



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103975239 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 06

(21) 申请号 201180074180. 2

(22) 申请日 2011. 09. 09

(30) 优先权数据

13/228, 705 2011. 09. 09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 04. 15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/050976 2011. 09. 09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/036239 EN 2013. 03. 14

(71) 申请人 魁戴尔公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 Y·李 P·D·奥里沃 J·金

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 袁泉

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

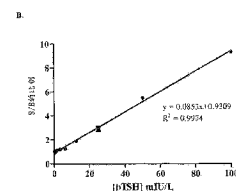
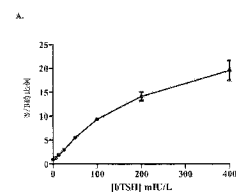
权利要求书2页 说明书19页 附图10页

(54) 发明名称

用于检测自身抗体的组合物和方法

(57) 摘要

本发明提供了用于检测甲状腺激素封闭免疫球蛋白(TBI)的组合物和方法。本发明的方法对于TBI是灵敏和特异性的,并且可以用于TBI和TSI的双重检测。本发明的组合物和方法用于诊断与TBI和/或TSI的存在相关的疾病,用于监控疾病进展和/或治疗方案、治疗剂、疫苗等,并且用于帮助临床医生作出治疗决定。



1. 一种用于检测测试样品中的甲状腺激素封闭免疫球蛋白(TBI)的方法,其包括:
  - a) 提供
    - i) 由包含下述的一种或多种表达载体稳定转染的转基因细胞:
      - 1) 与 cAMP 诱导型启动子可操作地连接的报道基因,和
      - 2) 与组成型启动子可操作地连接的嵌合 TSH 受体(TSHR) 基因,其中所述细胞在细胞膜上表达嵌合 TSHR,
    - ii) 促甲状腺激素(TSH),
    - iii) 对照样品,和
    - iv) 测试样品,
  - b) 使所述转基因细胞和所述 TSH 与下述接触:
    - i) 所述对照样品,以产生第一种样品,和
    - ii) 所述测试样品,以产生第二种样品,其中所述接触在用于所述 TSH 与所述嵌合 TSHR 结合的条件下,和
  - c) 测量所述第一种样品中和所述第二种样品中的所述报道基因的表达水平,其中与所述第一种样品相比较,在所述第二种样品中的所述报道基因的表达水平减少指示所述测试样品中 TBI 的存在。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述检测 TBI 的方法具有是在下述方法中检测 TBI 时的 TBI  $IC_{50}$  的 5 倍到 15 倍小的 TBI  $IC_{50}$ ,所述方法包括用表达野生型 TSHR 的细胞代替表达所述嵌合 TSHR 的所述转基因细胞。
3. 权利要求 1 的方法,其中所述检测 TBI 的方法具有是在下述方法中检测 TBI 时的 TBI  $IC_{50}$  的 10 倍到 30 倍小的 TBI  $IC_{50}$ ,所述方法包括用抗 TBI 单克隆抗体检测 TBI 的特异性结合。
4. 权利要求 1 的方法,其中所述方法进一步包括检测与所述第一种样品相比较,在所述第二种样品中的所述报道基因的表达水平减少。
5. 权利要求 1 的方法,其中所述方法进一步包括通过比较下述而测定所述测试样品中的 TBI 水平:
  - a) 在与所述测试样品的所述接触后的所述报道基因的表达水平,与
  - b) 在使所述转基因细胞与一种或多种标准样品接触后的所述报道基因的表达水平,所述标准样品各自含有已知浓度的 TSH。
6. 权利要求 1 的方法,其中所述方法是 TBI 特异性的。
7. 权利要求 1 的方法,其中所述 TSH 具有小于 100mIU/ml 的浓度。
8. 权利要求 1 的方法,其中所述报道基因的所述表达包含生物发光蛋白质的表达。
9. 权利要求 8 的方法,其中所述生物发光蛋白质包含海肾萤光素酶氨基酸序列 SEQ ID NO:03。
10. 权利要求 1 的方法,其中所述转基因细胞包含选自 CHO-MC4 细胞和 RD-MC4 细胞的细胞。
11. 权利要求 1 的方法,其中将所述 TSH 替换为甲状腺刺激单克隆抗体。
12. 权利要求 1 的方法,其中将所述 TSH 替换为甲状腺刺激多克隆抗体。
13. 一种用于检测测试样品中的甲状腺激素封闭免疫球蛋白(TBI)和甲状腺激素刺激

免疫球蛋白(TSI)的方法,其包括:

a) 提供

i) 由包含下述的一种或多种表达载体稳定转染的转基因细胞:

1) 与 cAMP 诱导型启动子可操作地连接的报告基因,和  
2) 与组成型启动子可操作地连接的嵌合 TSH 受体(TSHR) 基因,  
其中所述细胞在细胞膜上表达嵌合 TSHR,

ii) 促甲状腺激素(TSH),

iii) 对照样品,和

iv) 测试样品,

b) 使所述转基因细胞和所述 TSH 与下述接触:

i) 所述对照样品,以产生第一种样品,和

ii) 所述测试样品,以产生第二种样品,

其中所述接触在用于所述 TSH 与所述嵌合 TSHR 结合的条件下,和

c) 测量在所述接触前和在所述接触后,在所述转基因细胞中的所述报告基因的表达水平,其中

i) 与所述第一种样品相比较,在所述第二种样品中的所述报告基因的表达水平减少指示所述测试样品中 TBI 的存在,和

ii) 与所述第一种样品相比较,在所述第二种样品中的所述报告基因的表达水平增加指示所述测试样品中 TSI 的存在。

14. 权利要求 13 的方法,其中所述方法进一步包括检测与所述第一种样品相比较,在所述第二种样品中的所述报告基因的表达水平减少。

15. 权利要求 13 的方法,其中所述转基因细胞包含选自 CHO-MC4 细胞和 RD-MC4 细胞的细胞。

16. 一种试剂盒,其包含:

a) 由包含下述的一种或多种表达载体稳定转染的转基因细胞:

i) 与 cAMP 诱导型启动子可操作地连接的报告基因,和

ii) 与组成型启动子可操作地连接的嵌合 TSH 受体(TSHR) 基因,  
其中所述细胞在细胞膜上表达嵌合 TSHR,和

b) 关于使用所述转基因细胞用于检测甲状腺激素封闭免疫球蛋白(TBI)的说明书。

17. 权利要求 16 的试剂盒,其中所述试剂盒进一步包含阳性对照样品,其含有甲状腺激素封闭免疫球蛋白(TBI)。

18. 权利要求 16 的试剂盒,其中所述试剂盒进一步包含促甲状腺激素(TSH)。

19. 权利要求 16 的试剂盒,其中所述试剂盒进一步包含用于检测测试样品中的甲状腺激素刺激免疫球蛋白(TSI)的说明书。

20. 权利要求 19 的试剂盒,其中所述试剂盒进一步包含阳性对照样品,其含有甲状腺激素刺激免疫球蛋白(TSI)。

## 用于检测自身抗体的组合物和方法

### 发明领域

[0001] 本发明提供了用于检测甲状腺激素封闭免疫球蛋白(TBI)的组合物和方法。本发明的方法对于TBI是灵敏和特异性的,并且可以用于TBI和甲状腺刺激免疫球蛋白(TSI)的双重检测。本发明的组合物和方法用于诊断与TBI和/或TSI的存在相关的疾病,用于监控疾病进展和/或治疗方案、治疗剂、疫苗等,并且用于帮助临床医生作出治疗决定。

### [0002] 发明背景

[0003] 相当数量的群体患有甲状腺疾病,包括格雷夫斯氏病、桥本氏甲状腺炎、甲状腺功能亢进、甲状腺功能减退(包括新生儿甲状腺功能减退)、非甲状腺肿甲状腺功能减退、甲状腺机能正常或甲状腺机能减退自身免疫性甲状腺炎、原发性粘液性水肿和特发性粘液性水肿。这些疾病涉及自身抗体(甲状腺封闭免疫球蛋白(TBI)和/或甲状腺刺激免疫球蛋白(TSI))的作用,所述自身抗体识别且结合甲状腺上存在的受体,导致甲状腺激素生长中不希望有的变化。

[0004] 虽然关于这些疾病中的一些的诊断技术是可获得的,但这些技术是繁琐费力的且缺乏足够的灵敏度和/或特异性。

[0005] 因此,仍存在对用于检测甲状腺激素封闭免疫球蛋白(TBI)和/或甲状腺刺激免疫球蛋白(TSI)的组合物和方法的需要,所述组合物和方法是灵敏和特异性的,并且可以用于TBI和TSI的双重检测。

### [0006] 发明概述

[0007] 本发明提供了用于检测测试样品中的甲状腺激素封闭免疫球蛋白(TBI)的方法,其包括 a)提供 i)由包含下述的一种或多种表达载体稳定转染的转基因细胞:1)与cAMP诱导型启动子可操作地连接的报告基因,和2)与组成型启动子可操作地连接的嵌合TSH受体(TSHR)基因,其中所述细胞在细胞膜上表达嵌合TSHR, ii)促甲状腺激素(TSH), iii)对照样品,和 iv)测试样品;b)使转基因细胞和TSH与下述接触:i)对照样品,以产生第一种样品,和 ii)测试样品,以产生第二种样品,其中所述接触在用于TSH与嵌合TSHR结合的条件下;和c)测量第一种样品中和第二种样品中的报告基因的表达水平,其中与第一种样品相比较,在第二种样品中的报告基因的表达水平减少指示测试样品中TBI的存在。在一个实施方案中,检测TBI的方法具有是在下述方法中检测TBI时的TBI IC<sub>50</sub>的5倍到15倍小的TBI IC<sub>50</sub>,所述方法包括用表达野生型TSHR的细胞代替表达嵌合TSHR的转基因细胞。在另一个实施方案中,检测TBI的方法具有是在下述方法中检测TBI时的TBI IC<sub>50</sub>的10倍到30倍小的TBI IC<sub>50</sub>,所述方法包括用抗TBI单克隆抗体检测TBI的特异性结合。在进一步的实施方案中,该方法进一步包括与第一种样品相比较,检测在第二种样品中的报告基因的表达水平减少。在另外一个实施方案中,该方法进一步包括通过比较下述来测定测试样品中的TBI水平:a)在与测试样品接触后的报告基因的表达水平,与b)在使转基因细胞与一种或多种标准样品接触后的报告基因的表达水平,所述标准样品各自含有已知浓度的TSH。在进一步的实施方案中,该方法是TBI特异性的。在另一个实施方案中,TSH具有小于100mIU/ml的浓度。在备选实施方案中,报告基因的表达包含生物发光蛋白质的表达。在进一步的

实施方案中,生物发光蛋白质包含海肾萤光素酶氨基酸序列 SEQ ID NO:03。在另一个实施方案中,转基因细胞包含选自 CHO-MC4 细胞和 RD-MC4 细胞的细胞。在一些实施方案中,将 TSH 替换为甲状腺刺激单克隆抗体和 / 或甲状腺刺激多克隆抗体。

[0008] 本发明另外提供了用于检测测试样品中的甲状腺激素封闭免疫球蛋白(TBI)和甲状腺激素刺激免疫球蛋白(TSI)的方法,其包括 a) 提供 i) 由包含下述的一种或多种表达载体稳定转染的转基因细胞:1) 与 cAMP 诱导型启动子可操作地连接的报告基因,和 2) 与组成型启动子可操作地连接的嵌合 TSH 受体(TSHR)基因,其中所述细胞在细胞膜上表达嵌合 TSHR, ii) 促甲状腺激素(TSH), iii) 对照样品,和 iv) 测试样品;b) 使转基因细胞和 TSH 与下述接触:i) 对照样品,以产生第一种样品,和 ii) 测试样品,以产生第二种样品,其中所述接触在用于 TSH 与嵌合 TSHR 结合的条件下;和 c) 测量在接触前和在接触后,在转基因细胞中的报告基因的表达水平,其中 i) 与第一种样品相比较,在第二种样品中的报告基因的表达水平减少指示测试样品中 TBI 的存在,和 ii) 与第一种样品相比较,在第二种样品中的报告基因的表达水平增加指示测试样品中 TSI 的存在。在一个实施方案中,该方法进一步包括与第一种样品相比较,检测在第二种样品中的报告基因的表达水平减少。在特定实施方案中,转基因细胞包含选自 CHO-MC4 细胞和 RD-MC4 细胞的细胞。

[0009] 本文还提供的是包含下述的试剂盒:a) 由包含下述的一种或多种表达载体稳定转染的转基因细胞:i) 与 cAMP 诱导型启动子可操作地连接的报告基因,和 ii) 与组成型启动子可操作地连接的嵌合 TSH 受体(TSHR)基因,其中所述细胞在细胞膜上表达嵌合 TSHR;和 b) 关于使用转基因细胞用于检测甲状腺激素封闭免疫球蛋白(TBI)的说明书。在一个实施方案中,试剂盒进一步包含阳性对照样品,其含有甲状腺激素封闭免疫球蛋白(TBI)。在另一个实施方案中,试剂盒进一步包含促甲状腺激素(TSH)。在再进一步的实施方案中,试剂盒进一步包含用于检测测试样品中的甲状腺激素刺激免疫球蛋白(TSI)的说明书。在另一个实施方案中,试剂盒进一步包含阳性对照样品,其含有甲状腺激素刺激免疫球蛋白(TSI)。

[0010] 附图简述

[0011] 图 1 显示使用 CHO-MC4 细胞的 bTSH 剂量应答曲线。

[0012] 图 2 显示(A)含有 730 个氨基酸残基的嵌合 TSHR 的氨基酸序列(SEQ ID NO:01), (B) 含有 2193 个碱基的嵌合 TSHR 的 DNA 序列(SEQ ID NO:02),其包括终止密码子,(C) 含有 550 个氨基酸的海肾萤光素酶的氨基酸序列(SEQ ID NO:03),和(D)含有 1653 个碱基的嵌合 TSHR 的 DNA 序列(SEQ ID NO:04),其包括终止密码子。

[0013] 图 3:用甲状腺封闭单克隆抗体(MAb)K1-70 的甲状腺封闭免疫球蛋白(TBI)测定法在 CHO-MC4 和 TSHRwt 细胞(H10)中的检测灵敏度比较。

[0014] 图 4:用含封闭抗体的血清的 TBI 测定法在 MC4 和 H10 细胞中的检测灵敏度比较。

[0015] 图 5:甲状腺封闭单克隆抗体 K1-70 剂量应答曲线的比较:TBI 测定法相对于 TRAb 测定法。

[0016] 图 6:用连续稀释的(A)甲状腺刺激单克隆抗体 M22 或(B)TSI 阳性患者血清的 TBI 测定法。

[0017] 图 7:在对 171 个 TSI 阳性血清样品的 TSI 和 TBI 测定法之间的关联。

[0018] 图 8:使用甲状腺刺激单克隆抗体 M22 和甲状腺封闭单克隆抗体 K1-70 的不同比

例的 TBI 测定法。

[0019] 图 9 :使用 M22 单克隆抗体代替 bTSH 执行的 TBI 测定法。

[0020] 图 10 :使用样品 18HM bTSH 的稀释物相对于 TSI 阳性血清的 TBI 测定法。血清样品 18HM (TRAb 阳性和 TSI 阴性)在正常血清中从 1:44 稀释到 1:90112,并且随后与 A. bTSH (40mIU/ml) 混合或 B. 与 TSI 阳性血清(4.54ml/孔)混合。

[0021] 定义

[0022] 为了促进本发明的理解,下文定义了许多术语。

[0023] 当在提及细胞中使用术语“转基因的”指含有转基因或其基因组已通过“转基因”的引入而改变的细胞。转基因细胞可以通过几种方法产生,所述方法包括经由人为干预将包含核酸(通常为 DNA)的“转基因”引入靶细胞内,或将转基因整合到靶细胞的染色体内。

[0024] 如本文使用的术语“转基因”指通过实验操作引入细胞内的任何核酸序列。转基因可以是“内源 DNA 序列”或“异源 DNA 序列”(即,“外源 DNA”)。术语“内源 DNA 序列”指在它引入其内的细胞中天然发现的核苷酸序列,只要它不含相对于天然存在的序列的一些修饰(例如点突变、可选标记基因的存在等)。术语“异源 DNA 序列”指核苷酸序列,其连接到或被操作变得连接到它在自然界中不与之连接,或在自然界中的不同位置处与之连接的核酸序列。异源 DNA 对于它所引入其内的细胞不是内源的,而是已得自另一种细胞。异源 DNA 还包括含有一些修饰的内源 DNA 序列。一般地,尽管不一定,异源 DNA 编码通常不由它在其内表达的细胞产生的 RNA 和蛋白质。异源 DNA 的实例包括报道基因、转录和翻译调节序列、可选标记蛋白质(例如赋予药物抗性的蛋白质)等。

[0025] “嵌合”、“融合”和“杂交”序列(例如当提及氨基酸序列和 / 或核苷酸序列时)指含有来自不同起源的部分的序列。在一个实施方案中,该部分可以来自相同生物体、相同组织、相同细胞、相同病毒等的不同蛋白质和 / 或基因组序列。在一个实施方案中,嵌合蛋白是重组蛋白质,其通过表达编码氨基酸序列的可操作地连接的核苷酸序列产生。例如,“嵌合 TSH 受体”、“嵌合 TSHR”和“嵌合 MC4 受体”可互换地指来自不同生物体的含有 TSHR 的氨基酸序列。在一个实施方案中,嵌合 TSHR 由人 TSHR (hTSHR)蛋白质序列例示,其中如先前描述的(于 2008 年 8 月 7 日公开的美国专利申请公开号 US2008-0187942),用来自大鼠促黄体激素绒毛膜促性腺激素(LH/CG)受体的相应 73 个氨基酸残基取代 hTSHR 的氨基酸残基 262 - 335。在优选实施方案中,嵌合 MC4 受体由 730 氨基酸序列 SEQ ID NO:01 (图 2A)例示,所述氨基酸序列由 DNA 序列(SEQ ID NO:02) (2193 个碱基对,包括终止密码子)编码。

[0026] “MC-4”细胞指表达嵌合 TSH 受体的细胞。例如,如先前描述的(于 2008 年 8 月 7 日公开的美国专利申请公开号 US2008-0187942),“CHO-MC4”细胞和“RD-MC4”细胞分别指转基因中国仓鼠卵巢细胞和转基因人横纹肌肉瘤细胞,其表达嵌合 TSH 受体。

[0027] “报道序列”和“标记序列”可互换地用于指在任何检测系统中可检测的 DNA、RNA 和 / 或多肽序列,所述检测系统包括但不限于酶(例如 ELISA、以及基于酶的组织化学测定法)、荧光和发光系统。示例性报道基因包括例如  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶基因、绿色荧光蛋白(GFP)基因、大肠杆菌(E. coli)  $\beta$ -半乳糖苷酶(LacZ)基因、嗜盐杆菌属(Halobacterium)  $\beta$ -半乳糖苷酶基因、链孢霉属(Neuropsora)酪氨酸酶基因、人胎盘碱性磷酸酶基因、和氯霉素乙酰转移酶(CAT)基因、水母素(水母生物发光)基因、来自美洲萤火虫(北美萤火虫

(*Photinus pyralis*)的萤火虫萤光素酶(EC1.13.12.7)、光素酶、来自海肾(海肾(*Renilla reniformis*))的海肾萤光素酶(EC1.13.12.5)、和来自费氏发光杆菌(*Photobacterium fischeri*)的细菌萤光素酶(EC1.14.14.3)。在优选实施方案中,萤光素酶基因编码海肾萤光素酶氨基酸序列 SEQ ID NO:03。

[0028] “生物发光基因”指编码催化发光反应的蛋白质的报道基因,例如水母素(水母)生物发光基因和萤光素酶基因。

[0029] “萤光素酶基因”指编码单加氧酶的基因,所述单加氧酶催化发光反应,例如来自美洲萤火虫(北美萤火虫)的萤火虫萤光素酶(EC1.13.12.7)、光素酶、来自海肾(海肾)的海肾萤光素酶(EC1.13.12.5)、和来自费氏发光杆菌的细菌萤光素酶(EC1.14.14.3)。在优选实施方案中,萤光素酶基因编码海肾萤光素酶氨基酸序列 SEQ ID NO:03。

[0030] 如本文使用的,“启动子”、“启动子元件”或“启动子序列”指这样的 DNA 序列,当连接到目的核苷酸序列时,其能够控制目的核苷酸序列转录成 mRNA。启动子通常尽管不一定位于它控制其转录成 mRNA 的目的核苷酸序列的 5' (即,上游),并且提供用于通过 RNA 聚合酶和其他转录因子的特异性结合用于起始转录的位点。

[0031] “诱导型启动子”指这样的启动子,与在不存在刺激的情况下相比较,在刺激(例如热休克、化学制品等)的存在下,其能够指导可操作地连接的核酸序列的更高转录水平。例如,“cAMP 诱导型启动子”指这样的启动子,与在不存在 cAMP 的情况下相比较,在 cAMP 的存在下,其能够指导可操作地连接的核酸序列的更高转录水平。示例性 cAMP 诱导型启动子包括 PEPCK 启动子(Roesler 等人(1998) *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 14950-14957);含有 cAMP 应答元件(CRE)的启动子,其位于就人细胞周期蛋白 D2 启动子翻译起始位点而言的第 -294 位处(Muñiz 等人(2006) *Biology of Reproduction* 75 (2); 279-288);和含有乳酸脱氢酶 A 亚基启动子的 cAMP 应答元件(CRE)的启动子(Welfeld 等人(1989) *J. Biol. Chem.* 264 (12):6941-7。在优选实施方案中,示例性 cAMP 诱导型启动子包含 236 核苷酸糖蛋白激素  $\alpha$  亚基启动子,如先前于 2008 年 8 月 7 日公开的美国专利申请公开号 US2008-0187942 中描述的,其含有环状 AMP (cAMP) 调节元件(CRE) (AF401991)。

[0032] “组成型启动子”指这样的启动子,在不存在刺激(例如热休克、化学制品等)的情况下,其指导可操作地连接的核酸序列的连续转录。组成型启动子包括来自大肠杆菌( $\sigma 70$ 、 $\sigma S$ 、 $\sigma 32$ 、 $\sigma 54$  和  $\sigma A$ )启动子、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)  $\sigma B$  启动子、沙门氏菌属(*Salmonella*) Pspv2 和 Pspv 启动子、细菌噬菌体 T7 (由 T7RNA 聚合酶识别)、细菌噬菌体 SP6 (由 SP6RNA 聚合酶识别)、酵母(pAdh、ADH1、cyc100、pPGK1、pCYC)启动子和 SV40 启动子的那些。在优选实施方案中,组成型启动子是 SV40 启动子。

[0033] “稳定转化”和“稳定转染”和语法等价物指一种或多种目的核苷酸序列引入且整合到细胞的基因组内。因此,“稳定转化体”与瞬时转化体的不同之处在于:尽管来自稳定转化体的基因组 DNA 含有一种或多种目的异源核苷酸序列,但来自瞬时转化体的基因组 DNA 不含目的异源核苷酸序列。细胞的稳定转化可以通过细胞的基因组 DNA 与核酸序列的 DNA 印迹杂交进行检测,所述核酸序列能够与一种或多种目的核苷酸序列结合。备选地,细胞的稳定转化还可以通过细胞的基因组 DNA 的聚合酶链反应,以扩增目的核苷酸序列而进行检测。

[0034] “TBI”、“甲状腺封闭免疫球蛋白”、“甲状腺封闭抗体”(“TBAb”)、“促甲状腺素受体

封闭抗体”、“TSH 结合抑制免疫球蛋白”、“促甲状腺素结合抑制免疫球蛋白” (“TBII”)、“封闭性促甲状腺素受体抗体” (“TSHRab”) 可互换地用于指这样的抗体,其与促甲状腺激素受体(也称为“TSH 受体”或“TSHR”或“促甲状腺素受体”)上的表位特异性结合,并且抑制(即,减少)这种受体与其促甲状腺激素(TSH)配体的结合。TBI 由 K1-70 单克隆抗体例示。

[0035] “TSI”、“甲状腺刺激免疫球蛋白”、“甲状腺刺激抗体” (“TSAb”)、“刺激性促甲状腺素受体抗体” (“TSHRab”) 可互换地用于指这样的抗体,其与促甲状腺激素受体(也称为“TSH 受体”或“TSHR”或“促甲状腺素受体”)上的表位结合,并且刺激(即,增加)这种受体与其促甲状腺激素(TSH)配体的结合。甲状腺刺激抗体可以是单克隆或多克隆的。因此,“甲状腺刺激单克隆抗体”和“单克隆甲状腺刺激抗体”可互换地用于指单克隆甲状腺刺激抗体,其与 TSH 结合位点内的 TSHR 表位结合,如由 M22 抗体例示的。

[0036] “促甲状腺激素” (“TSH”) 由具有如先前描述(Szkudlinski 等人(1996) Nat. Biotechnol. 14:1257 - 1263)的示例性氨基酸序列的人 TSH (hTSH)和牛 TSH (bTSH)例示。

[0037] “抗体”和“免疫球蛋白”指糖蛋白(例如 IgG、IgM、IgA、IgE、IgD 等)和 / 或其含有用于与抗原结合的“可变结构域”(也称为“F<sub>v</sub> 区”)的部分。在一个实施方案中,抗体是“多克隆抗体”,即由浆细胞(例如 B 淋巴细胞)的多于单个克隆产生的免疫球蛋白。在另一个实施方案中,抗体是“单克隆抗体” (“MAb”),即由杂交瘤细胞的单个克隆产生的免疫球蛋白。在另一个实施方案中,抗体是由受试者产生的“自身抗体”,并且能够与相同受试者产生的抗原(“自身”抗原)结合。

[0038] 当提及分子时,“抗原”和“免疫原”指能够诱导特异性体液免疫应答(包括引发可溶性抗体应答)和 / 或细胞介导的免疫应答(包括引发 CTL 应答)的任何物质。

[0039] 当提及抗体与分子(例如肽)的结合或细胞(例如 T 细胞)与肽的结合时,“特异性结合”指抗体或细胞与分子上的一种或多种表位的相互作用,其中所述相互作用依赖分子上的特定结构的存在。例如,如果抗体对于分子上的表位“A”是特异性的,则在含有标记的“A”和抗体的反应中含有表位 A (或游离的未标记的 A)的蛋白质的存在将减少与抗体结合的标记 A 的量。在一个实施方案中,抗体与分子的结合水平使用“IC<sub>50</sub>”即“半数最大抑制浓度”进行测定,所述 IC<sub>50</sub> 指产生给定生物过程或过程组分(例如酶、抗体、细胞、细胞受体、微生物等)50% 抑制的物质(例如抑制剂、拮抗剂等)浓度。它通常用作拮抗剂物质的效力的量度。

[0040] 如本文使用的,“样品”和“样本”以其最广泛含义使用,以包括任何组合物,例如化学反应混合物,来自生物学和 / 或环境来源的组合物,以及已与这些组合物接触的取样装置(例如拭子)。“生物样品”包括得自受试者的那些,包括体液(例如尿、血液、血浆、粪便物、脑脊髓液(CSF)、精液、痰和唾液),以及固体组织。生物样品还包括细胞(例如细胞系、在从组织中分离后无论分离细胞是否培养的从组织中分离的细胞、固定的细胞例如固定用于组织学和 / 或免疫组织化学分析的细胞)、组织(例如活组织检查材料)、细胞提取物、组织提取物、和从细胞和 / 或组织中分离的核酸(例如 DNA 和 RNA)等等。这些实例是举例说明性的,并且不应解释为限制可应用于本发明的样品类型。

[0041] “对照样品”指通过除了一种或多种特定变量外,维持在对照及其他样品中的相同条件用于与另一种样品比较的样品,以便推断这个改变的一种或多种变量对现象的因果意义。例如,“阳性对照样品”是其中现象预期发生的对照样品。例如,“阴性对照样品”是其

中现象不预期发生的对照样品。

[0042] “标准样品”指用作用于评估另一种样品(例如测试样品)的参考的样品。例如,各自含有已知 TSH 浓度和 / 或量的一种或多种标准样品可以用作参考用于评估测试样品中的 TSH 浓度和 / 或量。

[0043] 当提及相对于第二种样品(或相对于第二个受试者),在第一种样品中(或在第一个受试者中)的任何分子(例如氨基酸序列和核苷酸序列、抗体等)、细胞和 / 或现象(例如基因的表达水平、疾病症状、两种分子的结合例如促甲状腺激素(TSH)配体与其促甲状腺激素受体(TSH受体)的结合的水平、两种分子结合的特异性、两种分子的结合亲和力、疾病症状、对疾病的特异性、对疾病的敏感性、结合亲和力、酶活性等)的水平时,术语“减少”、“抑制”、“减小”、“压制”、“降低”和语法等价物(包括“更低”、“更小”等),意指在第一种样品中(或在第一个受试者中)的分子、细胞和 / 或现象的数量比在第二种样品中(或在第二个受试者中)低任何量,所述任何量使用任何领域公认的统计分析方法是统计上显著的。在一个实施方案中,在第一种样品中(或在第一个受试者中)的分子、细胞和 / 或现象的数量比在第二种样品中(或在第二个受试者中)的相同分子、细胞和 / 或现象的数量低至少 10%、低至少 25%、低至少 50%、低至少 75%、和 / 或低至少 90%。在另一个实施方案中,在第一种样品中(或在第一个受试者中)的分子、细胞和 / 或现象的数量比在第二种样品中(或在第二个受试者中)的相同分子、细胞和 / 或现象的数量低 5%-100% 的任何数目百分比,例如但不限于 10%-100%、20%-100%、30%-100%、40%-100%、50%-100%、60%-100%、70%-100%、80%-100% 和 90%-100%。在一个实施方案中,第一种样品(或第一个受试者)由下述例示但不限于下述:已使用本发明的组合物和 / 或方法处理的样品(或受试者)。在进一步的实施方案中,第二种样品(或第二个受试者)由下述例示但不限于下述:未使用本发明的组合物和 / 或方法处理的样品(或受试者)。在备选实施方案中,第二种样品(或第二个受试者)由下述例示但不限于下述:已与第一个受试者相比较不同的剂量和 / 或不同的持续时间和 / 或经由不同的施用途径,使用本发明的组合物和 / 或方法处理的样品(或受试者)。在一个实施方案中,第一种和第二种样品(或受试者)可以是相同的,例如其中寻求测定本发明的组合物和 / 或方法的不同方案(例如剂量、持续时间、施用途径等)的对一种样品(或受试者)的作用。在另一个实施方案中,第一种和第二种样品(或受试者)可以是不同的,例如当比较本发明的组合物和 / 或方法对一种样品(或受试者)的作用时,例如参与临床试验的患者和医院中的另一个个体。

[0044] 当提及相对于第二种样品(或相对于第二个受试者),在第一种样品中(或在第一个受试者中)的任何分子(例如氨基酸序列和核苷酸序列、抗体等)、细胞和 / 或现象(例如基因的表达水平、疾病症状、两种分子的结合例如促甲状腺激素(TSH)配体与其促甲状腺激素受体(TSH受体)的结合的水平、两种分子结合的特异性、两种分子的结合亲和力、疾病症状、对疾病的特异性、对疾病的敏感性、结合亲和力、酶活性等)的水平时,术语“增加”、“升高”、“提升”和语法等价物(包括“更高”、“更大”等),意指在第一种样品中(或在第一个受试者中)的分子、细胞和 / 或现象的数量比在第二种样品中(或在第二个受试者中)高任何量,所述任何量使用任何领域公认的统计分析方法是统计上显著的。在一个实施方案中,在第一种样品中(或在第一个受试者中)的分子、细胞和 / 或现象的数量比在第二种样品中(或在第二个受试者中)的相同分子、细胞和 / 或现象的数量多至少 10%、多至少 25%、多至少 50%、多至少 75%、和 / 或多至少 90%。这包括但不限于,在第一种样品中(或在第一个受试者中)的分

子、细胞和 / 或现象的数量比在第二种样品中 (或在第二个受试者中) 的相同分子、细胞和 / 或现象的数量多至少 10%、多至少 15%、多至少 20%、多至少 25%、多至少 30%、多至少 35%、多至少 40%、多至少 45%、多至少 50%、多至少 55%、多至少 60%、多至少 65%、多至少 70%、多至少 75%、多至少 80%、多至少 85%、多至少 90%、和 / 或多至少 95%。在一个实施方案中, 第一种样品 (或第一个受试者) 由下述例示但不限于下述: 已使用本发明的组合物和 / 或方法处理的样品 (或受试者)。在进一步的实施方案中, 第二种样品 (或第二个受试者) 由下述例示但不限于下述: 未使用本发明的组合物和 / 或方法处理的样品 (或受试者)。在备选实施方案中, 第二种样品 (或第二个受试者) 由下述例示但不限于下述: 已以与第一个受试者相比较不同的剂量和 / 或不同的持续时间和 / 或经由不同的施用途径, 使用本发明的组合物和 / 或方法处理的样品 (或受试者)。在一个实施方案中, 第一种和第二种样品 (或受试者) 可以是相同的, 例如其中寻求测定本发明的组合物和 / 或方法的不同方案 (例如剂量、持续时间、施用途径等) 的对一种样品 (或受试者) 的作用。在另一个实施方案中, 第一种和第二种样品 (或受试者) 可以是不同的, 例如当比较本发明的组合物和 / 或方法对一种样品 (或受试者) 的作用时, 例如参与临床试验的患者和医院中的另一个个体。

[0045] 当提及相对于第二种样品 (或相对于第二个受试者), 在第一种样品中 (或在第一个受试者中) 的任何分子 (例如氨基酸序列和核苷酸序列、抗体等)、细胞和 / 或现象 (例如基因的表达水平、疾病症状、两种分子的结合例如促甲状腺激素 (TSH) 配体与其促甲状腺激素受体 (TSH 受体) 的结合的水平、两种分子结合的特异性、两种分子的结合亲和力、疾病症状、对疾病的特异性、对疾病的敏感性、结合亲和力、酶活性等) 的水平时, 术语“并未大量减少”意指在第一种样品中 (或在第一个受试者中) 的分子、细胞和 / 或现象的数量是在第二种样品中 (或在第二个受试者中) 的数量的 91%-100%。

[0046] 当提及任何分子和 / 或现象的水平时, 术语“改变”和“修饰”指增加和 / 或降低。

[0047] 当提及相对于第二种样品 (或相对于第二个受试者), 在第一种样品中 (或在第一个受试者中) 的任何分子 (例如氨基酸序列和核苷酸序列、抗体等)、细胞、病毒和 / 或现象 (例如基因的表达水平、疾病症状、两种分子的结合例如促甲状腺激素 (TSH) 配体与其促甲状腺激素受体 (TSH 受体) 的结合的水平、两种分子结合的特异性、两种分子的结合亲和力、疾病症状、对疾病的特异性、对疾病的敏感性、结合亲和力、酶活性等) 的水平时, 术语“基本上相同”意指使用任何领域公认的统计分析方法, 在第一种样品中 (或在第一个受试者中) 的分子、细胞和 / 或现象的数量与在第二种样品中 (或在第二个受试者中) 的数量并无不同。在一个实施方案中, 在第一种样品中 (或在第一个受试者中) 的分子、细胞和 / 或现象的数量是在第二种样品中 (或在第二个受试者中) 的数量的 90%-100% (例如 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 和 100%)。

[0048] 本文提及任何数值范围明确包括由该范围包含的每个数值 (包括分数和整数)。为了举例说明和非限制性地, 本文提及“至少 50”的范围包括整数 50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60 等, 和分数 50.1、50.2、50.3、50.4、50.5、50.6、50.7、50.8、50.9 等。在进一步举例说明中, 本文提及“小于 50”的范围包括整数 49、48、47、46、45、44、43、42、41、40 等, 和分数 49.9、49.8、49.7、49.6、49.5、49.4、49.3、49.2、49.1、49.0 等。在另外一个举例说明中, 本文提及“5-10”的范围包括 5、6、7、8、9 和 10 中的每个整数, 和每个分数例如 5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9 等。

**[0049]** 发明详述

**[0050]** 本发明提供了用于检测甲状腺激素封闭免疫球蛋白(TBI)的组合物和方法。本发明的方法对于TBI是灵敏和特异性的,并且可以用于TBI和甲状腺刺激免疫球蛋白(TSI)的双重检测。本发明的组合物和方法用于诊断与TBI和/或TSI的存在相关的疾病,用于监控疾病进展和/或治疗方案、治疗剂、疫苗等,并且用于帮助临床医生作出治疗决定。

**[0051]** 本发明在下述中进一步描述:(A)用于检测甲状腺封闭免疫球蛋白(TBI)的测定法,(B)用于甲状腺封闭免疫球蛋白(TBI)和甲状腺刺激免疫球蛋白(TSI)的双重检测的测定法,和(C)试剂盒。

**[0052]** A. 用于检测甲状腺封闭免疫球蛋白(TBI)的测定法

**[0053]** 本发明提供了用于检测测试样品中的甲状腺激素封闭免疫球蛋白(TBI)的方法,其包括a)提供i)由包含下述的一种或多种表达载体稳定转染的转基因细胞:1)与cAMP诱导型启动子可操作地连接的报告基因(例如萤光素酶基因),和2)与组成型启动子可操作地连接的嵌合TSH受体(TSHR)基因,其中所述细胞在细胞膜上表达嵌合TSHR,ii)促甲状腺激素(TSH)(例如bTSH),和iii)对照样品;和iv)测试样品(例如怀疑含有TBI);b)使转基因细胞和TSH与下述接触:i)对照样品,以产生第一种样品,和ii)测试样品,以产生第二种样品,其中所述接触在用于TSH与嵌合TSHR结合的条件下;和c)测量第一种样品中和第二种样品中的报告基因的表达水平,其中与第一种样品相比较,在第二种样品中的报告基因的表达水平减少指示测试样品中TBI的存在。

**[0054]** 在一个实施方案中,本发明的TBI测定法是基于细胞的免疫球蛋白竞争测定法,通过其甲状腺封闭免疫球蛋白与促甲状腺激素(TSH)竞争结合在示例性CHO-MC4细胞上表达的TSH受体(TSHR)。在一些实施方案中,TBI测定法包括使用CHO-MC4细胞、细胞生长培养基、bTSH、Thyretain™反应缓冲液(Quidel Corp.&Diagnostic Hybrids, Inc., Ohio, USA)、萤光素酶底物和患者血清样品。本发明的TBI测定法的试剂和组分对于本领域技术人员是可获得的(Thyretain™测定法;Quidel Corp.&Diagnostic Hybrids, Inc.)。

**[0055]** 本发明的测定法在实施例1中例示。本发明的TBI测定法的示例性CHO-MC4细胞是经遗传改造的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,其表达由糖蛋白激素 $\alpha$ 亚基启动子驱动的嵌合人/大鼠TSHR和萤光素酶报告基因。CHO-MC4细胞用于Thyretain™测定法(Quidel Corp.&Diagnostic Hybrids, Inc.)中。

**[0056]** 本发明的方法用于诊断与TBI的存在相关的疾病,例如格雷夫斯氏病、桥本氏甲状腺炎(Endo等人(1978)J. Clin. Endocrinology & Metabolism46(5):734-739;Takasu等人(1987)J. Clin. Endocrinology & Metabolism64(2):239-245);甲状腺功能减退(Takasu等人(1984)J. Clin. Endocrinology&Metabolism59(1):142-146);新生儿甲状腺功能减退(Iseki等人(1983)57(2):384-387;Matsuura等人(1980)The New England Journal of Medicine303(13):738-741);非甲状腺肿甲状腺功能减退(Arikawa等人(1985)J. Clin. Endocrinology & Metabolism60(5):953-959);甲状腺机能正常或甲状腺机能减退自身免疫性甲状腺炎(Chiovato等人(1990)71:40-45);原发性粘液性水肿(Drexhage等人(1980)Nature289:594-596;Konishi等人(1983)J. Clin. Endocrinology & Metabolism57(3):544-549);和特发性粘液性水肿(Kohn等人(2003)Autoimmunity36:331-337)。

**[0057]** 本发明的方法还用于监控疾病进展和/或治疗方案、治疗剂、疫苗等,并且用于帮

助临床医生作出治疗决定。

[0058] 本领域描述了用于甲状腺激素自身抗体的测定法,其使用也在本发明(于2008年8月7日公开的美国专利申请公开号US2008-0187942)中使用的MC4嵌合受体。然而,本发明的方法是令人惊讶的,因为本领域的测定法基于下述观点设计为测量甲状腺激素刺激(非封闭)免疫球蛋白(TSI):MC4嵌合受体仅响应刺激性抗体,并且甲状腺激素封闭抗体的结合被消除和/或减少。另外,本领域陈述它用于检测TSI的方法的特异性是使用表达嵌合MC4受体的细胞的结果,其通过与刺激性自身抗体(即与封闭性自身抗体相反)优先结合提供比野生型受体更大的特异性。此外,本领域陈述它用于检测TSI的方法的灵敏度是使用表达嵌合MC4受体的细胞的结果,其通过与刺激性自身抗体(即与封闭性自身抗体相反)优先结合提供比野生型受体更大的灵敏度。

[0059] 除了本发明的方法在检测TBI中令人惊讶的方面外,本发明的方法提供了对于检测TBI灵敏的令人惊讶的优点。因此,在一个实施方案中,检测TBI的本发明方法具有是在下述方法中检测TBI时的TBIIC<sub>50</sub>的5倍到15倍小(最优选7.5倍小)的TBI IC<sub>50</sub>,所述方法包括用表达野生型TSHR的细胞代替表达嵌合TSHR的转基因细胞。本文数据证实由CHO-MC4细胞表达的嵌合TSHR在检测TBI方面比野生型TSHR更有用(实施例2和4)。例如,本文数据证实与表达野生型TSHR的H10细胞相比较,当使用表达嵌合TSHR的CHO-MC4细胞时,在检测TBI中的更高灵敏度;CHO-MC4细胞的IC<sub>50</sub>是H10细胞的IC<sub>50</sub>的7.5倍小。

[0060] 就本发明用于检测TBI的灵敏度而言的另一个令人惊讶的优点是本发明的方法具有是在下述方法中检测TBI时的TBI IC<sub>50</sub>的10倍到30倍小(最优选22倍小)的TBI IC<sub>50</sub>,所述方法包括用抗TBI单克隆抗体检测TBI的特异性结合(例如在ELISA测定法中)。本文数据显示本发明使用CHO-MC4细胞的TBI测定法的IC<sub>50</sub>是1.344ng/ml,其是TRAb测定法的IC<sub>50</sub>的22倍小(实施例3和4)。

[0061] 上文讨论的本发明方法的灵敏度至少部分是令人惊讶的,因为现有技术的嵌合受体TSHR-LH/CGR据报道对TSI是灵敏的,但对TBI非常不灵敏,在所述嵌合受体中TSH受体(TSHR)连接到大鼠促黄体激素绒毛膜促性腺激素(LH/CG)受体(Tahara等人(1991)BBRC179:70-77;Tahara等人(1997)Thyroid7(6):867-877)。此外,现有技术提出通过本发明的示例性转基因细胞(例如CHO-MC4细胞和RD-MC4细胞)表达的MC4嵌合受体TSHR-LH/CGR缺乏关于TBI的表位,而保留关于TSI的表位(Kohn等人(2003)Autoimmunity36:331-337;Sanders等人(2011)J.Molecular Endocrinol.46:81-99)。

[0062] 虽然不是必需的,但在一个实施方案中,本发明的方法进一步包括d)与第一种样品相比较,检测第二种样品中的报道基因(例如萤光素酶基因)的表达水平减少。

[0063] 此外,虽然不是必需的,但在一个实施方案中,本发明的方法进一步包括测定测试样品中的TBI水平。这可以通过例如比较下述完成:1)在与测试样品接触后的报道基因的表达水平,与2)在使转基因细胞与一种或多种标准样品接触后的报道基因的表达水平,所述标准样品各自含有已知浓度的TSH。

[0064] 本发明方法的进一步令人惊讶的方面是它们是TBI特异性的。用于检测样品中的TBI存在的方法被称为是“对于TBI特异性的”或是“TBI特异性的”,其中该方法包括检测TSH与其受体(TSHR例如嵌合TSHR)的特异性结合被TBI的抑制,并且其中通过TBI的抑制水平通过下述中的一种或多种的存在基本上未改变(即,未从1%增至10%,或从1%降至

10%);促黄体激素(LH)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)、和促卵泡激素(FSH)。

[0065] 例如,本文数据证实本发明的 TBI 测定法对于 bTSH 是特异性的,因为当三种糖蛋白激素 LH、hCG 和 FSH 在本发明的 TBI 测定法中以其最高生物学正常范围浓度和以其最高生物学正常范围浓度两倍进行测试时,对 TSH 与 TSHR 结合的 TBI 抑制没有大量交叉反应性或干扰(实施例 5)。更特别地,虽然本发明的测定法检测到通过 TBI 的 86%抑制,但含有 TBI 与 LH、hCG 和 FSH 中的任何一种的混合物检测到 81%–84% 的抑制范围。

[0066] 虽然不预期限制在本发明的测定法中的 TSH 浓度范围,但在一个实施方式中,TSH 具有小于 100mIU/ml,并且更优选 0.2mIU/ml–100mIU/ml 的浓度。图 1B 显示当 TSH 浓度等于或小于 100mIU/ml 时,在生物发光基因(例如萤光素酶基因)的表达和 TSH 浓度之间的关系是线性的。

[0067] 不预期在本发明的方法中使用的转基因细胞含有任何特定报道基因。然而,在一个实施方案中,报道基因表达生物发光蛋白质,例如包含海肾萤光素酶氨基酸序列 SEQ ID NO:03 的蛋白质。

[0068] 不预期在本发明的方法中使用的转基因细胞限制于任何特定类型。然而,在一个实施方案中,转基因细胞包含由 CHO-MC4 细胞和 RD-MC4 细胞例示的细胞。

[0069] 在一个实施方案中,本发明的方法可以通过将 TSH 替换为甲状腺刺激单克隆抗体(例如 M22)和 / 或甲状腺刺激多克隆抗体来执行(图 9)。本文数据证实本发明的 TBI 测定法可以检测示例性样品 18HM 阻断通过 bTSH 和 / 或甲状腺刺激免疫球蛋白(TSI)的刺激的能力(图 10)。

#### [0070] B. 用于甲状腺封闭免疫球蛋白(TBI)和甲状腺刺激免疫球蛋白(TSI)的双重检测的测定法

[0071] 本发明提供了用于检测测试样品中的甲状腺激素封闭免疫球蛋白(TBI)和甲状腺激素刺激免疫球蛋白(TSI)的方法,其包括 a)提供 i)由包含下述的一种或多种表达载体稳定转染的转基因细胞:1)与 cAMP 诱导型启动子可操作地连接的报道基因(例如萤光素酶基因),和 2)与组成型启动子可操作地连接的嵌合 TSH 受体(TSHR)基因,其中所述细胞在细胞膜上表达嵌合 TSHR,ii)促甲状腺激素(TSH),和 iii)对照样品,iv)测试样品(例如怀疑含有 TBI 和 / 或 TSI);b)使转基因细胞和 TSH 与下述接触:i)对照样品,以产生第一种样品,和 ii)测试样品,以产生第二种样品,其中所述接触在用于 TSH 与嵌合 TSHR 结合的条件下;和 c)测量在接触前和在接触后,在转基因细胞中的报道基因的表达水平(例如通过检测起因于萤光素酶活性的生物发光),其中 i)与第一种样品相比较,在第二种样品中的报道基因的表达水平减少指示测试样品中 TBI 的存在,和 ii)与第一种样品相比较,在第二种样品中的报道基因的表达水平增加指示测试样品中 TSI 的存在。

[0072] 本文在实施例 6–8 中的数据证实本发明的测定法检测 TBI 和 TSI 两者的用途,包括在血清样品中的检测(表 8)。

[0073] 本发明用于 TBI 和 TSI 两者的双重检测的方法用于诊断与 TSI 的存在相关的疾病,例如格雷夫斯氏病和甲状腺功能亢进,用于监控疾病和 / 或治疗进展,并且用于帮助临床医生作出治疗决定。

[0074] 虽然不预期使转基因细胞限制于任何特定类型,但在一个实施方案中,转基因细胞包含由 CHO-MC4 细胞和 RD-MC4 细胞例示的细胞。

### [0075] C. 试剂盒

[0076] 本发明提供了用于帮助实践本发明的方法的试剂盒。在一个实施方案中,该试剂盒包含:i)由包含下述的一种或多种表达载体稳定转染的转基因细胞:1)与 cAMP 诱导型启动子可操作地连接的报告基因,和 2)与组成型启动子可操作地连接的嵌合 TSH 受体(TSHR)基因,其中所述细胞在细胞膜上表达嵌合 TSHR,和 ii)关于使用转基因细胞用于检测甲状腺激素封闭免疫球蛋白(TBI)的说明书。

[0077] 术语“试剂盒”用于指示及试剂及其他材料的组合。考虑试剂盒可以包括试剂例如缓冲剂、蛋白质稳定剂、信号产生系统(例如生物发光和/或荧光生成系统)、抗体、对照样品、以及测试容器(例如微量滴定板等)。

[0078] 在一个实施方案中,试剂盒包含阳性对照样品,其含有甲状腺激素封闭免疫球蛋白(TBI)。在另一个实施方案中,该试剂盒包含促甲状腺激素(TSH)。

[0079] 当希望 TBI 和 TSI 两者的双重检测时,该试剂盒可以进一步包含用于检测测试样品中的甲状腺激素刺激免疫球蛋白(TSI)的说明书。在另一个实施方案中,该试剂盒可以进一步包含阳性对照样品,其含有检测甲状腺激素刺激免疫球蛋白(TSI)。

### [0080] 实验

[0081] 提供下述实施例以便证实且进一步举例说明本发明的某些优选实施方案和方面,并且不应解释为限制其范围。

[0082] 在下述实验公开内容中,应用下述缩写:eq(当量);M(摩尔每升); $\mu$ M(微摩尔每升);N(正常);mol(摩尔);mmol(毫摩尔); $\mu$ mol(微摩尔);nmol(纳摩尔);g(克);mg(毫克); $\mu$ g(微克);ng(纳克);或 L(升);ml(毫升); $\mu$ l(微升); $\mu$ (微);m(毫);IU(国际单位);cm(厘米);mm(毫米); $\mu$ m(微米);nm(纳米); $^{\circ}$ C(摄氏度);sec.或 s(秒);min.和 m(分钟);MW(分子量);促甲状腺激素或促甲状腺素(TSH);bTSH(牛 TSH);TSI(甲状腺刺激免疫球蛋白);TSAb(甲状腺刺激抗体);EDTA(乙二胺四乙酸);RLU/sec(相对光单位/秒);GM或 PM(生长培养基或种植培养基);SM(饥饿培养基);HBSS(Hank 氏平衡盐溶液);EMEM(Eagle 氏最小必需培养基);FBS或 FCS(胎牛血清或小牛血清);DMSO(二甲基亚砷);CHO(中国仓鼠卵巢细胞);CHO-R(由人 TSH 受体转染的 CHO 细胞);CHO-Rluc(由 cre- 萤光素酶报告基因复合物转染的 CHO-R 细胞);Oxoid(Oxoid, Basingstoke, England);BBL(Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, ME);DIFCO(Difco Laboratories, Detroit, MI);U. S. Biochemical(U. S. Biochemical Corp., Cleveland, OH);Fisher(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA);Sigma(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.);ATCC(American Type Culture Collection, Rockville, Maryland);LTI(Life Technologies, Rockville, MD);和 Promega(Promega Corp., Madison, WI)。

[0083] 在下述方法中,这些方法中使用的所有溶液都是无菌的(除了 TSH、对照、患者样本外)和无菌处理的。所有操作都在生物安全柜中在无菌条件下进行。细胞培养基(例如 Ham's F-12, EMEM 等)得自 LTI,而另外的试剂例如非必需氨基酸得自 Sigma。

[0084] 直到紧在解冻前和在本发明的方法中使用前,才应允许细胞的冷冻小瓶由其  $-80^{\circ}$ C(或更低)贮存温度加温,因为温度循环可能导致活力丧失。因为它含有在室温下不稳定的二硫苏糖醇,所以 5x 细胞裂解溶液应仅从其  $-20^{\circ}$ C 贮存温度取出足够取出用于制备 1x 溶液的所需体积的时间。因为重构的萤光素酶底物溶液也含有二硫苏糖醇,所以它应

保持在  $-20^{\circ}\text{C}$  下冷冻直到紧在使用前,在所述时间它可以取出且置于  $25-37^{\circ}\text{C}$  水浴中,以解冻且达到室温。

[0085] 一般而言,当从孔(例如微量滴定板等)中取出液体时,液体可以从孔废弃到生物安全柜中的容器内。可以通过将平板倒置在无菌、吸收性纸巾上,排出且去除残留液体。或者,可以通过使用在抽吸器上的细尖端抽吸而去除液体。如果使用抽吸,则将平板保持在陡峭角度处,从而使得液体不溢出孔,并且将抽吸器尖端向下指向孔的侧面几乎到底部,以去除液体且仅留下最低限度残渣。然而,必须小心以便防止细胞单层的干扰,因为细胞可以容易地通过抽吸器取出。

[0086] 如下文方法中所示,推荐但不要求样本、标准和对照一式三份运行。由于溶液 3 的粘稠性质和实现孔中的足够混合中的困难,当一式三份总体积是这些试剂的  $+10\%$  ( $33\ \mu\text{L}$ ) 时,转移至溶液 3 的所需一式三份体积  $+10\%$  ( $330\ \mu\text{L}$ ),充分混合,并且将  $110\ \mu\text{L}$  转移到一式三份孔,实现最佳重现性。

[0087] 在细胞单层(例如在微量滴定板的孔内)的制备中,优选细胞在孔内平均分布。因此,为了避免不均匀的细胞分布,细胞悬液进入孔内的转移应在无振动的生物安全柜中执行。在平板中的所有孔都已接受细胞后,将平板覆盖且小心置于固体、无振动表面上 30 分钟,以允许细胞未受干扰地附着到孔底部。这帮助确保细胞的平均分布存在于孔的每一个中。

[0088] 实施例 1

[0089] 用于检测样品中的 TBI 的方法

[0090] 先前描述了(于 2008 年 8 月 7 日公开的美国专利申请公开号 US2008-0187942)用于检测甲状腺刺激免疫球蛋白(TSI 生物测定法, Thyretain™)的稳定转染的细胞系(CHO-MC4),其表达嵌合 TSH 受体(TSHR)和 CRE 依赖性萤光素酶。为了开发补充性甲状腺封闭抗体(TBI)生物测定法,我们比较了嵌合 TSHR 与野生型(wt) TSHR 的表现。

[0091] 分离表达 wt 或嵌合 TSHR 和 CRE 依赖性萤光素酶的 CHO 细胞。使细胞在  $37^{\circ}\text{C}$  下生长 15-18 小时,并且随后与 bTSH、TSI、TBI 和 / 或患者血清一起温育。在温育 3 小时后测量萤光素酶表达。封闭活性定义为相对于与单独的 bTSH 诱导的萤光素酶表达抑制百分比。

[0092] 嵌合和 wt 细胞系两者都显示以剂量依赖性方式响应 bTSH 的萤光素酶诱导,但展示不同水平的灵敏度和最大诱导。wt TSHR 表达细胞系响应  $0.8-50\text{mIU/L}$  的 bTSH 浓度,而嵌合 TSHR 表达细胞系具有更广泛的动态范围( $1.6-200\text{mIU/L}$ ),并且诱导至 8 倍的更高水平。两个细胞系都检测到来自具有格雷夫斯氏病的患者的血清中的 TSI。当细胞系用 TSI 或 bTSH 刺激时,通过添加增加浓度的封闭 MAb, K1-70 (RSR, Cardiff, U. K.) 或含有 TBI 的血清,以剂量依赖性方式减少萤光素酶表达。嵌合细胞系是更灵敏的,因为 K1-70 的抑制浓度  $50\%$  ( $\text{IC}_{50}$ ) 在嵌合细胞系上是 3 - 5 倍低。此外,与 wt 细胞相比较,当用 TBI 阳性血清测试时,嵌合细胞系展示 3-4 倍高的抑制活性,并且一致地展示对于连续稀释的封闭血清的 S 形剂量应答曲线。

[0093] 结果显示与 wt 相比较,嵌合 TSHR 细胞系表现更佳,并且是开发刺激性和封闭性生物测定法的独特媒介物。

[0094] A. 用于检测血清样品中的 TBI 的示例性方案:

[0095] 1. 用  $100\ \mu\text{L}$ /孔的细胞附着溶液(例如美国专利申请公开号 US2008-0187942 中

所述,并且作为 Thyretain™ Cell Attachment Solution 从 Quidel Corp. & Diagnostic Hybrids, Inc., Ohio, USA 商购可得) 涂布一块黑色、平坦 / 透明底部的 96 孔板。使溶液留在孔上 30 秒且随后倒出溶液。

[0096] 2. 将 1 个冷冻小瓶的 CHO MC4 细胞加入 5ml Thyretain™ Growth Media (例如美国专利申请公开号 US2008-0187942 中所述,并且作为 Thyretain™ Growth Media 从 Quidel Corp. & Diagnostic Hybrids, Inc., Ohio, USA 商购可得)。

[0097] 3. 将细胞以 100  $\mu$  l / 孔种植到 48 孔形式中(跳过平板的顶部和底部行以及平板的左手和右手侧上的前两列)。

[0098] 4. 将细胞平板在 37°C 下温育 16-18 小时。

[0099] 5. 在过夜生长期结束时,用显微镜就汇合检查细胞,并且证实细胞不含污染物。将平板放回到温箱内。

[0100] 6. 制备 400  $\mu$  IU/ml bTSH(这允许在每个孔中 100  $\mu$  IU/ml 终浓度的 bTSH)。这是工作储备液。

[0101] 7. 用 bTSH 制备每种样品的 1:11 稀释物 --40  $\mu$  L 每种样品、220  $\mu$  L 400  $\mu$  IU/ml bTSH 和 180  $\mu$  L Thyretain™ Reaction Buffer(例如美国专利申请公开号 US2008-0187942 中所述,并且作为 Thyretain™ Reaction Buffer 从 Quidel Corp. & Diagnostic Hybrids, Inc., Ohio, USA 商购可得)。

[0102] 8. 通过将正常血清在反应缓冲液中 1:11 稀释(40  $\mu$  L 血清和 400  $\mu$  L 反应缓冲液)来制备空白对照。

[0103] 9. 通过稀释 40  $\mu$  L 正常血清、220  $\mu$  L 400  $\mu$  IU/ml bTSH 和 180  $\mu$  L Thyretain™ Reaction Buffer, 制备 bTSH 对照。

[0104] 注:平板优选还包含仅含有 Thyretain™ Reaction Buffer 的重复孔。

[0105] 10. 从温箱中取出平板且清洗,并且随后用 100  $\mu$  l / 孔 Thyretain™ Reaction Buffer 给细胞再补料。

[0106] 11. 将制备的样品以 100  $\mu$  l / 孔加入一式三份的细胞。

[0107] 12. 将细胞在 37°C 下温育 3 小时。

[0108] 13. 在 3 小时温育后倒出所有孔的内容物。

[0109] 14. 将 75  $\mu$  l / 孔 Bright-Glo™ 加入每个孔。

[0110] 15. 使细胞在室温下温育 10 分钟,并且随后在 Veritas™ 平板阅读器上阅读平板。

[0111] B. 在 TBI 测定法中的示例性 TSH 浓度:

[0112] 图 1 显示使用 CHO-MC4 细胞的 bTSH 剂量应答曲线。图 1A 显示使用在 0.2mIU/ml-400mIU/ml 的浓度范围中的 bTSH 的连续两倍稀释的萤光素酶诱导;图 1B 显示使用在 0.2mIU/ml-100mIU/ml 的更窄浓度范围中的 bTSH 的萤光素酶诱导。S/B 比例指萤光素酶信号本底比,其标准化由不同实验产生的萤光素酶活性(如以 RLU 测量的)。

[0113] 图 1A 显示萤光素酶诱导随着 bTSH 浓度而增加。当 bTSH 浓度等于或小于 100mIU/ml 时,在萤光素酶诱导和 bTSH 浓度之间的关系是线性的。当 bTSH 的浓度高于 100mIU/ml 时,萤光素酶活性的增加减退,并且诱导逐渐接近但未完全达到平台。图 1B 是当 bTSH 浓度等于或小于 100mIU/ml 时,图 1A 的线性部分上的放大。 $R^2$  (系数值)接近于一。

[0114] 在 TBI 测定法中,甲状腺封闭抗体与 bTSH 竞争结合位于细胞膜上的 TSH 受体。因

此, bTSH 的浓度是用于测定测定法灵敏度的重要组分。图 1B 中所示的关于萤光素酶诱导的线性范围中的 bTSH 浓度具有比 bTSH 的更高非线性浓度更高的检测密度。在 bTSH 浓度的线性范围内, 最高浓度可以用作测定法的一个最佳浓度。尽管线性浓度都具有相同 bTSH 检测灵敏度, 但更高的 bTSH 浓度意味着更大的信号本底比。

[0115] 实施例 2

[0116] 嵌合 TSHR 在检测 TBI 方面比野生型 TSHR 更有用

[0117] A. 比较在 MC4 和 TSHRwt 细胞(H10)中, 使用 K1-70 甲状腺封闭单克隆抗体(MAb)的甲状腺封闭免疫球蛋白(TBI)测定法的检测灵敏度

[0118] 在 CHO-MC4 细胞或 H10 细胞中用 TBI 测定法测试从 0.1 到 100ng/ml 的连续稀释的封闭 MAb K1-70。结果显示于图 3 中。

[0119] 所有样品数据都用具有 1:11 稀释的正常血清的反应缓冲液的本底 RLU 标准化。抑制百分比(%) 计算为 : $(\text{bTSH 对照 RLU} - \text{样品 RLU}) / \text{bTSH 对照 RLU}$ 。

[0120] 结果显示 CHO-MC4 细胞具有比 H10 细胞高得多的对 K1-70 的检测灵敏度。CHO-MC4 细胞的  $IC_{50}$  是 H10 细胞的  $IC_{50}$  的 7.5 倍小。

[0121] B. 比较在 MC4 和 H10 细胞中使用含封闭抗体的血清的 TBI 测定法的检测灵敏度

[0122] 一个 TBI 阳性患者的血清从 1:22 连续稀释到 1:90,000, 并且在 MC4 或 H10 细胞中通过 TBI 测定法进行测试。结果显示于图 4 中。

[0123] 结果显示在 CHO-MC4 细胞中的血清稀释物的抑制百分比的 S 形曲线, 其类似于 K1-70 在先前实验中的那种。然而, 在 H10 细胞中未显示相同曲线。

[0124] 这个结果证实 CHO-MC4 细胞在检测 TBI 方面比 H10 细胞更灵敏。

[0125] 实施例 3

[0126] 本发明的 TBI 测定法的灵敏度高于竞争结合法, 例如 Kronus™ ELISA 测定法

[0127] 我们进行甲状腺封闭单克隆抗体 K1-70 剂量应答曲线的比较, 以比较本发明的 TBI 测定法与现有技术的竞争结合法, 例如 Kronus™ ELISA 测定法 (TRAb 测定法)。在这个实验中, K1-70 刺激单克隆抗体在 CHO-MC4 细胞中的 TBI 测定法和 TRAb 测定法 (Kronus™) 两者上进行测试。结果显示于图 5 中。

[0128] 结果显示使用 CHO-MC4 细胞的 TBI 测定法的  $IC_{50}$  是 1.344ng/ml, 其是 TRAb 测定法的  $IC_{50}$  的 22 倍小, 指示 CHO-MC4 细胞具有比 TRAb 测定法更高的 TBI 检测灵敏度。

[0129] 实施例 4

[0130] 本发明的 TBI 测定法的灵敏度

[0131] 下述数据比较本发明测定法与其他测定法在检测 TBI 方面的灵敏度。

[0132] 表 1. TBI 阳性血清样品的稀释应答

[0133]

稀释度	2800	2400	2000	1800	1600	1400	1200	1000	800	640	500	320	160	80	40
RLU	13418	13351	13140	12600	12114	11008	10235	10657	9970	9073	7474	6120	3689	2937	2807
% 抑制	6%	7%	9%	14%	19%	29%	37%	33%	39%	48%	63%	75%	98%	105%	107%

[0134] 表 2. 甲状腺封闭单克隆抗体 K1-70 的剂量应答  
 [0135]

ng/ml	0.0025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1	1.5	2	2.5	5	10
RLU	16354	15651	13630	14144	12804	12600	12708	11341	9422	7940	6617	4008	2700
%抑制	6%	0%	18%	13%	25%	27%	26%	38%	55%	68%	79%	102%	114%

[0136] 表 3. 在 TBI 和 TRAb 测定法上的 TBI 阳性血清稀释结果的比较

[0137]

稀释度		44	88	176	352	704	1408	2816	5632	11264	22528	45056	90112
	TBI 测定法	95%	96%	89%	65%	25%	15%	1%	-2%	0%	-4%	-5%	-5%
%抑制	TRAb 测定法	73%	50%	26%	9%	14%	2%	-10%	-7%	-4%	3%	-8%	-3%

[0138] 表 4. 在 TBI 和 TRAb 测定法上甲状腺封闭单克隆抗体 K1-70 剂量应答的比较

[0139]

K1-70	(ng/ml)	100	50	25	12.5	6.25	1.56	0.4	0.1
%抑制	TBI 测定法	101%	103%	104%	104%	99%	60%	21%	6%
	TRAb 测定法	81%	68%	46%	31%	18%	14%	13%	11%

[0140] 实施例 5

[0141] 本发明的 TBI 测定法的特异性

[0142] 表 5 和 6 显示本发明的 TBI 测定法对于糖蛋白激素亚家族——促黄体激素(LH)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)和促卵泡激素(FSH)的特异性测试。在实验中,测试每种激素的两个浓度。一个浓度是在正常范围内的最高水平;另一个是该浓度的两倍。K1-70 甲状腺封闭单克隆抗体用作阳性对照;激素在反应缓冲液中与 K1-70 一起测试。

[0143] 在人中的每种激素的正常范围如下:LH5-20mIU/ml;hCG0.1-8000mIU/ml;FSH1.4-116.3mIU/ml。

[0144] 表 5. 在 CHO-MC4 细胞中用最高正常范围浓度测试的糖蛋白激素的荧光素酶诱导

[0145]

		RLU	%抑制
TBI 阳性	2.5ng K1-70	5532	86%
FSH 116.3 mIU/ml	2.5ng K1-70	6101	81%
	反应缓冲液	16489	0%
LH 20 mIU/ml	2.5ng K1-70	6102	81%
	反应缓冲液	17263	-5%
hCG 8000 mIU/ml	2.5ng K1-70	5998	82%
	反应缓冲液	17502	-7%

[0146] 表 6. 在 CHO-MC4 细胞中用最高正常范围浓度两倍测试的糖蛋白激素的荧光素酶诱导

		RLU	%抑制	
[0147]	<b>TBI 阳性</b>	<b>2.5ng K1-70</b>	<b>5532</b>	<b>86%</b>
	<b>FSH 232.6 mIU/ml</b>	<b>2.5ng K1-70</b>	<b>5811</b>	<b>83%</b>
		<b>反应缓冲液</b>	<b>16272</b>	<b>1%</b>
	<b>LH 40 mIU/ml</b>	<b>2.5ng K1-70</b>	<b>5773</b>	<b>84%</b>
		<b>反应缓冲液</b>	<b>17368</b>	<b>-6%</b>
	<b>hCG 16000 mIU/ml</b>	<b>2.5ng K1-70</b>	<b>5947</b>	<b>82%</b>
<b>反应缓冲液</b>		<b>16483</b>	<b>0%</b>	

[0148] 数据证实当三种糖蛋白激素在 TBI 测定法中进行测试时,不存在大量交叉反应性或干扰。这些结果指示 TBI 测定法对于 bTSH 是非常特异性的。

[0149] 实施例 6

[0150] 本发明的双重生物测定法可以成功地检测 TBI 和 TSI

[0151] 此处我们描述了使用相同的转基因细胞 CHO 细胞系(CHO-MC4),用于检测甲状腺刺激免疫球蛋白(TSI)和甲状腺封闭免疫球蛋白(TBI)两者的测定法,所述 CHO-MC4 表达嵌合 TSH-受体(TSHR),并且在 2008 年 8 月 7 日公开的美国专利申请公开号 US2008-0187942 中描述。

[0152] 方法:为了检测阻断活性,用与抗 TSHR 封闭 MAb 或人血清样品混合的牛 TSH (bTSH) 诱导 CHO-MC4 细胞。阻断活性定义为相对于用单独的 bTSH 诱导的荧光素酶表达的抑制百分比。MAbs K1-70 和 M-22 购自 RSR (Cardiff, U.K.)。所有样品还都对于 TSHR 自身抗体(TrAb) (ELISA, Kronus™) 和 TSI (Thyretain™) 进行测量。

[0153] 结果:bTSH 刺激的 CHO-MC4 细胞的荧光素酶表达以剂量依赖性方式响应封闭 MAb K1-70 而降低。五十份甲状腺机能正常的对照血清证实 7-52% 的抑制,允许我们确定 50% 抑制的初步第 95 百分位数截断。来自具有自身免疫性甲状腺功能减退的患者的 TrAb 阳性和 TSI 阴性血清使荧光素酶表达减少到本底水平(100% 抑制)。连续稀释实验证实这些样品中直到 1:200 的封闭活性滴度。TBI 生物测定法比使用 K1-70MAb 的 TrAb 测定法更敏感超过 20 倍,显示  $1.34 \pm 0.09 \text{ ng/ml}$  的 IC<sub>50</sub> 相对于  $29.73 \pm 3.27 \text{ ng/ml}$  的 IC<sub>50</sub>。

[0154] TBI 生物测定法还能够检测 TSI。使用刺激 MAb (M-22) 或 TSI 阳性血清,我们观察到超过用单独的 bTSH 可见的荧光素酶表达,即阴性抑制。在两个测定法中 M-22 刺激活性的剂量应答是基本上相同的,在 TSI 和 TBI 测定法中分别具有  $0.14 \text{ ng/ml}$  和  $0.16 \text{ ng/ml}$  的 50% 有效浓度(EC<sub>50</sub>)。在两个测定法中测试的 TSI 阳性血清的连续稀释也显示相等的剂量应答曲线。

[0155] A. 使用连续稀释的 M22 或 TSI 阳性患者血清的 TBI 测定法

[0156] 将甲状腺刺激单克隆抗体 M22 或 TSI 阳性血清连续稀释,并且使用本发明的 TBI 测定法使用 CHO-MC4 细胞进行测试。结果在图 6 中。图 6 显示两个稀释曲线都证实本发明的 TBI 测定法可以检测甲状腺刺激免疫球蛋白(TSI)。

[0157] B. 在使用 171 个 TSI 阳性血清样品的 TSI 和 TBI 测定法之间的关联

[0158] 在这个实验中,制备 171 份 TSI 阳性血清,并且同时在 TSI 或 TBI 测定法上进行测试。结果显示于图 7 中。

[0159] 结果显示在 TSI 和 TBI 测定法之间的高相关( $R^2=0.9$ ), 指示 TBI 测定法可以用于检测 TSI 阳性血清。

[0160] 实施例 7

[0161] 本发明的双重生物测定法可以将抗 TSHR 自身抗体区分成刺激甲状腺的自身抗体和阻断甲状腺刺激的自身抗体

[0162] 在这个实验中, 将甲状腺刺激单克隆抗体 M22 和甲状腺封闭单克隆抗体 K1-70 以不同比例(例如 100:0、90:10、80:20 直到 0:100) 混合在一起, 并且在本发明的 TBI 测定法上使用 CHO-MC4 细胞进行测试。结果显示于图 8 中。

[0163] 图 8 显示当混合物中的 K1-70 的部分从 0 增至 100% (或 M22 从 100 到 0 百分比) 时, TBI% 抑制从阴性 100% 逐渐增至阳性 100%。它指示在 TBI 测定法中, 不仅能够检测甲状腺刺激自身抗体, 而且也显示作为阴性抑制结果的封闭抗体。

[0164] 实施例 8

[0165] 本发明的双重生物测定法用于检测 TBI 和 / 或 TSI 的灵敏度

[0166] 下述结果显示本发明的双重生物测定法用于检测血清样品中的 TBI 和 / 或 TSI(表 6) 和 / 或当使用单克隆抗体 M22 和 K1-70 时的灵敏度(表 5 和 7)。

[0167] 表 6. 使用不同比例的甲状腺刺激单克隆抗体 M22 和甲状腺封闭单克隆抗体 K1-70 的 TBI 测定法

[0168]

	*仅 M22										**仅 K1-70
M22:K1-70	100%	90:10	80:20	70:30	60:40	50:50	40:60	30:70	20:80	10:90	100%
RLU	21151	20364	19557	17624	16713	14649	12252	8651	6467	3999	2415
%抑制	-106%	-98%	-89%	-68%	-59%	-37%	-11%	27%	51%	77%	94%

[0169] \*0.8ng/ml M22\*\*5ng/ml K1-70

[0170] 表 7. 使用 TSI 阳性血清样品在 TBI 和 TSI 之间的比较

[0171]

	TSI 阳性血清样品											
稀释度	11	16	22	32	44	64	88	128	176	256	352	512
RLU	14712	13775	13213	12720	12076	10989	10356	10098	9571	9502	8999	9288
%抑制	-66%	-54%	-47%	-41%	-33%	-19%	-11%	-8%	-1%	-1%	6%	2%
SRR%	261%	235%	209%	163%	123%	92%	78%	66%	61%	52%	51%	49%

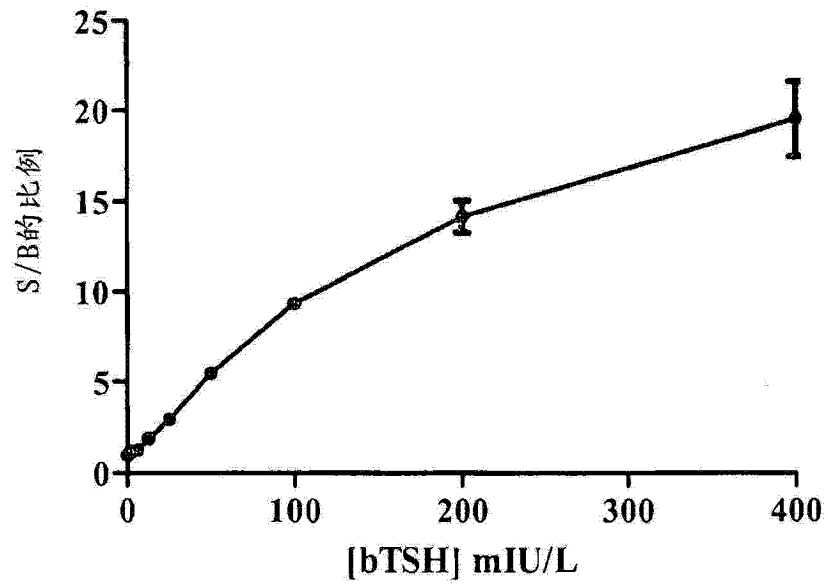
[0172] 表 8. 使用甲状腺刺激单克隆抗体 M22 在 TBI 和 TSI 之间的比较

[0173]

	M22 刺激抗体														
ng/ml	1.2	0.8	0.6	0.4	0.35	0.3	0.25	0.2	0.15	0.1	0.08	0.06	0.05	0.04	0.02
RLU	15702	14970	14415	14201	14135	14349	13142	13259	11715	11316	10891	10055	9690	9259	9066
%抑制	-83%	-73%	-66%	-64%	-63%	-65%	-50%	-52%	-32%	-27%	-21%	-11%	-6%	0%	2%
SRR% (TBI)	365%	368%	368%	332%	315%	302%	283%	270%	236%	180%	146%	122%	111%	95%	61%

[0174] 上文说明书中提及的所有出版物和专利都通过引用并入本文。本发明的所述方法和系统的多种修饰和改变对于本领域技术人员将是显而易见的,而不背离本发明的范围和精。尽管本发明已与特定优选实施方案结合进行描述,但应当理解如请求保护的本发明不应不适当地限制于此类特定实施方案。事实上,对于本领域技术人员显而易见的用于执行本发明的所述方式的多种修饰预期在下述权利要求的范围内。

A.



B.

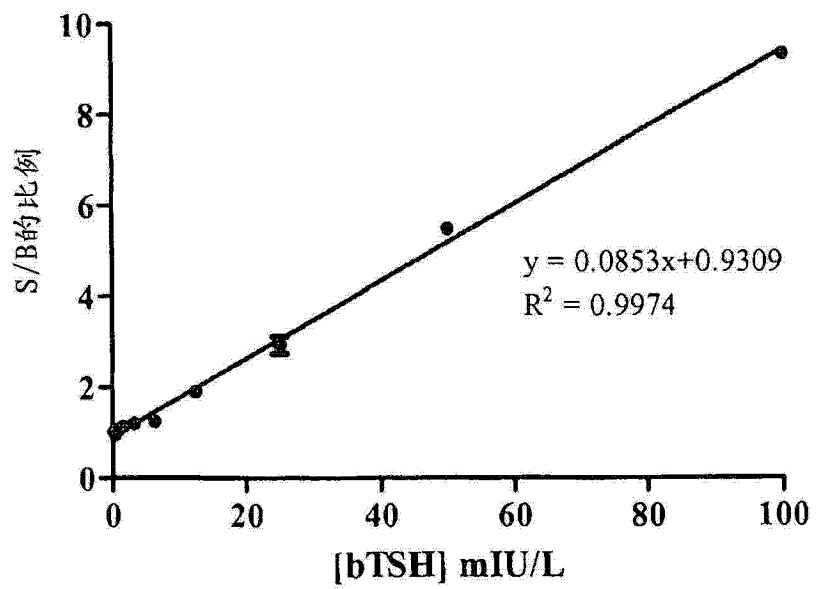


图 1

## A) 含有370个氨基酸残基的嵌合TSHR的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 01)

MRPADLLQLVLLLLDLPRDLGGMGCSPPCECHQEEDFRVTCKDIQRIPSLPP  
 STQTLKLIETHLRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQLESHSFYNLSKVT  
 HIEIRNTRNLTYIDPDALKELPLLKFLGIFNTGLKMFDPDLTKVYSTDIFFIL  
 EITDNPYMTSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQGYAFNGTKLDAVYLN  
 KNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLDVSQTSVTALPSKGLEHLKELIARNTWTL  
 KTLPSKEKFTSLLVATLTYPHCCAFSNLPKKEQNFSSIFENFSKQCESTV  
 RKADNETLYSAIFEENELSGWDELKNPQEETLQAFDSHYDYTCGDSEDMVC  
 TPKSDEFNPCEDIMGYKFLRIVVWFVSLALLGNVFLVLLILLTSHYKLNVR  
 FLMCNLAFADFCMGYLLLIASVDLYTHSEYYNHAIWQGTGPGCNTAGFFT  
 FASELSVYTLTVITLERWYAITFAMRLDRKIRLRHACAIVGGWVCCFLLAL  
 LPLVGISSYAKVSIKLPMDTETPLALAYIVFVLTNIVAFVIVCCCIVKIYI  
 TVRNPQYNPQDKDTIAKRMVLIIFTDFICMAPISFYALSAILNKPLITVSN  
 SKILLVLFYPLNSCANPFLYAIFTKAFQRDVFILLKFGICKRQAQAYRQR  
 VPPKNSTDIQVQKVTHDMRQGLHNMEDVYELIENSHLTPKKQGQISEEYMQT  
 VL

B) 含有2193个碱基的嵌合TSHR的DNA序列 (SEQ ID NO: 02),  
其包括终止密码子

ATGAGGCCGCGGACTTGCTGCAGCTGGTGCTGCTGCTCGACCTGCCCAGGG  
 ACCTGGGCGGAATGGGGTGTTCGTCTCCACCCTGCGAGTGCCATCAGGAGGA  
 GGACTTCAGAGTCACCTGCAAGGATATTCAACGCATCCCCAGCTTACCGCCC  
 AGTACGCAGACTCTGAAGCTTATTGAGACTCACCTGAGAACTATTCCAAGTC  
 ATGCATTTTCTAATCTGCCCAATATTTCCAGAATCTACGTATCTATAGATGT  
 GACTCTGCAGCAGCTGGAATCACACTCCTTCTACAATTTGAGTAAAGTGACT  
 CACATAGAAATTCGGAATACCAGGAACTTAACCTACATAGACCCTGATGCCC  
 TCAAAGAGCTCCCCCTCCTAAAGTTCCCTGGCATTTC AACACTGGACTTAA  
 AATGTTCCCTGACCTGACCAAAGTTTATTCCACTGATATATTCTTTATACTT  
 GAAATTACAGACAACCCTTACATGACGTCAATCCCTGTGAATGCTTTTCAGG  
 GACTATGCAATGAAACCTTGACACTGAAGCTGTACAACAATGGCTTTACTTC  
 AGTCCAAGGATATGCTTTCAATGGGACAAAGCTGGATGCTGTTTACCTAAAC  
 AAGAATAAATACCTGACAGTTATTGACAAAGATGCATTTGGAGGAGTATACA  
 GTGGACCAAGCTTGCTGGACGTGTCTCAAACCAGTGTCACTGCCCTTCCATC  
 CAAAGGCCTGGAGCACCTGAAGGAACTGATAGCAAGAAACACCTGGACTCTT  
 AAGACACTGCCCTCCAAAGAAAATTCACGAGCCTCCTGGTCGCCACGCTGA  
 CCTACCCCAGCCACTGCTGCGCCTTCAGTAATTTGCCGAAGAAAGAACAGAA  
 TTTTTCATTTTCCATTTTGTAAAACCTTCTCCAAACAATGCGAAAGCACAGTT  
 AGAAAAGCAGATAACGAGACGCTTTATTCGCCATCTTTGAGGAGAATGAAC  
 TCAGTGGCTGGGATGAGCTCAAAAACCCCCAGGAAGAGACTCTACAAGCTTT  
 TGACAGCCATTATGACTACACCATATGTGGGGACAGTGAA

图 2

GACATGGTGTGTACCCCAAGTCCGATGAGTTCAACCCGTGTGAAGACATAA  
 TGGGCTACAAGTTCCTGAGAATTGTGGTGTGGTTCCTTAGTCTGCTGGCTCT  
 CCTGGGCAATGTCTTTGTCTGCTTATTCTCCTCACCAGCCACTACAACTG  
 AACGTCCCCCGCTTTCTCATGTGCAACCTGGCCTTTGCGGATTTCTGCATGG  
 GGATGTACCTGCTCCTCATCGCCTCTGTAGACCTCTACACTCACTCTGAGTA  
 CTACAACCATGCCATCGACTGGCAGACAGGCCCTGGGTGCAACACGGCTGGT  
 TTCTTCACTGTCTTTGCAAGCGAGTTATCGGTGTATACGCTGACGGTCATCA  
 CCCTGGAGCGCTGGTATGCCATCACCTTCGCCATGCGCCTGGACCGGAAGAT  
 CCGCCTCAGGCACGCATGTGCCATCATGGTTGGGGGCTGGGTTTGCTGCTTC  
 CTTCTCGCCCTGCTTCCTTTGGTGGGAATAAGTAGCTATGCCAAAGTCAGTA  
 TCTGCCTGCCCATGGACACCGAGACCCCTCTTGCTCTGGCATATATTGTTTT  
 TGTTCTGACGCTCAACATAGTTGCCTTCGTCAICGTCTGCTGCTGTTATGTG  
 AAGATCTACATCACAGTCCGAAATCCGCAGTACAACCCAGGGGACAAAGATA  
 CCAAATTECCAAGAGGATGGCTGTGTTGATCTTCACCGACTTCATATGCAT  
 GGCCCAATCTCATTCTATGCTCTGTCAGCAATTCTGAACAAGCCTCTCATC  
 ACTGTTAGCAACTCCAAAATCTTGCTGGTACTCTTCTATCCACTTAACTCCT  
 GTGCCAATCCAATTCCTCTATGCTATTTTCACCAAGGCCTTCCAGAGGGATGT  
 GTTCATCCTACTCAGCAAGTTTGGCATCTGTAAACGCCAGGCTCAGGCATAC  
 CGGGGGACAGAGGGTTCCCTCCAAAGAACAGCACTGATATTCAGGTTCAAAGG  
 TTACCCACGACATGAGGCAGGGTCTCCACAACATGGAAGATGTCTATGAACT  
 GATTGAAAACCTCCCATCTAACCCCAAAGAAGCAAGGCCAAATCTCAGAAGAG  
 TATATGCAAACGGTTTTGTAA

C) 含有550个氨基酸的海肾萤光素酶的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 03)

MEDAKNIKKGPAPFYPLEDGTAGEQLHKAMKRYALVPGTIAFTDAHIEVNIT  
 YAEYFEMSVRLAEAMKRYGLNTNHRIVVCSENSLQFFMPVLGALFIGVAVAP  
 ANDIYNERELNSMNI SQPTVVVFSKKG LQKILNVQKLP I IQKIIIMDSKT  
 DYQGFQSMYTFVTSHLPPGFNEYDFVPESFDRDKTIALIMNSSGSTGLPKGV  
 ALPHRTACVRFSHARDPIFGNQIIPDTAILS VVPEFHGFGMFTTLGYLICGF  
 RVVLMYRFEEELFLRSLQDYKIQSALLVPTLFSFFAKSTLIDKYDLSNLHEI  
 ASGGAPLSKEVGEAVAKRFHLPGIRQGYGLTETTSAILITPEGDDKPGAVGK  
 VVPFFEAKVVDLDTGKTLGVNQRGELCVRGPMIMSGYVNNPEATNALIDKDG  
 WLHSGDIAYWDEDEHFFIVDR LKSLIKYKGYQVAPAELESILLQHPNIFDAG  
 VAGLPDDDAGELPAAVVVLEHGKTMTEKEIVDYVASQVTTAKKLRGGVVVD  
 EVPKGLTGKLDARKIREILIKAKKGGKSKL

图 2

D) 含有1653个碱基的嵌合TSHR的DNA序列 (SEQ ID NO: 04),  
其包括终止密码子

```
ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCCATTCTATCCTCTAG
AGGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCT
GGTTCCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGAACATCACG
TACGCGGAATACTTCGAAATGTCCGTTCCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGAT
ATGGGCTGAATACAAATCACAGAATCGTCGTATGCAGTGAAAACCTCTCTTCA
ATTCTTTATGCCGGTGTGGGCGCGTTATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCC
GCGAACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGAACATTTGCG
AGCCTACCGTAGTGTGGTTTCCAAAAAGGGGTTGCAAAAAATTTTGAACGT
GCAAAAAAATTAACCAATAATCCAGAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACG
GATTACCAGGGATTTTCAGTCGATGTACACGTTTCGTCACATCTCATCTACCTC
CCGGTTTTAATGAATACGATTTTGTACCAGAGTCCTTTGATCGTGACAAAAC
AATTGCACTGATAATGAATTCCTCTGGATCTACTGGGTTACCTAAGGGTGTG
GCCCTTCCGCATAGAACTGCCTGCGTCAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCTA
TTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTTAAGTGTGTTCCATT
CCATCACGGTTTTTGAATGTTTACTTACACTCGGATATTTGATATGTGGATT
CGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTTTACGATCCCTTC
AGGATTACAAAATTCAAAGTTCGTTGCTAGTACCAACCCTATTTTCATTCTT
CGCCAAAAGCACTCTGATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATT
GCTTCTGGGGGCGCACCTCTTTCGAAAGAAGTCGGGGAAGCGGTTGCAAAAC
GCTTCCATCTTCCAGGGATACGACAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATC
AGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACGGGCGCGGTCGGTAAA
GTTGTTCCATTTTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGGAAAACGC
TGGGCGTTAATCAGAGAGGCGAATTATGTGTCAGAGGACCTATGATTATGTC
CGGTTATGTAAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGA
TGGCTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCA
TAGTTGACCGCTTGAAGTCTTTAATTAATAACAAAGGATATCAGGTGGCCCC
CGCTGAATTGGAATCGATATTGTTACAACACCCCAACATCTTCGACGCGGGC
GTGGCAGGTCTTCCCGACGATGACGCCGGTGAACCTCCCGCCCGCGTTGTTG
TTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAAAAGAGATCGTGGATTACGTCCG
CAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGGAGTTGTGTTTGTGGAC
GAAGTACCGAAAGGTCTTACCGAAAACCTCGACGCAAGAAAAATCAGAGAGA
TCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGTCCAAATTGTAA
```

图 2

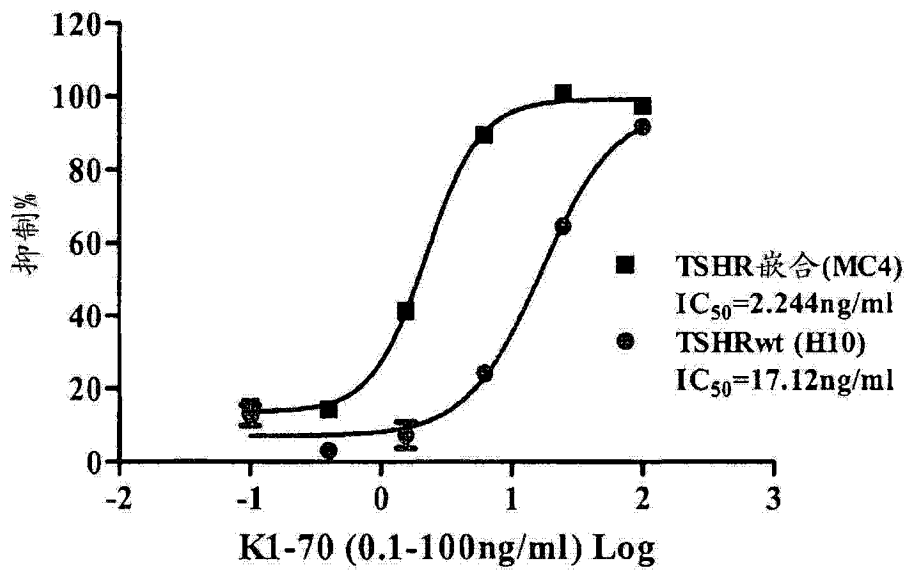


图 3

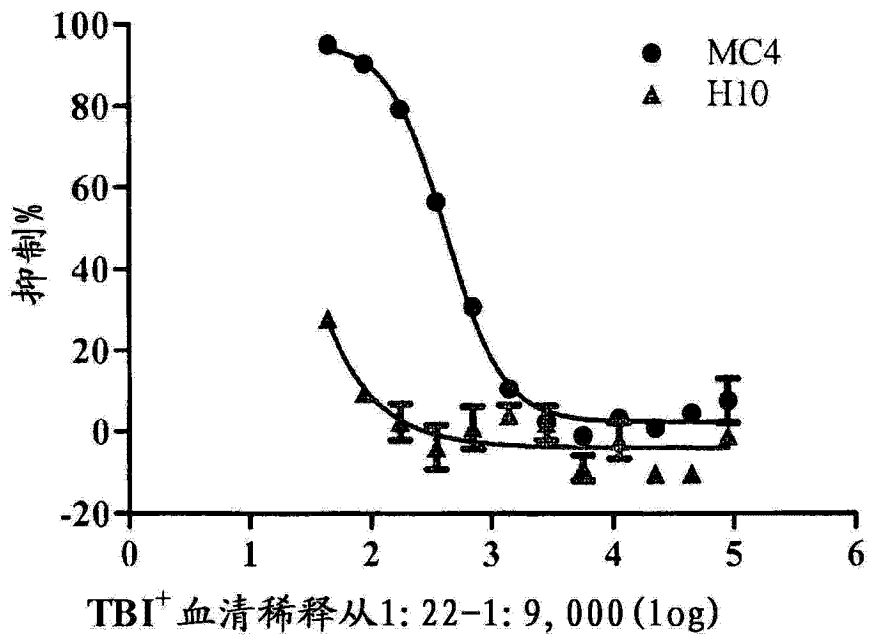


图 4

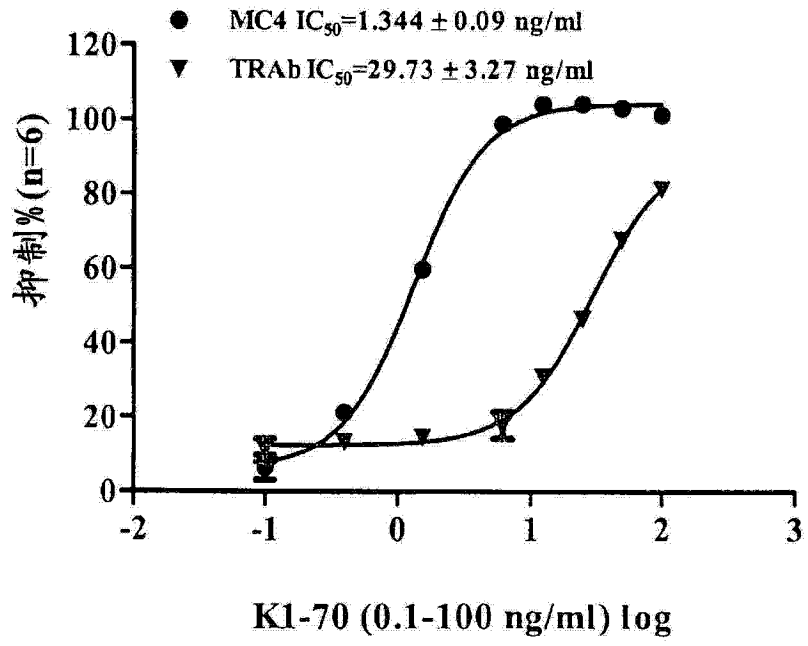
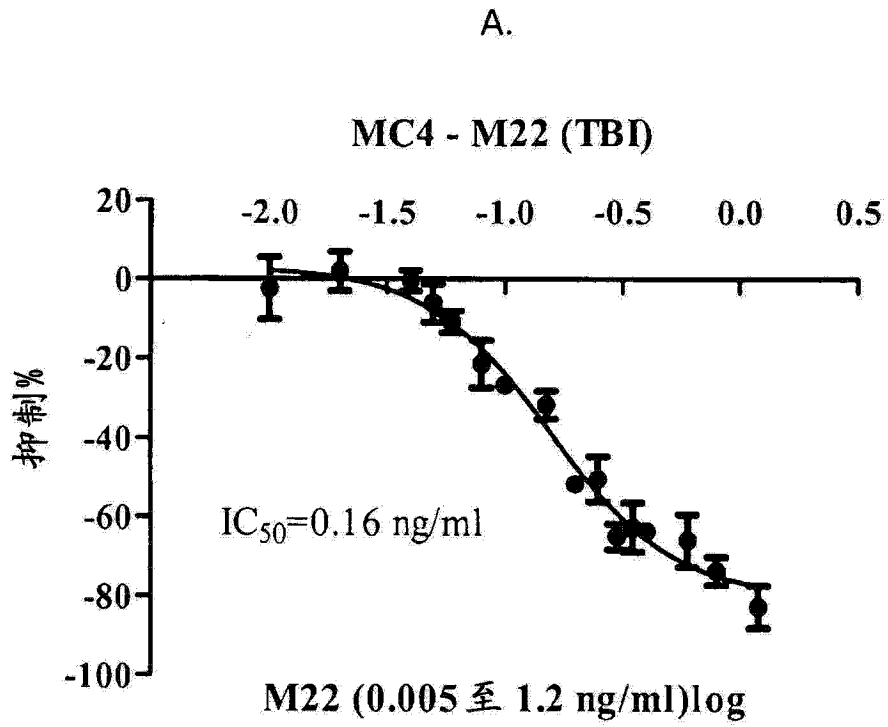


图 5



B.

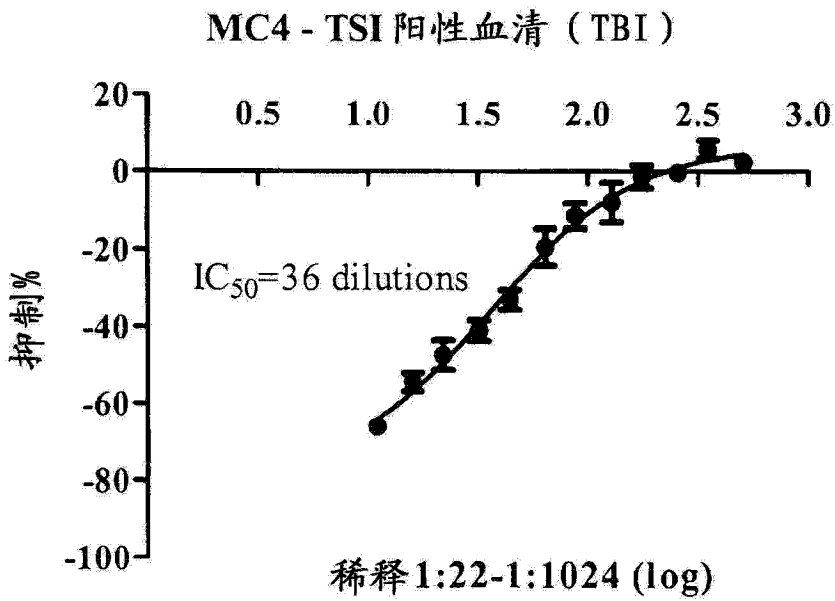


图 6

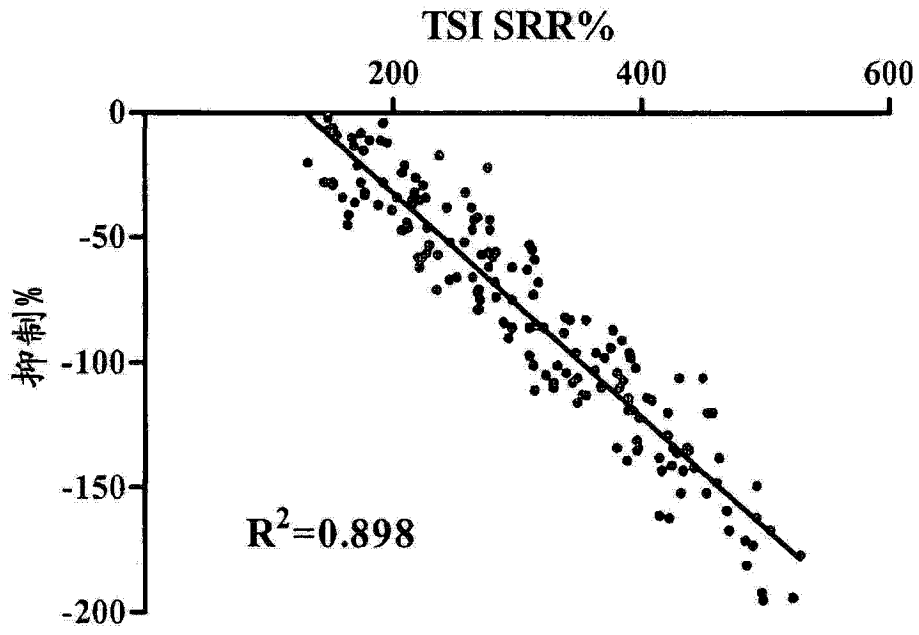


图 7

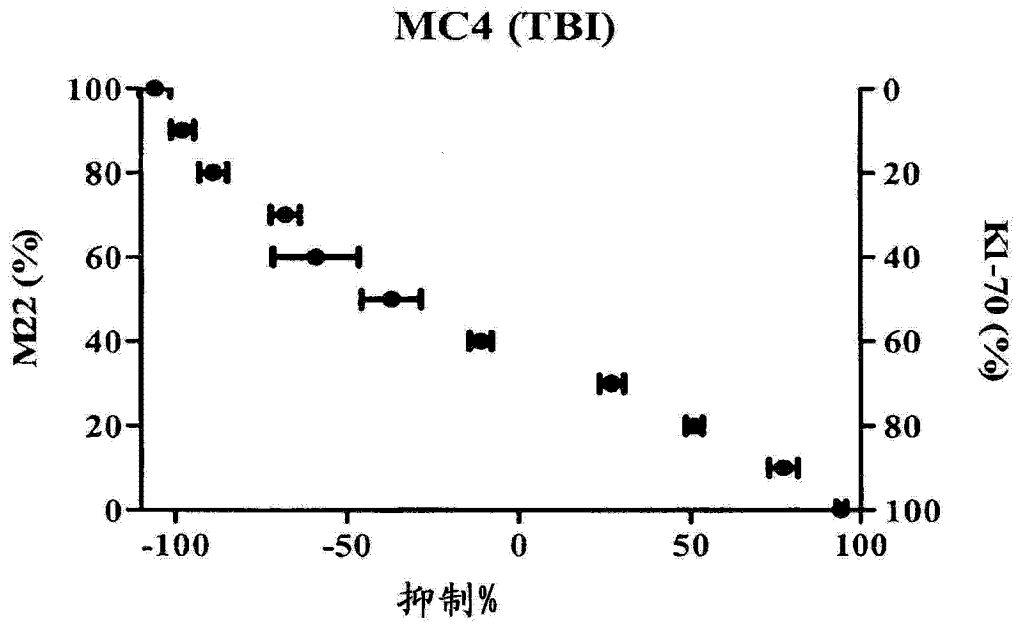


图 8

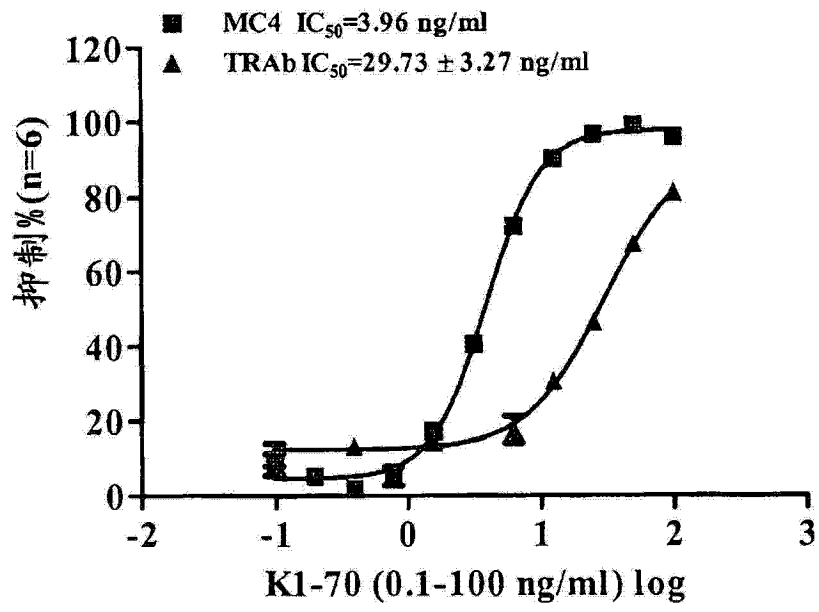


图 9

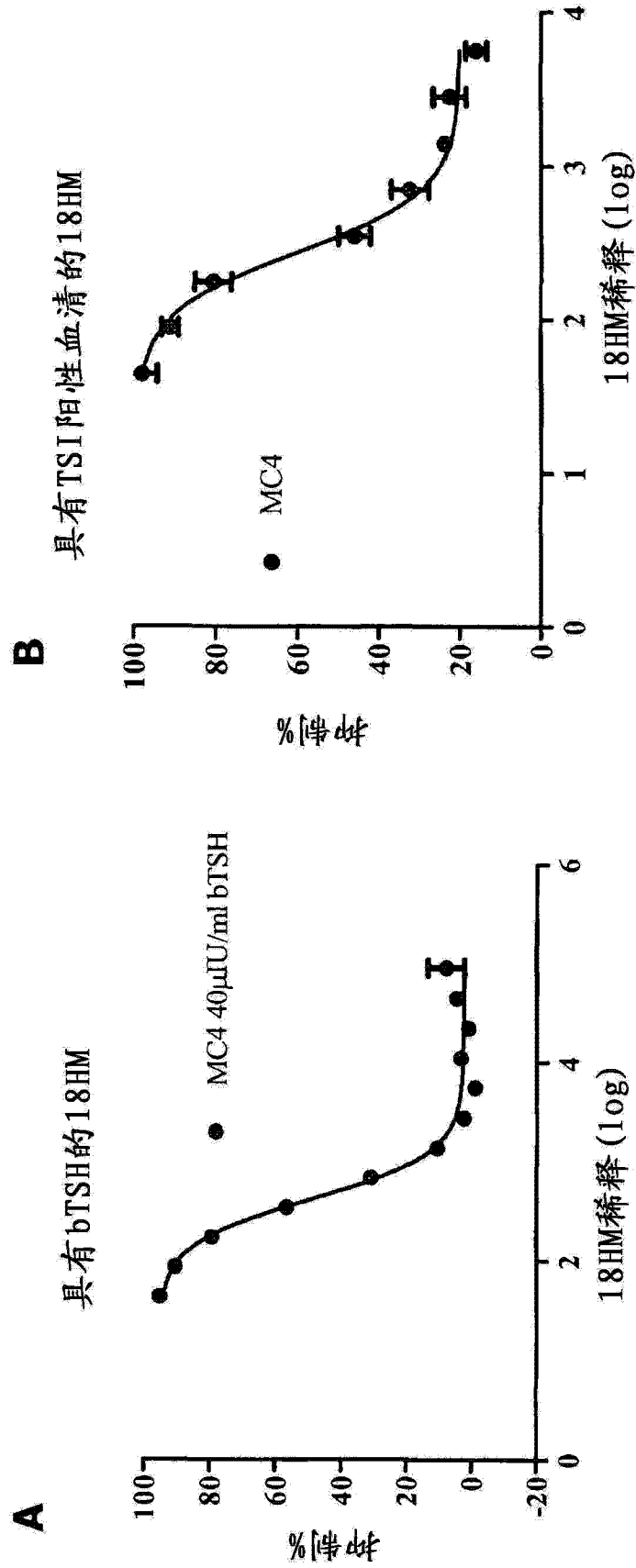


图 10

专利名称(译)	用于检测自身抗体的组合物和方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103975239A</a>	公开(公告)日	2014-08-06
申请号	CN201180074180.2	申请日	2011-09-09
[标]申请(专利权)人(译)	魁戴尔公司		
申请(专利权)人(译)	魁戴尔公司		
当前申请(专利权)人(译)	魁戴尔公司		
[标]发明人	Y李 PD奥里沃 J金		
发明人	Y·李 P·D·奥里沃 J·金		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/76 G01N33/566 G01N2333/726 G01N33/564 G01N2333/723 G01N2800/046		
代理人(译)	袁泉		
优先权	13/228705 2011-09-09 US		
其他公开文献	CN103975239B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了用于检测甲状腺激素封闭免疫球蛋白 ( TBI ) 的组合物和方法。本发明的方法对于TBI是灵敏和特异性的，并且可以用于TBI和TSI的双重检测。本发明的组合物和方法用于诊断与TBI和/或TSI的存在相关的疾病，用于监控疾病进展和/或治疗方案、治疗剂、疫苗等，并且用于帮助临床医生作出治疗决定。

