magnetické pole jsou dostupné u firmy Dyno Industrier ASA stejně jako u firmy Dynal AS, Norsko, Bang Particles, USA a Prolabo, Francie. Jestliže má být ligand imobilizovatelný, na rozdíl od imobilizovaného, může to být provedeno vazbou ligandu na člena specifického vazebného páru (např. biotin/streptavidin) a použitím dalšího členu vazebného páru, popřípadě navázaného na substrát, pro aglomeraci nebo jinou imobilizaci ligandu nebo komplexu ligand : TC II nebo ligand : holo-TC II, před separací frakce navázané na ligand od frakce nenavázané na ligand při provádění metody podle vynálezu.

- Způsob imobilizace afinitních molekul, například protilátek a fragmentů protilátek pro separační účely je v oboru dobře známý, a provádí se například vazbou nebo reakcí ligandů, popřípadě pomocí propojovací molekuly, k jakémukoli dobře známému pevnému nosiči nebo matici, které

jsou v současnosti běžně používané nebo navrhované pro separaci nebo imobilizaci na kolonách, a může být použito jakékoli v oboru známé metody. Tyto pevné fáze mohou mít formu částic, vrstev, gelů, filtrů, membrán, vláken nebo kapilár nebo mikrotitračních proužků, trubiček nebo destiček, jamek apod., a vhodně mohou být vyráběny ze skla, oxidu křemičitého, latexu nebo polymerního materiálu. Způsoby vazby ligandu na pevný nosič jsou rovněž extrémně dobře známé a široce popisované v literatuře.

Vazba ligandu na substrát nebo jeden člen specifického vazebného páru může být provedena použitím běžných způsobů.

Způsob podle vynálezu, jestliže se test provádí jako kompetitivní vazebný test, bude obecně shrnovat přidání značené sloučeniny, která soutěží o vazbu na ligand, ke vzorku. Obecně bude výhodné používat v této souvislosti značený holo-TC II. Použitá značka může být jakákoli značka, kterou je možno přímo nebo nepřímo stanovit, například chromofor (tento termín zahrnuje také fluorofor), radioaktivní značka (obecně navázaná kovalentně nebo prostřednictvím chelátu), enzym nebo substrát enzymu, magnetická značka apod.

Výhodné provedení způsobu podle předkládaného vynálezu zahrnuje uvedení bezbuněčného vzorku tělesné kapaliny do kontaktu s imobilizovaným kobalaminem nebo jeho analogem nebo fragmentem, který selektivně váže apoformy TC II a haptokorin uvedení imobilizovaného nebo imobilizovatelného ligandu vázajícího TC II nebo holo TC II do kontaktu se zkoumaným vzorkem; oddělení frakce navázané na ligand od frakce nenavázané na ligand; odštěpení navázaného kobalaminu z molekul holo-TC II v navázané frakci a stanovení koncentrace uvolněného kobalaminu, s výhodou při takovém provedení odštěpení, že koncentrace uvolněného kobalaminu je alespoň třikrát, s výhodou pětikrát a ještě výhodněji desetkrát vyšší než koncentrace holo-TC II v počátečním vzorku.

Podstata tohoto provedení vynálezu je oddělení a zakoncentrování TC II nebo holo-TC II, což umožňuje úspěšné použití standardních metod stanovení kobalaminu při této metodě. Jak je uvedeno výše, v nepřítomnosti takového kroku zakoncentrování nejsou metody podle dosavadního stavu techniky vhodné pro stanovení kobalaminu, protože je přítomen ve velmi nízké koncentraci. Pro uvolnění kobalaminu z holo-TC II mohou být použity jakékoli vhodné prostředky, ale s výhodou se bude uvolňování provádět teplem nebo změnou pH okolního prostředí. Různé formy kobalaminu mohou být převedeny na kyanokobalamin méně citlivý na světlo působením KCN. V rámci metody podle vynálezu mohou být použity jakékoli vhodné prostředky pro stanovení volného kobalaminu, například kompetitivní test prováděný uvedením imobilizovaného vazebného partnera kobalaminu do kontaktu s disociovaným kobalaminem ze vzorku v přítomnosti značeného ligandu, který s izolovaným kobalaminem soutěží o vazbu na imobilizované vazebné partnery. Vhodný může být například způsob popisovaný v Kuemmerk a další (1992) Clin. Chem. 38: 2073 – 2077. Alternativní způsob pro stanovení volného kobalaminu se popisuje v patentu US 5 451 508 a zahrnuje imunologické stanovení.

V tomto provedení vynálezu je výhodné, jestliže jsou vazebné ligandy pro TC II imobilizovány, a vážou se jak na holo, tak i apo-TC II.

V alternativním výhodném provedení zahrnuje testovací způsob podle předkládaného vynálezu uvedení pevného nosiče s imobilizovaným vazebným ligandem TC II nebo holo-TC II do kontaktu se zkoumaným vzorkem a také s neimobilizovaným ligandem,

přičemž uvedený imobilizovaný ligand je schopen vazby na TC II nebo holo-TC II, na uvedený neimobilizovaný ligand nebo na komplex uvedeného TC II nebo holo-TC II a uvedeného neimobilizovaného ligandu, a uvedený neimobilizovaný ligand je schopen vazby na alespoň jeden

z uvedených imobilizovaných ligandů, TC II nebo holo-TC II a komplexů uvedeného imobilizovaného ligandu a TC II nebo holo-TC II;

příčemž jestliže je tato testovací způsob sendvičový test, alespoň jeden z uvedených ligandů je specifický pro holo-TC II, a jestliže je tento test kompetitivní test, uvedený imobilizovaný ligand je specifický pro holo-TC II a látky, které s ním soutěží;

příčemž podíl uvedeného imobilizovaného ligandu vázaného TC II nebo holo-TC II, uvedeným neimobilizovaným ligandem nebo komplexu uvedeného neimobilizovaného ligandu a TC II nebo holo-TC II, je závislá na množství holo-TC II přítomného v uvedeném vzorku, a

uvedený neimobilizovaný ligand je schopný vytvářet přímo nebo nepřímě detekovatelný signál, jestliže je navázaný nebo jestliže je nenavázaný;

navázaná frakce se oddělí od nenavázané frakce; a

přímo nebo nepřímě se stanoví neimobilizovaný ligand navázaný na imobilizovaný ligand (navázaná frakce) nebo nenavázaný a v roztoku (nenavázaná frakce);

příčemž uvedení vzorku a uvedeného neimobilizovaného ligandu s pevným nosičem může být prováděno odděleně, současně nebo postupně, a pokud se provádí odděleně nebo postupně, může být prováděno v jakémkoli pořadí.

Alternativní výhodné provedení metody podle vynálezu tedy v podstatě zahrnuje stanovení neimobilizovaného ligandu, který se přímo nebo nepřímě navázal nebo se alternativně přímo nebo nepřímě nenavázal na imobilizovaný ligand. Jestliže neimobilizovaný ligand soutěží o vazbu na imobilizovaný ligand s holo-TC II, vysoká hladina nenavázaného neimobilizovaného ligandu je ukazatelem vysoké koncentrace holo-TC II ve vzorku, a nízká hladina nenavázaného neimobilizovaného ligandu je ukazatelem nízké koncentrace holo-TC II ve vzorku. Jestliže se neimobilizovaný ligand váže na TC II nebo holo-TC II, který se zase váže na imobilizovaný ligand, potom je vysoká hladina navázaného neimobilizovaného ligandu ukazatelem vysoké koncentrace holo-TC II ve vzorku a nízká hladina navázaného neimobilizovaného ligandu je ukazatelem nízké koncentrace holo-TC II ve vzorku.

Při metodě podle předkládaného vynálezu se proto stanovuje metabolicky aktivní zásoba (pool) kobalaminu měřením koncentrace komplexu holo-TC II nebo měřením množství kobalaminu navázaného na molekuly TC II přítomné v tělesném vzorku, který obsahuje směs jak apo, tak i holo-TC II a apo a holo-HC (haptokorin nebo TC I a III).

Předběžný krok separace se může provádět použitím imobilizovaného kobalaminu nebo analogu nebo fragmentu kobalaminu, který se selektivně váže na apoformy jak TC II, tak i haptokorinu (HC). V takovém předběžném kroku se navážou imobilizovaným kobalaminem, jeho analogem nebo fragmentem apoformy proteinů TC II a HC, a oddělí se od komplexů holo-TC II a holo-HC.

V tomto případě probíhá analýza oddělených holoform TC II podle jakéhokoli provedení vynálezu tak, jak bylo popsáno výše, ale je zřejmé, že je užitečnější, jestliže stanovení komplexu holo-TC II probíhá jinak než disociací komplexu a následným stanovením uvolněného kobalaminu. Odborníkům v oboru bude zřejmé, že jestliže před uvedeným alternativním výhodným provedením předchází takový předběžný krok, požadavek na specifitu alespoň jednoho ligandu sendvičového testu pro holo-TC II proti TC II a požadavek na specifitu imobilizovaného ligandu v kompetitivním testu pro holo-TC II a s ním soutěžící látky proti TC II již není relevantní, protože apoforma TC II již byla zachycena a není již dostupná. Imobilizované nebo neimobilizované ligandy mohou být tedy specifické pro holo-TC II nebo TC II nebo s nimi soutěžící látky.

Imobilizovaný kobalamin by neměl mít jakoukoli významnou tendenci k disociaci od svého nosiče, protože to by mohlo vést k vazbě apo TC II a jeho transformaci na holo-TC II. Biotinylovaný kobalamin se velmi stabilně váže na pevný povrch s navázaným avidinem/streptavidinem a navá-

zání kobalaminu na nosič tímto způsobem je pro provedení tohoto kroku vhodné. Ve skutečnosti, jestliže se používá biotinylovaný kobalamin, může být přidán do analyzovaného vzorku v neimobilizované formě, jestliže se váže na apoformy TC II a HC. Vzorek potom může být uveden do kontaktu s pevným povrchem obsahujícím imobilizovaného vazebného partnera, pro příklad biotinu avidin. Vytvoří se komplex avidin – biotinylovaný kobalamin – TC II, který může být snadno ze vzorku izolován.

V jednom provedení vynálezu, jestliže probíhá tento předběžný separační krok, zásoba holo-TC II je v podstatě stanovena přivedením vzorku do kontaktu s imobilizovaným ligandem TC II, který zachytí komplex holo-TC II a ponechá haptokorin v roztoku, a potom uvedením imobilizovaného holo-TC II do kontaktu s druhým ligandem TC II, který je značený a tím detekovatelný. Příklady vhodných vazebných ligandů TC II by byly nepřekrývající se monoklonální protilátky nebo samozřejmě polyklonální protilátka specifická pro TC II, které by byly v tomto provedení vhodné jak pro zachycení, tak i detekci, protože jsou na molekulách TC II rozpoznávány různé epitopy.

V dalším provedení vynálezu, kde probíhá tento krok předběžné separace, soutěží molekuly holo-TC II se značeným neimobilizovaným ligandem o vazbu na imobilizovaný ligand, a množství holo-TC II je vypočteno ve vztahu k množství značeného neimobilizovaného ligandu navázaného nebo nenavázaného na imobilizovaný ligand.

Ve výhodném provedení, v předběžném separačním kroku, probíhá vazba apo-TC II a apo-HC na kobalamin, jeho fragmenty nebo analogy, na takovém místě nebo takovým způsobem, že dojde k inhibici následného rozpoznání a vazby TC II na imobilizovaný kobalamin neimobilizovaným ligandem nebo vazebným partnerem TC II. V tomto provedení není nutné izolovat od navázaných apoforem holo-TC II a holo-HC před provedením testu podle vynálezu. V tomto provedení je velmi důležité místo, proti kterému je neimobilizovaný vazebný partner nebo ligand zaměřen, a mělo by jít o epitop na TC II, který se stane maskovaný nebo zastíněný nebo jinak nedostupný pro vazbu, jestliže dojde k imobilizaci apo-TC II a apo-HC na kobalamin, jeho analog nebo fragment.

Při zařazení předběžného kroku počáteční separace využívajícího imobilizovaného kobalaminu, jeho analogů nebo fragmentů, není úplná separace, tj. separace veškerých proteinů apo a holo TC II ze vzorku požadavkem metody a stačí, jestliže se od vzorku oddělí frakce, která obsahuje alespoň část požadované „podmnožiny proteinů TC II“.

V některých provedeních mohou být tedy vazební partneři nebo ligandy a vazebné podmínky voleny tak, aby bylo dosaženo oddělení v podstatě veškeré zvolené „podmnožiny“. V tomto případě může být nenavázaná frakce považována za v podstatě prostou proteinů TC II nebo holo-TC II, tj. z alespoň 80 %, 90 % nebo 95 % prostou buď TC II, nebo holo-TC II, v závislosti na tom, která složka je zvolena jako základ pro frakcionaci.

V alternativních provedeních jsou vazební partner a podmínky reakce voleny tak, aby se do frakce oddělila pouze část proteinů TC II ve vzorku. V tomto případě by měla být věnována pozornost částečnému oddělení při konstrukci standardní kalibrační křivky pro test. V tomto ohledu je vytvoření standardní kalibrační křivky, podle které je možno určit koncentraci detekovaného proteinu holo-TC II, standardní technikou dobře známou v oboru.

Při kroku frakcionace, jestliže se používá ligand vázající TC II, bude umístěna alespoň část kobalaminu navázaného TC II v navázané frakci, a jakýkoli kobalamin přítomný ve vzorku, navázaný na molekuly jiné než TC II, například HC nebo albuminu, budou v nenavázaných (tj. neseparovaných) frakci nebo frakcích. TC II v navázané frakci může být buď apo, nebo holo-forma a může být v komplexu s látkami podobnými kobalaminu nebo jeho analogy navíc ke kobalaminu.

V případě potřeby může zahrnovat způsob podle vynálezu další krok předběžné separace, při kterém se vzorek uvede do kontaktu s imobilizovaným nebo imobilizovatelným specifickým vazebným ligandem pro haptokorin (v apo a holoformách nebo v samotné holoformě). Tímto způsobem může být snížen příspěvek k chybám při určení kobalaminu navázaného na TC II pocházejícím z holo-HC a mohou být použity specifické vazebné ligandy pro TC II nebo holo-TC II, které mají určitou vazebnou afinitu pro haptokoriny.

Jinými slovy, jak je uvedeno výše, protože koncentrace TC II jak v apoformě, tak i v holoformě je v séru velmi nízká, jsou pro funkci vynálezu nezbytné ligandy pro vazební partneři se zvláště vysokou specificitou a afinitou.

Afinitní konstanty požadované u ligandů podle předkládaného vynálezu také závisí na tom, zda je ligand specifický pro TC II nebo holo-TC II a také na jeho použití jako zachycovacího nebo detekčního ligandu, protože koncentrace TC II v séru je přibližně 0,5 až 1 nM, ale koncentrace holo-TC II je pouze 35 až 160 pM. Pro zachycovací ligand TC II je tedy žádoucí afinitní konstanta alespoň 10^9 M^{-1} , s výhodou vyšší než $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ a výhodněji 10^{10} M^{-1} . Pro zachycovací ligand holo-TC II je žádoucí afinitní konstanta alespoň 10^{10} M^{-1} , s výhodou $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, výhodněji vyšší než $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ a nejvýhodněji vyšší než 10^{11} M^{-1} . Je jasné, že afinitní konstanta nutná pro detekční vazebnou látku může být nižší než afinitní konstanta pro vazebný ligand, což je způsobeno koncentračním efektem tohoto testu.

Stupeň zkřížené reaktivity vazebného ligandu holo-TC II nebo TC II s HC by měl být s výhodou nižší než 1 %, výhodněji mezi 0,1 % a 1 % a nejvýhodněji méně než 0,1 %. Podobně vazebný ligand holo-TC II by neměl mít s výhodou stupeň zkřížené reaktivity s apo-TC II vyšší než 1 %, výhodněji mezi 0,1 % a 1 % a nejvýhodněji by měla být zkřížená reaktivita nižší než 0,1 %.

Použitím ligandů s takto vysokou afinitou přesahuje jejich funkce jednoduchou funkci jako vazebných a/nebo detekčních ligandů, a tyto ligandy mají klíčovou úlohu při schopnosti separace a zakoncentrování proteinu TC II ze vzorku pro analýzu. Vazebné ligandy pro TC II nebo holo-TC II by měly s výhodou ligand zakoncentrovat alespoň trojnásobně, výhodněji pětinašobně a ještě výhodněji alespoň desetinásobně.

V dalším provedení testovací metody, která je příbuznější vytěšňovací metodě než kompetitivní metodě, se vzorek obsahující komplex holo-TC II přivede do kontaktu s pevnou fází, na kterou je navázán značený ligand rozpoznávající stejná vazebná místa na imobilizovaných ligandech jako holo-TC II. Holo-TC II ve vzorku soutěží s navázaným značeným ligandem o místa, takže po ekvilibraci systému je přímo úměrný vztah mezi množstvím značeného ligandu vytěšněného z pevného nosiče a detekovatelného v roztoku a množstvím holo-TC II přítomného v původním vzorku. Značený ligand může být detekován přímo nebo nepřímo a může být stanoven jako množství značeného ligandu navázaného nebo nenavázaného na pevný nosič, vždy podle potřeby. Důsledek tohoto provedení je, že neimobilizovaný ligand popisovaný dříve se naváže na imobilizovaný ligand před nanesením vzorku, ale nemělo by to znamenat, že ligand je jakýmkoli způsobem imobilizován.

Další výhodné provedení zahrnuje uvedení vzorku obsahujícího holo-TC II do kontaktu s pevným nosičem, na kterém je imobilizován holo-TC II, a značenou neimobilizovanou látkou specificky vázající holo-TC II. Volný holo-TC II ve vzorku a imobilizovaný holo-TC II soutěží o vazbu se značeným neimobilizovaným ligandem a stanovení značeného ligandu navázaného na pevnou fázi nebo zbývajících v roztoku umožní výpočet koncentrace holo-TC II. Ve zvláště výhodném provedení předkládaného vynálezu je značeným neimobilizovaným ligandem vázajícím holo-TC II protilátka.

V ještě dalším provedení se přivede vzorek obsahující analyt, který se stanovuje, do kontaktu se značeným holo-TC II a imobilizovaným ligandem. Značený a neznačený holo-TC II soutěží o vazbu na imobilizovaný ligand a po dosažení ekvibrace je množství značeného holo-TC II,

navázaného na imobilizovaný ligand, nepřímo úměrné množství holo-TC II ve vzorku, o který se zajímáme. Značený holo-TC II může být opět detekován přímo nebo nepřímo a může být stanoven jako množství holo-TC II navázaného nebo nenavázaného na pevný nosič podle potřeby.

5 V dalším provedení předkládaného vynálezu se neimobilizovaný, ale imobilizovatelný ligand specifický pro komplex holo-TC II (například ligand konjugovaný s biotinem nebo jiným členem specifického vazebního páru) přivede do kontaktu se vzorkem za vytvoření komplexu holo-TC II/neimobilizovaný ligand. Komplex ligand/holo TC II může být potom z roztoku vysrážen použitím známých prostředků a izolován pro analýzu.

10 V ještě dalším provedení vynálezu se ke vzorku přidají dva značení vazební partneri, popřípadě po předběžném kroku jako je odstranění apoforem TC II a HC ze vzorku. Vazební partneri jsou v tomto případě označený holo-TC II nebo jeho analog nebo fragment a jejich značený vazebný partner, například značená protilátka. V tomto provedení se detekovatelný signál vytváří pouze ze značek, které jsou ve vzájemné těsné blízkosti, tj. jestliže se dva značení vazební partneri na sebe navážou. Navíc ke vzorku se tedy značený vazebný partner pro holo-TC II může navázat buď na neznačený holo-TC II přítomný ve vzorku, přičemž v tomto případě se nevytvoří žádný detekovaný signál, nebo na značený holo TC II nebo jeho analog, fragment nebo variantu, který se váže na značeného vazebního partnera TC II, přičemž v tomto případě se detekovatelný signál vytvoří.

Pro zařazení do tohoto provedení jsou vhodné značící látky jako jsou testy Amersham scintillation proximity assays, popisované v patentu US 4 568 649, které umožní vysokou citlivost této metody a jsou vhodné pro testy, kde je analyt přítomen v takto nízké koncentraci. Tak například jeden člen vazebního páru by mohl být označen β -emitujícím nuklidem jako je ^{125}I nebo H^3 a druhý člen je označen vhodnou scintilační molekulou. Emitované částice β ztrácejí energii v obklopujícím vodném prostředí, pokud není scintilační látka ve vzdálenosti menší než 1,5 μm , což vyžaduje vzájemnou vazbu obou značených partnerů pro vznik detekovatelného signálu. Pravděpodobnost vazby dvou značených partnerů navzájem je určována koncentrací holo-TC II přítomného ve vzorku, takže čím vyšší signál se vytváří, tím nižší je koncentrace holo-TC II ve vzorku.

Jak se zde používá, termíny „stanovení“ nebo „zjištění“ zahrnují jak kvantifikaci ve smyslu získání absolutní hodnoty množství nebo koncentrace holo-TC II nebo kobalaminu navázaného na TC II ve vzorku, a také semikvantitativní a kvalitativní zjišťování nebo stanovení. Může být získán index, poměr, procento nebo podobný ukazatel hladiny nebo množství kobalaminu navázaného na TC II, například relativní k celkovému množství kobalaminu.

40 Tělesný vzorek používaný v testovací metodě podle předkládaného vynálezu může být jakýkoli vzorek s obsahem kobalaminu, například tělesná tekutina nebo vzorek tkáně nebo suspenze atd. S výhodou však bude vzorek tělesná tekutina, například semenná tekutina, cerebrospinální tekutina nebo amniotická tekutina, ale obecně bude vzorek odvozený z krve. Jestliže tomu tak je, vzorek použitý pro analýzu je s výhodou bezbuněčný, například může být použito sérum nebo plazma. Vzorek může být před použitím při testovací metodě zpracován, například může být zředěn přídatkem pufru nebo jiného vodného média a může být před analýzou skladován nebo uchováván například za chlazení nebo mrazení.

Při provádění předkládaného vynálezu, jestliže se navázaná frakce odděluje od nenavázané frakce, může být tato operace prováděna jakýmkoli vhodným způsobem, například srážením, 50 centrifugací, filtrací, chromatografickými způsoby apod.

Aby nevznikaly pochybnosti, termín „kobalamin“ se zde používá jako synonymum s termínem „vitamin B₁₂“ a zahrnuje všechny formy vitaminu B₁₂ (kyanokobalamin; 5,6-dimethylbenzimidazolylkyanokobamid; methylkobalamin; 5'-deoxyadenosylkobalamin), které se mohou vyskytovat 55 a jsou metabolicky aktivní (při vhodné prezentaci) v organismu.

Jak je uvedeno výše, při způsobu podle vynálezu může být stanovení kobalaminu navázaného na TC prováděno detekcí ligandu navázaného na oddělený holo-TC II, nebo provedením kompetitivního testu s použitím značeného kompetitora vůči holo-TC II, při kterém holo-TC II soutěží s tímto značeným kompetitorem o vazbu na jeho značený ligand, nebo detekcí kobalaminu uvolněného ze separovaného holo-TC II.

Detekovatelný ligand může být pohodlně označen jakýmkoli vhodným způsobem, například značkou vytvářející signál, který může být stanoven například luminiscencí, chemiluminiscencí, kolorimetrickým testem, fluorescencí, radioaktivně nebo pomocí enzymatické aktivity. Při metodě podle vynálezu může být ve skutečnosti použito jakékoli označení známé v oboru poskytující signál.

Jako příklady je možno uvést některé vhodné příklady barevných nebo fluorescenčních sloučenin, které mohou být použity pro značení vazebného ligandu tak, aby byla umožněna v rámci předloženého vynálezu detekce: antrachinony, azobarviva, azinová barviva jako jsou oxaziny a thiaziny, triaziny, v přírodě se vyskytující pigmenty jako jsou porfyriny, fykobiliproteiny, včetně fykoerythinů a fykochaninů, chlorofyly a jejich analogy a deriváty, karotenoidy, akrinidiny, xantheny včetně fluoresceinů a rhodaminů, indigová barviva, thioxantheny, kumariny, polymethiny včetně di- a triarylmethinů a jejich derivátů, nebo ftalocyaniny a kovové ftalocyaniny.

Podobně je možno jako značku vytvářející signál v části reakčního činidla použít v rámci předkládaného vynálezu široké rozmezí radioaktivních sloučenin, například sloučeniny značené jodem 125.

Alternativně mohou být vazebné ligandy konjugovány s přírodními nebo syntetickými sloučeninami, které mohou produkovat chemiluminiscenční signál, který může být známým způsobem zjišťován (Cormier, M. J. a další; Chemiluminiscence a Bioluminiscence, Plenum Press, New York 1973). Mezi vhodné chemiluminiscenční sloučeniny patří luciferin, estery kyseliny šťavelové, 1,2 dioxethan, luminol nebo jeho deriváty, ale možné sloučeniny nejsou na uvedené příklady omezeny. Pokud to bude vhodné, mohou být pro získání chemiluminiscenčního signálu z molekul produkujících signál použity například peroxid vodíku, enzymy, například luciferáza nebo další chemická činidla.

Silně aniontové molekuly vytvářející signál nemusí být při metodě podle předkládaného vynálezu výhodné, protože mají sklon vázat na sérové proteiny, jako je lidský sérový albumin (HSA), které mohou být přítomny ve vzorku. Zvláště vhodné příklady, které mohou být použity, jsou fluoresceinisothiokyanát, rhodamin B nebo (N-hydroxysukcinimidester) kyseliny N (resorufin-4-karbonyl)piperidin-4-karboxylové nebo resolátky.

Podle jednoho provedení metody podle vynálezu může být frakce obsahující alespoň část TC II oddělena od vzorku tělesné tekutiny reakcí tělesné tekutiny s vazebným ligandem specifickým pro TC II a potom oddělením frakce navázané na TC II od zbytku vzorku, čímž se cílový analyt ve vzorku izoluje a zakoncentruje. V jednom provedení vynálezu může být pro stanovení komplexu TC II-kobalamin, přítomného v oddělené navázané frakci, použit detekovatelný vazebný ligand proti holo-TC II. Holo-TC II vazebný ligand může být přiveden do kontaktu s testovaným vzorkem před, současně nebo po kontaktu s vazebným ligandem TC OO a před nebo po oddělení frakce navázané na TC II od zbytku vzorku.

Odpovídajícím způsobem může být od zbytku vzorku oddělena frakce obsahující kobalamin (například obsahující holo-TC II a holo-HC) reakcí testované tělesné tekutiny s imobilizovaným nebo navázaným kobalaminem neb jeho analogem nebo fragmentem, který váže apo-TC II a apo-HC, a oddělením od navázané frakce zbytku vzorku s obsahem holo-TC II a holo-HC. Detekovatelný vazebný ligand TC II může být potom použit pro detekci komplexu TC II-kobalamin, přítomného v oddělené frakci. Detekovatelný vazebný ligand TC II může být přive-

den do kontaktu s testovaným vzorkem před, současně s nebo po kontaktu s navázaným kobalaminem a před nebo po oddělení navázané frakce od zbytku vzorku.

5 V některých provedeních mohou být imobilizované ligandy pro jednu nebo další složky komplexů apo a/nebo holo TC II/HC uspořádány do kolony. Tělesná tekutina obsahující komplex TC II – kobalamin může být nanesena na kolonu a přivedena do kontaktu s vazebným ligandem nebo ligandy. Kolona může být proplachována nebo promývána a může být použit eluent v případě potřeby pro uvolnění navázané frakce z kolony a její jímání.

10 Jestliže mají být analyzovány složky nenavázané frakce popřípadě spolu s dalšími složkami, kolona by měla být s ohledem na další složky promyta pufrům nebo médiem použitím kalibrované mikropipety pro zajištění přesného známého objemu nanesené a jímání tekutiny. Nanesený objem je s výhodou do 3 % požadovaného (tj. kalibračního) objemu, výhodněji 1 nebo 2 %. Podobně, jestliže se má analyzovaná frakce z kolony před detekcí uvolnit, eluent použitý pro
15 uvolnění komplexu by měl být nanášen použitím kalibrované mikropipety.

V alternativním provedení mohou být vazebné ligandy použité pro separaci frakce vzorku imobilizovány na pevné fázi nosiče ve formě částic, například latexových nebo polymerových kulič-
20 kách. Aby byla usnadněna manipulace a separace, mohou být samozřejmě ve výhodném provedení předkládaného vynálezu použity magnetické kuličky. Termín „magnetický“, jak se zde používá, znamená, že nosič je schopen při vložení do magnetického pole získat magnetický moment. Jinými slovy, nosič obsahující magnetické částice může být snadno odstraněn shromážděním v magnetickém poli, což poskytne rychlou, jednoduchou a účinnou cestu pro oddělení frakcí po navázání ligandu.

25 Použitím metody podle vynálezu mohou být tedy magnetické částice s navázaným komplexem TX II – kobalamin odstraněny na vhodný povrch použitím magnetického pole, například použitím permanentního magnetu. Obvykle dostačuje přiložit magnet na stranu nádoby obsahující směs vzorku, aby bylo dosaženo seskupení částic u stěny nádoby a jejich izolace pro další ana-
30 lyzu.

Zvláště výhodné jsou superparamagnetické částice, například částice popisované Sintefem v EP-
A 106873, protože je možno zabránit magnetické agregaci a tvorbě shluků částic při reakci. Pro použití v rámci předkládaného vynálezu mohou být zvláště vhodné známé magnetické kuličky
35 vyráběné firmou Bang Practices (USA).

Při provádění testovací metody podle vynálezu budou také obecně kromě zkoumaných vzorků testovány kalibrační vzorky se známým obsahem komplexu holo–TC II. Tato stanovení mohou
40 být použita pro vynesení kalibrační křivky, ze které může být určen obsah kobalaminu navázaného na TC II přítomného v testovaném vzorku. Povaha kalibračních vzorků a volba faktorů pro převádění nebo nastavení při stanovení komplexu holo–TC II se může lišit například v závislosti na konkrétních při vazbě použitých ligandech a krocích separace při testu a jiných znacích metody, které ovlivňují vazbu a oddělování ze vzorku, jako jsou například složení pufru, pod-
45 mínky testu apod. Typicky budou mít kalibrační vzorky obsah holo–TC II 0 až 300 pmol/l. Referenční rozmezí, uvnitř kterého se budou obecně pohybovat nalezené hodnoty pro kobalamin navázaný na TC II, bude 30 až 160 pmol/l.

Kalibrační standard holo–TC II může být typicky lidský, přírodní nebo rekombinantní holo–TC
50 II. Použití holo–TC jako kalibrátoru v testech holo–TC II je nové a tvoří další provedení vynálezu.

Z ještě dalšího hlediska poskytuje vynález kit pro diagnostický test podle předkládaného vynálezu, přičemž tento kit obsahuje:

imobilizovaný nebo imobilizovatelný specifický vazebný ligand pro TC II nebo holo–TC II;

s výhodou roztok holo-TC II známé koncentrace a výhodněji sadu takových roztoků s určitým rozmezím koncentrací komplexu holo-TC II;

popřípadě uvolňovací činidlo pro uvolnění kobalaminu od holo-TC II; a

popřípadě značený ligand.

5

Testovací způsob podle vynálezu určuje metabolicky aktivní zásobu (pool) kobalaminu stanovením komplexu holo-TC II nebo izolací komplexu holo-TC II a potom stanovením s tímto komplexem spojeného kobalaminu před nebo po nástupu klinických projevů této deficiencie. Testovací metoda může být s výhodou použita před nástupem příznaků, protože má přesnou předpověd

10

řící hodnotu negativní rovnováhy kobalaminu.

Předkládaný vynález bude nyní ilustrován na následujících neomezu

15

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 je standardní křivka pro holo-TC II;

20

obr. 2 je vynesení ukazující vztah mezi celkovou koncentrací kobalaminu v séru a koncentrací holo-TC II; a

obr. 3 je vynesení ukazující vztah mezi celkovou koncentrací kobalaminu v séru a koncentrací holo-HC.

25

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

30 K alikvotu séra (100 až 500 μ l) se přidá nadbytek biotinylovaného kobalaminu tak, aby se navázal veškerý apo-TC II a apo-HC. Po inkubaci 10 min se na vzorek séra působí magnetickými částicemi potaženými avidinem 10 min. Částice se ponechají sedimentovat užitím silného magnetu. Supernatant se oddělí a smísí se dvěma nepřekrývajícími se monoklonálními protilátkami anti-TC II, přičemž jedna je radioaktivně značená I^{125} a druhá je konjugována s biotinem. Po 35 10 min se přidají magnetizovatelné částice potažené avidinem a ponechají se vázat na biotinylované addukty 10 minut. Potom se provede sedimentace částic silným magnetem a promytí PBS. Změří se radioaktivita a koncentrace holo-TC II se stanoví interpolací na standardní křivce.

40

Příklad 2

Stejným způsobem jako v příkladu 1, ale s odstraněným apo-TC II, se sérum smísí s pevným množstvím I^{125} značeného holo-TC II a omezeným množstvím protilátky anti-TC II imobilizované na magnetizovatelných částicích. Po inkubaci 15 min se provede sedimentace částic použitím silného magnetu. Částice se promyjí PBS a měří se radioaktivita.

45

Příklad 3

50 Kobalamin se imobilizuje na magnetizovatelné mikročástice, například kovalentní vazbou nebo použitím vazby biotin-(strept)avidin. Typicky se magnetizovatelné mikrokuličky potažené streptavidinem inkubují s 1 μ M biotinylovaným kobalaminem 30 min při laboratorní teplotě a v temnu. Kuličky se usadí pomocí magnetu, dvakrát promyjí PBS a resuspendují v 1% koncentraci v PBS + 5 mg/ml HSA. K alikvotu séra (100 až 500 μ l) se přidá stejný objem PBS a 1/10 objemu

magnetizovatelných mikrokuliček potažených kobalaminem. Směs se inkubuje 30 min při laboratorní teplotě v temnu, aby se navázal veškerý apoTCII a apoHC. Částice se ponechají sedimentovat pomocí magnetu a supernatant se oddělí a smísí se s nepřekrývajícími se monoklonálními protilátkami proti lidskému TC II, jednou radioaktivně značenou I^{125} a druhou konjugovanou s biotinem. Po 10 min se přidají (strept)avidinem potažené magnetizované mikrokuličky a ponechají se vázat biotinylované addukty po dobu 10 min. Potom se provede sedimentace částic magnetem a promytí PBS. Radioaktivita se měří a koncentrace holo-TC II se stanoví interpolací na standardní křivce.

Příklad 4

Provedení je stejné jako v příkladu 3, ale nadbytek biotinylovaného kobalaminu se přidá přímo ke vzorku séra + PBS, aby se navázal veškerý apoTCII a apoHC. Po inkubaci 10 min se na vzorek séra působí (strept)avidinem potaženými magnetizovatelnými mikrokuličkami 30 minut při laboratorní teplotě v temnu.

Příklad 5

Králičí protilátka specifická pro lidský TC II se zdánlivou vazebnou konstantou $>5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ byla imobilizována na magnetizovatelných mikrokuličkách o průměru 1 μm potažených kozí protikráličí IgG protilátkou (Indica Diagnostics). Vzorky séra po 400 μl od každého z 49 zdravých dobrovolníků se smíchají se stejným objemem PBS a 40 μl imobilizované protilátky (1 %). Směsi byly udržovány při laboratorní teplotě v temnu 1 h a potom byla provedena sedimentace mikročástic použitím magnetu. Sraženiny byly jednou promyty ledovým promývacím pufrem (PBS plus 0,02% Tween 20) a potom byly resuspendovány v 50 μl 50mM dithiothreitolu, 0,001% kyanidu draselného a pevným množstvím látky $^{57}\text{Co}\text{-CN-Cobalamin}$ (Amersham) ve fosfátovém pufru, pH 7,5. Směs byla ponechána stát 30 min při laboratorní teplotě a potom bylo přidáno 25 μl 0,5M hydroxidu sodného a o 15 min později 300 μl vnitřního vektoru imobilizovaného na dextranu (dostatečné množství pro navázání 50 % stopovací látky) v borátovém pufru, pH 8,6. Po 1 h při laboratorní teplotě v temnu byly vzorky centrifugovány při 1000 g a 4 °C 10 min, supernatanty byly opatrně odstraněny a sedimenty byly počítány na přístroji Packard Riasar. Koncentrace kobalaminu navázaného na TC II byla zjišťována ze standardní křivky zkonstruované pomocí osmi kalibrátorů (0 až 500 pM holo-TC II), které byly zpracovány stejným způsobem jako vzorky. Bylo také analyzováno 37 vzorků séra s ohledem na celkové množství kobalaminu v séru použitím testu Abbot IMx B12.

Standardní křivka pro holo-TC II je ukázána na obr. 1 a vztah mezi celkovou koncentrací kobalaminu v séru a koncentracemi holo-TC II u 37 zdravých dobrovolníků je ukázán na obr. 2. Je zřejmé, že korelace je nízká, s hodnotou koeficientu $r^2 = 0,50$. Naopak korelace mezi koncentrací holoHC a celkovou koncentrací kobalaminu v séru je vysoká, $r^2 = 0,96$ (obr. 3). Průměrná koncentrace holoTC pro 49 zdravých dobrovolníků byla $64 \pm 28 \text{ pM}$ a 95% referenční rozmezí je 23 až 127 pM.

U testu je hodnota CV 10 %, analytická citlivost (0 kalibrátor – 3 standardní odchylky) nižší než 10 pM a nedochází ke zkřížené reakci s haptokorinem.

PATENTOVÉ NÁROKY

5

1. Způsob stanovení kobalaminu navázaného na transkobalamin II, TC II, v tělesném vzorku, **vyznačující se tím**, že se bezbuněčný vzorek tělesné kapaliny přivede do kontaktu s imobilizovaným kobalaminem nebo jeho analogem nebo fragmentem, který selektivně váže apoformy TC II a haptokorin, a potom se tento vzorek přivede do kontaktu s imobilizovaným nebo imobilizovatelným specifickým vazebným ligandem pro TC II nebo pro TC II navázaný na kobalamin, (holo-TC II), frakce navázaná na ligand se oddělí od frakce nenavázané na ligand a měří se obsah holo-TC II nebo kobalaminu navázaného na TC II ve vzorku.

10

2. Způsob stanovení podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že specifický vazebný ligand se volí ze skupiny zahrnující polyklonální nebo monoklonální protilátku, fragment protilátky, polypeptid, oligopeptid, malou organickou molekulu, specifickou vazebnou molekulu zvolenou ze sbírky kombinační chemie nebo sbírky prezentované lágem, specifickou vazebnou sekvencí DNA nebo RNA nebo receptor buněčného povrchu.

15

3. Způsob stanovení podle některého z nároků 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že specifický vazebný ligand má vysoký stupeň selektivity a specifity vzhledem k TC II a má nízkou afinitu vzhledem k jiným proteinům TC, buď v apo-, nebo holoformě, nebo jiným proteinům vázajícím kobalamin.

20

4. Způsob stanovení podle některého z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že kobalamin se uvolňuje z molekul holo-TC II změnou teploty nebo pH okolního prostředí.

25

5. Způsob stanovení podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že uvolněný kobalamin se stanovuje kompetitivním testem prováděným uvedením do kontaktu imobilizovaného vazebného partnera pro kobalamin s disociovaným kobalaminem vzorku v přítomnosti značeného ligandu, který soutěží s izolovaným kobalaminem o vazbu na imobilizované vazebné partnery.

30

6. Způsob stanovení podle některého z nároků 1 až 5, **vyznačující se tím**, že zahrnuje uvedení pevného nosiče, který má na sobě imobilizovaný vazebný ligand pro TC II nebo holo-TC II, do kontaktu se zkoumaným vzorkem a rovněž s neimobilizovaným ligandem,

35

příčemž tento imobilizovaný ligand je schopen vázat se na TC II nebo holo-TC II, na neimobilizovaný ligand nebo na komplexy TC II nebo holo-TC II a neimobilizovaného ligandu, a kde neimobilizovaný ligand je schopen vázat se na alespoň jeden z imobilizovaných ligandů. TC II nebo holo-TC II a komplexy tohoto imobilizovaného ligandu a TC II nebo holo-TC II;

40

příčemž jestliže je tato testovací metoda sendvičového typu, alespoň jeden z ligandů je specifický pro holo-TC II, a jestliže je test kompetitivního typu, imobilizovaný ligand je specifický pro holo-TC II a jeho kompetitory;

příčemž podíl imobilizovaného ligandu vázaného TC II nebo holo-TC II, neimobilizovaným ligandem nebo komplexy neimobilizovaného ligandu a TC II nebo holo-TC II je závislý na množství holo-TC II přítomného ve vzorku, a

45

neimobilizovaný ligand je schopen vytvářet v navázaném nebo nenavázaném stavu přímo nebo nepřímo detekovatelný signál;

navázaná frakce se oddělí od nenavázané frakce: a

přímo nebo nepřímo se stanoví neimobilizovaný ligand navázaný na imobilizovaný ligand, tj. navázaná frakce, nebo nenavázaný a v roztoku, tj. nenavázaná frakce;

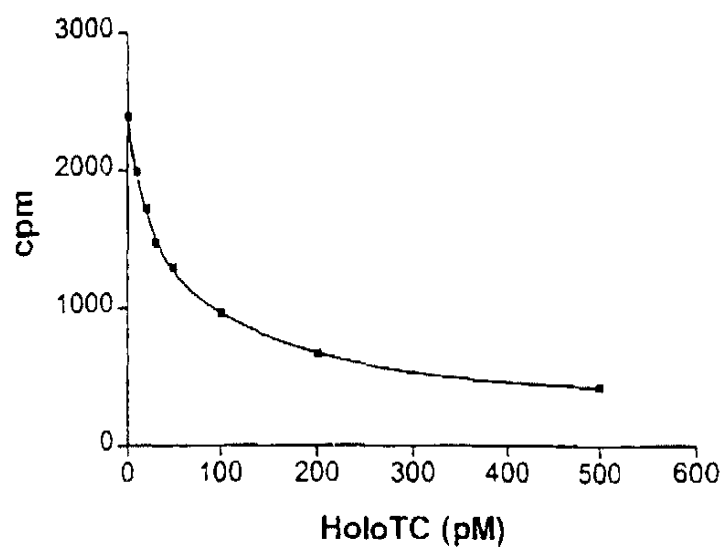
50

příčemž uvedení vzorku a neimobilizovaného ligandu do kontaktu s pevným nosičem se může provádět odděleně, současně nebo postupně, a jestliže se provádí odděleně nebo postupně, může se provádět v jakémkoli pořadí.

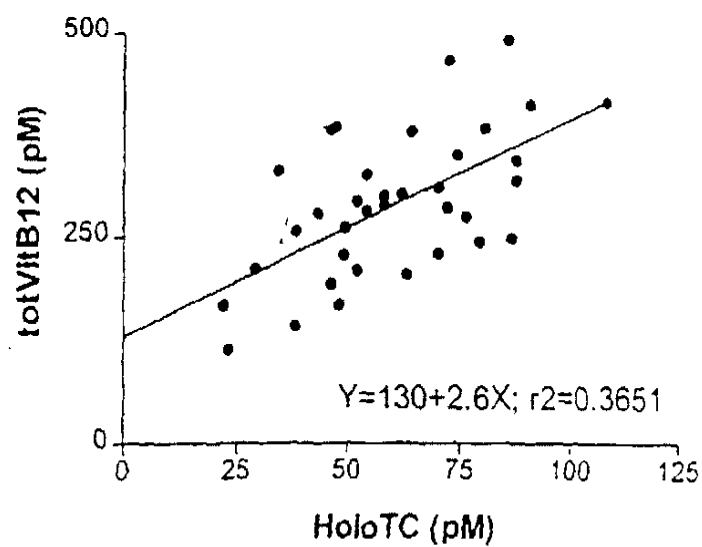
7. Způsob stanovení podle některého z nároků 1 až 6, **vyznačující se tím**, že ligand, který váže TC II, má afinitní konstantu alespoň 10^9 M^{-1} .
- 5 8. Způsob stanovení podle některého z nároků 1 až 7, **vyznačující se tím**, že afinitní konstanta je vyšší než 10^{11} M^{-1} .
9. Způsob stanovení podle některého z nároků 1 až 8, **vyznačující se tím**, že stupeň zkřížené reaktivity vazebného ligandu holo-TC II nebo vazebného ligandu TC II s HC je mezi
10 0,1 % a 1 %.
10. Způsob stanovení podle některého z nároků 1 až 9, **vyznačující se tím**, že stupeň zkřížené reaktivity vazebného ligandu holo-TC II nebo vazebného ligandu TC II s HC je méně než 0,1 %.
- 15 11. Způsob stanovení podle některého z nároků 1 až 10, **vyznačující se tím**, že vzorek obsahující komplex holo-TC II se uvede do kontaktu s pevnou fází, na kterou je navázán značený ligand rozpoznávající stejná vazebná místa na imobilizovaných ligandech jako holo-TC II; holo-TC II ve vzorku soutěží s navázaným značeným ligandem o tato vazebná místa, takže po ekvili-
20 braci systému existuje přímo úměrný vztah mezi množstvím značeného ligandu vytěsněného z tohoto pevného nosiče a detekovatelného v roztoku a množstvím holo-TC II přítomného v původním vzorku; kde značený ligand se detekuje podle potřeby přímo nebo nepřímo jako množství značeného ligandu navázaného nebo nenavázaného na pevný nosič.
- 25 12. Způsob stanovení podle některého z nároků 1 až 11, **vyznačující se tím**, že vzorek obsahující holo-TC II se uvede do kontaktu s pevným nosičem, který má na sobě imobilizován holo-TC II, a značenou neimobilizovanou látkou, která se specificky váže na holo-TC II, přičemž volný holo-TC II ve vzorku a imobilizovaný holo-TC II soutěží o vazbu se značeným neimobilizovaným ligandem; a provede se stanovení značeného ligandu navázaného na pevnou fázi
30 nebo zbylého v roztoku umožňující určení koncentrace holo-TC II.
13. Způsob stanovení podle některého z nároků 1 až 12, **vyznačující se tím**, že vzorek obsahující holo-TC II se uvede do kontaktu se značeným holo-TC II a jeho imobilizovaným ligandem; značené a neznačené komplexy holo-TC II soutěží o vazbu na imobilizovaný ligand a
35 po dosažení rovnováhy je množství značeného holo-TC II navázaného na imobilizovaný ligand nepřímo úměrné množství holo-TC II ve vzorku.
14. Způsob stanovení podle některého z nároků 1 až 13, **vyznačující se tím**, že tělesný vzorek se volí ze skupiny vzorku semenné tekutiny, cerebrospinální tekutiny, amniotické tekutiny
40 nebo vzorku odvozeného z krve.
15. Způsob stanovení podle nároku 14, **vyznačující se tím**, že vzorkem odvozeným z krve je sérum nebo plazma.
- 45 16. Způsob stanovení podle některého z nároků 1 až 15, **vyznačující se tím**, že navázaná frakce se oddělí od uvedené nenavázané frakce srážením, centrifugací, filtrací nebo chromatografickými metodami.
17. Způsob stanovení podle některého z nároků 1 až 16, **vyznačující se tím**, že detekovatelný ligand je značený značkou vytvářející signál, který může být stanoven jako luminiscence, chemiluminiscence, kolorimetrické stanovení, fluorescence, radioaktivita nebo jako enzymatická
50 aktivita.
18. Způsob stanovení podle některého z nároků 1 až 17, **vyznačující se tím**, že kalibrace testu se provádí použitím standardu holo-TC II.
- 55

19. Způsob stanovení podle nároku 18, **vyznačující se tím**, že standardem je lidský, přírodní nebo rekombinantní holo-TC II.
- 5 20. Kit pro použití při způsobu stanovení podle některého z nároků 1 až 19, **vyznačující se tím**, že obsahuje:
imobilizovaný kobalamin nebo jeho analog nebo fragment, který selektivně váže apoformy TC II a haptokorin; a
imobilizovaný nebo imobilizovatelný specifický vazebný ligand pro TC II nebo holo-TC II.
- 10 21. Kit podle nároku 20, **vyznačující se tím**, že navíc obsahuje roztok holo-TC II o známé koncentraci nebo soupravu takových roztoků, která obsahuje rozmezí koncentrací komplexu holo-TC II.
- 15 22. Kit podle nároku 20 nebo 21, **vyznačující se tím**, že navíc obsahuje uvolňovací činidlo pro uvolnění kobalaminu od holo-TC II.
- 20 23. Kit podle některého z nároků 20 až 22, **vyznačující se tím**, že navíc obsahuje značený ligand.
- 25 24. Použití holo-TC II jako kalibrátoru při způsobu stanovení holo-TC II podle některého z nároků 1 až 19.

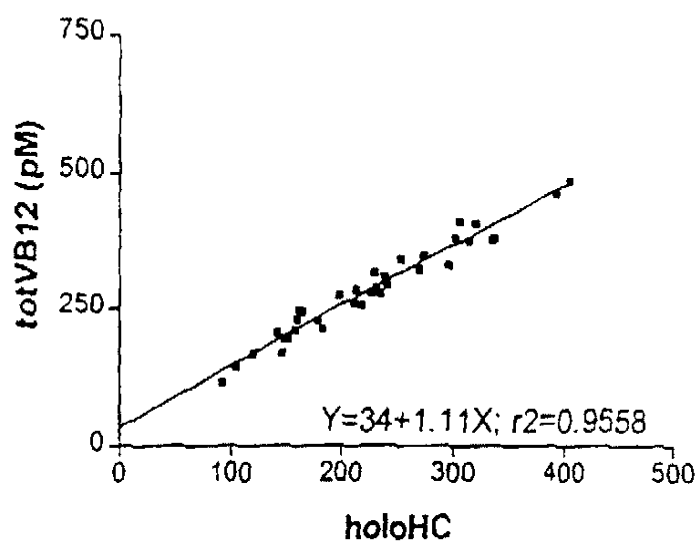
2 výkresy



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3

Konec dokumentu
