



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **327771**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

G01N 33/82 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20011353	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1999.09.20 PCT/GB99/03127
(22)	Inng.dag	2001.03.16	(85)	Videreføringsdag	2001.03.16
(24)	Løpedag	1999.09.20	(30)	Prioritet	1998.09.18, GB, 9820473
(41)	Alm.tilgj	2001.05.11			
(45)	Meddelt	2009.09.21			
(73)	Innehaver	Axis-Shield ASA, Postboks 206 Økern, 0510 OSLO			
(72)	Oppfinner	Erling Sundrehagen OSLO			
		Lars Ørming, c/o Axis-Shield ASA, Postboks 206 Økern, 0510 OSLO			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO			
(54)	Benevnelse	Analysemetode for bestemmelse av transcobalamin II-(TC II) bundet cobalamin, sett samt anvendelse av holo-TC II som kalibrator.			
(56)	Anførte publikasjoner	NEXØ E., "Characterization of the cobalamins attached to transcobalamin I and transcobalamin II in human plasma", Scand. J. Haematol., 1977, Vol.18, No.5, s.358-360. QUADROS, E. et al. "Characterization of monoclonal antibodies to epitopes of human transcobalamin II", Biochem. Biophys. Res. Comm., 1996, Vol.222, No.1, side 149-154. US 4680273 A			
(57)	Sammendrag				

Det beskrives en analysemetode for bestemmelse av transcobalamin II- (TC II) bundet cobalamin i en kroppsprøve, som omfatter at en cellefri prøve av en kroppsvæske kontaktes med en immobilisert eller immobiliserbar spesifikk bindings- ligand for TC II eller cobalamin-bundet TC II (holo TC II). separering av en ligand- bundet fraksjon fra en ikke-ligandbundet fraksjon og måling av det holo-TC II- eller TC II-bundne cobalamin-innhold i denne.

Foreliggende oppfinnelse vedrører analysemetoder for bestemmelse av transcobalamin II-(TCII) bundet cobalamin, sett samt anvendelse av holo-TCII som kalibrator.

Foreliggende oppfinnelse vedrører følgende analysemetoder for bestemmelse
5 av cobalamin eller vitamin B₁₂ i en kroppsvæske og særlig analysemetoder for bestemmelse av det metabolsk aktive cobalamin-forråd.

Cobalamin eller vitamin B₁₂ er et vannløselig vitamin som utgjør en del av det vitamin B-kompleks som finnes i næringsmidler. Kjernemolekylet består av en corrin-ring av fire pyrrolenheter som omgir det essensielle koboltatom. Cobalamin er
10 det eneste vitamin som ikke kan syntetiseres av dyr eller planter og må absorberes i tarmen fra mat. Det kan imidlertid lagres i leveren. Det syntetiseres av mikroorganismer, særlig av anaerobe bakterier og gjær.

Cobalamin virker *in vivo* som et ko-enzym, og cobalamin-enzym katalyserer tre typer reaksjoner: (i) intra-molekylære omløpninger, for eksempel dannelsen av
15 succinyl CoA fra L-metylmalonyl CoA, (ii) metyleringer, for eksempel dannelsen av metionin ved metylering av homocystein og (iii) reduksjon av ribonukleotider til deoksyribonukleotider i enkelte mikroorganismer. I pattedyr er bare to enzymreaksjoner, nemlig de nevnt under (i) og (ii) ovenfor, kjent for å fordele cobalamin som ko-enzym.

20 Under fordøyelsesprosessen binder et protein i spytt, betegnet haptocorrin, heretter omtalt som HC (som på området også omtales som R-binder eller kollektivt som transcobalaminene I og III) cobalamin i den øvre gastrointestinaltrakt under dannelsen av et kompleks som passerer gjennom mavesekken. Pankreatiske enzymer fordøyer cobalamin-haptocorrin- (holo-HC) komplekset i ileum, under
25 frigjøring av cobalamin som så bindes til et protein betegnet intrinsisk faktor, som utskilles av maveslimhinnen under dannelsen av et ytterligere kompleks. Komplekset av cobalamin-intrinsisk faktor bindes til en spesifikk reseptor på den innvendige kledning den terminale ileum, hvorefter det dissosieres av en frigjøringsfaktor og cobalaminet transporteres aktivt gjennom membranen av ileum inn i blodstrømmen.

30 Cobalamin sirkulerer ikke i kroppen i fri form i nevneverdig mengde. Antagelig er omkring 99% av cobalaminet bundet av ett av transcobalaminproteinene (TC I-III) eller albumin.

Det protein som antas å være ansvarlig for transportering av cobalamin til målvev, er transcobalamin II (TC II), et avgjørende sporprotein som cobalamin ikke

kan krysse cellemembraner uten. På tross av denne viktige metabolske funksjon er bare ca. 6-25% av cobalaminet i serum bundet til TC II og det meste båret av HC. TC II er et enkeltkjede-polypeptid på 45 kDa som primært finnes i serum, sædvæske og cerebrospinalvæske. Cobalamin-bundet TC II eller holo-TC II, fester seg til

5 spesifikke reseptorer på cellemembraner og holo-TC II-komplekset tas, når det er bundet, inn i celler ved pinocytose.

TC II syntetiseres av leveren, vaskulært endotel, enterocytter, makrofager og fibroblaster og sirkulerer hovedsakelig som apo-TC II, dvs. mangler bundet cobalamin. Det har en kort halveringstid på ca. 90 minutter.

10 Mindre enn en fjerdedel av det totale plasma cobalamin er assosiert med TC II. Resten er som nevnt ovenfor, bundet til de øvrige transcobalaminene eller til albumin.

Siden cobalamin må absorberes fra mat, kan enhver tilstand som resulterer i nedsatt gastrisk funksjon, for eksempel gastroenteritt, eller tilstander som resulterer i

15 gastrisk atrofi eller manglende evne til å produsere funksjonelt haptocorrin, intrinsisk faktor, frigjøringsfaktor, TC II eller TC II-reseptorer, resultere i svekket opptak av cobalamin og resulterende mangel.

Enkelte undergrupper av populasjonen, for eksempel eldre, gravide kvinner, pasienter med kronisk eller akutt gastrointestinal sykdom, de som lider av enkelte

20 autoimmunsykdommer, de med en familiær pernisiøs anemi og AIDS-offere, er særlig utsatt for cobalamin-mangel.

De kliniske manifestasjonene av cobalamin-mangel er varierte og tallrike, men involverer primært, anemi, megaloblastisk hematopoese og funksjonelle og

25 strukturelle forstyrrelser av nervesystemet. Omkring 60% av individer diagnostisert som i underskudd av cobalamin, er anemiske, men hos mange er neurologiske symptomer de eneste kliniske tegn som observeres. Omkring 10% av pasientene oppviser psykiatriske symptomer, og omkring 40% oppviser både neurologiske og psykiatriske symptomer.

Tidlig diagnostisering av cobalamin-mangel er avgjørende for å sikre

30 pasientene god prognose, siden enkelte av manifestasjonene av cobalamin-mangel, særlig de neuropsykiatriske virkningene, er irreversible dersom de ikke hurtig påvises og lindres ved cobalamin-terapi.

Det er derfor ønskelig å kunne fastslå nøyaktig cobalamin-nivået til et individ på en rask og effektiv måte, med det formål å fastslå hvorvidt vedkommende individ kan lide av cobalamin-mangel eller ikke.

Måling av totalt plasma-cobalamin, dvs. cobalamin (og cobalamin-lignende substanser) bundet til hvilket som helst av transcobalamin- (TC) proteinene I, II og III, har vært benyttet i forsøk på å måle cobalamin-mangel. Denne teknikk resulterer i en bred konsentrasjonsfordeling innenfor en befolkning, som ansees å være normal og som derfor frembringer et bredt referanseområde. I enkeltindivider er imidlertid det tilgjengelige cobalamin-området som ansees normalt for vedkommende individ, meget snevert. Det har vært observert at selv om et individs metabolsk aktive cobalaminkonsentrasjon har forskjøvet seg ut over deres eget referanseområde, har deres totale plasma-cobalamin-innhold forblitt innenfor det området som ansees normalt for befolkningen. Under slike omstendigheter kan cobalamin-mangel forbli upåvist. En slik upålitelig metode er selvsagt lite ønskelig, og det er velkjent at slike serum- eller plasma-cobalamin-målinger har lav diagnostisk følsomhet og spesifisitet.

Mikrobielle målinger som involverer mikroorganismer som for sin vekst er avhengig av cobalamin, er blitt utviklet og benyttet til måling av cobalamin-konsentrasjon i plasma, men i tillegg til vanskeligheten med å bestemme det riktige referanseområdet, fordrer disse metodene ekstraksjon og omdannelse av cobalaminene som er meget tidkrevende, besværlig og fullstendig uegnet for hurtig laboratoriemessig screening.

Alternative metoder for bestemmelse av cobalamin-mangel innebærer måling av akkumuleringen i plasmaet av metabolitter som fordrer cobalamin for deres omdannelse. Nivået av plasma-metylmalonat og plasma-homocystein tiltar hos individer med cobalamin-mangel (Chanarin, *The megaloblastic anaemia*; London, Blackwell Scientific Publications, 1991) og gir gode kandidatmolekyler for korrelasjon med vitamin B₁₂-mangel. Metoder basert på homocysteinbestemmelse har imidlertid også vist seg å være kompliserte og upraktiske og oppviser liten spesifisitet og følsomhet. Mens metoder basert på metylmalonat-måling er nøyaktige og pålitelige, er de imidlertid arbeidskrevende og fordrer analyse ved kombinert gasskromatografi/-massespektrometri og er følgelig kostbare og igjen uegnet for rutinemessig klinisk screening (Nexø *et al.*, (1994) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 54:61-76).

Det har også vært antydnet at måling av TC II-bundet cobalamin, i motsetning til totalt plasma-cobalamin, kunne utgjøre en pålitelig klinisk indikator på sann-

synligheten for cobalamin-mangel (Herbert *et al.*, (1990) Am. J. Hematol. 34:132-139; Wickramasinghe & Fida (1993) J. Clin. Pathol. 46:537-539; US-patent 4680273). Slike bestrebelser på å bestemme holo-TC II-konsentrasjon har imidlertid hittil for det meste vært indirekte, idet holo-TC II-konsentrasjonen anslås som

5 forskjellen mellom totalt plasma-cobalamin og cobalamin-konsentrasjonen av TC II utarmet plasma.

Slik TC II utarming kan oppnås ved adsorpsjon til ammoniumsulfat (Carmel (1974) Am. J. Clin. Pathol. 62:367-372), mikrosilika (Herzlich & Hubert (1988) Lab. Invest. 58:332-337; Wickramasinghe & Fida (1993) J. Clin. Pathol. 46:537-539),

10 mikrofint glass (Vu *et al.*, (1993) Am. J. Hematol. 42:202-211) eller immobiliserte anti-TC II polyklonale antistoffer (Lindemans *et al.*, (1983) Clin. Chim. Acta 132:53-61). Konsentrasjonsmålingen av cobalamin i totalt plasma og den utarmede fraksjon foretas etter velkjente metoder, som f.eks. radio- eller enzym-immunoassay teknikker. Disse metodene er uegnet for automatisert eller ikke-automatisert

15 rutine-screening fordi de er komplekse og tidkrevende og fordi den lave grad av spesifisitet av de adsorberende materialer som benyttes, resulterer i utilstrekkelig separasjon av holo-TC II og holo-HC, hvilket resulterer i en over-estimering av holo-TC II. Variasjoner mellom ulike satser av det adsorberende materialet introduserer ytterligere feil, og, viktigst av alt, resulterer subtraksjonen av et stort

20 volum fra et annet stort volum, i uakseptabel unøyaktighet og upålitelighet.

Andre forsøk på bestemmelse av TC II har involvert separasjon av TC II fra andre serumkomponenter, inklusivt TC I og TC III, ved å gjøre bruk av dets lipofili. Kapel *et al.* (1988) Clin. Chim. Acta 172:297-310, Benhayoun *et al.* (1993) Acta Haematol. 89:195-199 og Toft *et al.* (1994) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 54:62 omtaler

25 således fremgangsmåter for separering av TC II fra andre transcobalaminer ved å benytte henholdsvis heparin-sepharose, silikagel eller cellulose. Disse metodene lider imidlertid av de samme ulemper som de indirekte metodene, siden de er basert på de samme adsorberende materialene. Dessuten gjør den lave plasma-konsentrasjonen av holo-TC II disse metodene uegnet for kombinasjon med

30 eksisterende metoder for cobalamin-kvantifisering. Normalområdet for holo-TC II er 35-160 pM, og verdier under 35 pM vil i alminnelighet ansees som indikative på cobalamin-mangel. Den rapporterte analytiske følsomhet for de fleste rutinemetoder for plasma-cobalamin er ca. 40 pM, men i praksis er den ofte meget høyere, typisk

omkring 90 pM. Normale plasmanivåer av holo-TC II ligger således under eller nær følsomhetsgrensen for rutinemetodene for cobalamin-kvantifisering.

Den muligens mest nøyaktige kjente metode for bestemmelse av TC II-bundet cobalamin innebærer adsorbering av TC II til silika og deretter bestemmelse av den bundne fraksjon med henblikk på cobalamin-innhold ved å benytte enten en immunologisk analyse som beskrevet for eksempel av Kuemmerle *et al.* (1992) Clin. Chem. 38/10:2073-2077, eller en mikrobiologisk bestemmelse, hvorav sistnevnte tilsynelatende gir de beste resultater. Metoden fordrer en hel arbeidsdag for gjennomføring av kun tyve bestemmelser. Den er meget kostbar og upraktisk og lite egnet for rutinemessige kliniske diagnostiske laboratorieundersøkelser.

Det foreligger således et stort behov for forbedrede metoder for bestemmelse av nivået av metabolsk aktivt cobalamin i en kroppsvæske med det formål å korrelere cobalamin-nivået med sannsynligheten for cobalamin-mangel, som er egnet for rutinemessig klinisk diagnostisk anvendelse.

I henhold til et første aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en analysemetode for bestemmelse av transcobalamin II-(TC II)bundet cobalamin i en kroppsprøve, som omfatter at en cellefri prøve av en kroppsvæske kontaktes med et immobilisert cobalamin eller en analog eller fragment derav, som selektivt binder apo-formene av TC II og haptocorrin, med påfølgende kontakting av nevnte prøve med en immobilisert eller immobiliserbar spesifikk bindingsligand for TC II eller cobalamin-bundet TC II (holo TC II), separering av en ligandbundet fraksjon fra en ikke-ligandbundet fraksjon og måling av det holo-TC II- eller TC II-bundne cobalamin-innhold i denne.

Med en spesifikk bindingsligand menes en som binder til TC II (dvs. apo-TC II og holo-TC II) eller holo-TC II som følge av dens spesifikke kjemiske struktur eller konformasjon og ikke bare som følge av en generell fysisk-kjemisk egenskap (så som lipofili) som kan være felles for mange komponenter i en kroppsvæskeprøve. Bindingsaffiniteten og spesifisiteten av de ligander som er egnet for anvendelse for metoden gir fortrinnsvis mulighet for en 3 gangers, mer foretrukket en 5 gangers og enda mer foretrukket en 10 gangers og mest foretrukket en mer enn 10 gangers konsentrering av TC II eller holo-TC II i prøven, og en slik metode er følgelig i stand til å gi nøyaktige og pålitelige verdier for holo-TC II i det lavere normalområdet av holo-TC II og også i det subnormale området. En slik separasjon og konsentrering av målmolekylene er ikke mulig med dagens eksisterende metoder som ikke effektivt

kan separere TC II eller holo-TC II fra HC eller holo-HC. Muligheten for å konsentrere TC II eller holo-TC II minst tre ganger, tillater bruk av automatisert analyseutstyr ved utførelse av bestemmelsen. Uten et slikt konsentreringstrinn vil mengden av forekommende analytt i en prøve sannsynligvis være under den nedre påvisningsgrense. Slikt automatisert analyseutstyr fordrer typisk mellom 40 og 100 µL prøve i et totalvolum på typisk 150 µL eller mer. En lav analyttkonsentrasjon blir derved ytterligere fortynnet for analyse. Ved å benytte analysemetoden ifølge oppfinnelsen konsentreres imidlertid analytten minst 3 ganger. Siden bruk av slikt automatisert analyseutstyr i alminnelighet involverer et kontrollområde på 100-700 pM med en nedre følsomhetsgrense på ca. 40 pM, men med en praktisk nedre grense på ca. 90 pM, letter en 5 gangers konsentrering måling av holo-TC II ned til 18 pM og en 10 gangers konsentrering letter måling ned til 9 pM holo-TC II. Siden foreliggende oppfinnelse letter konsentrering mer enn 10 ganger, vil fagmannen lett innse i hvilken grad følsomheten økes, hvilket virkelig gjør den til en meget virkningsfull teknikk.

Muligheten for å konsentrere analytten slik at den er egnet for analyse ved hjelp av slike automatiserte fremgangsmåter, er en viktig fordel ved foreliggende analysemetode.

Fra en 600 µL utgangsprøve av kroppsvæske vil det utvikles fortrinnsvis et volum på opptil 150 µL, mer foretrukket opptil 100 µL og mest foretrukket mindre enn 60 µL, som så kan analyseres, eventuelt ved å benytte automatiserte prosedyrer.

Enhver TC II spesifikk bindingsligand kan benyttes for fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, enten som en innfangende, konsentrerende eller separerende ligand eller som en påvisende ligand og kan, avhengig av den bestemte utførelsesform av oppfinnelsen, binde til TC II i både apo- og holo-formen, eller den kan binde spesifikt eller fortrinnsvis til holo-formen. Den TC II-bindende ligand oppviser fortrinnsvis høy grad av selektivitet og spesifisitet overfor TC II, og vil oppvise liten eller mer foretrukket, i det vesentlige ingen, affinitet overfor andre TC-proteiner, dvs. TC I eller III; hverken i apo- eller holo-form, eller overfor et annet cobalamin-bindende protein. Dersom den TC II-bindende ligand er en holo-TC II spesifikk bindingsligand, oppvises de samme egenskaper i tillegg til det krav at liten, eller fortrinnsvis ingen affinitet oppvises overfor apo-TC II.

Den TC II eller holo-TC II-bindende ligand vil i alminnelighet enten være et antistoff, et antistoff-fragment eller en forbindelse med affinitet overfor henholdsvis TC II eller holo-TC II, så som en celleoverflatereseptor, et polypeptid, et oligopeptid, et lite organisk molekyl, etc. Andre bindingsligander kan være et spesifikt bindende middel valgt fra et kombinatorisk kjemi- eller fag-display-bibliotek eller en spesifikk bindende sekvens av DNA eller RNA.

Dersom bindingsliganden er et antistoff, kan det være polyklonalt, men bør fortrinnsvis være monoklonalt. Monoklonale antistoffer kan utvikles med vesentlig høyere spesifisitet og ensartethet enn polyklonale antistoffer, og dette reduserer kryssreaktivitet med andre komponenter i kroppsvæsken, særlig andre transcobalaminer og, om relevant, den alternative konformasjon, dvs. apo-formen av målanalytten. Den ensartethet og reproducerbarhet som monoklonale antistoffer byr på i forhold til polyklonale antistoffer, sikrer en større presisjon, noe som er vitalt for en bestemmelse hvor analytten forekommer i så lav konsentrasjon. Alternativt kan det være et antistoff-fragment som for eksempel F(ab), F(ab')₂ eller F(v) fragment. Antistoffene eller antistoff-fragmentene kan være monovalente eller divalente og kan fremstilles ved hjelp av hybridomteknologi eller være av syntetisk opprinnelse og utviklet ved rekombinant DNA-teknologi eller kjemisk syntese. Antistoffer med enkeltkjede eller andre antistoff-derivater eller mimetika vil for eksempel kunne benyttes. Antistoffet kan være rettet eller utviklet mot en hvilken som helst epitop, komponent eller struktur, av det relevante TC II eller holo-TC II-protein.

Egnede antistoffer for bruk som bindingsligander i henhold til foreliggende oppfinnelse, er omtalt for eksempel av Quadros *et al.* (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 222:149-154; McLean *et al.* (1997) Blood 89(1):235-242.

Reseptormolekyler som kan binde apo- og holo-formene av TC II eller fortrinnsvis eller spesifikt binder holo-TC II-formen, kan likeledes benyttes. Egnede reseptorer er celleoverflatereseptorer eller membran-bundne TC II eller holo-TC II-reseptorer, og kryssreaktivitetsegenskaper mellom arter betyr at slike reseptormolekyler fra en hvilken som helst pattedyrart kan benyttes, selv om opprinnelsen av slike reseptorer fortrinnsvis er fra menneske eller storfe. Selv om reseptormolekylene fortrinnsvis isoleres i en relativt renset form, kan anvendelsen av cellemembraner eller blandede membranfraksjoner som omfatter reseptorene, fortrinnsvis i konsentrert form, også være aktuell. Slike reseptorer eller reseptor-holdige membraner eller membranfraksjoner, kan med fordel isoleres fra nyre-, placenta-

eller tumorceller. Oppbevarte celler bør generelt ikke benyttes som kilde for slike reseptorer. Oppbevarte celler kan imidlertid benyttes som en kilde for haptocorrin-reseptorer.

En membranfraksjon anrikt på TC II-reseptor kan oppnås som beskrevet av
 5 Seligman *et al.*, J. Biol. Chem. 253:1766-1772 (1978) og Nexø *et al.*, Biochem. Biophys. Acta 628:190-200 (1980). Herunder kuttes vev, f.eks. human placenta eller kaninlever, i små stykker og homogeniseres i Tris-buffer, pH 7,4, inneholdende 0,15M NaCl og 10 mM EDTA, etterfulgt av sentrifugering ved 25.000 x g i 30 minutter. For å fjerne gjenværende blod gjentas homogenisering/sentrifugeringen
 10 minst én gang. Denne membranfraksjonen ekstraheres videre med overflateaktivt middel, f.eks. Ammonyx-LO, Triton X-100 eller Chapso, og klarnes ved sentrifugering ved 100.000 x g i 30 minutter ved 4°C. Supernatanten benyttes som TC-II-reseptor-kilden.

Et eksempel på et egnet reseptormolekyl som fortrinnsvis binder holo-TC II-
 15 komplekset er det 62 kDa enkeltkjedede glykoprotein som forekommer som en ikke kovalent homodimer og finnes på celleoverflaten av alle vev (Rothenberg & Quadros (1996) Balliere's Clinical Haematology 8(3) 499-514; WO 96/085150). Et annet protein som er egnet for bruk for analysemetoden ifølge oppfinnelsen, er gp300, et 600 kDa endocytose-medierende membranprotein som uttrykkes i absorberende
 20 epitelceller, for eksempel celler av de proksimale nyrekanaler omtalt og beskrevet av Moestrup *et al.* (1996) Proceedings National Academy Science 93:8612-8617). Denne reseptor er en LDL-reseptor og binder både apo- og holo-formene av TC II.

Når det benyttes en celleoverflatereseptor, kan den immobiliseres ved konjugering til en overflate, f.eks. av en kule eller et ark, eller kan det alternativt
 25 dannes en cellemembranfraksjon som inneholder reseptorene, i vesikler eller ark som fremviser reseptorene.

Der hvor liganden er immobilisert, kan dette for eksempel være på overflaten av et faststoff, f.eks. en filterfilm eller ark eller innsiden av et rør, men immobilisering på partikler, f.eks. mikrokuler av den type som fremstilles av Dyno Industrier ASA,
 30 Norge, er spesielt foretrukket. Slike partikler kan være porøse eller uporøse og kan om ønskes være forsynt med anordninger som gjør at de kan oppsamles, f.eks. ved å inkludere partikler av magnetisk responderende materiale, for eksempel super-paramagnetiske jernoksydkrystaller. Slike magnetisk responderende mikrokuler er

tilgjengelig fra Dyno Industrier ASA så vel som fra Dynal AS, Norge, Bang Particles, USA og Prolabo, Frankrike. Når liganden skal være immobiliserbar i motsetning til immobilisert, kan dette oppnås ved å koble liganden til et element av et spesifikt bindingspar (f.eks. biotin/streptavidin) og benytte det andre elementet av bindingsparet, eventuelt bundet til et substrat, til å agglomerere eller på annen måte immobilisere liganden eller ligand:TC II- eller ligand:holo-TC II-kompleksene, før separering av den ligand-bundne fraksjon fra den ubundne fraksjon, ved utførelse av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen.

Det er på området velkjent å immobilisere affinitetsmolekyler, f.eks. antistoffer og antistoff-fragmenter, for separasjonsformål, for eksempel ved binding eller kobling av ligandene, eventuelt ved hjelp av en linker, til en hvilken som helst av de velkjente faste bærere eller matrikser som for tiden har utstrakt anvendelse eller er foreslått for separasjon eller immobilisering på kolonner, og en hvilken som helst kjent metode på dette området skulle kunne benyttes. Slike faste faser kan ha form av partikler, ark, gel, filtere, membraner, fibre eller kapillærer eller mikrotiterstrimler, rør eller brønnplater, etc., og kan lett fremstilles av glass, silika, lateks eller et polymert materiale. Teknikker for binding av liganden til den faste bærer er også høyst velkjent og omfattende beskrevet i litteraturen.

Kobling av liganden til et substrat eller til et element av et spesifikt bindingspar kan oppnås ved å benytte konvensjonelle teknikker.

Dersom bestemmelsen i henhold til fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen foretas som en kompetitiv bindingsbestemmelse, vil den i alminnelighet medføre at prøven tilsettes en merket forbindelse som konkurrerer om binding til liganden. Generelt vil bruk av merket holo-TC II foretrekkes i denne henseende. Merkingen som benyttes kan være en hvilken som helst merking som kan bestemmes direkte eller indirekte, f.eks. en kromofor (en betegnelse som her innbefatter fluoroforer), en radioaktiv merking (i alminnelighet kovalent bundet eller chelat-bundet), et enzym eller enzym-substrat, en magnetisk merking, etc.

I henhold til en foretrukket utførelsesform involverer fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse at en immobilisert eller immobiliserbar TC II- eller holo-TC II-bindingsligand kontaktes med den prøve som skal undersøkes;

separering av en ligand-bundet fraksjon fra en ikke-ligand-bundet fraksjon;

dissosiering av bundet cobalamin fra holo-TC II-molekylene i den bundne fraksjon og bestemmelse av konsentrasjonen av frigitt cobalamin, fortrinnsvis hvor

dissosieringen påvirkes slik at konsentrasjonen av det frigitte cobalamin er minst 3 ganger, fortrinnsvis 5 ganger og enda mer foretrukket 10 ganger høyere enn konsentrasjonen av holo-TC II i den opprinnelige prøve.

Det vesentlige ved dette aspekt av oppfinnelsen er separeringen og konsentreringen av TC II eller holo-TC II som muliggjør effektiv anvendelse av standardmetoder for cobalamin-bestemmelse. Som nevnt ovenfor er metodene uten et slikt kjent konsentrasjonstrinn ikke egnet for cobalamin-bestemmelse, siden det forekommer i en så lav konsentrasjon. En hvilken som helst passende måte å frigi cobalamin fra holo-TC II kan benyttes, men hensiktsmessig benyttes i denne henseende varme eller endring av pH av det omgivende medium. De forskjellige cobalamin-formene kan omdannes til det mindre lysfølsomme cyanocobalamin ved behandling med KCN. En hvilken som helst passende måte for bestemmelse av fritt cobalamin kan benyttes for fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, således for eksempel en kompetitiv test foretatt ved å kontakte en immobilisert bindingspartner for cobalamin med prøvens dissosierte cobalamin i nærvær av en merket ligand som konkurrerer med det isolerte cobalamin om binding til de immobiliserte bindingspartnere. En metode som beskrevet av Kuemmerk *et al.* (1992) Clin. Chem. 38:2073-2077 ville for eksempel være egnet. En alternativ måte for bestemmelse av fritt cobalamin er beskrevet i US-patent 5451508 og involverer en immunologisk analyseteknikk.

I denne utførelsesform av oppfinnelsen er det å foretrekke at bindingsligandene for TC II er immobilisert og binder til både holo- og apo-TC II.

I en alternativ foretrukket utførelsesform omfatter fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse at en fast bærer som på denne har immobilisert en TC II- eller holo-TC II-bindende ligand, kontaktes med den aktuelle prøve og også med en ikke-immobilisert ligand,

hvor nevnte immobiliserte ligand er i stand til binding til TC II eller holo-TC II, til nevnte ikke-immobiliserte ligand eller til komplekser av nevnte TC II eller holo-TC II og nevnte ikke-immobiliserte ligand, og hvor nevnte ikke-immobiliserte ligand er i stand til binding til minst én av nevnte immobiliserte ligand, TC II eller holo-TC II og komplekser av nevnte immobiliserte ligand og TC II eller holo-TC II;

hvor, dersom nevnte analysemetode er en sandwich-test, minst én av nevnte ligander er spesifikk for holo-TC II og, dersom nevnte analyse er en kompetitiv

bestemmelse, nevnte immobiliserte ligand er spesifikk for holo-TC II og konkurrenter derav;

hvorunder forholdet mellom nevnte immobiliserte ligand bundet av TC II eller holo-TC II med nevnte ikke-immobiliserte ligand eller med komplekser av nevnte ikke-immobiliserte ligand, og TC-II eller holo-TC II er avhengig av den mengde holo-TC II som forekommer i nevnte prøve, og

nevnte ikke-immobiliserte ligand er i stand til å utvikle et direkte eller indirekte påvisbart signal når den er bundet eller er ubundet;

separering av en bundet fraksjon fra en ikke-bundet fraksjon; og

direkte eller indirekte bestemmelse av den ikke-immobiliserte ligand bundet til den immobiliserte ligand (den bundne fraksjon) eller ikke-bundne og i løsning (den ubundne fraksjon);

hvor kontaktingen av prøven og nevnte ikke-immobiliserte ligand med den faste bærer kan foretas separat, samtidig eller suksessivt, og dersom det skjer separat eller suksessivt at de kan kontaktes i en hvilken som helst rekkefølge.

I det vesentlige involverer derfor den alternativt foretrukne utførelsesform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, bestemmelse av den ikke-immobiliserte ligand som enten direkte eller indirekte har bundet seg til, eller alternativt ikke bundet seg direkte eller indirekte, til den immobiliserte ligand. Når den ikke-immobiliserte ligand konkurrerer med holo-TC II om binding til den immobiliserte ligand, indikerer et høyt nivå ubundet ikke-immobilisert ligand en høy konsentrasjon av holo-TC II i prøven, mens et lavt nivå ubundet ikke-immobilisert ligand indikerer en lav konsentrasjon av holo-TC II i prøven. Når den ikke-immobiliserte ligand binder til det TC II eller holo-TC II som på sin side er bundet til den immobiliserte ligand, indikerer et høyt nivå av bundet ikke-immobilisert ligand en høy konsentrasjon av holo-TC II i prøven, mens et lavt nivå av bundet ikke-immobilisert ligand indikerer en lav konsentrasjon av holo-TC II i prøven.

I fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse bestemmes derfor det metabolsk aktive forråd av cobalamin ved å måle holo-TC II-komplekset eller ved å måle mengden cobalamin bundet til TC II-molekyler forekommende i en kroppsprøve som inneholder en blanding av både apo- og holo-TC II og apo- og holo-HC (haptocorrin eller TC-I og III).

Et forutgående separasjonstrinn kan foretas ved å benytte immobilisert cobalamin eller en analog eller et fragment derav, som selektivt binder til apo-

formene av både TC II og haptocorrin (HC). I et slikt forutgående trinn bindes apo-formene av TC II og HC-proteinene av det immobiliserte cobalamin eller en analog eller et fragment derav, og separeres fra holo-TC II og holo-HC-kompleksene.

I dette tilfellet skjer analyse av de separerte holo-formene av TC II i henhold til
5 en hvilken som helst utførelsesform av oppfinnelsen, deretter slik som beskrevet ovenfor, men den er klart mer egnet når bestemmelsen av holo-TC II-komplekset skjer på annen måte enn ved dissosiering av komplekset og påfølgende bestemmelse av det frigitte cobalamin. Det vil for fagmannen være klart at dersom et slikt innledende trinn går forut for ovennevnte alternative foretrukne utførelsesform, er
10 kravet om at minst én ligand i en sandwich-test, til forskjell fra TC II, skal være spesifikk for holo-TC II, og kravet om at den immobiliserte ligand i en kompetitiv test, til forskjell fra TC II, skal være spesifikk for holo-TC II og konkurrenter derav, ikke lenger er relevant, siden apo-formen av TC II er blitt innfanget og ikke lenger er tilgjengelig. De immobiliserte eller ikke-immobiliserte ligandene kan således være
15 spesifikke for holo-TC II eller TC II eller konkurrenter til disse.

Det immobiliserte cobalamin bør ikke oppvise noen vesentlig tendens til å bli dissosiert fra dets bærer, idet dette vil kunne resultere i binding til apo-TC II og omdannelse av dette til holo-TC II. Biotinylerte cobalaminer binder seg på en meget stabil måte til en fast overflate til hvilken det er bundet avidin/streptavidin, og fast-
20 binding av cobalamin til en bærer på denne måte er gunstig for utførelsen av dette trinn. Når biotinylert cobalamin benyttes kan det faktisk tilsettes prøven under analyse, i en ikke-immobilisert form, hvor det binder til apo-formene av TC II og HC. Prøven kan deretter bringes i kontakt med en fast overflate som har en bindingspartner for biotinet, eksempelvis avidin, immobilisert på denne. Det dannes da et
25 kompleks av avidin-biotinylert cobalamin-TC II som lett kan isoleres fra prøven.

I én utførelsesform av oppfinnelsen hvor dette forutgående separasjonstrinn har funnet sted, bestemmes deretter holo-TC II-forrådet ved å kontakte prøven med en immobilisert TC II-ligand som innfanger holo-TC II-komplekset og etterlater haptocorrinet i løsning, hvorpå det immobiliserte holo-TC II kontaktes med en andre
30 TC II-ligand som er merket og således påvisbar. Eksempler på egnede TC II-bindingsligander er ikke-overlappende monoklonale antistoffer, eller et polyklonalt antistoff spesifikt for TC II ville i denne utførelsesform være egnet både for innfangning og påvisning siden ulike epitoper på TC II-molekylene gjenkjennes.

I en annen utførelsesform av oppfinnelsen hvor dette forutgående separasjonstrinn har funnet sted, bestemmes holo-TC II-molekylene som konkurrerer med den merkede ikke-immobiliserte ligand om binding til den immobiliserte ligand for denne, og mengden holo-TC II beregnes i forhold til den mengde merket ikke-immobilisert ligand som er bundet eller ikke-bundet til den immobiliserte ligand.

I en foretrukket utførelsesform foregår bindingen av apo-TC II og apo-HC til cobalamin, analoger eller fragmenter derav, i det forutgående separasjonstrinn på et sted eller en måte som inhiberer påfølgende gjenkjenning og binding av det immobiliserte cobalamin-bundne TC II av den ikke-immobiliserte ligand eller bindingspartner for TC II. I denne utførelsesform er det ikke noe behov for å isolere holo-TC II og holo-HC fra de bundne apo-formene før bestemmelsen ifølge oppfinnelsen foretas. I denne utførelsesform er det settet som den ikke-immobiliserte bindingspartner eller ligand er rettet mot, meget viktig, og det bør være en epitop på TC II som maskeres eller skjermes eller på annen måte gjøres utilgjengelig for binding når apo-TC II og apo-HC immobiliseres på cobalaminet, analogen eller fragmentet derav.

Enten det innledende separasjonstrinn involverer bruk av en bindingsligand for TC II eller det før dette foretas et forutgående trinn ved å benytte immobilisert cobalamin, analoger eller fragmenter derav, fordres ikke total separasjon, dvs. separasjon av alle apo- og holo-TC II-proteinene fra prøven, og det er tilstrekkelig at det fra prøven separeres en fraksjon som omfatter i det minste en del av det ønskede «TC II-subsett av proteiner».

I enkelte utførelsesformer kan bindingspartnere eller ligander og bindingsbetingelser velges slik at det oppnås separasjon av tilnærmet hele det valgte «subsett». I dette tilfellet kan den ikke-bundne fraksjon ansees å være tilnærmet fri for TC II- eller holo-TC II-proteiner, dvs. være minst 80%, 90% eller 95% fri for enten TC II eller holo-TC II, avhengig av hvilken komponent som er valgt som basis for fraksjonering.

I alternative utførelsesformer kan bindingspartneren og betingelsene velges slik at bare en del av TC II-proteinene i prøven separeres i en fraksjon. I dette tilfellet må det tas hensyn til den partielle separasjon ved konstruksjon av en standard kalibreringskurve for bestemmelsen. I så henseende benyttes for utvikling av en standard kalibreringskurve som konsentrasjonen av det påviste holo-TC II kan bestemmes mot, velkjente standardteknikker.

Dersom det i et fraksjoneringstrinn benyttes en TC II-bindingsligand, vil i det minste en del av det TC II-bundne cobalamin være lokalisert i den bundne fraksjon, og eventuelt cobalamin i prøven bundet til andre molekyler enn TC II, for eksempel HC eller albumin, vil være i den ubundne (dvs. ikke-separerte) fraksjon eller

5 fraksjoner. TC II i den bundne fraksjon kan være i apo- eller holo-form og kan være kompleksert med cobalamin-lignende substanser eller analoger i tillegg til cobalamin.

Om ønskes kan fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen innbefatte et ytterligere forutgående separasjonstrinn, hvor prøven kontaktes med en immobilisert eller immobiliserbar spesifikk bindingsligand for haptocorrin (i apo- og holo-former eller

10 kun i holo-form). På denne måte kan et eventuelt bidrag til feil ved bestemmelsen av TC II-bundet cobalamin, som skriver seg fra holo-HC, reduseres, og spesifikke bindingsligander for TC II eller holo-TC II som har en viss bindingsaffinitet for haptocorriner, benyttes.

Siden, som angitt ovenfor, serumkonsentrasjonen av TC II både i apo- og

15 holo-form er meget lav, er ligander eller bindingspartnere av særlig høy spesifisitet og affinitet nødvendige for gjennomføring av oppfinnelsen. De affinitetskonstanter som fordres av ligandene ifølge foreliggende oppfinnelse avhenger også av hvorvidt liganden er spesifikk for TC II eller holo-TC II, og også av dens anvendelse enten som en innfangende eller påvisende ligand, siden serumkonsentrasjonen av TC II er

20 ca. 0,5-1 nM, mens konsentrasjonen av holo-TC II bare er 35-160 pM. For en TC II-innfangende ligand er derfor en affinitetskonstant på minst 10^9 M^{-1} , fortrinnsvis mer enn $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ og mer foretrukket 10^{10} M^{-1} ønskelig. For en holo-TC II-innfangende ligand er en affinitetskonstant på minst 10^{10} M^{-1} ønskelig, fortrinnsvis $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, mer foretrukket større enn $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ og mest foretrukket større enn 10^{11} M^{-1} . Den

25 affinitetskonstant som fordres for et påvisende bindemiddel kan klart være mindre enn det for en innfangende ligand som følge av analysens konsentreringseffekt.

Graden av kryssreaktivitet av en holo-TC II eller TC II-bindende ligand med HC bør fortrinnsvis være mindre enn 1%, mer foretrukket mellom 0,1% og 1% og mest foretrukket mindre enn 0,1%. Tilsvarende bør en holo-TC II-bindende ligand

30 fortrinnsvis ikke oppvise større grad av kryssreaktivitet med apo-TC II over 1%, mer foretrukket mellom 0,1% og 1% og mest foretrukket bør kryssreaktiviteten være mindre enn 0,1%.

Ved å benytte slike høyaffinitetsligander utvides deres funksjon ut over det at de ganske enkelt er innfangnings- og/eller påvisningsligander, og de spiller en vital

rolle ved å være i stand til å separere og konsentrere TC II-protein fra analyseprøven. Bindingsligandene for TC II eller holo-TC II bør fortrinnsvis konsentrere liganden minst 3 ganger, mer foretrukket 5 ganger og enda mer foretrukket minst 10 ganger.

5 I henhold til en ytterligere utførelsesform av analyseteknikken, mer beslektet med en fortrenningsbestemmelse enn en kompetitiv bestemmelse, kontaktes prøven som omfatter holo-TC II-komplekset med en fast fase til hvilken det er bundet en merket ligand som gjenkjenner de samme bindingssetene på de immobiliserte ligandene som holo-TC II. Holo-TC II i prøven konkurrerer med den bundne
10 merkede ligand om setene, slik at det etter ekvilibrerings av systemet, er et direkte proporsjonalt forhold mellom mengden merket ligand fortrent fra den faste bærer og påvisbar i løsning, og den mengde holo-TC II som er tilstede i den opprinnelige prøve. Den merkede ligand kan påvises direkte eller indirekte og kan bestemmes som den mengde merket ligand som er bundet eller ikke bundet til den faste bærer,
15 alt etter hva som er relevant. I denne utførelsesform bindes i virkeligheten den ikke-immobiliserte ligand som det tidligere er referert til, til den immobiliserte ligand før påføring av prøven, men slik binding må ikke oppfattes som at liganden på noen måte er immobilisert.

En ytterligere foretrukket utførelsesform involverer at en holo-TC II-holdig
20 prøve kontaktes med en fast bærer som har holo-TC II immobilisert på denne, og et merket ikke-immobilisert holo-TC II spesifikt bindemiddel. Det frie holo-TC II i prøven og det immobiliserte holo-TC II konkurrerer om binding med den merkede ikke-immobiliserte ligand, og bestemmelse av den merkede ligand bundet til den faste fase, eller som er igjen i løsning, muliggjør beregning av holo-TC II-konsentrasjonen.
25 I en særlig foretrukket utførelsesform av foreliggende oppfinnelse er den merkede ikke-immobiliserte holo-TC II-bindende ligand et antistoff.

I henhold til en annen utførelsesform kontaktes prøven som omfatter den aktuelle analytt, med merket holo-TC II og immobilisert ligand. Det merkede og ikke-merkede holo-TC II konkurrerer om binding til den immobiliserte ligand, og etter at
30 likevekt er innstillet, er mengden merket holo-TC II bundet til den immobiliserte ligand, indirekte proporsjonal med mengden av holo-TC II i den aktuelle prøve. Igjen kan det merkede holo-TC II påvises direkte eller indirekte og bestemmes som den mengde merket holo-TC II som er bundet, eller ikke bundet, til den faste bærer, alt etter hva som er relevant.

I henhold til en ytterligere utførelsesform av foreliggende oppfinnelse kontaktes en ikke-immobilisert, men immobiliserbar ligand som er spesifikk for holo-TC II-komplekset (f.eks. en ligand konjugert til biotin eller et annet element av et spesifikt bindingspar) med prøven for å danne et holo-TC II/ikke-immobilisert ligand-

5 kompleks. Ligand/holo-TC II-komplekset kan deretter på kjent måte utfeltes fra løsning og isoleres for analyse.

I henhold til nok en annen utførelsesform av oppfinnelsen tilsettes to merkede bindingspartnere til prøven, eventuelt etter et innledende trinn, så som utarming av apo-formene av TC II og HC fra prøven. Bindingspartnerne er i dette tilfelle merket

10 holo-TC II eller en analog eller et fragment derav, og en merket bindingspartner for dette, for eksempel et merket antistoff. I denne utførelsesform utvikles et påvisbart signal bare fra merkingene når de er i umiddelbar nærhet til hverandre, dvs. når de to merkede bindingspartnerne blir bundet til hverandre. Ved tilsetning til prøven kan den merkede bindingspartner for holo-TC II således binde enten til umerket

15 holo-TC II som forekommer i prøven, hvorunder det ikke utvikles noe påvisbart signal, eller til merket holo-TC II eller en analog, fragment eller variant derav, som binder den merkede TC II-bindingspartner, hvorunder det utvikles et påvisbart signal. Merkingmidler som f.eks. de som er beskrevet i Amersham scintillation proximity assays i US-patent 4568649, egner seg for inkorporering i en slik utførelsesform, og

20 den høye følsomheten for denne fremgangsmåte er velegnet i en analyse hvor analytten foreligger i en så lav konsentrasjon. Det ene elementet i bindingsparet kan således for eksempel merkes med et β -emitterende nuklid, så som I^{125} eller H^3 mens det andre element merkes med et egnet scintillasjonsmolekyl. Den emitterte β -partikkel mister sin energi i de vandige omgivelsene medmindre det scintillerende

25 molekyl er innenfor 1,5 μ M og fordrer derfor at begge merkede partnere bindes til hverandre for at et signal skal være påvisbart. Sannsynligheten for at to merkede partnere binder til hverandre bestemmes av konsentrasjonen av tilstedeværende holo-TC II i prøven, slik at jo høyere signal som utvikles, dess lavere er konsentrasjonen av holo-TC II i prøven.

30 I denne sammenheng innbefatter betegnelsen «bestemmelse» eller «måling» både kvantifisering i den forstand at det oppnås en absolutt verdi for den mengde eller konsentrasjon av holo-TC II eller TC II-bundet cobalamin i prøven, og også halvkvantitative og kvalitative målinger eller bestemmelser. Det kan oppnås en indeks, et

forhold, prosentandel eller lignende angivelser av graden eller mengden TC II-bundet cobalamin, for eksempel i forhold til totalt cobalamin.

Prøven av kroppsmaterialet benyttet i analysemetoden ifølge oppfinnelsen kan være en hvilken som helst cobalamin-holdig prøve, f.eks. en kroppsvæske eller vevsprøve eller en suspensjon, etc. Prøven vil imidlertid fortrinnsvis være en kroppsvæske, for eksempel sædvæske, cerebrospinalvæske eller amnionvæske, men vil i alminnelighet være en prøve avledet fra blod. Når dette er tilfelle kan det, idet prøven benyttet for analyse fortrinnsvis er cellefri, benyttes enten serum eller plasma. Prøven kan behandles før den benyttes i analysemetoden ifølge oppfinnelsen, og kan for eksempel fortynnes ved tilsetning av en buffer eller et annet vandig medium og kan oppbevares eller konserveres, for eksempel ved avkjøling eller frysing før analyse.

Ved praktisering av oppfinnelsen, hvor en bundet fraksjon separeres fra en ubundet fraksjon, kan dette skje på en hvilken som helst egnet måte, for eksempel ved presipitasjon, sentrifugering, filtrering, kromatografiske metoder, etc.

For å unngå enhver tvil, er betegnelsen «cobalamin» her benyttet synonymt med «vitamin B₁₂» og inkluderer alle former av vitamin B₁₂ (cyanocobalamin; 5-6-dimetylbenzimidazolylcyanocobamid; metylcobalamin; 5'-deoksyadenosylcobalamin) som kan opptre og være metabolsk aktive (ved riktig presentasjon) i kroppen.

Som angitt ovenfor kan bestemmelsen av det TC-bundne cobalamin etter fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen foretas ved å påvise en ligand bundet til det fraskilte holo-TC II, eller ved å foreta en kompetitiv måling under bruk av en merket konkurrent til holo-TC II, hvorunder holo-TC II konkurrerer med den merkede konkurrent om binding til en bindingsligand for denne, eller ved å påvise cobalamin frigitt fra separert holo-TC II.

Den påvisbare ligand kan lett merkes på en hvilken som helst konvensjonell måte, for eksempel med en signaldannende merking som kan bestemmes ved f.eks. luminescens, kjemiluminescens, kolorimetrisk måling, fluorescens, radioaktivitet eller enzymatisk aktivitet. I virkeligheten kan en hvilken som helst kjent signaldannende merking benyttes for fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen.

Enkelte egnede eksempler på fargede eller fluorescerende forbindelser som kan benyttes til påviselig å merke en bindingsligand ifølge foreliggende oppfinnelse, er antrakinoner, azofarvestoffer, azinfarvestoffer, så som oksaziner og tiaziner, triaziner, naturlig forekommende pigmenter, så som porfyriner, fykobiliproteiner,

inkludert fykoerytriner og fykoguaniner, klorofyller og deres analoger og derivater, karotenoider, akrinidiner, xantener, inkludert fluoresceiner og rhodaminer, indigofarvestoffer, tioksanter, kumariner, polymetiner, inkludert di- og triarylmeteriner og derivater derav eller ftalocyaniner og metall-ftalocyaniner og derivater derav.

5 Tilsvarende kan et bredt utvalg radioaktive forbindelser benyttes som den signaldannende merkingsdel av reagenset som benyttes i henhold til denne oppfinnelse, blant disse jod-125-merkede forbindelser.

Alternativt kan bindingsligandene konjugeres til naturlige eller syntetiske forbindelser som kan frembringe et kjemiluminescens-signal som kan måles på kjent
10 måte (Cormier, M.J., *et al.*, Chemiluminescence and Bioluminescence, Plenum Press, New York 1973). Egnede kjemiluminescens-forbindelser er luciferin, oksalsyre-estere, 1,2-dioksetan, luminol eller derivater derav, men ikke begrenset til disse. Om relevant kan hydrogenperoksyd, enzymer, f.eks. luciferase, eller andre kjemikalier, benyttes for å frembringe kjemiluminescens-signalet fra de anvendte
15 signalproduserende molekyler.

Sterkt anioniske signaldannende molekyler er ikke å foretrekke for bruk for fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, siden de har en tendens til å binde til serumproteiner, så som humant serumalbumin (HSA) som kan forekomme i prøven. Særlig egnede eksempler som kan benyttes er fluorescein-isotiocyanat, rhodamin B eller N-
20 (resorufin-4-karbonyl)piperidin-4-karboksytsyre-N-hydrokso-succinimidester) eller «resos».

I henhold til én utførelsesform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan en fraksjon som omfatter minst en del av TC II, separeres fra en kroppsvæske-prøve ved å omsette kroppsvæsken med en bindingsligand som er spesifikk for TC II, og
25 deretter separere den TC II-bundne fraksjon fra resten av prøven, hvorved den tilsiktede analytt i denne isoleres og konsentreres. I en utførelsesform av oppfinnelsen kan det benyttes en påvisbar bindingsligand rettet mot holo-TC II, for å bestemme det TC II-cobalaminkompleks som er tilstede i den fraskilte bundne fraksjon. Holo-TC II-bindingsliganden kan kontaktes med prøven under under-
30 søkelsen før, samtidig med eller etter kontakt med den TC II-bindende ligand, og før eller etter separasjon av den TC II-bundne fraksjon fra resten av prøven.

Tilsvarende kan en cobalamin-holdig fraksjon (f.eks. som omfatter holo-TC II og holo-HC) separeres fra resten av prøven ved å omsette den aktuelle kroppsvæske med et immobilisert eller bundet cobalamin, eller en analog eller fragment

derav, som binder apo-TC II og apo-HC, og fra den bundne fraksjon separere resten av prøven som omfatter holo-TC II og holo-HC. En påvisbar TC II-bindende ligand kan deretter benyttes for å påvise det TC II-cobalamin-kompleks som forekommer i den fraskilte fraksjon. Den påviselige TC II-bindende ligand kan kontaktes med den aktuelle prøve før, samtidig med eller etter kontakt med det bundne cobalamin og før eller etter separering av den bundne fraksjon fra resten av prøven.

I henhold til enkelte utførelsesformer kan immobiliserte ligander for den ene eller den andre komponent av apo- og/eller holo-TC II/HC-kompleksene anbringes i en kolonne. Kroppsvæsken som inneholder TC II-cobalaminkomplekset, kan avsettes på kolonnen og kontaktes med bindingsliganden(e).

Kolonnen kan spyles gjennom eller vaskes, og en eluent om nødvendig, benyttes for å frigjøre en bundet fraksjon fra kolonnen og lette oppsamlingen av denne. Dersom innholdet av den ubundne fraksjon også skal analyseres med henblikk på andre bestanddeler, vaskes kolonnen med en buffer eller et middel som tilføres ved å benytte en kalibrert mikropipette for å sikre at et nøyaktig kjent volum tilsettes og oppsamles. Det administrerte volum er fortrinnsvis innenfor 3% av det ønskede (kalibrerings-) volum, mer foretrukket innenfor 1 eller 2%. Dersom fraksjonen som analyseres skal frigis fra kolonnen før påvisning, bør eluenten som benyttes for å frigi komplekset, likeledes administreres ved å benytte en kalibrert mikropipette.

I henhold til en alternativ utførelsesform kan bindingsligandene som benyttes til å separere en fraksjon av en prøve, immobiliseres på en partikkelformet fast bærer, for eksempel lateks- eller polymerkuler. For å lette manipulering og separering kan det benyttes magnetiske kuler, og dette er virkelig en foretrukket utførelsesform av foreliggende oppfinnelse. Betegnelsen «magnetisk» betyr i denne sammenheng at bæreren kan gis et magnetisk moment når den anbringes i et magnetfelt. En bærer som omfatter magnetiske partikler kan med andre ord lett fjernes ved magnetisk aggregering, hvilket gir en hurtig, enkel og effektiv måte for separering av fraksjonene etter ligandbinding.

Ved å benytte metoden ifølge oppfinnelsen kan magnetpartiklene med det festede TC II-cobalamin-kompleks således fjernes på en passende overflate ved å påføre et magnetfelt, for eksempel ved bruk av en permanent magnet. Det er vanligvis tilstrekkelig å anbringe en magnet på siden av den beholder som inneholder

prøveblandingen for å bevirke at partiklene samler seg på beholderveggen og så isolere dem for videre analyse.

Spesielt foretrukket er superparamagnetiske partikler, for eksempel de som er beskrevet av Sintef i EP-A-106873, idet magnetisk aggregering og klumpdannelse av partiklene under reaksjonen, kan unngås. De velkjente magnetkulene fremstillet av Bang Particles (USA) kan være særlig egnet for bruk i henhold til foreliggende oppfinnelse.

I alminnelighet vil det foruten den prøve som vurderes, også bli målt kalibreringsprøver med kjent innhold av holo-TC II-kompleks ved utførelse av analysemetoden ifølge oppfinnelsen. Slike bestemmelser kan benyttes til å plote en kalibreringskurve som innholdet av TC II-bundet cobalamin i den aktuelle prøve kan bestemmes fra. Kalibreringsprøvenes natur og valget av konverterings- eller justeringsfaktorer benyttet ved bestemmelsen av holo-TC II-komplekset kan variere, for eksempel avhengig av de bestemte ligander som er benyttet for bindingen og av separasjonstrinn og andre sider ved metoden som påvirker bindingen og separasjonen av prøven, for eksempel buffersammensetning, målebetingelser, etc. Kalibreringsprøver som har holo-TC II-innhold på 0 til 300 pmol/L vil i alminnelighet bli benyttet. Det referanseområde innenfor hvilket verdien for TC II-bundet cobalamin i alminnelighet vil bli funnet, er 30 til 160 pmol/L.

Standarden for holo-TC II-kalibreringen kan typisk være human, nativ eller rekombinant holo-TC II. Anvendelsen av holo-TC II som kalibreringsmiddel ved holo-TC II-bestemmelser er ny og utgjør et ytterligere aspekt ved oppfinnelsen.

I henhold til nok et ytterligere aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et sett for diagnostisk analyse i henhold til oppfinnelsen, hvor settet omfatter:

en immobilisert eller immobiliserbar spesifikk bindingsligand for TC II eller holo-TC II;

fortrinnsvis en holo-TC II-løsning av kjent konsentrasjon, og mer foretrukket, et sett av slike løsninger som har et utvalg av holo-TC II-komplekskonsentrasjoner;

eventuelt et frigjøringsmiddel for å frigjøre cobalamin fra holo-TC II; og

eventuelt en merket ligand.

Analysemetoden ifølge oppfinnelsen bestemmer det metabolsk aktive forråd av cobalamin ved å bestemme holo-TC II-komplekset eller isolere holo-TC II-komplekset og deretter bestemme det cobalamin som er assosiert med dette, og tilveiebringer således en lettvinnt metode for bestemmelse av cobalamin-mangel før

eller etter inntreden av kliniske manifestasjoner av cobalamin-mangel. Analysemetoden kan med fordel benyttes før symptomer opptrer, siden den har en nøyaktig prediksjonsverdi ved negativ cobalamin-likevekt.

Ifølge foreliggende oppfinnelser er det også beskrevet sett for anvendelse ved en diagnostisk bestemmelse i henhold til et hvilket som helst av kravene 1 til 19, kjennetegnet ved at det omfatter:

immobilisert cobalamin eller en analog eller et fragment derav, som selektivt binder apo-formene av TC II og haptocorrin;

en immobilisert eller immobiliserbar spesifikk bindingsligand for TC II eller holo-TC II;

fortrinnsvis en holo-TC II-løsning av kjent konsentrasjon, eller et sett av slike løsninger som har et utvalg av holo-TC II-kompleksskonsentrasjoner;

eventuelt et frigjøringsmiddel for å frigjøre cobalamin fra holo-TC II; og eventuelt en merket ligand.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre anvendelse av holo-TC II som kalibrator i en bestemmelse av holo-TC II ifølge et hvilket som helst av kravene 1-19.

Foreliggende oppfinnelse vil nå bli illustrert gjennom de etterfølgende eksempler og de ledsagende tegninger, hvor:

Figur 1 er en standardkurve for holo-TC II;

Figur 2 er et diagram som viser forholdet mellom totalt serum-cobalamin og holo-TC II-konsentrasjon; og

Figur 3 er et diagram som viser forholdet mellom totalt serum-cobalamin og holo-HC-konsentrasjon.

Eksempel 1

Antistoffer (f.eks. monoklonale eller polyklonale antistoffer) som er spesifikke for TC II, immobiliseres på magnetiserbare partikler. En serumalikkvot (100-500 µL) blandet med et likt volum PBS, får reagere i 15 minutter med et overskudd av det immobiliserte antistoff og et overskudd av et ikke-overlappende anti-holo-TC II antistoff (f.eks. monoklonalt antistoff) radioaktivt merket med I^{125} . De magnetiserbare partiklene sedimenteres ved å benytte en sterk magnet, supernatanten fjernes og partiklene vaskes med PBS.

Radioaktiviteten måles og holo-TC II-konsentrasjonen av prøven bestemmes ved interpolering på en standardkurve.

Eksempel 2

5 Antistoffer (f.eks. monoklonale eller polyklonale antistoffer) som er spesifikke for TC II, immobiliseres på magnetiserbare partikler. En serumalikkvot (600 μL) blandet med et likt volum PBS, får reagere med antistoffet i 30 minutter. De magnetiserbare partiklene sedimenteres ved å benytte en sterk magnet, hvorpå supernatanten fjernes. Partiklene vaskes én gang med PBS og behandles deretter
10 med natriumhydroksyd (0,3M) inneholdende kaliumcyanid (100 μM), ditiotreitol (15 mM) og en fast mengde cyanocobalamin radioaktivt merket med I^{125} eller Co^{57} i et totalvolum på 100 μL i 15 minutter, for å frigjøre cobalamin bundet til det immobiliserte holo-TC II og samtidig omdanne alle former av cobalamin til cyano-cobalamin og blanding med en fast mengde merket cyanocobalamin. En begrenset
15 mengde intrinsisk faktor i 100 μL boratbuffer tilsettes og får reagere i 10 minutter. De magnetiserbare partiklene sedimenteres med en sterk magnet, og 150 μL av supernatanten uttas for måling av radioaktivitet. Konsentrasjonen av TC II-bundet cobalamin i serumprøven bestemmes fra en standardkurve.

Alternativt kan det frigitte cobalamin måles ved å benytte Abbot's IMx metode
20 eller lignende metoder.

Eksempel 3

Antistoffer (f.eks. monoklonale eller polyklonale antistoffer) som er spesifikke for holo-TC II, immobiliseres på magnetiserbare partikler. Til en serumalikkvot (100-
25 500 μL) blandet med et likt volum PBS, tilsettes en fast mengde I^{125} merket holo-TC II og en begrenset mengde av det immobiliserte anti-holo-TC II antistoff. Etter inkubering i 15 minutter sedimenteres de magnetiserbare partiklene ved å benytte en sterk magnet. Partiklene vaskes med PBS, og radioaktiviteten måles. Konsentrasjonen av holo-TC II bestemmes fra en standardkurve.

30

Eksempel 4

Rekombinant holo-TC II immobiliseres på magnetiserbare partikler. Til en serumalikkvot (100-500 μL) blandet med et likt volum PBS tilsettes en fast mengde

immobilisert holo-TC II og et overskudd av et antistoff (f.eks. et monoklonalt eller polyklonalt antistoff) som er spesifikt for holo-TC II, og merkes radioaktivt med I^{125} . Etter inkubering i 15 minutter sedimenteres partiklene ved å benytte en sterk magnet. Partiklene vaskes med PBS, og radioaktiviteten måles. Konsentrasjonen av holo-TC II bestemmes fra en standardkurve.

Eksempel 5

Til en serumalikkvot (100-500 μ L) tilsettes et overskudd av biotinyllert cobalamin slik at det binder all apo-TC II og apo-HC. Etter inkubering i 10 minutter behandles serumprøven med avidin-belagte magnetiske partikler i 10 minutter. Partiklene sedimenteres ved å benytte en sterk magnet. Supernatanten isoleres og blandes med to ikke-overlappende monoklonale anti-TC II antistoffer, det ene radioaktivt merket med I^{125} og det andre med konjugert biotin. Etter 10 minutter tilsettes avidin-belagte magnetiserbare partikler som får binde til de biotinyllerte adduktene i 10 minutter. Deretter sedimenteres partiklene med en sterk magnet og vaskes med PBS. Radioaktiviteten måles og holo-TC II-konsentrasjonen bestemmes ved interpolering på en standardkurve.

Eksempel 6

Samme som Eksempel 5, men det apo-TC II-utarmede serum blandes med en fast mengde I^{125} -merket holo-TC II og en begrenset mengde anti-TC II antistoff immobilisert på magnetiserbare partikler. Etter inkubering i 15 minutter sedimenteres partiklene ved å benytte en sterk magnet.

Partiklene vaskes med PBS og radioaktiviteten måles.

Eksempel 7

Cobalamin immobiliseres på magnetiserbare mikrokuler, f.eks. ved kovalent kobling eller ved å benytte biotin- (Strept)avidin-kobling. Streptavidin-belagte magnetiserbare mikrokuler inkuberes typisk med 1 μ M biotinyllert cobalamin i 30 minutter ved romtemperatur og i mørke. Kulene sedimenteres ved å benytte en magnet, vaskes to ganger med PBS og resuspenderes til 1% i PBS + 5 mg/mL HSA. Til en serumalikkvot (100-500 μ L) tilsettes det samme volum PBS og 1/10 volum cobalamin-dekkede magnetiserbare mikrokuler. Blandingen inkuberes i

30 minutter ved romtemperatur i mørke, slik at all apo-TC II og apo-HC bindes. Partiklene sedimenteres med magnet og supernatanten isoleres og blandes med to ikke-overlappende monoklonale anti-humane TC II antistoffer, det ene radioaktivt merket med I^{125} og det andre konjugert med biotin. Etter 10 minutter tilsettes

5 (Strept-)avidin-belagte magnetiserbare mikrokuler som får binde til de biotinylerne adduktene i 10 minutter. Deretter sedimenteres partiklene med en magnet og vaskes med PBS. Radioaktiviteten måles, og holo-TC II-konsentrasjonen bestemmes ved interpolering på en standardkurve.

10 **Eksempel 8**

Samme som Eksempel 7, men overskudd av biotinyler cobalamin tilsettes direkte til serumprøven + PBS, slik at all apoTCII og apoHC bindes. Etter inkubering i 10 minutter behandles serumprøven med (Strept)avidin-belagte magnetiserbare mikrokuler i 30 minutter ved romtemperatur, i mørke.

15

Eksempel 9

Kanin-antistoff som er spesifikt for humant TCII og med en tilsynelatende bindingskonstant $>5 \times 10^9 M^{-1}$ ble immobilisert på $1 \mu M$ magnetiserbare mikrokuler belagt med geit-anti-kanin IgG antistoff (Indica Diagnostics). Serumprøver på $400 \mu L$

20 fra 48 friske forsøkspersoner, ble blandet med et likt volum PBS og $40 \mu L$ av det immobiliserte antistoff (1%). Blandingen ble holdt ved romtemperatur i mørke i 1 time, og deretter ble mikrokulene sedimentert ved å benytte en magnet.

Presipitatene ble vasket én gang med iskald vaskebuffer (PBS + 0,02% Tween 20) og deretter resuspendert i $50 \mu L$ 50 mM ditiotreitol, 0,001% kaliumcyanid og en fast

25 mengde $^{57}Co-CN-cobalamin$ (Amersham) i fosfatbuffer, pH 7,5. Dette fikk stå i 30

minutter ved romtemperatur, hvorefter $25 \mu L$ 0,5M natriumhydroksyd og 15 minutter senere $300 \mu L$ intrinsisk faktor immobilisert på dekstran (nok til å binde 50% tracer) i boratbuffer, pH 8,6, ble tilsatt. Etter 1 time ved romtemperatur, i mørke, ble prøvene sentrifugert ved 1000 g og $4^\circ C$ i 10 minutter, supernatanter forsiktig fjernet og pellets

30 tellet i en Packard Riastar. Konsentrasjonen av TCII-bundet cobalamin ble bestemt fra en standardkurve konstruert med åtte kalibratorer (0-500 pM holoTC-II) behandlet identisk med prøver. 37 serumprøver ble også analysert med henblikk på totalt serum-cobalamin ved å benytte Abbot IMx B12 bestemmelsen.

Standardkurven for holo TC-II er vist i Figur 1 og forholdet mellom totalt serum-cobalamin og holo TC II-konsentrasjoner i 37 friske forsøkspersoner, er illustrert i Figur 2. Det er tydelig at korrelasjonen er lav, med $r^2=0,50$. Derimot er korrelasjonen mellom holoHC og totalt serum-cobalamin høy, $r^2=0,96$ (Fig. 3). Den
5 gjennomsnittlige holoTC-konsentrasjon for de 49 friske forsøkspersonene var 64 ± 28 pM og 95% referanseområdet 23-127 pM.

Analysen har en CV på 10%, en analytisk følsomhet (0-kalibrator - 3 s.d.) på under 10 pM og kryssreagerer ikke med haptocorrin.

P A T E N T K R A V

1. Analysemetode for bestemmelse av transcobalamin II- (TC II) bundet cobalamin i en kroppsprøve, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den omfatter at en
5 cellefri prøve av en kroppsvæske kontaktes med et immobilisert cobalamin eller en analog eller fragment derav, som selektivt binder apo-formene av TC II og haptocorrin, med påfølgende kontakting av nevnte prøve med en immobilisert eller immobiliserbar spesifikk bindingsligand for TC II eller cobalamin-bundet TC II (holo TC II), separering av en ligandbundet fraksjon fra en ikke-ligandbundet fraksjon
10 og måling av det holo-TC II- eller TC II-bundne cobalamin-innhold i denne.

2. Analysemetode ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte spesifikke bindingsligand er valgt fra gruppen som omfatter et polyklonalt eller monoklonalt antistoff, et antistoff-fragment, et
15 polypeptid, et oligopeptid, et lite organisk molekyl, et spesifikt bindende middel valgt fra et kombinatorisk kjemi- eller fag-display-bibliotek, en spesifikk bindende sekvens av DNA eller RNA eller en celleoverflatereseptor.

3. Analysemetode ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 2, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte spesifikke bindingsligand oppviser en høy
20 grad av selektivitet og spesifisitet overfor TC II og oppviser lav affinitet overfor andre TC-proteiner, enten i apo- eller holo-form, eller et hvilket som helst annet cobalamin-bindende protein.

- 25 4. Analysemetode ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte cobalamin frigis fra holo-TCII-molekylene ved endring av temperaturen eller pH i det omgivende medium.

- 30 5. Analysemetode ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte frigitte cobalamin bestemmes ved en kompetitiv bestemmelse foretatt ved å kontakte en immobilisert bindingspartner for cobalamin med det dissosierte cobalamin i prøven i nærvær av en merket ligand som konkurrerer med det isolerte cobalamin om binding til de immobiliserte bindingspartnere.

6. Analysemetode ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5, karakterisert ved at den omfatter kontakting av en fast bærer som på denne har immobilisert en TC II- eller holo-TC II-bindende ligand, med den aktuelle prøve og også med en ikke-immobilisert ligand,

5 hvor nevnte immobiliserte ligand er i stand til binding til TC II eller holo-TC II, til nevnte ikke-immobiliserte ligand eller til komplekser av nevnte TC II eller holo-TC II og nevnte ikke-immobiliserte ligand, og hvor nevnte ikke-immobiliserte ligand er i stand til binding til minst én av nevnte immobiliserte ligand, TC II eller holo-TC II og komplekser av nevnte immobiliserte ligand og TC II eller holo-TC II;

10 hvor, dersom nevnte analysemetode er en sandwich-test, minst én av nevnte ligander er spesifikk for holo-TC II og, dersom nevnte analyse er en kompetitiv analyse, nevnte immobiliserte ligand er spesifikk for holo-TC II og konkurrenter derav;

15 hvorunder forholdet mellom nevnte immobiliserte ligand bundet av TC II eller holo-TC II, av nevnte ikke-immobiliserte ligand eller av komplekser av nevnte ikke-immobiliserte ligand, og TC-II eller holo-TC II, avhenger av den mengde holo-TC II som forekommer i nevnte prøve, og

nevnte ikke-immobiliserte ligand er i stand til å utvikle et direkte eller indirekte påvisbart signal når den er bundet eller er ubundet;

20 separering av en bundet fraksjon fra en ikke-bundet fraksjon; og direkte eller indirekte bestemmelse av den ikke-immobiliserte ligand bundet til den immobiliserte ligand (den bundne fraksjon) eller ikke-bundne og i løsning (den ubundne fraksjon);

25 hvor kontaktingen av prøven og nevnte ikke-immobiliserte ligand med den faste bærer kan foretas separat, samtidig eller suksessivt, og at dersom det skjer separat eller suksessivt, de kan kontaktes i en hvilken som helst rekkefølge.

7. Analysemetode ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 6, karakterisert ved at nevnte TC II-bindende ligand har en affinitetskonstant
30 på minst 10^9M^{-1} .

8. Analysemetode ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, karakterisert ved at affinitetskonstanten er større enn 10^{11}M^{-1} .

9. Analysemetode ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 8, karakterisert ved at graden av kryssreaktivitet av en holo-TC II eller TC II-bindende ligand med HC er mellom 0,1% og 1%.

5 10. Analysemetode ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9, karakterisert ved at graden av kryssreaktivitet av en holo-TC II eller TC II-bindende ligand med HC er mindre enn 0,1%.

11. Analysemetode ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10,
10 karakterisert ved at nevnte prøve som omfatter holo-TC II-komplekset kontaktes med en fast fase til hvilken det er bundet en merket ligand som gjenkjenner de samme bindingssetene på de immobiliserte ligandene som holo-TC II; holo-TC II i nevnte prøve konkurrerer med nevnte bundne merkede ligand om nevnte bindingsseter, slik at det etter ekvilibrerings av systemet, er et direkte proporsjonalt
15 forhold mellom mengden merket ligand fortrent fra den faste bærer og påvisbar i løsning, og den mengde holo-TC II som er tilstede i den opprinnelige prøve; hvor nevnte merkede ligand påvises direkte eller indirekte som den mengde merket ligand som er bundet eller ikke bundet til nevnte faste bærer, alt etter hva som er relevant.

20 12. Analysemetode ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 11, karakterisert ved at nevnte holo-TC II-holdige prøve kontaktes med en fast bærer som har holo-TC II immobilisert på denne, og et merket ikke-immobilisert holo-TC II spesifikt bindemiddel, hvor fritt holo-TC II i prøven og immobilisert holo-TC II konkurrerer om binding med den merkede ikke-immobiliserte ligand; og
25 hvor bestemmelse av den merkede ligand bundet til den faste fase eller som er igjen i løsning, muliggjør bestemmelse av holo-TC II-konsentrasjonen.

13 Analysemetode ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 12,
karakterisert ved at nevnte holo-TC II-holdige prøve kontaktes med
30 merket holo-TC II og immobilisert ligand for denne; hvor nevnte merkede og ikke-merkede holo-TC II-komplekser konkurrerer om binding til den immobiliserte ligand, og hvor, etter at likevekt er innstillet, mengden av merket holo-TC II bundet til den immobiliserte ligand, er indirekte proporsjonal med mengden av holo-TC II i den aktuelle prøve.

14. Analysemetode ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 13, karakterisert ved at nevnte kroppsprøve er valgt fra gruppen omfattende sædvæske, cerebrospinalvæske, amnionvæske, eller en prøve avledet fra blod.

5

15. Analysemetode ifølge krav 14, karakterisert ved at nevnte prøve avledet fra blod er serum eller plasma.

16. Analysemetode ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 15,

10 karakterisert ved at nevnte bundne fraksjon separeres fra nevnte ubundne fraksjon ved presipitasjon, sentrifugering, filtrering eller ved kromatografiske metoder.

17. Analysemetode ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 16,

15 karakterisert ved at nevnte påvisbare ligand merkes med en signaldannende merking som kan bestemmes ved luminescens, kjemiluminescens, kolorimetrisk bestemmelse, fluorescens, radioaktivitet eller ved enzymatisk aktivitet.

18. Analysemetode ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 17,

20 karakterisert ved at analysekalibrering skjer ved å benytte en holoTC II standard.

19. Analyse ifølge krav 18, karakterisert ved at nevnte standard er humant, nativt eller rekombinant holo-TC II.

25

20. Sett for anvendelse ved en diagnostisk bestemmelse i henhold til et hvilket som helst av kravene 1 til 19, karakterisert ved at det omfatter:

immobilisert cobalamin eller en analog eller et fragment derav, som selektivt binder apo-formene av TC II og haptocorrin;

30

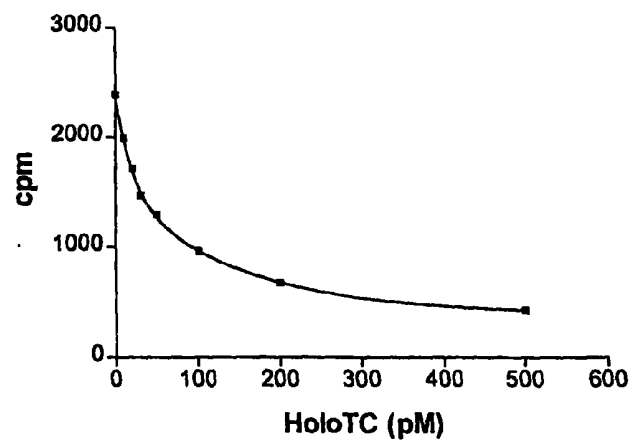
en immobilisert eller immobiliserbar spesifikk bindingsligand for TC II eller holo-TC II;

fortrinnsvis en holo-TC II-løsning av kjent konsentrasjon, eller et sett av slike løsninger som har et utvalg av holo-TC II-komplekskonsentrasjoner;

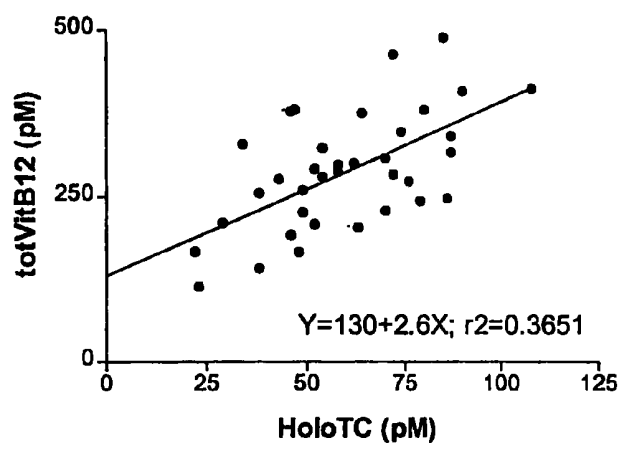
eventuelt et frigjøringsmiddel for å frigjøre cobalamin fra holo-TC II; og

eventuelt en merket ligand.

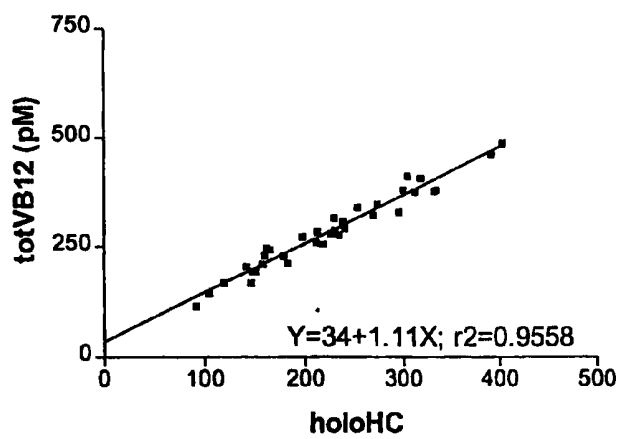
21. Anvendelse av holo-TC II som kalibrator i en bestemmelse av holo-TC II ifølge et hvilket som helst av kravene 1-19.



Figur 1



Figur 2



Figur 3