

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-526973  
(P2004-526973A)

(43) 公表日 平成16年9月2日(2004.9.2)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/53	H
GO 1 N 33/577	GO 1 N 33/543	5 2 1
	GO 1 N 33/543	5 4 5 Z
	GO 1 N 33/543	5 9 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 53 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-583990 (P2002-583990)  
 (86) (22) 出願日 平成14年4月23日 (2002. 4. 23)  
 (85) 翻訳文提出日 平成15年10月6日 (2003. 10. 6)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2002/001846  
 (87) 国際公開番号 W02002/086513  
 (87) 国際公開日 平成14年10月31日 (2002. 10. 31)  
 (31) 優先権主張番号 0109925.8  
 (32) 優先日 平成13年4月23日 (2001. 4. 23)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

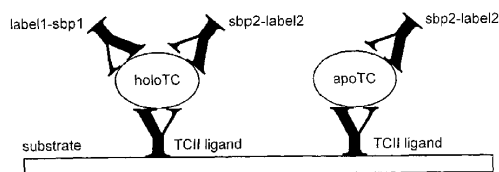
(71) 出願人 501029515  
 アクシス-シールド・エーエスエー  
 ノルウェー王国、エヌ-0510 オスロ  
 ー、ウルベンベイエン 87  
 (74) 代理人 110000040  
 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ  
 (72) 発明者 アーニング、ラース  
 ノルウェー、エヌ-0510 オスロー、  
 エケルン、ウルベンベイエン 87、アク  
 シス-シールド・エーエスエー内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トランスコバラミン I I 分析方法

(57) 【要約】

【課題】トランスコバラミン飽和度の測定用分析方法であって、トランスコバラミンを含む液体試料を、トランスコバラミン固定リガンドが固定された多孔質基質と接触させることで、トランスコバラミンとレポーター標識トランスコバラミン結合相手とを接触させ、ついで、前記基質に固定されたレポーター標識からのシグナルを検出することにおいて、ここで、前記リガンドまたは前記結合相手のいずれか一つが、ホロトランスコバラミンに特異的に結合可能な第 1 のリガンドまたは結合相手を含み、さらにアポトランスコバラミンまたはホロトランスコバラミンおよびアポトランスコバラミンに結合可能な第 2 のリガンドまたは結合相手を含むことを特徴とする方法。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

トランスコバラミン飽和度の測定用分析方法であって、トランスコバラミンを含む液体試料を、トランスコバラミン固定リガンドが固定された多孔質基質と接触させることで、トランスコバラミンとレポーター標識トランスコバラミン結合相手とを接触させ、ついで、前記基質に固定されたレポーター標識からのシグナルを検出することにおいて、ここで、前記リガンドまたは前記結合相手のいずれか一つが、ホロトランスコバラミンに特異的に結合可能な第 1 のリガンドまたは結合相手を含み、さらにアポトランスコバラミンまたはホロトランスコバラミンおよびアポトランスコバラミンに結合可能な第 2 のリガンドまたは結合相手を含むことを特徴とする方法。

10

**【請求項 2】**

以下の工程を含む液体試料に含まれるトランスコバラミン中のトランスコバラミン飽和度の測定用の請求項 1 記載の方法。

( i ) 前記試料を、トランスコバラミン固定リガンドが固定されている多孔質基質と接触させる工程。 ;

( i i ) 前記 ( i ) 工程の前、間または後において、前記試料のトランスコバラミンを、トランスコバラミンに対する第 1 および第 2 のレポーター標識結合相手と接触させる工程。ここで、前記第 1 の結合相手は、ホロトランスコバラミンおよびアポトランスコバラミンの双方に結合可能であるか、またはアポトランスコバラミンに特異的な結合相手であって、前記第 2 の結合相手は、ホロトランスコバラミンに特異的な結合相手である。 ;

20

( i i i ) 前記基質に固定された結合相手のレポーター標識からのシグナルを検出し、そのシグナルから前記試料中のトランスコバラミン飽和度を測定する工程。

**【請求項 3】**

前記基質に、ホロトランスコバラミンおよびアポトランスコバラミンの双方に結合可能であるリガンドを固定し、第 1 のレポーター標識からのシグナルと第 2 のレポーター標識からのシグナルとが区別可能である請求項 2 記載の方法。

**【請求項 4】**

以下の工程を含む請求項 1 記載の方法。 :

( i ) 液体試料に含まれるトランスコバラミンを、第 1 および第 2 のトランスコバラミン固定リガンドが異なる領域に固定された多孔質基質と接触させる工程。ここで、前記第 1 のリガンドは、ホロトランスコバラミンに特異的に結合でき、前記第 2 のリガンドは、アポトランスコバラミン、またはアポトランスコバラミンおよびホロトランスコバラミンを固定できる。 ;

30

( i i ) 前記工程 ( i ) の前、間または後に、トランスコバラミンのためのレポーター標識結合相手と前記試料のトランスコバラミンを接触させる工程 ; および

( i i i ) 前記基質の異なる領域上に固定した結合相手のレポーター標識からのシグナルを検出し、そのシグナルから前記試料中のトランスコバラミン飽和度を測定する工程。

**【請求項 5】**

ホロトランスコバラミンに特異的な結合相手またはホロトランスコバラミンに特異的に結合できるリガンドが、非ペプチドホロトランスコバラミン結合基を含む請求項 2 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

40

**【請求項 6】**

ホロトランスコバラミンに特異的な結合相手またはホロトランスコバラミンに特異的に結合可能なリガンドが、モノクロナール抗体を含む請求項 2 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 7】**

ホロトランスコバラミンに特異的な結合相手またはホロトランスコバラミンに特異的に結合可能なリガンドが、アポトランスコバラミンと比較してホロトランスコバラミンに対して少なくとも 10 倍の特異性を持つ請求項 2 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 8】**

前記シグナルが電磁放射線である請求項 2 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

50

## 【請求項 9】

前記シグナルをデジタルカメラにより検出する請求項 8 記載の方法。

## 【請求項 10】

前記試料が血液または血液由来の液体である請求項 2 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 11】

前記基質がセルロースシートである請求項 2 ~ 10 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 12】

前記基質がディップスティック上にマウントされている請求項 2 ~ 11 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 13】

前記工程 (i) において、前記試料を前記多孔質基質の片面に塗布し、前記多孔質基質の面に対して隣接した吸水性物質により促進される毛管現象により前記多孔質基質内に吸収させる請求項 2 ~ 12 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 14】

前記レポーター標識された特異的な結合相手を自身の質量のみで標識し、表面プラズモン共鳴により検出する請求項 2 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 15】

以下のものを含むアッセイキット。

TC 固定リガンドが表面上に固定されている多孔質基質；

トランスコバラミンに対する第 1 のレポーター標識結合相手および第 2 のレポーター標識結合相手。なお、前記第 1 の結合相手は、ホロトランスコバラミンおよびアポトランスコバラミンの双方を結合可能なものかまたはアポトランスコバラミンに特異的な結合相手であり、前記第 2 の結合相手は、ホロトランスコバラミンに特異的な結合相手である。

## 【請求項 16】

以下のものを含むアッセイキット。

異なる領域で、第 1 のトランスコバラミン固定リガンドおよび第 2 のトランスコバラミン固定リガンドが固定されている多孔質基質。なお、前記第 1 のリガンドはホロトランスコバラミンに特異的に結合可能で、前記第 2 のリガンドはアポトランスコバラミン、またはアポトランスコバラミンおよびホロトランスコバラミンを固定可能である。；

トランスコバラミンのためのレポーター標識結合相手。

## 【請求項 17】

さらに、洗浄剤を含む請求項 15 または 16 に記載のキット。

## 【請求項 18】

さらに、酵素レポーター標識のための基質を少なくとも 1 つ含む請求項 15 ~ 17 のいずれかに記載のキット。

## 【請求項 19】

さらに、アポ TC およびホロ TC を既知の比率で含む較正標準を少なくとも一つ含む請求項 15 ~ 18 のいずれかに記載のキット。

## 【請求項 20】

さらに、前記レポーター標識からシグナルを検出可能な検出器を含む請求項 15 ~ 19 のいずれかに記載のキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、診断分析方法の改善、特に、トランスコバラミンの分析に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

コバラミン、あるいはビタミン B<sub>12</sub> は、食物中に見られるビタミン B 複合体の一部を形成する水溶性ビタミンである。その核となる分子は、必須のコバルト原子を取り囲む 4 つのピロールユニットのコリン環からなる。コバラミンは、動物または植物により合成するこ

10

20

30

40

50

とができず、腸内で食物から吸収しなければならない唯一のビタミンである。しかしながら、コバラミンは、肝臓に貯えることができる。コバラミンは、微生物により、特に、嫌気性菌および酵母菌により合成される。

【0003】

コバラミンは、ピボでは、補酵素およびコバラミン酵素として機能し、三つの型の反応を触媒する。(i)分子内転移、例えば、L-メチルマロニルCoAからスクシニルCoAの形成。(ii)メチル化、例えば、ホモシステインのメチル化によるメチオニンの形成、および(iii)ある微生物における、リボヌクレオチドのデオキシリボヌクレオチドへの還元。哺乳類では、(i)および(ii)で特別に述べた2の酵素反応のみが、コバラミンを補酵素として必要とすることが知られている。

10

【0004】

消化の過程では、ハプトコリンと呼ばれる唾液タンパク質、以下、HCと表すが(このものは、また、当技術分野では、集合名詞的に、RバインダーまたはトランスコバラミンIおよびIIと表される。)、それが消化管上部の中でコバラミンと結合し、複合体を形成し、それは胃を通過する。膵酵素は、前記コバラミンハプトコリン(ホロHC)複合体を回腸内で消化し、コバラミンを放出し、そのコバラミンは、つぎに胃粘膜から分泌される内因子と呼ばれるタンパク質と結合し、さらなる複合体を形成する。前記コバラミン内因子複合体は、末端回腸の裏地(lining)の中で特定のレセプターと結合し、その上で、放出因子により解離させられ、そして、前記コバラミンは、回腸の膜を通して、血管走行の中に活発に輸送される。

20

【0005】

コバラミンは、検出可能な量の遊離形態では身体内を循環しない。おそらく、99%ほどのコバラミンは、トランスコバラミンまたはアルブミンの一つと結合している。

【0006】

コバラミンを目標とする組織に輸送する原因であると信じられているタンパク質は、重要な微量タンパク質であるトランスコバラミンII(以下、トランスコバラミンまたはTCとする)であり、それなしでは、コバラミンは、細胞膜を通過することができない。この重要な代謝機能にもかかわらず、血清中の約6~25%のコバラミンしかTCに結合せず、かつ、ほとんどは、HCにより運ばれる。TCは、血清、精液および脳脊髄液(cerebro-spinal fluid)中に最初に発見された45kDaの単鎖のポリペプチドである。コバラミンに結合したTCあるいはホロTCは、細胞膜上の特定のレセプターに付着し、そして、いったん結合すると、前記ホロTCの複合体は、飲作用により細胞内に取り込まれる。

30

【0007】

TCは、肝臓、脈管内皮、腸細胞(enterocyte)、マクロファージおよび繊維芽細胞により合成され、主としてアポTCの形態で、すなわち、結合したコバラミンなしで循環する。このものの半減期は、ほぼ90分と短い。

【0008】

血漿中の全コバラミンの4分の1未満がTCと結合している。残りは、上に述べた他のトランスコバラミンまたはアルブミンと結合している。

【0009】

コバラミンは食物から吸収しなければならないが、胃機能障害につながる任意の状態、例えば胃腸炎、または胃萎縮につながる状態、または機能的ハプトコリン、内因子、放出因子、TCもしくはTCレセプターを生産できないことは、コバラミンの吸収障害および結果としての欠乏症につながり得る。

40

【0010】

ある個体群の個体、例えば、高齢の妊娠した女性、慢性または急性の胃腸病患者、自己免疫疾患に苦しむそのような個体、悪性貧血およびエイズに苦しむ家族歴を持つそのような個体は、特に、コバラミン欠乏症に陥りやすい。

【0011】

コバラミン欠乏症の臨床症状は、多様でありかつ多数であるが、しかし、根本的には、貧

50

血、巨赤芽球の造血(haematopoiesis)ならびに神経系統の機能的および構造的な障害に関係している。コバラミン欠乏症と診断された個体の約60%は貧血症であるが、しかし、多くの場合、神経症状だけが、観測される臨床症状である。約10%の患者は、精神医学的な症状を示し、かつ、約40%は、神経的および精神医学的の両方の症状を示す。

【0012】

あるコバラミン欠乏症の現われ、特に、精神神経性効果は、早急に発見され、かつコバラミン療法により苦痛を和らげなければ元に戻せないの、コバラミン欠乏症の早期診断は、患者のための良い予想を確立するために重要である。

【0013】

それゆえ、個体のコバラミンレベルを、適切かつ効果的な方法で、その個体がコバラミン欠乏症に苦しむか否かを確立する観点から、正確に評価することが望ましい。 10

【0014】

血漿中コバラミン、すなわちHCまたはTCと結合したコバラミン(およびコバラミン類似物質)の総量の測定が、コバラミン欠乏を評価するための試みとして使用されてきている。この技術は、正常であると考えられる個体群における広範囲の濃度分布につながり、それゆえに、広い基準範囲を生み出す。個体に関しては、しかしながら、その個体について正常であると考えられる有効なコバラミンの範囲は極めて狭い。代謝活性コバラミンの濃度が自身の基準範囲から外に移動した個体であっても、その血漿中コバラミン総含有量は、個体群にとって正常であると考えられる範囲内に止まることが観測されたことがある。そのような環境下では、コバラミン欠乏症は、発見されないまま進行する可能性がある。 20  
そのような信頼性に欠ける方法は、明らかに望ましくなく、また、そのような血清または血漿中のコバラミンの測定は、診断上、低い感度および特異性しか持たないことがよく認識されている。

【0015】

微生物学的定量は、成長についてコバラミンに依存する微生物に関係し、血漿中コバラミン濃度を測定するために用いられるが、適切な基準範囲を確立することの困難さに加え、これらの方法は、コバラミンの抽出と変換とを必要とし、それは、実験室での迅速なスクリーニングのためには、非常に時間を消費し、煩雑であり、全体として適切でない。

【0016】

コバラミン欠乏を評価するために他にとり得る方法は、血漿中の代謝物質の蓄積を測定することに関係し、コバラミンを、その変換として必要とする。血漿中マロン酸メチルおよび血漿中ホモシステインのレベルは、コバラミン欠乏症の個体においては増加し、ビタミンB<sub>12</sub>欠乏症との相関関係についての候補物質分子であることを実証している。しかしながら、ホモシステイン評価に基づいた方法は、複雑であり、実用的でなく、不十分な特異性および感度しか示さないことが示されている。マロン酸メチルの測定に基づく方法は、正確で信頼できるが、扱いにくく、かつ、ガスクロマトグラフィーおよびマススペクトルを組み合わせた分析を必要とし、かつ、それゆえに高価であり、これもまた日常的な臨床のスクリーニングには適していない。 30

【0017】

血漿中コバラミンの総量に対するものとして、TCに結合したコバラミンを測定することもまた、コバラミン欠乏症の可能性についての信頼できる臨床上の検出手段(indicator)を提供するであろうことが提案されている(例えば、非特許文献1、非特許文献2、特許文献1参照。)。しかしながら、ホロTC濃度を定量するためのそのような努力は、今日までは、ほとんど間接的であり、ホロTC濃度を、血漿中コバラミンの総量とTCを除去した血漿中のコバラミン濃度との差として確立している。 40

【0018】

そのようなTCの除去は、硫酸アンモニウム(例えば、非特許文献3参照。)、マイクロシリカ(例えば、非特許文献4、非特許文献5参照。)、マイクロファイングラス(micro fine glass)(例えば、非特許文献6参照。 )または固定化された抗TCポリクローナル抗体(例えば、非特許文献7参照。 )への吸着によって成し遂げられる。全血漿中および 50

TC除去フラクション(depleted fraction)中のコバラミン濃度は、ラジオイムノアッセイまたは酵素イムノアッセイのような当業者に周知の方法により行われる。これらの方法は、自動化のまたは非自動化の日常的なスクリーニングには適していない。なぜならば、これらは、複雑で、時間がかかり、かつ、使用される前記吸着材の低い程度の特異性が、ホ口TCとホ口HCの不十分な分離につながり、さらに、ホ口TCを多く見積もることにつながるからである。前記吸着材のロット間ばらつきはさらなる誤差を導き、かつ、さらに重要なことには、一の大きな体積から他の大きな体積の引き算は、受け入れられない不正確さおよび非信頼性につながる

TCを評価するための他の試みは、TCを、HCを含む他の血漿成分と、その親油性を利用して分離することに関係する。そのように、ヘパリンセファローズ、シリカゲルまたはセルローズをそれぞれ用いて、TCをHCと分離する方法を開示されている(例えば、非特許文献8、非特許文献9、非特許文献10参照。)。これらの方法は、しかしながら、前記と同じ吸着材に頼るため、前記間接的方法と同じ欠点により損害を被る。また、ホ口TCの低い血漿中濃度は、これらの方法を、すでに存在するコバラミン定量方法と組み合わせることを不適切にする。ホ口TCの正常範囲は35~160 pMであり、35 pM未満の数値は、一般的に、コバラミン欠乏症を示すと考えられている。血漿中コバラミンのためのもっとも日常的な方法について報告されている分析感度は、約40 pMであるが、実際問題として、それはしばしばはるかに高く、典型的には約90 pMである。このゆえに、正常なホ口TCの血漿中レベルは、前記コバラミンの定量のための日常的な方法における前記感度限界よりも下かまたはその近くである。

10

20

#### 【0019】

TCに結合したコバラミンを定量するための方法として最近認識された、あるいは最も正確であるかもしれない方法は、TCをシリカに吸着させることと、つぎに、コバラミンを含む前記結合したフラクションを、イムノアッセイ(例えば、非特許文献11参照。)、または微生物学的検定法により検定することに関係し、後者の方が一見すると、最良の結果を生むように見える。この方法は、わずか20の検定を実行するのに、丸1労働日を必要とする。これは、非常に高価につき、かつ、非実用的であり、日常的な臨床上の診断の研究室における調査にほとんど適していない。

#### 【0020】

ホ口TC濃度を測定するための代替方法として、例えば、無細胞試料を、TCに特異的な抗体が固定された磁化粒子、ならびに非重複、非固定、放射性同位体で識別したホ口TCに特異的な抗体と接触させる等がある(例えば、特許文献2参照。)。前記粒子を磁界により分離して洗浄し、それらの放射能を測定することで、前記試料のホ口TC含量の測定する。しかしながら、この方法は、較正を必要としているため、医師または医師助手による患者への治療の時よりも、臨床学的実験での使用により適している。

30

#### 【特許文献1】

US 4,680,273号

#### 【特許文献2】

WO 00/17659号

#### 【非特許文献1】

Herbert et al. (1990) Am. J. Hematol. 34:132-139

40

#### 【非特許文献2】

Wickramasinghe and Fida (1993) J. Clin. Pathol. 46:537-539

#### 【非特許文献3】

Carmel (1974) Am. J. Clin. Pathol. 62:367-372

#### 【非特許文献4】

Herzlich & Hubert (1988) Lab. Invest. 58:332-337

#### 【非特許文献5】

Wickramasinghe & Fida (1993) J. Clin. Pathol. 46:537-539

#### 【非特許文献6】

50

Vu et al. (1993) Am. J. Hematol. 42:202-211

【非特許文献 7】

Lindemans et al. (1983) Clin. Chim. Acta 132:53-61

【非特許文献 8】

Kapel et al. (1988) Clin. Chim. Acta 172:297-310

【非特許文献 9】

Benhayoun et al. (1993) Acta Haematol. 89:195-199

【非特許文献 10】

Toft et al. (1994) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 54:62

【非特許文献 11】

10

Kuemmerle et al. (1992) Clin. Chem. 38/10: 2073-2077

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0021】

以上のことから、現在、治療の時で簡単かつ実施可能なホロTCのアッセイが必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0022】

本発明は、そのような単純なアッセイを以下のようにして行うことができる方法を提供する。ホロTC含量だけでなくTC飽和量、すなわちホロ型のTCの割合を、2つの標識した特異的結合相手、具体的には1つはホロTCのためのもの、他方はアポTC、もしくはホロTCおよびアポTCのためのものを使用して、それら2つのラベルからのシグナル比を測定することで行うことができる方法を提供する。さらには、そのようなアッセイは、体積に依存しないため、使用する液体試料（例えば、体液）の量を正確に測定する必要がない。これは、治療時に使用するにあたって大きな利点である。

20

【0023】

すなわち、一つの形態から見ると、本発明は、トランスコバラミン飽和度の測定用分析方法であって、トランスコバラミンを含む液体試料を、トランスコバラミン固定リガンドが固定された多孔質基質と接触させることで、トランスコバラミンとレポーター標識トランスコバラミン結合相手とを接触させ、ついで、前記基質に固定されたレポーター標識からのシグナルを検出することにおいて、ここで、前記リガンドまたは前記結合相手のいずれか一つが、ホロトランスコバラミンに特異的に結合可能な第1のリガンドまたは結合相手を含み、さらにアポトランスコバラミンまたはホロトランスコバラミンおよびアポトランスコバラミンに結合可能な第2のリガンドまたは結合相手を含むことを特徴とする方法。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

一つの実施形態において、本発明の分析方法は、以下の工程を含む。

(i) トランスコバラミンを含む液体試料を、トランスコバラミン固定リガンドが固定されている多孔質基質と接触させる工程。

(ii) 前記(i)工程の前、間または後において、前記試料のトランスコバラミンを、トランスコバラミンに対する第1および第2のレポーター標識結合相手と接触させる工程。ここで、前記第1の結合相手は、ホロトランスコバラミンおよびアポトランスコバラミンの双方に結合可能であるか、またはアポトランスコバラミンに特異的な結合相手であって、前記第2の結合相手は、ホロトランスコバラミンに特異的な結合相手である。

40

(iii) 前記基質に固定された結合相手のレポーター標識からのシグナルを検出し、そのシグナルから前記試料中のトランスコバラミン飽和度を測定する工程。

【0025】

また、前記基質は、ホロトランスコバラミンに特異的な結合相手であるリガンドが固定された第1の領域、およびアポトランスコバラミンに特異的な結合相手であるリガンドもしくはホロトランスコバラミンおよびアポトランスコバラミンの双方に固定可能であるリガ

50

ンドが固定された第2の領域を持ち、さらに前記工程(i i i)は、前記第1の領域および前記第2の領域からのシグナルを検出することを含む。

【0026】

特異的な結合相手またはリガンドは、その特定の化学構造またはコンホメーションの効力によって、かつ、単に体液由来の試料中の多くの成分に共通するであろう一般的な物理化学的性質(例えば、親油性)によってでなく、TC(すなわち、アポTCおよび/または必要に応じてホロTC)と結合するものを意味する。

【0027】

前記特異的な結合相手またはリガンドは、例えば、抗体、抗体フラグメント、単鎖の抗体、抗体フラグメント二量体、三量体もしくは四量体、またはアポTCおよび/またはホロTCに親和性を有する化合物、より具体的には、細胞表面の受容体、ポリペプチド、オリゴペプチド、オリゴヌクレオチド、小有機化合物等である。ほかの特異的な結合相手またはリガンドは、コンビナトリアルケミストリー、ファージ提示ライブラリまたはDNAもしくはRNAの特異的な結合配列から選択してもよい。

10

【0028】

前記結合リガンドが抗体である場合、それはポリクローナル抗体であっても良いが、好ましくはモノクローナル抗体である。モノクローナル抗体の方がポリクローナル抗体よりもはるかに大きい特異性および均質性を持たせて生産することができ、かつ、体液の他の成分、特に他のトランスコバリンおよび適切には前記標的分析物の他のコンホメーションすなわちアポ形態との交差反応性を減少させる。モノクローナル抗体により与えられる均質性および再生産性は、ポリクローナル抗体のそれと比べて、検定において前記分析物がそのように低い濃度であるときに必要なより優れた精度を確立する。その他、それは、抗体フラグメント、例えば、F(ab)、F(ab')<sub>2</sub>またはF(v)断片であっても良い。前記抗体または抗体フラグメントは、一価または二価であっても良く、かつ、ハイブリドーマ技術により生産されても合成由来でも、また、組替えDNA技術または化学合成により発生させても良い。一本鎖抗体または他の抗体誘導體もしくは疑似物質を、例えば使用することができる。前記抗体は、必要に応じて、前記アポTCタンパク質および/またはホロTCタンパク質のあらゆるエピトープ、構成要素または構造により産生してもよい(directed or raised)。

20

【0029】

本発明の分析方法に使用するホロTCに特異的な結合相手またはリガンド(s b p)は、(アポTCと比較して)ホロTCに対して少なくとも10倍の特異性を持つ必要があり、好ましくは少なくとも50倍であって、少なくとも100倍であることがより好ましい。すなわち、アポTCの量が過剰で、それが少なくとも10倍であっても、前記ホロTC s b pの多くが、アポTCよりもホロTCに結合する必要があるということである。それゆえ、宿主動物での抗体産生による選択よりもむしろ、ピトロの方法を使用して前記ホロTC s b pを選択することが好ましい。したがって、候補ホロTC s b pのスクリーニングは、ピトロのライブラリ、例えば、ファージ提示抗体(特に、単鎖の抗体)のライブラリ、オリゴヌクレオチドライブラリまたは化学ライブラリを用いて行うことが好ましい。また、ホロTCに対する前記ホロTC s b pの親和性は、ナノモラー濃度のホロTCを検出できることが好ましい。

30

40

【0030】

例えば、候補ホロTC s b pは、基質(例えば、ビーズまたはシート)上にホロTCを、例えば、アミド結合により固定して選択してもよいし、過剰な固定されていないアポTCの存在下で、前記ライブラリをピックアップしてもよい。ついで、前記基質を完全に洗浄して、ホロTCに結合した候補を解離し、前記ライブラリの型にあった従来の手法により同定してもよい。

【0031】

ついで、候補をアポTCへの交差反応試験をし、アポTCよりもホロTCに対して十分な選択性を有する候補を選択してもよい。また、候補ホロTC s b pをスクリーニングして

50

、HCに交差反応するsbpを除外することが望ましい。

【0032】

最も好ましくは、前記ホロTCsbpの結合領域を非ペプチド、例えば、有機小分子またはオリゴヌクレオチド（例えば、20～50mer）とすることである。

【0033】

候補アポTCsbpを同様の方法で選択してもよい。しかしながら、ホロTCsbpおよび非重複TCsbp（すなわち、アポTCおよびホロTCのどちらとも結合するもの）を使用することが好ましく、TCsbpは、下記文献等によりよく知られている（例えば、Quadros et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.222: 149-154 (1996)およびMcLean et al., Blood89: 235-242 (1997)を参照。）。

10

【0034】

ある候補ホロTCsbpおよびTCまたはアポTCsbpを一旦選択して、それらを従来の方法によりレポーター標識してもよい。

【0035】

前記レポーターは、異なるリガンドが前記基質の異なる領域に結合していれば、同一であってもよい。しかしながら、異なるレポーターを使用することがよく、すなわちそれらのシグナルが識別できることが好ましい。

【0036】

前記sbpのレポーター基は、いかなる従来レポーター、例えば、発光体または吸収体、特に、電磁放射線または電磁吸収体、酵素であってもよく、放射性同位体で標識すること等も少なからず好ましい。酵素レポーター基を使用する場合、検出するシグナルは、前記酵素により触媒された反応からのシグナル、例えば、発行光である。すなわち、前記検出するシグナルは、直接または間接的に前記レポーター基により生じるものであればよい。

20

【0037】

本発明においてsbpの標識に使用する検出可能な発色化合物または蛍光化合物の適当な例としては、アントラキノン、アゾ染料、アジン染料、例えば、オキサジンおよびチアジン、トリアジン、天然型顔料、例えば、ポルフィリン、フィコビリタンパク質、例えば、フィコエリチンおよびフィコキアニン、クロロフィルおよびその類似体ならびに誘導体、カロチノイド、アクリニジン、キササンチン、例えば、フルオレセインおよびローダミン、インディゴ染料、チオキササンチン、クマリン、ポリメチン、例えば、ジアリルメチンならびにトリアリルメチンおよびフタロシアニンならびに金属フタロシアニンの誘導体があげられる。

30

【0038】

同様に、広範囲の放射性化合物をシグナル形成標識として使用してもよく、中でも、ヨウ素125標識した化合物を使用してもよい。

【0039】

あるいは、前記sbpと、化学発光シグナルを生成できる天然化合物または合成化合物とを結合させて、前記シグナルを既知の方法により分析してもよい（例えば、Cormier, M.J. et al.; Chemiluminescence and Bioluminescence, Plenum Press, New York 1973参照。）。適当な化学発光化合物には、ルシフェリン、シュウ酸エステル、1,2-ジオキソエタン、ルミノールまたはそれらの誘導体等があげられるが、これらに限定されない。適当であれば、過酸化水素、酵素、例えば、ルシフェラーゼ、アルカリフォスファターゼまたは別の化学薬品を使用して、使用したシグナル発生分子からの化学発光シグナルを発生させてもよい。

40

【0040】

複数のレポーター分子、例えば、酵素、発色団、蛍光団等を持つ高分子の「土台」に、前記sbpを結合することが好ましい。このようにすると、前記シグナルを、例えば、数百倍に増幅することができる。高分子の土台としては、例えば、デキストラン（例えば、アミデックス）、ポリエチレングリコールおよびデンドリマー（例えば、スターバーストデ

50

ンドリマー)等が含まれる。

【0041】

本発明において、強力な陰イオン性シグナルを発生する分子を使用することは好ましくない。その理由としては、それらは試料中に存在する血清タンパク質、例えば、ヒト血清アルブミン(HSA)等と結合する傾向があるからである。使用するものの特に適当な例としては、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミンBまたはN-(レソルフィン-4-カルボニル)ピペリジン-4-カルボン酸-N-ヒドロキシスクシニイミド-エステル(resos)等があげられる。

【0042】

前記レポーターが発光体または光吸収体である場合、前記レポーターが、前記シグナルを増幅させるために複数の発色団または蛍光団を含むことが特に好ましい(特に、前記標識したホロTCsbp)。特に好ましいレポーター群の一つは、時間遅延蛍光可能なレポーター群であって、別のものとしては誘引発光可能な群である。レポーターの具体例としては、 $\beta$ -ガラクトシダーゼおよびチキンアルカリフォスファターゼ等があげられる。

【0043】

親和性分子、例えば、分離を目的とした抗体および抗体フラグメントを、例えば、前記リガンドを結合または共役させることにより、既知の固体担体または基質に固定することは、当業者に知られている。また、前記固体担体または基質は、従来幅広く使用されて、分離または固定することが提案されており、当業者に既知の方法により使用することができる。そのような固相は、例えば、小片、シート、ゲル、フィルター、膜、ファイバーまたはキャピラリー等の形状をとっていてもよい。前記リガンドを前記多孔質基質に結合させる方法は、大変よく知られていて、文献に広く記載されている。

【0044】

本発明の方法において、前記基質は、多孔質シートまたは多孔質小片(例えば、セルロース系材料、好ましくはニトロセルロース)であることが好ましく、非多孔質担体上に貼り付けることが特に好ましく、また、適宜、毛細管現象により前記基質への前記液体試料の吸収を促進させるために背後に吸収支持剤を併用してもよい。すなわち、ある一つの好ましい実施形態において、好ましくは、吸収層に支持されている前記基質層は、ディップスティック上にマウントされている。別の好ましい実施形態において、好ましくは吸収層に支持されている前記基質層が、前記基質層の露出した表面に前記液体試料を適用し、前記基質層からのシグナルを読み取るための孔をもつプラスチックのケーシングに担持されている。

【0045】

シグナル発生は、必要に応じて、選択した標識に適した方法、例えば、光や酵素標識用基質を曝露することにより行うことができ、シグナルの検出は、前記放出されたシグナルを検出するために適当な検出器、例えば、放射能検出器または光検出器により行うことができる。特に、前記シグナルが光シグナルであれば、デジタルカメラを前記検出器として使用することが好ましく、必要であれば、フィルター、プリズムまたは前記検出器を所望の波長帯に到達させることを確実にするための別の手段を付していてもよい。

【0046】

前記2つの標識したsbpからのシグナルの検出を、同時または連続して行ってもよいが、同時検出が好ましい。

【0047】

検出シグナル操作を行い、TC飽和度の定量的指標、半定量的指標または定性的指標を得る。その方法は、例えば、コンピュータで行い、前記アッセイを行うために使用する機械内に組み込まれたものや前記アッセイの処理を制御するために手配されたもので行うことが好ましい。前記シグナルを形成する標識が前記sbpと異なる場合、前記アッセイは、通常の方法によって校正し、前記シグナル比( $S_a/S_b$ または $S_a/(S_a+S_b)$ )、ここで、 $S_a$ は、前記ホロTCsbpシグナルであり、 $S_b$ は、前記TCまたはアポTCsbpシグナルである。)をTC飽和値に変換することを必要とする。したがって、前記

アッセイは、必要に応じて、アポTCおよびホロTCを既知の比率で含む較正基準を提供してもよい。

【0048】

その他の実施形態において、本発明のいかなる方法も、表面プラズモン共鳴(SPR)検出器内のチップ型の基質の表面で行うことができる。このような方法の場合、特異的なリガンドまたは基質を活性させた標識の必要性がなくなり、前記表面に結合する特異的な結合リガンドまたは特異的な結合相手の付加質量により直接、結合を検出する。この形態の好ましい例において、TCIIバインダーは、SPR「チップ」の表面上に固定する(例えば、前記チップの金メッキにより、チオール接合TCIIバインダーの吸着または前記バインダーとデキストランメッキチップとのアミド結合により)。ついで、前記チップを前記表面プラズモン共鳴検出器中におき、前記試料を含む溶液を前記チップ上溢れさせ、固定されたりガンドに前記試料からホロTCおよびアポTCを結合させる。ついで、アポTCに特異的な第1の特異的なバインダーまたはアポTCおよびホロTCの双方に特異的な第1の特異的なバインダーを含む溶液を前記チップ上に溢れさせ、表面プラズモン共鳴により前記結合を測定し、第1のシグナルを得る。ついで、この第1の特異的なバインダーを洗い流してもよい。ついで、ホロTCのみに特異的な第2の特異的なバインダーを、前記チップ上を通過させる。ホロTCへの結合に呼応する第2のシグナルを表面プラズモン共鳴により検出する。ついで、前記第1のSPRと第2のSPRとの違いを用いて、前記TCII飽和度を計算する。SPRを使用することにより、「標識」または「レポーター標識」として記載したあらゆるリガンドまたは特異的な結合相手を、あらゆる付加標識または活性標識なしで、質量により検出することができる。この場合、前記「標識」は、単に、前記特異的な結合相手またはリガンドの質量である。前記基質に適用する試料は、体液または組織由来液体が好ましく、より好ましくは無細胞液体、特に哺乳類由来の血漿または血清、さらに特に人または患者由来の血漿または血清である。

【0049】

さらなる形態からみると、本発明は、下記のものを含むアッセイキットを提供する。  
TC固定リガンドが表面上に固定された多孔質基質；  
トランスコバラミンに対する第1のレポーター標識結合相手および第2のレポーター標識結合相手。なお、前記第1の結合相手は、ホロトランスコバラミンおよびアポトランスコバラミンの双方を結合可能なものかまたはアポトランスコバラミンに特異的な結合相手であり、前記第2の結合相手は、ホロトランスコバラミンに特異的な結合相手であり；  
洗浄剤(任意)；  
酵素レポーター標識のための基質(任意)；  
アポTCおよびホロTCを既知の比率で含む少なくとも1つの較正基準(任意)；および前記レポーター標識からのシグナルを検出できる検出器(任意)。

【0050】

代替方法において、前記トランスコバラミン飽和度は、前記基質の異なる領域の2つのリガンドに結合させることにより測定することができ、第1の領域にホロTCを固定し、第2の領域にアポTC(またはアポTCおよびホロTC)を固定し、前記基質と前記TCを含む試料およびTCのためのレポーター標識したsbpとを接触させる。本発明のさらなる形態を形成するこの方法において、前記基質の異なる領域から前記シグナルを読み取り、前記シグナル比、すなわち $S_a / (S_a + S_b)$ または $S_a / S_b$ (ここで、 $S_a$ は前記ホロTCリガンド領域からのシグナルであって、 $S_b$ は前記アポTCまたはホロTCおよびアポTCリガンド領域からのシグナルである)は、TC飽和度の指標となる。本発明のこの形態または別の形態において、前記基質の「領域」は、例えば、膜の表面の異なる部分であっても、ディップスティック上の異なる膜表面であっても、ケーシングの異なる膜であっても、分離ビーズの異なる組(例えば、磁化できる一組、他のもの)であってもよい。

【0051】

10

20

30

40

50

この構成において、本発明の分析方法は、例えば、下記工程を含む。

( i ) トランスコバラミンを含む液体試料と、その異なる領域において第 1 および第 2 のトランスコバラミン固定リガンドが固定されている多孔質基質とを接触させる工程。ここで、前記第 1 のリガンドは、ホロトランスコバラミンに特異的に結合でき、前記第 2 のリガンドは、アポトランスコバラミンまたはアポトランスコバラミンおよびホロトランスコバラミンを固定できる。

( i i ) 前記工程 ( i ) の前、間または後に、トランスコバラミンのためのレポーター標識した結合相手と前記試料のトランスコバラミンを結合させる工程。

( i i i ) 前記基質の異なる領域上に固定した前記結合相手のレポーター標識からのシグナルを検出し、そこから前記試料中のトランスコバラミン飽和度を測定する工程。

10

#### 【 0 0 5 2 】

したがって、さらなる形態からみると、本発明は、以下のものを含むアッセイキットを提供する。

異なる領域で、第 1 のトランスコバラミン固定リガンドおよび第 2 のトランスコバラミン固定リガンドが固定されている多孔質基質。ここで、前記第 1 のリガンドはホロトランスコバラミンに特異的に結合可能で、前記第 2 のリガンドはアポトランスコバラミン、またはアポトランスコバラミンおよびホロトランスコバラミンを固定可能である。 ;

トランスコバラミンのためのレポーター標識した結合相手。 ;

洗浄剤 ( 任意 ) ;

酵素レポーター標識のための基質 ( 任意 ) ;

20

アポ T C および ホロ T C を既知の比率で含む少なくとも 1 つの較正基準 ( 任意 ) ; および前記レポーター標識からのシグナルを検出できる検出器 ( 任意 ) 。

#### 【 0 0 5 3 】

以下の実施例および図面を用いて本発明についてさらに説明するが、本発明は、これらに限定されない。

#### 【 0 0 5 4 】

図 1 は、T C リガンドが固定されている基質を示し ;

図 2 は、2 つの領域をもつ基質を示し、第 1 はホロ T C I I に特異的な固定されたりガンドを含み、第 2 はアポ T C I I に特異的な固定されたりガンドを持ち ;

図 3 は、前記表面上に固定された T C の抗体を持つ表面プラズモン共鳴検出器内のチップを示す。

30

#### 【 0 0 5 5 】

図 1 において、「標識 - s b p 1」は、第 1 の標識を持つ第 1 の特異的な結合相手を示し、「s b p - 標識 2」は、結合した第 2 の標識を持つ第 2 の特異的な結合相手を示す。標識 1 からのシグナルは、前記ホロ T C レベルに対応し、標識 2 からのシグナルが、全アポおよびホロ T C レベルに対応することがわかる。

#### 【 0 0 5 6 】

図 2 において、ホロ T C I I は第 1 の領域 ( 左側 ) に結合し、アポ T C I I は第 2 の領域 ( 右側 ) に結合していることがわかる。前記「s b p - 標識 1」は、結合した標識 1 を持つ T C に特異的な結合相手を示す。このように、前記 2 つの領域からのシグナルは、前記

40

#### 【 0 0 5 7 】

図 3 において、チップ表面が、第 1 のモノクロナール抗体 ( m A b 1 ) の結合により修飾されている。これは、試料のアポ T C およびホロ T C へ結合する。また、前記第 2 の抗体 ( m A b 2 ) は、ホロ T C またはアポ T C に結合し、これにより、全 T C 量の S P R シグナルを得ることができる。前記第 3 の抗体 ( m A b 3 ) は、ホロ T C のみに結合するため、前記ホロ T C 量を示す S P R シグナルを得ることができる。

#### 【 実施例 1 】

#### 【 0 0 5 8 】

ホロ T C s b p の生成

50

A) ビーズ上へのホロTCの固定

0.1 M 2-(N-モルホリン)-エタンスルホン酸(MES)(pH 5.0)中の0.2 M 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノ-プロピル)カルボジイミド(EDAC) 1 mLと0.1 M MES(pH 5.0)中の2%(w/v)カルボン酸を修飾したビーズ(直径1 μm、Merck-Estapor社製) 1 mLとを混合した。前記混合物をバス・ソニケーション(bath sonication)して前記試薬を分散させ、ついで、室温で一時間、上下に回転させた。前記混合物を300 gで遠心し、そのペレットを0.1 M MES(pH 7.0)で洗浄して遠心し、ついで1.0 mLの脱イオン水で再懸濁した。プラスチック製の小さなバイアル瓶中で、前記EDAC活性化ビーズと0.1 M 3-[N-モルホリノ]-プロパンスルホン酸(MOPS)(pH 7.5)中の1 mg/mLホロTCとを同量で混合し、室温で一晩回転させた。その後、前記混合物を0.05% Tween 20(水溶液)で2回洗浄して、さらに5 mg/mL BSAを含む50 mM Tris緩衝液(pH 7.4)で2回洗浄した。約10 μg/mgのホロTCの単層を持つ被覆したビーズを、50 mM Tris緩衝液(pH 7.4)、0.15 M NaClおよび1 mg/mL BSA中で0.1%となるように保存した。

【0059】

B) (i) 前記目的分子としてのホロTCをもつアプタマーライブラリのバイオパンニング(biopanning)

化学工程および酵素工程の組み合わせにより、二本鎖DNA配列のライブラリを準備した。具体的には、40のヌクレオチド長の $10^{14} \sim 10^{15}$ の一本鎖DNA(ssDNA)配列を合成し、ついで、酵素手法により二本鎖に変換した後、PCR増幅した。第2に、その二本鎖DNAを転写して、一本鎖RNAまたは修飾RNAのライブラリを得た。第3に、そのRNAライブラリを対象とする目的分子で調べた。その選択された分子を逆転写して、PCRにより増幅した(DNAライブラリに対してPCRが十分な程度にまで)。前記対象に結合した配列の部分集合は、第2回目のバイオパンニングのためにプールした。前記選択工程は、だいたい7~15回行う。

【0060】

明確なプライマーアニーリング配列に挟まれた40ヌクレオチドの連続配列を含む配列([5'-GGGAGGACGATGCGG-(N)<sub>40</sub>-CAGACGACTCGCCCGA-3'] (配列番号1))をゲル精製した合成鑄型DNA 5 nmolを、プライマー5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGGACGATGCGG-3' (配列番号2)および5'-TCGGGCGAGTCGTCTG-3' (配列番号3)でPCRを4サイクル行うことにより、増幅させた。前記PCR由来の鑄型DNA(約 $5 \times 10^{14}$ 分子)約800 pmolを3 mLの転写反応液中のT7 RNAポリメラーゼによりピトリ口で転写した。ここで、前記転写反応液は、40 mM Tris HCl(pH 8.0)、12 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM スペルミジン(Spermidine)、5 mM ジチオセレイトール(DTT)、0.002% Triton X-100(v/v)、4% ポリエチレングリコール(w/v)、グアニジン-5'-トリホスフェート(GTP)、2'-NH<sub>2</sub>CTPおよび2'-NH<sub>2</sub>UTP (CTP=シチジン5'-トリホスフェートおよびUTP=ウリジン5'-トリホスフェート)前記各ATPを2 mMずつ含む。全長転写生成物を、変性条件下で、8% ポリアクリルアミドゲルで精製し、結合緩衝液(10 mM Tris HCl、0.1 mM EDTA、2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、pH 6.8)中に懸濁して70 °Cに加熱し、氷上で冷却した。

【0061】

前記溶液中にビーズ上に固定した約10 μgのホロTCおよび競合相手として100 μgの固定されていないアポTCを加え、それらとともに、37 °Cで15分間、前記RNAプールを培養した。前記ビーズを遠心により分離し、その後すぐに5 mLの結合緩衝液で洗浄した。pHを低くすることによりそのビーズから結合したRNA分子を溶離し、エタノール沈殿により回収し、プライマーとしてDNA配列5'-TCGGGCGAGTCGTCTG-3' (配列番号4)を用いて、鳥類の骨髄細胞症ウイルス転写酵素(Life Science)により、48 °Cで45分間逆転写した。前記cDNAのPCR増幅の後に、得られた二本鎖のDNA鑄型をビ

トロで転写して第2の選択用のRNAを得た。前記結合液中のビーズで覆われたホロTCの量を断続的に減らし、徐々に選択圧を増加させた。ホロTC用の豊富なRNAプールの親和性が十分に増加するまで、前記選択工程を繰り返した。この時点で、cDNAをプライマー5'-CCGAAGCTTAATACGACTCACTATAGGGAGGACGATGCGG-3' (配列番号5) および5'-GCCGGATCCTCGGGCGAGTCGTCTG-3' (配列番号6) でPCRにより増幅させ、前記PCR産物の5'-末および3'-末にBamHIおよびHindII制限酵素認識部位(下線部)をそれぞれ導入した。前記PCR産物をBamHIおよびHindII、酵素で短くし、エレクトロポレーションにより大腸菌由来のSURE(ストラテジーン)に導入した。プラスミドを単一のバクテリアクローンから短離し、選別し、従来技術で適当なもの、例えば、Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp C1.に記載の方法を用いて配列を決定した。

#### 【0062】

RNAヌクレアーゼ耐性を比較するために、前記RNA分子をその糖の2'の位置で、例えば、アミノ置換等により改変しても良い。

#### 【0063】

前記ライブラリがRNAアプタマーに基づくものであろうとssDNAアプタマーに基づくものであろうと、もしくは前記ライブラリが偏っていようとなかろうと、前記バイオパンニング(biopanning)手法は本質的には同じものである。要するに、その違いは、ssDNAライブラリが転写を必要としないことである。

#### 【0064】

(ii) ファージ提示ペプチドまたは抗体ライブラリとホロTCとのバイオパンニング  
1 pmolのファージ提示ライブラリを、100 μL PBS-Tween 10 μgのビーズ上に固定したホロTCおよび100 μgのアポTC、1 mg/mL BSAまたは3% BLOTTOと混合した。(BLOTTOは、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM塩化ナトリウム中の5% w/v脱脂粉乳、pH 7.4、0.01%消泡剤A、0.01%チメロサル(thimerosal)のことである)。その混合物を4で一晚インキュベートし、前記ビーズを遠心により選別し、1 mL PBS-Tweenで9回洗浄し、標準食塩水で1回洗浄して、緩衝能力を除去した。前記ビーズを600 μLの0.1 Mグリシン-HCl緩衝液(pH 2.2)に再懸濁して、15分後にそのビーズを3000 gで3分間の遠心により選別した。その上清を除去して、36 μLの2 M Tris (pH 9.0)で中和して、400 μLの大腸菌(例えば、K91-Kan)と混合した。プラスミドを単一のバクテリアクローンから単離して、標準的な方法、例えば、Sambrook J. et al., supraに記載の方法により配列を決定した。前記結合反応および抽出反応を少なくとも3回行った。前記結合反応でBSAおよびBLOTTOを交互に使用して、これらのタンパク質に結合するファージの濃縮を抑制した。

#### 【実施例2】

#### 【0065】

##### セルロース紙上へのTC特異的な結合剤の固定

セルロース紙(例えば、Whatman No. 52)を最初に脱イオン水で3分間膨張させ、ついで、3% CNBr(aq)で処理した。そのpHを1 mM NaOHの添加により10.5まで上昇させた。30分後、前記セルロース紙を500 mLの5 μM NaHCO<sub>3</sub>で12回、500 mLの脱イオン水で2回、500 mLの25%アセトン、50%アセトンならびに75%アセトンでそれぞれ2回ずつ洗浄した。最後に、500 mLアセトンで4回洗浄し、室温で空気乾燥させた。

#### 【0066】

抗TC抗体の共有結合を、100 mLの0.1 M NaHCO<sub>3</sub>で10 μg/mLまで前記抗体を希釈することにより行い、20 gのcut paperを添加した。前記混合物を4で3時間穏やかに攪拌し、ついで室温で10分間10 mL 0.5 mM NaHCO<sub>3</sub>で2回洗浄し、30分間100 mLの0.1 M酢酸ナトリウム(pH 4.0)で洗浄し、0.

15 M NaCl、0.1% Tweenおよび0.1%ゼラチンを含む50 mMリン酸緩衝液(pH 7.5)で2回洗浄した。前記抗体を充填した紙は、少量の前記緩衝液に保存した。

【0067】

ついで、前記抗体を充填した紙の一部分を柔軟性のあるプラスチック製のディップスティックに付着させた。

【実施例3】

【0068】

分析

50  $\mu$ Lのヒト血清を、実施例2により調製したディップスティックの膜パッドに塗布した。5分後、前記ディップスティックを100  $\mu$ LのTris緩衝化食塩水(TBS-100 mM Tris、pH 7.2、150 mM塩化ナトリウム)ですすぎ、50  $\mu$ Lの検出溶液を添加して5分間インキュベートした。前記検出溶液は、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼに接合する非重複、抗ヒトTC特異的モノクロナール抗体およびトリ由来のアルカリフォスファターゼに接合する実施例1のホロTCsbp(または非重複抗ヒトTC特異的モノクロナール抗体)を含む。ついで、前記ディップスティックを100  $\mu$ LのTBSですすいだ。TBS中のアルカリフォスファターゼに対する発光基質50  $\mu$ L添加した(例えば、0.25 mM Tropix由来のCPD-Star)。前記ディップスティックを照度計で1秒から15分間測定した。ついで、前記ディップスティックを100  $\mu$ LのPBS(リン酸緩衝生理食塩水)ですすぎ、PBS中の $\alpha$ -ガラクトシダーゼに対する発光基質(例えば、0.1 mM Tropix由来Galacton-Star)を50  $\mu$ Lのアルカリフォスファターゼ阻害剤(例えば、40  $\mu$ M シクロヘキサノールとリスメチレンスルホネート)を添加した。ついで、前記ディップスティックを再び前記照度計で読み取った。最初の読み取り値が前記ディップスティック上のホロTC量を示すのに対し、2回目の読み取り値は全TC量を示す。それらの比は、前記試料中のTCのコバラミン飽和値に独立した値を示す。

【実施例4】

【0069】

ヒト由来トランスコバラミンおよびヒト由来ホロトランスコバラミンに特異的なマウスモノクロナール抗体の開発

i) 免疫

BALB/cメスマウスに、AdjuPrime 免疫変調成分(Pierce, IL, USA)と混合した組み換えヒト由来ホロトランスコバラミンを20  $\mu$ g免疫注射(i.p.)し、その後4週間ごとに20  $\mu$ gのブースター注射した。

【0070】

ii) 細胞融合

最後のブースター注射より4日後に脾臓を取り出し、PEG(ペーリンガー・マンハイム社製(ドイツ))を用いて脾臓嚢胞とHAT(ヒポサンチン, アミノプロテイン, チミジン(Hypoxanthine, Aminopterin, Thymidine); シグマ社製)感受性形質細胞種OUR1(X63-Ag8.653のサブクローン)とを細胞融合した。HAT存在下の培地(10% CFSR3(シグマ社製)添加DMEM/Ham's F12(インビトロゲン社製))を含む5  $\times$  96 Fトレイ(ヌンク(Nunc)社製)に、細胞融合生成物を塗布した。一週間後、HT(シグマ社製)を含む培地でその融合物を育てた。

【0071】

iii) 最初のスクリーニング

2週間後、固相捕捉アッセイを用いて、培地から前記ハイブリドーマをスクリーニングした。ヒツジ由来の抗マウスIgG抗体(メルク-エスタポア社製(Merck-Estapor)(フランス))で被覆した1  $\mu$ m磁化ビーズ1%の懸濁液10  $\mu$ Lと前記細胞媒体とを混合し、室温で1時間保持した。マウスモノクロナール抗体と結合した磁化ビーズを、マグネットを用いて単離して、1 mLリン酸緩衝液(pH 7.2)、0.15 M NaClおよび

1 mg/mL ウシ血清アルブミンで4回洗浄した。57Coで標識したコバラミン (ICN、USA) で前処理したプールしたヒト血清 (スキャンティボディ社製 (Scantibodies)、USA) 100 µL で洗浄したビーズを再懸濁し、前記血清中のアポトランスコバラミンを57Coで標識したホロTCに変換した。前記混合物を室温で30分間保持して、マグネットを用いてビーズを単離した。前記ビーズに伴う放射能をガンマカウンターで計測した。

#### 【0072】

##### iv) クローニング

Balb/c 腹膜フィダーセル (10000 per cell) でプレシードした96ウェルFトレイ (ヌンク社製 (Nunc)) 上で限界希釈することにより、抗トランスコバラミン抗体に陽性のウェルをクローニングした。陽性のクローンを選別し、100%のサブクローンが特異的な抗体を生成するまでクローニングを繰り返した。10% DMSO (シグマ社製) を含むCPR3 (シグマ社製) 中に細胞を入れ、液体窒素で凍結することに保存した。

#### 【0073】

第2のスクリーニング。細胞培地から抗体を前記した磁化ビーズ上に単離した。前記抗体で被覆したビーズ10 µL と前述の57Coで標識した血清とを、組み換えヒト由来アポトランスコバラミンまたは組み換えヒト由来ホロトランスコバラミンの濃度を増加させた状態で混合した。

#### 【0074】

2つの抗トランスコバラミン抗体 (mAb1 および mAb2) は、アポトランスコバラミンおよびホロトランスコバラミンの双方に対する親和性に基づいて選択し、1つのモノクロナール抗体 (mAb3) は、ホロトランスコバラミンに対する特異性に基づいて選択した。それぞれのクローンをビトロで、テクノマウス社製のCL1000で拡張した (expanded)。タンパク質Aアフィニティークロマトグラフィーにより培地から抗体を精製した。要約すると、前記抗体を含む培地上清を、1M NaCl (結合緩衝液) を含む0.1M Tris (pH 8.0) で1:1に希釈し、結合緩衝液で平衡化した前記タンパク質Aカラムに適用した。ついで、前記タンパク質Aカラムをカラムの15倍の容量の結合緩衝液で広範囲にわたって洗浄した。前記抗体を0.1Mクエン酸緩衝液 (pH 4.0) で溶出し、1M Tris 緩衝液 (pH 8.0) でpH 7.0に中和して、セファデックスG-25カラムで0.15M NaCl を含む0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.2) に緩衝液を交換した。

#### 【実施例5】

#### 【0075】

##### TC 特異的モノクロナール抗体 mAb1 のデキストラン被覆表面への固定

前記デキストランで被覆したチップ (ファルマシア社製、スウェーデン) のカルボキシル化した表面を0.05M N-ヒドロキシスクシニイミド (NHS) / 0.2M N-エチル-N'-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]カルボジイミド塩酸塩 (EDC) で活性化し、脱イオン水ですすぎ、0.01 HEPES 緩衝液 (pH 7.4) (0.15M NaCl、0.003M EDTA および 0.005% ポリソルベート (HBS) 含有) 中で50 µg/mL の mAb1 (実施例4より) で共有的に被覆した。未反応のNHSは、1Mエタノールアミンにより反応を遮断し、前記チップをHBSで広範囲にわたって洗浄した。

#### 【実施例6】

#### 【0076】

##### ホロトランスコバラミン、mAb2 および mAb3 と固定した mAb1 との結合

前記結合の様子は、表面プラズモン共鳴を用いてリアルタイムで追跡し、ピアコア (BioCore) 装置 (ピアコア社製、スウェーデン) で行った。前記チップに結合する遊離リガンドの量を応答単位 (RU) で測定し、なお、前記応答単位とは、結合したリガンドの量と固定したターゲットに対する親和性のどちらも踏まえたものである。mAb1を固

10

20

30

40

50

定したチップ（実施例 5）を前記装置に導入し、5 μL の 100 nM ホロトランスコバラミン、5 μL の 50 μg / mL mAb2 ならびに 5 μL の 50 μg / mL mAb3 を連続して注入し、それぞれ注入の間に洗浄工程を行った。前記装置にホロトランスコバラミンを流入した後、565RU の mAb3 と前記固定した mAb1 とを結合した。ホロトランスコバラミンがない場合は、mAb2 も mAb3 も前記固定した mAb1 を持つチップに結合しなかった。

【図面の簡単な説明】

【0077】

【図1】図1は、TCリガンドが固定されている基質を示す模式図である。

【図2】図2は、2つの領域をもつ基質を示す模式図である。

10

【図3】図3は、前記表面上に固定されたTCの抗体を持つ表面プラズモン共鳴検出器内のチップを示す模式図である。

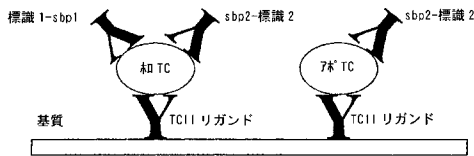
【配列表フリーテキスト】

【0078】

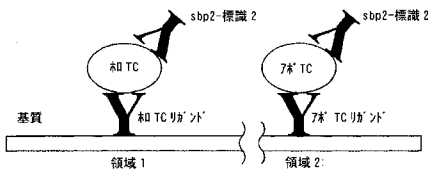
- 配列番号 1 合成鋳型 DNA、n はヌクレオチド
- 配列番号 2 PCR用プライマー
- 配列番号 3 PCR用プライマー
- 配列番号 4 RTPCR用プライマー
- 配列番号 5 PCR用プライマー
- 配列番号 6 PCR用プライマー

20

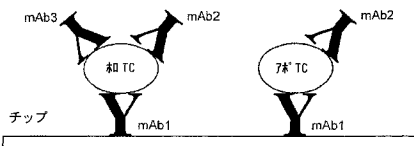
【図1】



【図2】



【図3】



## 【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
31 October 2002 (31.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 02/086513 A2**

- (51) International Patent Classification: **G01N 33/82**
- (21) International Application Number: PCT/GB02/01846
- (22) International Filing Date: 23 April 2002 (23.04.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
0109925.8 23 April 2001 (23.04.2001) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): **AXIS-SHIELD ASA** [NO/NO]; Ulvenveien 87, Økern, N-0510 Oslo (NO).
- (71) Applicant (for GB only): **COCKBAIN, Julian** [GB/GB]; 42 Southmoor Road, Oxford OX2 6RD (GB).
- (72) Inventor; and  
(75) Inventor/Applicant (for US only): **ØRNING, Lars** [SE/NO]; Axis-Shield ASA, Ulvenveien 87, Økern, N-0510 Oslo (NO).
- (74) Agents: **COCKBAIN, Julian** et al.; Frank B. Dehn & Co., 179 Queen Victoria Street, London EC4V 4EL (GB).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GU, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KR, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, P1, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**  
without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 02/086513 A2

(54) Title: TRANSCOBALAMIN II ASSAY METHOD

(57) Abstract: An assay method for determining transcobalamin saturation wherein a transcobalamin containing liquid sample is contacted with a porous substrate with immobilized thereon a transcobalamin immobilizing ligand and with a reporter-labelled transcobalamin binding partner and wherein signals from reporter labels which become immobilized on said substrate are detected, characterised in that one of said ligand or said binding partner comprises a first ligand or binding partner capable of specific binding to holo transcobalamin and a second ligand or binding partner capable of binding to apo transcobalamin or to holo and apo transcobalamin.

Transcobalamin II Assay Method

The invention relates to improvements in and relating to diagnostic assay methods, in particular assays for transcobalamin.

Cobalamin or vitamin B<sub>12</sub> is a water-soluble vitamin which forms part of the vitamin B complex found in foods. The core molecule consists of a corrin ring of four pyrole units which surround the essential cobalt atom. Cobalamin is the only vitamin which cannot be synthesised by animals or plants and must be absorbed from food in the gut. It can however be stored in the liver. It is synthesised by micro-organisms, in particular by anaerobic bacteria and yeasts.

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

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

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

- 2 -

it is dissociated by a releasing factor and the cobalamin transported actively across the membrane of the ileum into the blood stream.

Cobalamin does not circulate in the body in a free form in an appreciable amount. Probably 99% or so of cobalamin is bound by haptocorrin, transcobalamin or albumin.

The protein believed to be responsible for transporting cobalamin to target tissues is transcobalamin II (hereinafter simply referred to as transcobalamin or TC), a critical trace protein without which cobalamin cannot cross cell membranes. Despite this important metabolic function, only about 6-25% of cobalamin in the serum is bound to TC and most is carried by HC. TC is a single chain polypeptide of 45 kDa found primarily in serum, seminal fluid and cerebro-spinal fluid. Cobalamin bound TC or holo-TC, attaches to specific receptors on cell membranes and once bound, the holo-TC complex is taken into cells by pinocytosis.

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

Less than a quarter of the total plasma cobalamin is associated with TC. The rest is bound to HC or albumin as mentioned above.

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

Certain population sub-groups, for example the aged, pregnant women, patients with chronic or acute gastrointestinal disease, those suffering from certain

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

- 3 -

autoimmune diseases, those with a family history of pernicious anaemia and AIDS sufferers, are particularly prone to cobalamin deficiency.

The clinical manifestations of cobalamin deficiency are varied and numerous but primarily involve anaemia, megaloblastic haematopoiesis and functional and structural disorders of the nervous system. Around 60% of individuals diagnosed as being deficient in cobalamin are anaemic, but in many neurological symptoms are the only clinical signs observed. Around 10% of patients exhibit psychiatric symptoms and around 40% exhibit both neurological and psychiatric symptoms.

Early diagnosis of cobalamin deficiency is crucial to ensure a good prognosis for patients, since some of the manifestations of cobalamin deficiency, particularly the neuropsychiatric effects, are irreversible if not detected and alleviated by cobalamin therapy quickly.

It is desirable therefore to accurately assess the cobalamin level of an individual in an expedient and efficient manner, with a view to establishing whether or not the individual may be suffering from cobalamin deficiency.

Measurement of total plasma cobalamin, i.e. cobalamin (and cobalamin like substances) bound to HC or TC, has been used in attempts to assess cobalamin deficiency. This technique results in a broad based concentration distribution within a population which is considered to be normal and hence produces a wide reference range. Within individuals however, the range of available cobalamin considered to be normal for that individual, is very narrow. It has been observed that although an individual's metabolically active cobalamin concentration has moved outside their own reference range, their total plasma cobalamin content remains within the range considered to be normal for the population. Under such circumstances, cobalamin deficiency can go undetected. Such an unreliable method

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

- 4 -

is clearly undesirable and it is well recognised that such serum or plasma cobalamin measurements have low diagnostic sensitivity and specificity.

Microbial assays involving micro-organisms dependent upon cobalamin for growth, have been developed and used in measuring plasma cobalamin concentration, but in addition to the difficulty of estimating the appropriate reference range, these methods require extraction and conversion of the cobalamins which is very time consuming, troublesome and wholly unsuited for rapid laboratory screening.

Alternative methods for assessing cobalamin deficiency involve measuring the accumulation of metabolites in the plasma which require cobalamin for their conversion. Plasma methylmalonate and plasma homocysteine levels increase in cobalamin deficient individuals and make good candidate molecules for correlation with vitamin B<sub>12</sub> deficiency. Methods based on homocysteine assessment have been shown, however, to be complicated, impractical and show poor specificity and sensitivity. Whilst methods based on methylmalonate measurement are accurate and reliable, they are cumbersome and require analysis by combined gas-chromatography/mass-spectrometry and are hence expensive and again unsuitable for routine clinical screening.

It has also been suggested that measurement of TC bound cobalamin as opposed to total plasma cobalamin may provide a reliable clinical indicator of the likelihood of cobalamin deficiency (Herbert et al. (1990) *Am. J. Hematol.* 34:132-139; Wickramasinghe and Fida (1993) *J. Clin. Pathol.* 46:537-539; US Patent 4680273). Such efforts to determine holo-TC concentration were mostly indirect, estimating holo-TC concentration as the difference between total plasma cobalamin and the cobalamin concentration of TC depleted plasma.

Such TC depletion may be accomplished by adsorption to ammonium sulphate (Carmel (1974) *Am. J. Clin. Pathol.*

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

- 5 -

62:367-372), microsilica (Herzlich & Hubert (1988) Lab. Invest. 58:332-337; Wickramasinghe & Fida (1993) J. Clin. Pathol. 46:537-539), microfine glass (Vu et al. (1993) Am. J. Hematol. 42:202-211) or immobilized anti-TC polyclonal antibodies (Lindemans et al. (1983) Clin. Chim. Acta 132:53-61). The concentration of cobalamin in total plasma and the depleted fraction is performed by methods well known in the art such as radio or enzyme immunoassay techniques. These methods are unsuitable for routine screening whether automated or not automated because they are complex and time consuming and because the low degree of specificity of the adsorptive materials used results in insufficient separation of holo-TC and holo-HC resulting in an overestimation of holo-TC. Lot-to-lot variation of the adsorptive material introduces further errors and most importantly, the subtraction of one large volume from another large volume results in unacceptable inaccuracies and unreliability.

Other attempts to assess TC have involved separating TC from other serum components, including HC, using its lipophilicity. Thus Kapel et al. (1988) Clin. Chim. Acta 172:297-310, Benhayoun et al. (1993) Acta Haematol. 89:195-199 and Toft et al. (1994) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 54:62 disclose methods for separating TC from HC using heparin sepharose, silica gel or cellulose respectively. These methods however suffer from the same disadvantages as the indirect methods since they rely on the same adsorptive materials. Also, the low plasma concentration of holo-TC renders these methods unsuitable for combination with existing methods of cobalamin quantification. The normal range of holo-TC is 35-160 pM and values below 35 pM would generally be considered as indicative of cobalamin deficiency. The reported analytical sensitivity of most routine methods for plasma cobalamin is about 40 pM but in practice it is often much higher, typically around 90

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

- 6 -

pM. Hence, normal plasma levels of holo-TC are below or near the sensitivity limit of the routine methods for cobalamin quantification.

Possibly the most accurate method currently recognised for determining TC bound cobalamin involves adsorbing TC to silica and then assaying the bound fraction for cobalamin content using either an immunoassay as described for example by Kuemmerle et al. (1992) Clin. Chem. 38/10: 2073-2077, or a microbiological assay, the latter apparently producing the best results. This method requires an entire working day to perform only twenty assays. It is very expensive and impractical and poorly suited to routine clinical diagnostic laboratory investigations.

In WO 00/17659, an alternative method for determining holo-TC concentration in which, for example, a cell-free sample is contacted with an antibody specific for TC immobilized on magnetizable particles and with a non-overlapping, non-immobilized, radiolabelled antibody specific for holo-TC. The particles are separated out using a magnetic field and washed and their radioactivity is measured so providing a measurement of the holo-TC content of the sample. This method however requires calibration and is more suited for performance in a clinical laboratory than by a physician or physician's assistant at the point of care for the patient.

There thus still exists a need for an assay for holo-TC which is simple and operable at the point of care.

We have recognized that such a simple assay can be achieved by measuring not holo-TC content but TC saturation, i.e. the proportion of TC that is in the holo form, by using two labelled specific binding partners, one for holo-TC and the other for apo-TC or for both holo and apo-TC and by determining the ratio of the signals from the two labels. Moreover such an assay

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

- 7 -

is volume independent, i.e. the quantity of the liquid sample (e.g. body fluid) used need not be precisely determined. This is a major advantage for point-of-care use.

Thus viewed from one aspect the invention provides an assay method for determining transcobalamin saturation wherein a transcobalamin containing liquid sample is contacted with a porous substrate with immobilized thereon a transcobalamin immobilizing ligand and with a reporter-labelled transcobalamin binding partner and wherein signals from reporter labels which become immobilized on said substrate are detected, characterised in that one of said ligand or said binding partner comprises a first ligand or binding partner capable of specific binding to holo transcobalamin and a second ligand or binding partner capable of binding to apo transcobalamin or to holo and apo transcobalamin.

In one embodiment, the assay method of the invention comprises:

- (i) contacting a transcobalamin containing liquid sample with a porous substrate having immobilized thereon a transcobalamin-immobilizing ligand;
- (ii) before, during or after step (i) above, contacting transcobalamin of said sample with a first and a second reporter-labelled binding partner for transcobalamin, said first binding partner being capable of binding both holo and apo transcobalamin or being a specific binding partner for apo transcobalamin and said second binding partner being a specific binding partner for holo transcobalamin; and
- (iii) detecting signals from the reporter labels of said binding partners immobilized on said substrate and determining therefrom an indication of transcobalamin saturation in said sample.

Alternatively, the substrate may have a first region having immobilized thereon a ligand which is a

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

- 8 -

specific binding partner for holo transcobalamin and a second region having immobilized thereon a ligand which is a specific binding partner for apo transcobalamin or which is capable of immobilizing both holo- and apo transcobalamin and step (iii) may comprise detecting signals from said first and second regions.

By a specific binding partner or ligand is meant one which binds to TC (ie. apo-TC and/or holo-TC as required) by virtue of its specific chemical structure or conformation and not simply by virtue of an overall physico-chemical property (such as lipophilicity) which may be common to many components of a body fluid sample.

The specific binding partner or ligand will generally be either an antibody, an antibody fragment, a single chain antibody, an antibody fragment dimer, trimer or tetramer, or a compound with an affinity for apo-TC and/ or holo-TC, such as a cell surface receptor, a polypeptide, an oligopeptide, an oligonucleotide, a small organic chemical, etc. Other specific binding partners or ligands may be selected from a combinatorial chemistry or phage display library or specific binding sequences of DNA or RNA.

If the specific binding partner or ligand is an antibody it may be polyclonal but will preferably be monoclonal. Monoclonal antibodies can be generated with much greater specificity and uniformity than polyclonal antibodies and this reduces cross-reactivity with other components of the body fluid, in particular HC and where appropriate, the alternative conformation, e.g. the apo form of the target analyte. The uniformity and reproducibility offered by monoclonal antibodies relative to polyclonal antibodies ensures a greater accuracy which is vital for an assay wherein the analyte is in such low concentration. Alternatively, it may be an antibody fragment for example F(ab), F(ab')<sub>2</sub> or F(v) fragment. The antibodies or antibody fragments may be monovalent or divalent and may be produced by hybridoma

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

- 9 -

technology or be of synthetic origin, and generated by recombinant DNA technology or chemical synthesis. Single chain antibodies or other antibody derivatives or mimics could for example be used. The antibody may be directed or raised against any epitope, component or structure of the apo and/or holo-TC protein as appropriate.

The specific binding partner or ligand (sbp) for holo-TC used in the assay method of the invention should have a specificity for holo-TC (as opposed to apo-TC) which is at least 10-fold, preferably at least 50-fold, more preferably at least 100-fold, i.e. in an excess of apo at least 10 times as much of the holo-TC sbp should bind to holo-TC than to apo-TC. In general therefore it will be preferred to select the holo-TC sbp using *in vitro* methods, rather than by antibody generation in a host animal. Accordingly screening for candidate holo-TC sbps will preferably be done using *in vitro* libraries, e.g. phage display antibody (especially single chain antibody) libraries or oligonucleotide or chemical libraries. The affinity of the holo-TC sbp for holo-TC will moreover preferably be such that nanomolar concentrations of holo-TC can be detected.

Candidate holo-TC sbps can for example be selected by immobilizing holo-TC on a substrate (e.g. beads or sheets), e.g. by amide coupling, and panning the library in the presence of an excess of non-immobilized apo-TC. The substrate should then be washed thoroughly and holo-TC binding candidates should then be released and identified by the means conventional for the library type.

Candidates may then be tested for cross-reactivity for apo-TC and candidates having sufficient preference for holo-TC rather than apo-TC can then be selected. Desirably candidate holo-TC sbps will also be screened to deselect sbps which are cross-reactive for HC.

Most preferably, the binding regions of the holo-TC

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

- 10 -

sbps should be non-peptidic, e.g. they may be small organic molecules or oligonucleotides (e.g. 20 to 50-mers).

Candidate apo-TC sbps can be selected in equivalent fashion; however it will generally be preferred to use a holo-TC sbp and a non-overlapping TC sbp (i.e. one which binds to both apo and holo TC) and TC sbps are well known from the literature (see for example Quadros et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **222**: 149-154 (1996) and McLean et al., *Blood* **82**: 235-242 (1997)).

Once candidate holo TC sbps and TC or apo-TC sbps have been selected, they may be reporter-labelled by conventional means.

The reporters may be the same if different ligands are immobilized on different regions of the substrate; however otherwise the reporters used should be different, i.e. their signals should be interdistinguishable.

The reporter moieties in the sbps may be any of the conventional reporters, e.g. radiation emitters or absorbers, in particular electromagnetic radiation emitters or absorbers, enzymes, or, less preferably, radiolabels, etc. In the case of enzymatic reporter moieties, the signals detected will be signals, e.g. emitted light, from the reaction catalysed by the enzyme. Thus the detected signals may be generated directly or indirectly by the reporter moieties.

By means of example only, some suitable examples of coloured or fluorescent compounds which may be used to label a sbp detectably in the present invention are anthraquinones, azo dyes, azine dyes such as oxazines and thiazines, triazines, naturally occurring pigments such as porphyrins, phycobiliproteins, including phycoerythins and phycoquinans, chlorophylls and their analogues and derivatives, carotenoids, acridines, xanthenes including fluoresceins and rhodamines, indigo-dyes, thioxanthenes, coumarins, polymethines including

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

- 11 -

di and tri arylmethines and derivatives thereof of phthalocyanines and metal phthalocyanines.

Similarly, a wide range of radioactive compounds may be used as the signal forming label, among them Iodine-125-labelled compounds.

Alternatively, the sbp may be conjugated to natural or synthetic compounds which can produce a chemiluminescent signal which may be assayed in known manner (Cormier, M.J. et al.; Chemiluminescence and Bioluminescence, Plenum Press, New York 1973). Suitable chemiluminescent compounds include luciferin, oxalic esters, 1,2-dioxethane, luminol or derivatives thereof, but are not limited to these. If appropriate, hydrogen peroxide, enzymes e.g. luciferase, alkaline phosphatase or other chemicals may be used to produce the chemiluminescent signal from the signal-producing molecules used.

Preferably, the sbp is conjugated to a polymeric "scaffold" which carries a plurality of reporter moieties, e.g. enzymes, chromophores, fluorophores, etc. In this way the signal may be magnified, e.g. several hundred-fold. Typical polymer scaffolds include dextran (e.g. Amdex), polyethylene glycol and dendrimers (e.g. starburst dendrimers).

Strongly-anionic signal forming molecules may not be preferred for use in the method of the invention, since they have a tendency to bind to serum proteins such as human serum albumin (HSA) which may be present in the sample. Particularly suitable examples which may be used are fluorescein isothiocyanate, Rhodamine B or N-(resorufin-4-carbonyl)piperidine-4-carboxylic acid-N-hydroxysuccinimide-ester (resos).

Where the reporter is a light emitter or absorber, it is particularly preferred (especially for the labelled holo-TC sbp) that the reporter comprise a plurality of chromophores or fluorophores so that the signal is magnified. One particularly preferred group

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

- 12 -

of reporters is the group of reporters capable of time-delayed fluorescence, another is the group capable of provoking luminescence. Specific examples of reporters include  $\beta$ -galactosidase and chicken alkaline phosphatase.

It is well known in the art to immobilise affinity molecules, e.g. antibodies and antibody fragments for separation purposes, for example by binding or coupling the ligands, optionally by means of a linker, to any of the well known solid supports or matrices which are currently widely used or proposed for separation or immobilisation, and any known method in the art could be used. Such solid phases may take the form of particles, sheets, gels, filters, membranes, fibres or capillaries. Techniques for binding the ligand to the porous substrate are thus extremely well known and widely described in the literature.

In the method of the invention, the substrate is preferably a porous sheet or strip (e.g. of a cellulosic material, preferably nitrocellulose), especially preferably mounted on a non-porous support, optionally with an absorbent backing which serves to promote absorption of the liquid sample into the substrate by capillary action. Thus in one preferred embodiment the substrate layer, preferably backed by an absorbent layer, is mounted on a dipstick. In another preferred embodiment the substrate layer preferably backed by an absorbent layer, is held in a plastic casing provided with an aperture for application of the liquid sample to the exposed surface of the substrate layer and for reading the signals from the substrate layer.

Signal generation, if required, may be by whatever means are suitable for the selected labels, e.g. by exposure to light or to a substrate for an enzymatic label, and signal detection may be by any detector suitable for detecting the emitted signals, e.g. radioactivity or light detectors. Especially

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

- 13 -

preferably, where the signals are light signals, a digital camera will be used as the detector, if necessary provided with a filter, prism or other means to ensure that the desired wavelength band is allowed to reach the detector.

Detection of the signals from the two labelled sbps may be simultaneous or sequential. Simultaneous detection is preferred.

Detected signal manipulation to generate a quantitative, semi-quantitative or qualitative indication of TC saturation is conveniently performed by a computer, preferably one built into the apparatus used to perform the assay and arranged to control performance of the assay. Where the signal forming labels are different in the sbps, the assay will require calibration in conventional fashion to transform the signal ratio ( $S_a/S_b$  or  $S_a/(S_a+S_b)$  where  $S_a$  is the holo-TC sbp signal and  $S_b$  is the TC or apo-TC sbp signal respectively) into a TC saturation value. Accordingly the assay may if desired be provided with calibration standards containing apo and holo-TC in known ratios.

In an alternative embodiment, any method of the current invention may be carried out on the surface of a chip-type substrate within a surface plasmon resonance (SPR) detector. In such a method, the need for active labelling of the specific ligands or substrates is avoided and binding is detected directly by the additional mass of the specific binding ligands or specific binding partners binding to the surface. In a preferred example of this alternative, a TCII binder is immobilised on the surface of an SPR "chip" (e.g. by gold-coating of the chip, followed by absorption of a thiol-conjugated TCII binder or by amide coupling of the binder to a dextran-coated chip). The chip is then placed in the surface plasmon resonance detector and a solution containing the sample is caused to flow over the chip, so binding holo-TC and apo-TC from the sample

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

- 14 -

onto the immobilised ligand. A solution containing a first specific binder with specificity for apo-TC or for both apo-TC and holo-TC is then caused to flow over the chip and the binding measured by surface plasmon resonance to give a first signal. This first specific binder is then optionally washed off and a second specific binder with specificity for holo-TC only is passed over the chip. A second signal, representing the binding to holo-TC is detected by surface plasmon resonance. This difference between the first and second SPR is then used to calculate the TCII saturation. By using SPR, any ligands or specific binding partners described as "labelled" or "reporter labelled" may be detected by mass without any additional or active label. In this case the "label" is simply the mass of the specific binding partner or ligand.

The sample applied to the substrate is preferably a body fluid or tissue-derived liquid, preferably a cell-free liquid, especially plasma or serum from a mammalian, especially human, subject.

Viewed from a further aspect the invention provides an assay kit comprising:

- a porous substrate having immobilized thereon a TC-immobilizing ligand;

- a first and a second reporter-labelled binding partner for transcobalamin, said first binding partner being capable of binding both holo and apo transcobalamin or being a specific binding partner for apo, transcobalamin and said second binding partner being a specific binding partner for holo transcobalamin;

- optionally, a washing agent;

- optionally, a substrate for an enzymatic reporter label;

- optionally, at least one calibration standard containing apo and holo-TC at known ratio; and

- optionally, a detector capable of detecting signals from said reporter labels.

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

- 15 -

In an alternative format, the transcobalamin saturation can be determined by binding to different regions of the substrate two ligands, a first which immobilizes holo-TC and a second which immobilizes apo-TC (or apo and holo-TC), and contacting the substrate with the TC-containing sample and a reporter labelled sbp for TC. In this form, which forms a further aspect of the invention, the signals are read from the different regions of the substrate and the signal ratio  $S_a/(S_a+S_b)$  or  $S_a/S_b$  (where  $S_a$  is the signal for the holo-TC ligand region and  $S_b$  is the signal for the apo-TC or holo and apo-TC ligand region) is indicative of the TC saturation level. The "regions" of the substrate in this or other aspects of the invention may for example be different areas of the surface of a membrane, different membrane surfaces on a dipstick, different membranes in a casing, or different sets of separable beads (e.g. one set being magnetizable, the other not).

In this format, the assay method of the invention typically comprises:

- (i) contacting a transcobalamin containing liquid sample with a porous substrate having immobilized thereon in different regions thereof a first and a second transcobalamin-immobilizing ligand, said first ligand being capable of specific binding to holo transcobalamin and said second ligand being capable of immobilizing apo or apo and holo transcobalamin;
- (ii) before, during or after step (i), contacting transcobalamin of said sample with a reporter-labelled binding partner for transcobalamin; and
- (iii) detecting signals from the reporter labels of said binding partner immobilized on the different regions of said substrate and determining therefrom an indication of transcobalamin saturation in said sample.

Viewed from a yet further aspect the invention thus provides an assay kit comprising:

- a porous substrate having immobilized thereon in

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

- 16 -

different regions thereof a first and a second transcobalamin-immobilizing ligand, said first ligand being capable of specific binding to holo transcobalamin and said second ligand being capable of immobilizing apo or apo and holo transcobalamin;

a reporter-labelled binding partner for transcobalamin;

optionally, a washing agent;

optionally, a substrate for an enzymatic reporter label;

optionally, at least one calibration standard containing apo and holo-TC at known ratio; and

optionally, a detector capable of detecting signals from said reporter labels.

The invention will now be described further with reference to the following non-limiting Examples and to the drawings in which;

Figure 1 represents a substrate upon which TC ligands have been immobilised;

Figure 2 represents a substrate having two regions, one containing immobilised ligands specific to holo-TCII and a second having immobilised ligands specific to apo-TCII; and

Figure 3 represents a chip within a surface plasmon resonance detector having antibodies for TC immobilised on the surface.

In Figure 1, "label-spb1" represents a first specific binding partner having a first label attached and "spb-label2" represents a second specific binding partner having a second label attached. It can be seen that the signal from label1 corresponds to the holo-TC level and the signal from label2 corresponds to the total apo- and holo-TC levels.

In Figure 2, it can be seen that holo-TCII has bound to

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

- 17 -

the first (left hand) region and apo-TCII to the second (right hand) region. The "sbp-label" represents a specific binding partner for TC having an attached label. In this way, the signals from the two regions represent the holoTC and apoTC content respectively.

In Figure 3, a chip surface has been modified by attachment of a first monoclonal antibody (mAb1). This binds to apoTC and to holoTC from a sample. The second antibody (mAb2) also binds either holo-TC or apo-TC, thus giving an SPR signal for total TC content when this is added. The third antibody (mAb3) binds only to holo-TC and so gives an SPR signal representing the holo-TC content.

EXAMPLE 1 - Generation of holo-TC sbp

A) Immobilization of holo-TC on beads

One milliliter of 0.2M 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimide (EDAC) in 0.1M 2-(N-morpholine)-ethanesulfonic acid (MES), pH 5.0 is mixed with 1.0 mL 2% (w/v) carboxylate-modified beads (1  $\mu$ m diameter Merck-Estapor) in 0.1M MES, pH 5.0. The mixture is treated with bath sonication to disperse the reagents and is then rotated end-over-end for 1 h at room temperature. The mixture is centrifuged at 300g and the pellet is washed with 0.1 M MES, pH 7.0, centrifuged and is resuspended in 1.0 mL deionized water. The EDAC activated beads are mixed in a small plastic vial with the same volume of 1 mg/mL holo-TC in 0.1M 3-[N-morpholino]-propane sulphonic acid (MOPS), pH 7.5 and rotated overnight at room temperature. Thereafter, the mixture is washed twice with 0.05% Tween 20 (aq) and twice with 50 mM Tris buffer, pH 7.4, containing 5 mg/mL BSA. The coated beads having a monolayer of holo-TC of about 10  $\mu$ g/mg are stored at 0.1% in 50 mM Tris, pH 7.4,

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

- 18 -

0.15M NaCl, and 1 mg/mL BSA.

B) (i) Biopanning of aptamer libraries with holo-TC as the target molecule

A library of double-stranded DNA sequences is prepared by a mixture of chemical and enzymatic steps. Typically,  $10^{14}$ - $10^{15}$  single stranded DNA (ssDNA) sequences of length 40 nucleotides are made synthetically and are then converted to the double-stranded form by enzymatic means prior to PCR amplification. Second, the double-stranded DNA is transcribed to yield a library of single-stranded RNA or modified RNA. Third, the RNA library is challenged with the intended target molecule. The selected molecules are reverse transcribed and then amplified by PCR (for DNA libraries PCR is sufficient). The subset of sequences that bind to the target becomes the pool for a second round of biopanning. Usually the selection process takes from 7 to 15 rounds.

Five nmol of gel-purified, synthetic template DNA containing 40 nucleotides contiguous sequence flanked by defined primer annealing sequences [5'-GGGAGGACGATGCGG-(N)<sub>40</sub>-CAGACGACTCGCCCGA-3'] is amplified by four PCR cycles with primers 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGGACGATGCGG-3' and 5'-TCGGGCGAGTCGCTCTG-3'. Approximately 800 pmol of the PCR-derived template DNA (about  $5 \times 10^{14}$  molecules) are transcribed in vitro by T7 RNA polymerase (1000 U) in a 3 mL transcription reaction consisting of 40 mM TrisHCl (pH 8.0), 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Spermidine, 5 mM dithiothreitol (DTT), 0.002% Triton X-100 (v/v), 4% polyethylene glycol (w/v) and 2 mM each of ATP, guanine-5'-triphosphate (GTP), 2'-NH<sub>2</sub>CTP and 2'-NH<sub>2</sub>UTP (CTP = cytidine 5'-triphosphate and UTP = uridine 5'-triphosphate). Full length transcription products are purified on 8% polyacrylamide gels under denaturing

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

- 19 -

conditions, suspended in binding buffer (10 mM TrisHCl, 0.1 mM EDTA, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6.8), heated to 70°C and chilled on ice.

The RNA pool is incubated at 37°C for 15 min with about 10 µg holo-TC immobilized on beads and 100 µg of apo-TC free in the solution as competitor. The beads are separated by means of centrifugation and are immediately washed with 5 mL binding buffer. Bound RNA molecules are eluted from the beads by lowering the pH, recovered by ethanol precipitation and reverse transcribed by avian myeloblastosis virus transcriptase (Life Sciences) at 48°C for 45 min with the DNA sequence 5'-TCGGGGAGTCTCGTCTG-3' as the primer. Following PCR amplification of the cDNA, the resulting duplex DNA template is transcribed in vitro to obtain RNA for the next round of selection. The amount of holo-TC coated beads in the binding reaction are successively reduced to progressively increase the selection pressure. The selection process is repeated until the affinity of the enriched RNA pool for holo-TC is substantially increased. At this point, cDNA is amplified by PCR with primers 5'-CCGAAGCTTAAATACGACTCACTATAGGGAGGACGATGCGG-3' and 5'-GCCGGATCCTCGGGGAGTCTCGTCTG-3', which introduces *Bam*HI and *Hind*III restriction sites (underlined) at the 5' and 3'-ends of the PCR products, respectively. The PCR products are digested with *Bam*HI and *Hind*III and cloned into pUC18 that has been digested with the same enzymes and introduced into *Escherichia coli* SURE (Stratagene) by electroporation. Plasmids are isolated from single bacterial clones and are screened and sequenced using standard techniques as described in e.g. Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp C1.

In order to confer RNA nuclease resistance, the RNA

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

- 20 -

molecules may be modified at the 2' position of the sugar, e.g. amino substitution.

The biopanning protocol will be essentially identical whether the library is based on RNA aptamers or ssDNA aptamers, or whether the library is naive or biased. Basically, the difference will be that ssDNA libraries will not require transcription.

(ii) Biopanning of phage display peptide or antibody libraries with holo-TC

One pmol of phage display library is mixed with 10  $\mu$ g of holo-TC immobilized on beads and 100  $\mu$ g of apo-TC in 100  $\mu$ L PBS-Tween with 1 mg/mL BSA or 3% BLOTTO. (BLOTTO is 5% w/v non-fat powdered milk in 100 mM sodium phosphate, 150 mM sodium chloride, pH 7.4, 0.01% Antifoam A, 0.01% thimerosal). The mixture is incubated at 4°C overnight and the beads are separated through centrifugation and washed 9 times with 1 mL PBS-Tween and one time with normal saline to remove any buffering capacity. The beads are resuspended in 600  $\mu$ L of 0.1 M glycine-HCl buffer, pH 2.2 and after 15 min the beads are separated through centrifugation at 3000g for 3 min. The supernatant is removed and neutralized with 36  $\mu$ L of 2M Tris, pH 9.0, and mixed with 400  $\mu$ L of Escherichia coli (e.g. K91-Kan). Plasmids are isolated from single bacterial clones and are screened and sequenced using standard techniques as described in e.g. Sambrook J. et al., supra. The binding and elution reactions are performed at least three times. BSA and BLOTTO are used alternating in the binding reaction to prevent enrichment of phages binding to these proteins.

EXAMPLE 2

Immobilization of TC specific binder on cellulose paper

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

- 21 -

Cellulose paper (e.g. Whatman No. 52) is activated by first swelling it in deionized water for 3 min and then treating it with 3% CNBr (aq). The pH is raised to 10.5 by addition of 1 mM NaOH. After 30 min the paper is washed with 12 x 500 mL 5  $\mu$ M NaHCO<sub>3</sub>, 2 x 500 mL deionized water, 2 x 500 mL of each of 25%, 50%, and 75% acetone. Finally it is washed with 4 x 500 mL acetone and air dried at room temperature.

Covalent coupling of anti-TC antibody is performed by dilution of the antibody to 10  $\mu$ g/mL in 100 mL 0.1M NaHCO<sub>3</sub> and adding 20 g of cut paper. The mixture is stirred gently for 3h at 4°C, then washed at room temperature for 10 min with 2 x 100 mL 0.5 mM NaHCO<sub>3</sub>, for 3h with 100 mL 50 mM ethanolamine in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, for 10 min with 2 x 100 mL 0.5 mM NaHCO<sub>3</sub>, for 30 min with 100 mL 0.1 M sodium acetate, pH 4.0, and twice with 50 mM phosphate buffer, pH 7.5, containing 0.15M NaCl, 0.1% Tween 20, and 0.1% gelatin. The antibody loaded paper is stored in a small volume of this buffer.

Sections of the antibody loaded paper are then adhered to a flexible plastic dipstick.

#### EXAMPLE 3 - Assay

50  $\mu$ L of human serum is applied to the membrane pad of a dipstick prepared according to Example 2. After 5 min, the dipstick is rinsed with 100  $\mu$ L of Tris-buffered saline (TBS - 100 mM Tris, pH 7.2, 150 mM sodium chloride) and 50  $\mu$ L of a Detection solution is added and incubated for 5 minutes. The Detection solution contains a non-overlapping, anti-human TC specific monoclonal antibody conjugated to  $\beta$ -galactosidase and a holo-TC sbp according to Example 1 (or a non-overlapping anti-human holo-TC monoclonal antibody) conjugated to chicken alkaline phosphatase. The dipstick is then

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

- 22 -

rinsed with 100  $\mu$ L TBS. 50  $\mu$ L of a luminescent substrate to alkaline phosphatase in TBS is added (e.g. 0.25 mM CPD-Star from Tropix). The dipstick is measured in a luminometer for 1 s to 15 minutes. The dipstick is then rinsed with 100  $\mu$ L PBS (phosphate buffered saline), and 50  $\mu$ L of a luminescent substrate for  $\beta$ -galactosidase in PBS (e.g. 0.1 mM Galacton-Star from Tropix), and an alkaline phosphatase inhibitor (e.g. 40  $\mu$ M cyclohexane-trimethylenesulfonate), are added. The dipstick is then read once more in the luminometer. Whereas the first reading gives the holo-TC content on the dipstick, the second reading gives the total TC content. The ratio of the two gives the volume independent value for the cobalamin saturation of TC in the sample.

#### EXAMPLE 4

##### Development of mouse monoclonal antibodies specific for human transcobalamin and human holo-transcobalamin

###### *i) Immunization.*

BALB/c female mice were immunized *i.p.* with 20  $\mu$ g of recombinant human holo-transcobalamin mixed with AdjuPrime Immune modulator (Pierce, IL, USA), followed by two booster injections of 20  $\mu$ g at four week intervals.

###### *ii) Fusion.*

Four days after the final boost, spleens were removed and splenocytes fused to the HAT (Hypoxanthine, Aminopterin, Thymidine; Sigma) sensitive plasmacytoma OUR1 (a sub-clone of X63-Ag8.653) using PEG (Boehringer Mannheim, Germany). Fusion products were plated over 5 x 96F trays (Nunc) in the presence of HAT in culture medium (DMEM/Ham's F12 (Invitrogen) plus 10% CFSR3 (Sigma). Fusions were fed after 1 week with culture medium containing HT (Sigma).

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

- 23 -

*iii) Primary screening.*

After two weeks, medium from the hybridomas was screened using a solid phase capture assay. The cell media were mixed with 10  $\mu\text{L}$  of 1% (w/v) suspension of 1  $\mu\text{m}$  magnetizable beads coated with a sheep anti-mouse IgG antibody (Merck-Estapor, France) and kept at ambient temperature for 1h. The magnetizable beads with bound mouse monoclonal antibodies were isolated by using a magnet, and washed four times with 1 mL phosphate buffer, pH 7.2, 0.15M NaCl and 1 mg/mL bovine serum albumin. Washed beads were resuspended in 100  $\mu\text{L}$  of pooled human serum (Scantibodies, USA) which had been pretreated with  $^{57}\text{Co}$ -labeled cobalamin (ICN, USA) to convert apo-transcobalamin in the serum into  $^{57}\text{Co}$ -labeled holoTC. The mixtures were kept at ambient temperature for 30 min and beads isolated by using a magnet. The radioactivity associated with the beads was counted in a gamma counter.

*iv) Cloning.*

Wells positive for anti-transcobalamin antibodies were cloned by limiting dilution over 96wellF trays (Nunc), pre-seeded with Balb/c peritoneal feeder cells (10,000 per well). Positive clones were selected, and recloned until 100% of the subclones were producing specific antibody. Cell stocks were frozen in liquid nitrogen, in CFSR3 (Sigma) containing 10% DMSO (Sigma).

*Secondary screening.* Antibodies from cell media were isolated on magnetizable beads as described above. Ten  $\mu\text{L}$  of the antibody coated beads were mixed with serum prelabeled with  $^{57}\text{Co}$ , as described above, in the presence of increasing concentrations of recombinant, human apo-transcobalamin or recombinant, human holo-transcobalamin.

Two anti-transcobalamin antibodies (mAb1 and mAb2) were selected based on their affinity for both apo- and holo-transcobalamin and one monoclonal antibody (mAb3) was

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

- 24 -

selected based on specificity for holo-transcobalamin. The respective clones were expanded *in vitro* in Tecnomouse, CL1000. Antibodies were purified from cell medium by protein A affinity chromatography. In short, the antibody containing culture supernatant was diluted 1:1 in 0.1M Tris, pH 8.0, containing 1M NaCl (binding buffer) and applied to the protein A column, which had been pre-equilibrated with binding buffer. The protein A column was then extensively washed with 15 column volumes of binding buffer. The antibody was eluted with 0.1M citrate buffer, pH 4.0, neutralized to pH 7.0 with 1M Tris buffer, pH 8, and buffer changed on a Sephadex G-25 column (Pharmacia) to 0.1M phosphate, pH 7.2, containing 0.15M NaCl.

#### Example 5

##### Immobilization of TC specific monoclonal antibody mAb1 on dextran coated surface

The carboxylated surface of the dextran coated chip (Pharmacia, Sweden) was activated with 0.05M N-hydroxysuccinimide (NHS)/0.2M N-ethyl-N'-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide hydrochloride (EDC), rinsed with deionized water and coated covalently with mAb1 (from Example 4) at 50 µg/mL in 0.01 HEPES buffer, pH 7.4, containing 0.15M NaCl, 0.003M EDTA, and 0.005% polysorbate (HBS). Unreacted NHS was blocked by 1M ethanolamine and the chip washed extensively with HBS.

#### Example 6

##### Binding of holo-transcobalamin, mAb2, and mAb3 to immobilized mAb1

The binding events were followed in real time using surface plasmon resonance and performed on a Biocore instrument (Biacore, Sweden). The amount of free ligand binding to the chip was measured in response units (RU),

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

- 25 -

which reflect both the mass of ligand binding and its affinity for the immobilized target. The chip with immobilized mAb1 (Example 5) was introduced into the instrument, after which was injected 5  $\mu$ L of 100 nM holo-transcobalamin, 5  $\mu$ L of 50  $\mu$ g/mL mAb2, and 5  $\mu$ L of 50  $\mu$ g/mL mAb3 successively with washing steps between each. After flowing holo-transcobalamin through the instrument, 565 RU of mAb3 bound to the immobilised mAb1. In the absence of holo-transcobalamin neither mAb2 nor mAb3 bound to the chip with the immobilised mAb1.

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

- 26 -

**Claims**

1. An assay method for determining transcobalamin saturation wherein a transcobalamin containing liquid sample is contacted with a porous substrate with immobilized thereon a transcobalamin immobilizing ligand and with a reporter-labelled transcobalamin binding partner and wherein signals from reporter labels which become immobilized on said substrate are detected, characterised in that one of said ligand or said binding partner comprises a first ligand or binding partner capable of specific binding to holo transcobalamin and a second ligand or binding partner capable of binding to apo transcobalamin or to holo and apo transcobalamin.

2. A method as claimed in claim 1 for the determination of transcobalamin saturation in a transcobalamin containing liquid sample, said method comprising:

(i) contacting said sample with a porous substrate having immobilized thereon a transcobalamin-immobilizing ligand;

(ii) before, during or after step (i) above, contacting transcobalamin of said sample with a first and a second reporter-labelled binding partner for transcobalamin, said first binding partner being capable of binding both holo and apo transcobalamin or being a specific binding partner for apo transcobalamin and said second binding partner being a specific binding partner for holo transcobalamin; and

(iii) detecting signals from the reporter labels of said binding partners immobilized on said substrate and determining therefrom an indication of transcobalamin saturation in said sample.

3. A method as claimed in claim 2 wherein said substrate has immobilized thereon a said ligand which is

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

- 27 -

capable of immobilizing both holo and apo transcobalamin and wherein the signals from the first and second reporter labels are interdistinguishable.

4. A method as claimed in claim 1 comprising:
  - (i) contacting a transcobalamin containing liquid sample with a porous substrate having immobilized thereon in different regions thereof a first and a second transcobalamin-immobilizing ligand, said first ligand being capable of specific binding to holo transcobalamin and said second ligand being capable of immobilizing apo or apo and holo transcobalamin;
  - (ii) before, during or after step (i), contacting transcobalamin of said sample with a reporter-labelled binding partner for transcobalamin; and
  - (iii) detecting signals from the reporter labels of said binding partner immobilized on the different regions of said substrate and determining therefrom an indication of transcobalamin saturation in said sample.
5. A method as claimed in any one of claims 2 to 4 wherein said specific binding partner for holo transcobalamin or said ligand capable of specific binding to holo transcobalamin comprises a non-peptidic holo transcobalamin binding moiety.
6. A method as claimed in any one of claims 2 to 4 wherein said specific binding partner for holo transcobalamin or said ligand capable of specific binding to holo transcobalamin comprises a monoclonal antibody.
7. A method as claimed in any one of claims 2 to 6 wherein said specific binding partner for holo transcobalamin or said ligand capable of specific binding to holo transcobalamin has a specificity for holo transcobalamin vs apo transcobalamin which is at

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

- 28 -

least 10-fold.

8. A method as claimed in any one of claims 2 to 7 wherein said signals are electromagnetic radiation.
9. A method as claimed in claim 8 wherein said signals are detected by a digital camera.
10. A method as claimed in any one of claims 2 to 9 wherein said sample is blood or a blood-derived liquid.
11. A method as claimed in any one of claims 2 to 10 wherein said substrate is a cellulose sheet.
12. A method as claimed in any one of claims 2 to 11 wherein said substrate is mounted on a dipstick.
13. A method as claimed in any one of claims 2 to 12 wherein in step (i) said sample is applied to one face of said porous substrate and is drawn into said porous substrate by capillary flow promoted by a water-absorbent material adjacent the opposed face of said porous substrate.
14. A method as claimed in any one of claims 2 to 7 wherein said reporter labelled specific binding partner is labelled only by its own mass and is detected by surface plasmon resonance.
15. An assay kit comprising:
  - a porous substrate having immobilized thereon a TC-immobilizing ligand and;
  - a first and a second reporter-labelled binding partner for transcobalamin, said first binding partner being capable of binding both holo and apo transcobalamin or being a specific binding partner for apo transcobalamin and said second binding partner being

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

- 29 -

a specific binding partner for holo transcobalamin;

16. An assay kit comprising:

a porous substrate having immobilized thereon in different regions thereof a first and a second transcobalamin-immobilizing ligand, said first ligand being capable of specific binding to holo transcobalamin and said second ligand being capable of immobilizing apo or apo and holo transcobalamin and;

a reporter-labelled binding partner for transcobalamin.

17. A kit as claimed in either one of claims 15 or 16 additionally comprising a washing agent.

18. A kit as claimed in any one of claims 15 to 17 additionally at least one substrate for an enzymatic reporter label

19. A kit as claimed in any one of claims 15 to 18 additionally comprising at least one calibration standard containing apo and holo-TC at known ratio.

20. A kit as claimed in any one of claims 15 to 19, additionally comprising a detector capable of detecting signals from said reporter labels.

WO 02/086513

PCT/GB02/01846

1 / 1

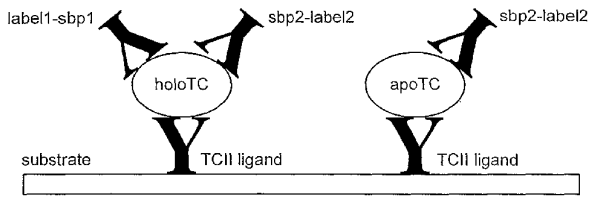


FIG. 1

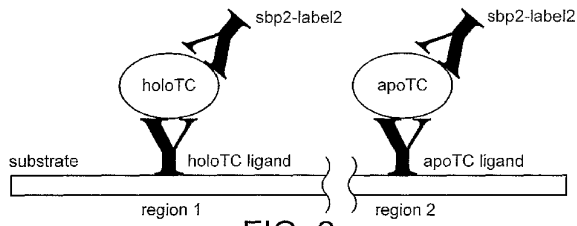


FIG. 2

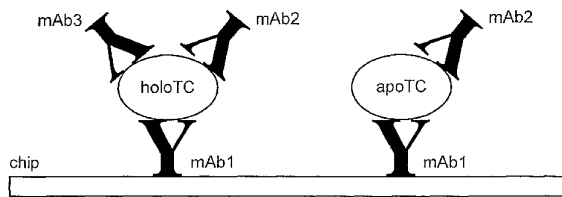


FIG. 3

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

## 【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

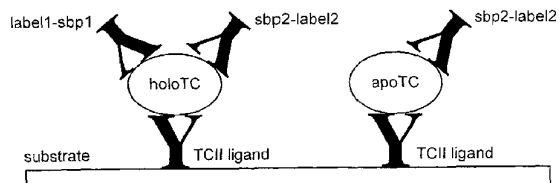
(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
31 October 2002 (31.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/086513 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/82
- (21) International Application Number: PCT/GB02/01846
- (22) International Filing Date: 23 April 2002 (23.04.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0109925 8 23 April 2001 (23.04.2001) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): AXIS-SHIELD ASA (NO/NO); Ulvenveien 87, Økern, N-0510 Oslo (NO).
- (72) Inventor: and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): ÖRNING, Lars (SE/NO); Axis-Shield ASA, Ulvenveien 87, Økern, N-0510 Oslo (NO).
- (74) Agents: COCKBAIN, Julian et al.; Frank B. Dehn & Co., 179 Queen Victoria Street, London EC4V 4EL (GB).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, GU, HK, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Published: with international search report before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report: 10 April 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: TRANSCOBALAMIN II ASSAY METHOD



(57) Abstract: An assay method for determining transcobalamin saturation wherein a transcobalamin containing liquid sample is contacted with a porous substrate with immobilized thereon a transcobalamin immobilizing ligand and with a reporter-labelled transcobalamin binding partner and wherein signals from reporter labels which become immobilized on said substrate are detected, characterised in that one of said ligand or said binding partner comprises a first ligand or binding partner capable of specific binding to holo transcobalamin and a second ligand or binding partner capable of binding to apo transcobalamin or to holo and apo transcobalamin.

WO 02/086513 A3

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/GB 02/01846
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 601N33/82		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 601N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, SCISEARCH, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 273 757 A (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY) 16 June 1981 (1981-06-16) column 2, line 26 -column 3, line 44; claims 1-22	1-20
A	WICKRAMASINGHE S N ET AL: "LIMITED VALUE OF SERUM HOLO-TRANSCOBALAMIN II MEASUREMENTS IN THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF MACROCYTOSIS" JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY, LONDON, GB, vol. 49, no. 9, September 1996 (1996-09), pages 755-758, XP001058213 ISSN: 0021-9746 abstract	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 February 2003		Date of mailing of the international search report 05/03/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 2818 Patentstr 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Moreno de Vega, C

Form PCT/ISA/210 (revised sheet) July 1992

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internat. Application No. PCT/GB 02/01846
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NEXO EBBA ET AL: "Measurement of transcobalamin by ELISA." CLINICAL CHEMISTRY, vol. 46, no. 10, October 2000 (2000-10), pages 1643-1649, XP001145456 ISSN: 0009-9147 the whole document ---	1-20
A	WO 00 17659 A (AXIS-SHIELD ASA) 30 March 2000 (2000-03-30) cited in the application the whole document ---	1-20
P, A	ULLELAND MARIUS ET AL: "Direct assay for cobalamin bound to transcobalamin (holo-transcobalamin) in serum." CLINICAL CHEMISTRY, vol. 48, no. 3, March 2002 (2002-03), pages 526-532, XP001145417 ISSN: 0009-9147 abstract -----	1-20

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat. Application No  
PCT/GB 02/01846

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4273757	A 16-06-1981	US 4167556 A CA 1092956 A1	11-09-1979 06-01-1981
WO 0017659	A 30-03-2000	AU 6102699 A BR 9913770 A CA 2344193 A1 CN 1324450 T CZ 20010975 A3 EP 1114323 A1 WO 0017659 A1 HU 0103532 A2 JP 2002525607 T NO 20011353 A PL 347104 A1 US 2001051346 A1	10-04-2000 05-06-2001 30-03-2000 28-11-2001 14-11-2001 11-07-2001 30-03-2000 28-01-2002 13-08-2002 11-05-2001 25-03-2002 13-12-2001

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 33/577

B

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

专利名称(译)	分析转钴胺素II的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004526973A</a>	公开(公告)日	2004-09-02
申请号	JP2002583990	申请日	2002-04-23
[标]申请(专利权)人(译)	阿克西斯 - 希尔德公司		
申请(专利权)人(译)	轴 - 盾Eesue		
[标]发明人	アーニングラズ		
发明人	アーニング、ラズ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/573 G01N33/577 G01N33/82		
CPC分类号	G01N33/82 C07K16/18 C07K16/44 C07K2317/32 G01N33/543 G01N33/5735 G01N33/68		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.H G01N33/543.521 G01N33/543.545.Z G01N33/543.595 G01N33/577.B		
优先权	2001009925 2001-04-23 GB		
其他公开文献	JP3935437B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供一种分析钴胺饱和度的测量方法，将含有钴胺的液体样品，由固定的配体的多孔基材接触钴胺是固定的，钴胺和报道分子标记的钴胺结合配体然后检测来自固定在基底上的报道标记的信号在于，在所述配体的一个或结合伴侣包括第一配体或结合伴侣能够特异性地结合到全息钴胺，进一步APO钴胺或全息钴胺和apo反其特征在于其包含能够结合钴胺素或结合配偶体的第二配体。

