

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5908590号
(P5908590)

(45) 発行日 平成28年4月26日 (2016. 4. 26)

(24) 登録日 平成28年4月1日 (2016. 4. 1)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/02
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
G O 1 N 33/53 (2006. 01)	G O 1 N 33/53 N

請求項の数 20 (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願2014-529656 (P2014-529656)	(73) 特許権者	504195071
(86) (22) 出願日	平成23年9月9日 (2011. 9. 9)		クイデル コーポレーション
(65) 公表番号	特表2014-529993 (P2014-529993A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
(43) 公表日	平成26年11月17日 (2014. 11. 17)		21, サン ディエゴ, マクケラー
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/050976		コート 10165
(87) 国際公開番号	W02013/036239	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成25年3月14日 (2013. 3. 14)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	平成26年8月8日 (2014. 8. 8)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	13/228, 705		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成23年9月9日 (2011. 9. 9)	(74) 代理人	100181674
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		(74) 代理人	230113332
			弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自己抗体を検出するための組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試験サンプルにおける甲状腺ホルモン阻害免疫グロブリン (TBI) を検出するための方法であって、

a)

i) 1つ以上の発現ベクターにより安定してトランスフェクトされたトランスジェニック細胞であって、該発現ベクターは、

1) レポーターをコードする第1のヌクレオチド配列であって、該第1のヌクレオチド配列は、cAMP誘導性プロモーターに対して作動可能に連結されている、第1のヌクレオチド配列、および

2) キメラTSH受容体 (TSHR) をコードする第2のヌクレオチド配列であって、該第2のヌクレオチド配列は、配列番号2を含み、かつ、構成的プロモーターに対して作動可能に連結されている、第2のヌクレオチド配列

を含み、該細胞が、細胞膜上に該キメラTSHRを発現する、トランスジェニック細胞、

ii) 該TSHRに結合すると該キメラTSHRを刺激する甲状腺刺激ポリペプチドであって、該甲状腺刺激ポリペプチドは、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、甲状腺刺激モノクローナル抗体、および、甲状腺刺激ポリクローナル抗体からなる群より選択される、甲状腺刺激ポリペプチド、ならびに

iii) サンプルであって、該サンプルが、コントロールサンプル、または試験サンプルである、サンプル、

10

20

を組み合わせるステップであって、

該トランスジェニック細胞および該 T S H を、

A) 該コントロールサンプルと組み合わせると第 1 のサンプルが生成し、および

B) 該試験サンプルと組み合わせると第 2 のサンプルが生成し、そして、

該組み合わせるステップが、該キメラ T S H R に対する該 T S H の結合のための条件下にある、ステップ、ならびに

b) 該第 1 のサンプルおよび該第 2 のサンプルにおける該レポーターの発現のレベルを測定するステップであって、該第 1 のサンプルと比較して、該第 2 のサンプルにおいて、該レポーターの発現のレベルが低下していることが、該試験サンプルにおける T B I の存在を示す、ステップを含む方法。

10

【請求項 2】

T B I を検出する前記方法が、前記キメラ T S H R を発現する前記トランスジェニック細胞を、野生型 T S H R を発現する細胞で置換するステップを含む前記方法において T B I を検出する場合の T B I I C ₅₀ の 5 ~ 15 分の 1 の T B I I C ₅₀ を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

T B I を検出する前記方法が、抗 T B I モノクローナル抗体との T B I の特異的な結合を検出するステップを含む方法において T B I を検出する場合の T B I I C ₅₀ の 10 ~ 30 分の 1 の T B I I C ₅₀ を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記方法が、前記第 1 のサンプルと比較して、前記第 2 のサンプルにおいて、前記レポーターの発現のレベルが低下していることを検出するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記方法が、

a) 前記試験サンプルと組み合わせた後の前記レポーターの発現のレベルを、
b) それぞれが既知濃度の T S H を含有する 1 つ以上の標準サンプルと前記トランスジェニック細胞を組み合わせた後の該レポーターの発現のレベルと比較することによって、該試験サンプルにおける T B I のレベルを決定するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 6】

前記方法が、T B I 特異的である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記 T S H が、100 mIU / ml 未満の濃度を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記レポーターの前記発現が、生物発光タンパク質の発現を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記生物発光タンパク質が、レニラルシフェラーゼアミノ酸配列の配列番号 03 を含む、請求項 8 に記載の方法。

40

【請求項 10】

前記トランスジェニック細胞が、CHO 細胞を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 T S H が、甲状腺刺激モノクローナル抗体で置き換えられる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 T S H が、甲状腺刺激ポリクローナル抗体で置き換えられる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

サンプルにおける甲状腺ホルモン阻害免疫グロブリン (T B I) および甲状腺ホルモン刺

50

激免疫グロブリン (T S I) を検出するための方法であって、

a)

i) 1 つ以上の発現ベクターにより安定してトランスフェクトされたトランスジェニック細胞であって、該発現ベクターは、

1) レポーターをコードする第 1 のヌクレオチド配列であって、該第 1 のヌクレオチド配列は、c A M P 誘導性プロモーターに対して作動可能に連結されている、第 1 のヌクレオチド配列、および

2) キメラ T S H 受容体 (T S H R) をコードする第 2 のヌクレオチド配列であって、該第 2 のヌクレオチド配列は、配列番号 2 を含み、かつ、構成的プロモーターに対して作動可能に連結されている、第 2 のヌクレオチド配列

を含み、該細胞が、細胞膜上にキメラ T S H R を発現する、トランスジェニック細胞、

i i) 甲状腺刺激ホルモン (T S H) 、

i i i) コントロールサンプル、または試験サンプル、を組み合わせるステップであって、

該トランスジェニック細胞および該 T S H を、

A) 該コントロールサンプルと組み合わせると第 1 のサンプルが生成し、および

B) 該試験サンプルと組み合わせると第 2 のサンプルが生成し、そして、

該組み合わせるステップが、該キメラ T S H R に対する該 T S H の結合のための条件下にある、ステップ、ならびに

b) 該組み合わせる前および該組み合わせた後の、該トランスジェニック細胞における該レポーターの発現のレベルを測定するステップであって、

i) 該第 1 のサンプルと比較して、該第 2 のサンプルにおいて、該レポーターの発現のレベルが低下していることが、該試験サンプルにおける T B I の存在を示し、

i i) 該第 1 のサンプルと比較して、該第 2 のサンプルにおいて、該レポーターの発現のレベルが上昇していることが、該試験サンプルにおける T S I の存在を示す、ステップを含む方法。

【請求項 1 4】

前記方法が、前記第 1 のサンプルと比較して、前記第 2 のサンプルにおいて、前記レポーターの発現のレベルが低下していることを検出するステップをさらに含む、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記トランスジェニック細胞が、C H O 細胞を含む、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 6】

キットであって、

a) 1 つ以上の発現ベクターにより安定してトランスフェクトされたトランスジェニック細胞であって、該発現ベクターは、

i) c A M P 誘導性プロモーターに対して作動可能に連結されたレポーター遺伝子および

i i) 配列番号 2 を含み、かつ、構成的プロモーターに対して作動可能に連結されたキメラ T S H 受容体 (T S H R) 遺伝子

を含み、該細胞が、細胞膜上にキメラ T S H R を発現する、トランスジェニック細胞、ならびに

b) 甲状腺ホルモン阻害免疫グロブリン (T B I) を検出するために該トランスジェニック細胞を使用するための説明書であって、該説明書が、

A)

i) 1 つ以上の発現ベクターにより安定してトランスフェクトされたトランスジェニック細胞であって、該発現ベクターは、

1) レポーターをコードする第 1 のヌクレオチド配列であって、該第 1 のヌクレオチド配列は、c A M P 誘導性プロモーターに対して作動可能に連結されている、第 1 のヌクレオチド配列、および

10

20

30

40

50

2) キメラTSH受容体(TSHR)をコードする第2のヌクレオチド配列であって、該第2のヌクレオチド配列は、配列番号2を含み、かつ、構成的プロモーターに対して作動可能に連結されている、第2のヌクレオチド配列

を含み、該細胞が、細胞膜上に該キメラTSHRを発現する、トランスジェニック細胞、

i i) 該TSHRに結合すると該キメラTSHRを刺激する甲状腺刺激ポリペプチドであって、該甲状腺刺激ポリペプチドは、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、甲状腺刺激モノクローナル抗体、および、甲状腺刺激ポリクローナル抗体からなる群より選択される、甲状腺刺激ポリペプチド、ならびに

i i i) サンプルであって、該サンプルが、コントロールサンプル、または試験サンプルである、サンプル、

を組み合わせることであって、

該トランスジェニック細胞および該TSHを、

a) 該コントロールサンプルと組み合わせると第1のサンプルが生成し、および

b) 該試験サンプルと組み合わせると第2のサンプルが生成し、そして、

該組み合わせることが、該キメラTSHRに対する該TSHの結合のための条件下にある、こと、ならびに

B) 該第1のサンプルおよび該第2のサンプルにおける該レポーターの発現のレベルを測定することであって、該第1のサンプルと比較して、該第2のサンプルにおいて、該レポーターの発現のレベルが低下していることが、該試験サンプルにおけるTBIの存在を示す、こと

のための指示を含む、説明書

を備えるキット。

【請求項17】

前記キットが、甲状腺ホルモン阻害免疫グロブリン(TBI)を含有するポジティブコントロールサンプルをさらに含む、請求項16に記載のキット。

【請求項18】

前記キットが、甲状腺刺激ホルモン(TSH)をさらに含む、請求項16に記載のキット。

【請求項19】

前記キットが、サンプルにおける甲状腺ホルモン刺激免疫グロブリン(TSI)を検出するための説明書をさらに含む、請求項16に記載のキット。

【請求項20】

前記キットが、甲状腺ホルモン刺激免疫グロブリン(TSI)を含有するポジティブコントロールサンプルをさらに含む、請求項19に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、甲状腺ホルモン阻害免疫グロブリン(thyroid hormone blocking immunoglobulin)(TBI)を検出するための組成物および方法を提供する。本発明の方法は、TBIに対して高感度であり、かつ特異的であり、TBIおよび甲状腺刺激免疫グロブリン(TSI)の両方の二重検出に使用されてもよい。本発明の組成物および方法は、TBIおよび/またはTSIの存在と関連する疾患の診断に、疾患および/または処置レジメン、治療薬、ワクチンなどの進行をモニターするのに、ならびに臨床医が処置決定を下すのを支援するのに有用である。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

かなりの数の人口が、グレーブス病、橋本甲状腺炎、甲状腺機能亢進症、甲状腺機能低下症(新生児甲状腺機能低下症を含む)、非甲状腺腫性甲状腺機能低下症、甲状腺機能正

10

20

30

40

50

常または甲状腺機能低下自己免疫性甲状腺炎、原発性粘液水腫、および特発性粘液水腫を含む甲状腺疾患に罹患している。これらの疾患は、甲状腺上に存在する受容体を認識し、かつそれらに結合する自己抗体（甲状腺障害免疫グロブリン（TBI）および/または甲状腺刺激免疫グロブリン（TSI））の作用を伴い、甲状腺ホルモンの産生における望ましくない変化をもたらす。

【0003】

診断技術は、これらの疾患のうちのいくつかに利用可能であるが、これらの技術は、それにもかかわらず、扱いにくく、骨が折れ、十分な感度および/または特異度を欠く。

【0004】

したがって、高感度でありかつ特異的であるならびにTBIおよびTSIの両方の二重検出に使用されてもよい、甲状腺ホルモン障害免疫グロブリン（TBI）および/または甲状腺刺激免疫グロブリン（TSI）を検出するための組成物および方法についての必要性が残っている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

発明の概要

本発明は、試験サンプルにおける甲状腺ホルモン障害免疫グロブリン（TBI）を検出するための方法であって、a) i) 1つ以上の発現ベクターにより安定してトランスフェクトされたトランスジェニック細胞であって、該発現ベクターは、1) cAMP誘導性プロモーターに対して作動可能に連結されたレポーター遺伝子および2) 構成的プロモーターに対して作動可能に連結されたキメラTSH受容体（TSHR）遺伝子を含み、であって、該細胞が、細胞膜上にキメラTSHRを発現する、トランスジェニック細胞、ii) 甲状腺刺激ホルモン（TSH）、iii) コントロールサンプル、ならびにiv) 試験サンプル、を提供するステップ、b) トランスジェニック細胞およびTSHを、i) 該コントロールサンプルと接触させて第1のサンプルを生成し、およびii) 該第2のサンプルをもたらす試験サンプルと接触させて第2のサンプルを生成するステップであって、該接触が、該キメラTSHRに対する該TSHの結合のための条件下にある、ステップ、ならびにc) 該第1のサンプルおよび該第2のサンプルにおける該レポーター遺伝子の発現のレベルを測定するステップであって、該第1のサンプルと比較して、該第2のサンプルにおいて、該レポーター遺伝子の発現のレベルが低下していることが、該試験サンプルにおけるTBIの存在を示す、ステップを含む方法を提供する。一実施形態において、TBIを検出する方法が、キメラTSHRを発現するトランスジェニック細胞を野生型TSHRを発現する細胞で置換するステップを含む方法においてTBIを検出する場合のTBI IC₅₀の5～15分の一のTBI IC₅₀を有する。他の実施形態において、TBIを検出する方法が、抗TBIモノクローナル抗体とTBIの特異的な結合を検出するステップを含む方法においてTBIを検出する場合のTBI IC₅₀の10～30分の一のTBI IC₅₀を有する。さらなる実施形態において、方法が、第1のサンプルと比較して、第2のサンプルにおいて、レポーター遺伝子の発現のレベルが低下していることを検出するステップをさらに含む。さらに他の実施形態において、方法が、a) 試験サンプルと接触させた後のレポーター遺伝子の発現のレベルを、b) それぞれが既知濃度のTSHを含有する1つ以上の標準サンプルとトランスジェニック細胞を接触させた後のレポーター遺伝子の発現のレベルと比較することによって、試験サンプルにおけるTBIのレベルを決定するステップをさらに含む。さらなる実施形態において、方法が、TBI特異的である。他の実施形態において、TSHが、100 mIU/ml未満の濃度を有する。代替の実施形態において、レポーター遺伝子の発現が、生物発光タンパク質の発現を含む。さらなる実施形態において、生物発光タンパク質が、レニラルシフェラーゼアミノ酸配列の配列番号03を含む。他の実施形態において、トランスジェニック細胞が、CHO-MC4細胞およびRD-MC4細胞から選択される細胞を含む。いくつかの実施形態において、TSHが、甲状腺刺激モノクローナル抗体および/または甲状腺刺激ポリクローナル

10

20

30

40

50

抗体で置き換えられる。

【0006】

本発明は、試験サンプルにおける甲状腺ホルモン阻害免疫グロブリン (TBI) および甲状腺ホルモン刺激免疫グロブリン (thyroid hormone stimulating immunoglobulin) (TSI) を検出するための方法であって、
 a) i) 1つ以上の発現ベクターにより安定してトランスフェクトされたトランスジェニック細胞であって、該発現ベクターが、1) cAMP誘導性プロモーターに対して作動可能に連結されたレポーター遺伝子および2) 構成的プロモーターに対して作動可能に連結されたキメラTSH受容体 (TSHR) 遺伝子を含み、該細胞が、細胞膜上にキメラTSHRを発現する、トランスジェニック細胞、ii) 甲状腺刺激ホルモン (TSH)、ii) コントロールサンプル、ならびにiv) 試験サンプル、を提供するステップ、b) 該トランスジェニック細胞および該TSHを、i) 該コントロールサンプルと接触させて、第1のサンプルを生成し、およびii) 該試験サンプルと接触させて、第2のサンプルを生成するステップであって、該接触が、該キメラTSHRに対する該TSHの結合のための条件下にある、ステップ、ならびにc) 該接触前および該接触後の、該トランスジェニック細胞における該レポーター遺伝子の発現のレベルを測定するステップであって、i) 該第1のサンプルと比較して、該第2のサンプルにおいて、該レポーター遺伝子の発現のレベルが低下していることが、該試験サンプルにおけるTBIの存在を示し、ii) 該第1のサンプルと比較して、該第2のサンプルにおいて、該レポーター遺伝子の発現のレベルが上昇していることが、該試験サンプルにおけるTSIの存在を示す、ステップを含む方法をさらに提供する。一実施形態において、前記方法が、第1のサンプルと比較して、第2のサンプルにおいて、レポーター遺伝子の発現のレベルが低下していることを検出するステップをさらに含む。特定の実施形態において、トランスジェニック細胞が、CHO-MC4細胞およびRD-MC4細胞から選択される細胞を含む。

【0007】

キットであって、a) 1つ以上の発現ベクターにより安定してトランスフェクトされたトランスジェニック細胞であって、該発現ベクターは、i) cAMP誘導性プロモーターに対して作動可能に連結されたレポーター遺伝子およびii) 構成的プロモーターに対して作動可能に連結されたキメラTSH受容体 (TSHR) 遺伝子を含み、該細胞が、細胞膜上にキメラTSHRを発現する、トランスジェニック細胞、ならびにb) 甲状腺ホルモン阻害免疫グロブリン (TBI) を検出するために該トランスジェニック細胞を使用するための説明書を備えるキットもまた、本明細書において提供される。一実施形態において、キットが、甲状腺ホルモン阻害免疫グロブリン (TBI) を含有するポジティブコントロールサンプルをさらに含む。他の実施形態において、キットが、甲状腺刺激ホルモン (TSH) をさらに含む。さらなる実施形態において、キットが、試験サンプルにおける甲状腺ホルモン刺激免疫グロブリン (TSI) を検出するための説明書をさらに含む。他の実施形態において、キットが、甲状腺ホルモン刺激免疫グロブリン (TSI) を含有するポジティブコントロールサンプルをさらに含む。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

試験サンプルにおける甲状腺ホルモン阻害免疫グロブリン (TBI) を検出するための方法であって、

a)

i) 1つ以上の発現ベクターにより安定してトランスフェクトされたトランスジェニック細胞であって、該発現ベクターは、

1) cAMP誘導性プロモーターに対して作動可能に連結されたレポーター遺伝子、および

2) 構成的プロモーターに対して作動可能に連結されたキメラTSH受容体 (TSHR) 遺伝子

を含み、該細胞が、細胞膜上にキメラTSHRを発現する、トランスジェニック細胞、

10

20

30

40

50

- i i) 甲状腺刺激ホルモン (T S H)、
i i i) コントロールサンプル、ならびに
i v) 試験サンプル、
を提供するステップ、
b) 前記トランスジェニック細胞および前記 T S H を、
i) 該コントロールサンプルと接触させて第 1 のサンプルを生成し、および
i i) 該試験サンプルと接触させて第 2 のサンプルを生成するステップであって、
該接触が、該キメラ T S H R に対する該 T S H の結合のための条件下にある、ステップ、
ならびに
c) 該第 1 のサンプルおよび該第 2 のサンプルにおける該レポーター遺伝子の発現のレベ 10
ルを測定するステップであって、該第 1 のサンプルと比較して、該第 2 のサンプルにおい
て、該レポーター遺伝子の発現のレベルが低下していることが、該試験サンプルにおける
T B I の存在を示す、ステップを含む方法。
- (項目 2)
T B I を検出する前記方法が、前記キメラ T S H R を発現する前記トランスジェニック細
胞を、野生型 T S H R を発現する細胞で置換するステップを含む前記方法において T B I
を検出する場合の T B I I C ₅₀ の 5 ~ 15 分の一の該 T B I I C ₅₀ を有する、項
目 1 に記載の方法。
- (項目 3)
T B I を検出する前記方法が、抗 T B I モノクローナル抗体との T B I の特異的な結合を 20
検出するステップを含む方法において T B I を検出する場合の T B I I C ₅₀ の 10 ~
30 分の一の T B I I C ₅₀ を有する、項目 1 に記載の方法。
- (項目 4)
前記方法が、前記第 1 のサンプルと比較して、前記第 2 のサンプルにおいて、前記レポ
ーター遺伝子の発現のレベルが低下していることを検出するステップをさらに含む、項目 1
に記載の方法。
- (項目 5)
前記方法が、
a) 前記試験サンプルとの前記接触の後の前記レポーター遺伝子の発現のレベルを、
b) それぞれが既知濃度の T S H を含有する 1 つ以上の標準サンプルと前記トランスジェ 30
ニック細胞を接触させた後の該レポーター遺伝子の発現のレベルと
比較することによって、該試験サンプルにおける T B I のレベルを決定するステップをさ
らに含む、項目 1 に記載の方法。
- (項目 6)
前記方法が、T B I 特異的である、項目 1 に記載の方法。
- (項目 7)
前記 T S H が、100 m I U / m l 未満の濃度を有する、項目 1 に記載の方法。
- (項目 8)
前記レポーター遺伝子の前記発現が、生物発光タンパク質の発現を含む、項目 1 に記載の 40
方法。
- (項目 9)
前記生物発光タンパク質が、レニラルシフェラーゼアミノ酸配列の配列番号 03 を含む、
項目 8 に記載の方法。
- (項目 10)
前記トランスジェニック細胞が、C H O - M C 4 細胞および R D - M C 4 細胞からなる群
から選択される細胞を含む、項目 1 に記載の方法。
- (項目 11)
前記 T S H が、甲状腺刺激モノクローナル抗体で置き換えられる、項目 1 に記載の方法。
- (項目 12)
前記 T S H が、甲状腺刺激ポリクローナル抗体で置き換えられる、項目 1 に記載の方法。 50

(項目 1 3)

試験サンプルにおける甲状腺ホルモン阻害免疫グロブリン (T B I) および甲状腺ホルモン刺激免疫グロブリン (T S I) を検出するための方法であって、

a)

i) 1 つ以上の発現ベクターにより安定してトランスフェクトされたトランスジェニック細胞であって、該発現ベクターは、

1) c A M P 誘導性プロモーターに対して作動可能に連結されたレポーター遺伝子および

2) 構成的プロモーターに対して作動可能に連結されたキメラ T S H 受容体 (T S H R) 遺伝子を含み、該細胞が、細胞膜上にキメラ T S H R を発現する、トランスジェニック細胞、

i i) 甲状腺刺激ホルモン (T S H) 、

i i i) コントロールサンプル、ならびに

i v) 試験サンプル、

を提供するステップ、

b) 該トランスジェニック細胞および該 T S H を、

i) 該コントロールサンプルと接触させて、第 1 のサンプルを生成し、および

i i) 該試験サンプルと接触させて、第 2 のサンプルを生成するステップであって、該接触が、該キメラ T S H R に対する該 T S H の結合のための条件下にある、ステップ、ならびに

c) 該接触前および該接触後の、該トランスジェニック細胞における該レポーター遺伝子の発現のレベルを測定するステップであって、

i) 該第 1 のサンプルと比較して、該第 2 のサンプルにおいて、該レポーター遺伝子の発現のレベルが低下していることが、該試験サンプルにおける T B I の存在を示し、

i i) 該第 1 のサンプルと比較して、該第 2 のサンプルにおいて、該レポーター遺伝子の発現のレベルが上昇していることが、該試験サンプルにおける T S I の存在を示す、ステップを含む方法。

(項目 1 4)

前記方法が、前記第 1 のサンプルと比較して、前記第 2 のサンプルにおいて、前記レポーター遺伝子の発現のレベルが低下していることを検出するステップをさらに含む、項目 1 3 に記載の方法。

(項目 1 5)

前記トランスジェニック細胞が、C H O - M C 4 細胞および R D - M C 4 細胞からなる群から選択される細胞を含む、項目 1 3 に記載の方法。

(項目 1 6)

キットであって、

a) 1 つ以上の発現ベクターにより安定してトランスフェクトされたトランスジェニック細胞であって、該発現ベクターは、

i) c A M P 誘導性プロモーターに対して作動可能に連結されたレポーター遺伝子および

i i) 構成的プロモーターに対して作動可能に連結されたキメラ T S H 受容体 (T S H R) 遺伝子を含み、該細胞が、細胞膜上にキメラ T S H R を発現する、トランスジェニック細胞、ならびに

b) 甲状腺ホルモン阻害免疫グロブリン (T B I) を検出するために該トランスジェニック細胞を使用するための説明書を備えるキット。

(項目 1 7)

前記キットが、甲状腺ホルモン阻害免疫グロブリン (T B I) を含有するポジティブコントロールサンプルをさらに含む、項目 1 6 に記載のキット。

(項目 1 8)

10

20

30

40

50

前記キットが、甲状腺刺激ホルモン（TSH）をさらに含む、項目16に記載のキット。
（項目19）

前記キットが、試験サンプルにおける甲状腺ホルモン刺激免疫グロブリン（TSI）を検出するための説明書をさらに含む、項目16に記載のキット。

（項目20）

前記キットが、甲状腺ホルモン刺激免疫グロブリン（TSI）を含有するポジティブコントロールサンプルをさらに含む、項目19に記載のキット。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】図1は、CHO-MC4細胞を使用する、bTSH用量応答曲線を示す。

10

【図2-1】図2は、（A）730アミノ酸残基を含有するキメラTSHRのアミノ酸配列（配列番号01）、（B）終止コドンを含む、2193塩基を含有するキメラTSHRのDNA配列（配列番号02）、（C）550アミノ酸を含有するレニラルシフェラーゼのアミノ酸配列（配列番号03）、および（D）終止コドンを含む、1653塩基を含有するキメラTSHRのDNA配列（配列番号04）を示す。

【図2-2】図2は、（A）730アミノ酸残基を含有するキメラTSHRのアミノ酸配列（配列番号01）、（B）終止コドンを含む、2193塩基を含有するキメラTSHRのDNA配列（配列番号02）、（C）550アミノ酸を含有するレニラルシフェラーゼのアミノ酸配列（配列番号03）、および（D）終止コドンを含む、1653塩基を含有するキメラTSHRのDNA配列（配列番号04）を示す。

20

【図2-3】図2は、（A）730アミノ酸残基を含有するキメラTSHRのアミノ酸配列（配列番号01）、（B）終止コドンを含む、2193塩基を含有するキメラTSHRのDNA配列（配列番号02）、（C）550アミノ酸を含有するレニラルシフェラーゼのアミノ酸配列（配列番号03）、および（D）終止コドンを含む、1653塩基を含有するキメラTSHRのDNA配列（配列番号04）を示す。

【図3】CHO-MC4およびTSHRwt細胞（H10）における、甲状腺障害モノクローナル抗体（MAb）K1-70による、甲状腺障害免疫グロブリン（TBI）アッセイの検出感度の比較。

【図4】MC4およびH10細胞における、障害抗体含有血清によるTBIアッセイの検出感度の比較。

30

【図5】甲状腺障害モノクローナル抗体K1-70用量応答曲線：TBIアッセイ対TRA bアッセイの比較。

【図6】段階希釈（A）甲状腺刺激モノクローナル抗体M22または（B）TSIポジティブ患者血清によるTBIアッセイ。

【図7】171 TSIポジティブ血清サンプルについてのTSIおよびTBIアッセイの間の相関。

【図8】様々な比の甲状腺刺激モノクローナル抗体M22および甲状腺障害モノクローナル抗体K1-70によるTBIアッセイ。

【図9】bTSHの代わりにM22モノクローナル抗体を使用して実行したTBIアッセイ。

40

【図10】サンプル18HM bTSH対TSIポジティブ血清の希釈液によるTBIアッセイ。血清サンプル18HM（TRA bポジティブおよびTSIネガティブ）は、正常血清中で1:44~1:90112まで希釈し、次いで、A.bTSH（40mIU/ml）と混合したまたはB.TSIポジティブ血清（4.54ml/ウェル）と混合した。

【発明を実施するための形態】

【0009】

定義

【0010】

本発明についての理解を容易にするために、多くの用語を下記に定義する。

【0011】

50

細胞に関して使用される場合の用語「トランスジェニック」は、トランスジーンを含有するまたはそのゲノムが「トランスジーン」の導入によって改変された細胞を指す。トランスジェニック細胞は、ヒト介入を介した、標的細胞の中への核酸（通常DNA）を含む「トランスジーン」の導入または標的細胞の染色体の中へのトランスジーンの統合を含む、いくつかの方法によって産生されてもよい。

【0012】

本明細書において使用される場合、用語「トランスジーン」は、実験的な操作によって細胞の中に導入される任意の核酸配列を指す。トランスジーンは、「内因性DNA配列」または「異種DNA配列」（つまり「外来性DNA」）であってもよい。用語「内因性DNA配列」は、それが、天然に存在する配列に比べていくつかの修飾（たとえば点突然変異、選択可能なマーカー遺伝子の存在など）を含有していない限り、それが導入される細胞において天然に見つけられるヌクレオチド配列を指す。用語「異種DNA配列」は、自然の中でライゲーションされていないまたは自然の中で異なる位置でライゲーションされている核酸配列にライゲーションされる、または操作されてライゲーションされるようになるヌクレオチド配列を指す。異種DNAは、それが導入される細胞に対して内因性ではないが、他の細胞から得られたものである。異種DNAはまた、いくつかの修飾を含有する内因性DNA配列を含む。一般に、必ずしもではないが、異種DNAは、それが発現される細胞によって通常産生されないRNAおよびタンパク質をコードする。異種DNAの例は、レポーター遺伝子、転写および翻訳調節配列、選択可能なマーカータンパク質（たとえば薬剤抵抗性を付与するタンパク質）などを含む。

【0013】

「キメラ」、「融合」、および「ハイブリッド」配列（たとえばアミノ酸配列および/またはヌクレオチド配列に関する場合）は、異なる起源由来の部分を含む配列を指す。一実施形態において、その部分が、同じ生物、同じ組織、同じ細胞、同じウイルスなどに由来する、異なるタンパク質および/またはゲノム配列であってもよい。一実施形態において、キメラタンパク質が、アミノ酸配列をコードする、作動可能に連結されたヌクレオチド配列の発現によって産生される組換えタンパク質である。たとえば、「キメラTSH受容体」、「キメラTSHR」、および「キメラMC4受容体」は、異なる生物由来のアミノ酸配列を含むTSHRを区別なく指す。一実施形態において、キメラTSHRが、以前に記載される（2008年8月7日に公開された米国特許出願公開第2008-0187942号明細書）ように、hTSHRのアミノ酸残基262~335が、ラット黄体形成ホルモン絨毛性ゴナドトロピン（LH/CG）受容体由来の、対応する73アミノ酸残基と置換されたヒトTSHR（hTSHR）タンパク質配列によって例証される。好ましい実施形態において、キメラMC4受容体が、DNA配列（配列番号02）（終止コドンを含む2193塩基対）によってコードされる、730アミノ酸配列の配列番号01（図2A）によって例証される。

【0014】

「MC-4」細胞は、キメラTSH受容体を発現する細胞を指す。たとえば、「CHO-MC4」細胞および「RD-MC4」細胞は、以前に記載される（2008年8月7日に公開された米国特許出願公開第2008-0187942号明細書）ように、それぞれ、キメラTSH受容体を発現するトランスジェニックチャイニーズハムスター卵巢細胞およびトランスジェニックヒト横紋筋肉腫細胞を指す。

【0015】

「レポーター配列」および「マーカー配列」は、酵素（たとえばELISAおよび酵素ベースの組織化学的アッセイ）、蛍光、ならびに発光系を含むが、これらに限定されない、任意の検出系において検出可能であるDNA、RNA、ならびに/またはポリペプチド配列を指すために区別なく使用される。例示的なレポーター遺伝子は、たとえばβ-グルクロニダーゼ遺伝子、緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子、大腸菌β-ガラクトシダーゼ（lacZ）遺伝子、ハロバクテリウムβ-ガラクトシダーゼ遺伝子、ニューロスポラ（Neurospora）チロシナーゼ遺伝子、ヒト胎盤アルカリホスファターゼ遺伝子

、およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子、エクオリン (クラゲ生物発光) 遺伝子、アメリカホタル、ホチナス ピラリス (*Photinus pyralis*) 由来のホタルルシフェラーゼ (EC 1.13.12.7)、ウミシイタケ、レニラ レニフォルミス由来のレニラルシフェラーゼ (EC 1.13.12.5)、ならびに *Photobacterium fischeri* 由来の細菌ルシフェラーゼ (EC 1.14.14.3) を含む。好ましい実施形態において、ルシフェラーゼ遺伝子が、レニラルシフェラーゼアミノ酸配列の配列番号 03 をコードする。

【0016】

「生物発光遺伝子」は、エクオリン (クラゲ) 生物発光遺伝子およびルシフェラーゼ遺伝子などのような、発光性の反応を触媒するタンパク質をコードするレポーター遺伝子を指す。

10

【0017】

「ルシフェラーゼ遺伝子」は、アメリカホタル、ホチナス ピラリス由来のホタルルシフェラーゼ (EC 1.13.12.7)、ウミシイタケ、レニラ レニフォルミス由来のレニラルシフェラーゼ (EC 1.13.12.5)、および *Photobacterium fischeri* 由来の細菌ルシフェラーゼ (EC 1.14.14.3) などのような、発光性の反応を触媒する、モノオキシゲナーゼ酵素をコードする遺伝子を指す。好ましい実施形態において、ルシフェラーゼ遺伝子が、レニラルシフェラーゼアミノ酸配列の配列番号 03 をコードする。

20

【0018】

本明細書において使用される場合、「プロモーター」、「プロモーターエレメント」、または「プロモーター配列」は、関心のあるヌクレオチド配列にライゲーションされた場合に、関心のあるヌクレオチド配列の mRNA への転写をコントロールすることができる DNA 配列を指す。プロモーターは、典型的に、必ずしもではないが、それが mRNA への転写をコントロールする関心のあるヌクレオチド配列の 5' (つまり、上流) に位置し、また、RNA ポリメラーゼおよび転写の開始のための他の転写因子による特異的な結合のための部位を提供する。

【0019】

「誘導性プロモーター」は、刺激の非存在下と比較して、刺激 (たとえば熱ショック、化学物質など) の存在下において、作動可能に連結された核酸配列のより高いレベルの転写を指示することができるプロモーターを指す。たとえば、「cAMP 誘導性プロモーター」は、cAMP の非存在下と比較して、cAMP の存在下において、作動可能に連結された核酸配列のより高いレベルの転写を指示することができるプロモーターを指す。例示的な cAMP 誘導性プロモーターは、PEPCK プロモーター (Roesler ら (1998) *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 14950-14957); ヒトサイクリン D2 プロモーターの翻訳開始部位に関して -294 位に位置する cAMP 応答性エレメント (CRE) を含有するプロモーター (Muniz ら (2006) *Biology of Reproduction* 75 (2): 279-288); および乳酸デヒドロゲナーゼ A サブユニットプロモーターの cAMP 応答性エレメント (CRE) を含有するプロモーター (Welfeld ら (1989) *J. Biol. Chem.* 264 (12): 6941-7 を含む。好ましい実施形態において、例示的な cAMP 誘導性プロモーターが、2008 年 8 月 7 日に公開された米国特許出願公開第 2008-0187942 号明細書において記載されるように、サイクリック AMP (cAMP) 調節エレメント (CRE) (AF401991) を含有する 236 ヌクレオチド糖タンパク質ホルモンアルファサブユニットプロモーターを含む。

30

40

【0020】

「構成的プロモーター」は、刺激 (たとえば熱ショック、化学物質など) の非存在下において、作動可能に連結された核酸配列の継続的な転写を指示するプロモーターを指す。構成的プロモーターは、大腸菌 ($\sigma 70$ 、 σS 、 $\sigma 32$ 、 $\sigma 54$ 、および σA) プロモーター、*B. subtilis* σB プロモーター、サルモネラ *Ps p v 2* および *Ps p v*

50

プロモーター、バクテリオファージ T7 (T7 RNAポリメラーゼによって認識される)、バクテリオファージ SP6 (SP6 RNAポリメラーゼによって認識される)、酵母 (pAdh、ADH1、cyc100、pPGK1、pCYC) プロモーター、ならびに SV40 プロモーター由来のものを含む。好ましい実施形態において、構成的プロモーターが、SV40 プロモーターである。

【0021】

「安定した形質転換」および「安定したトランスフェクション」および文法上の等価物は、細胞のゲノムの中への、関心のある1つ以上のヌクレオチド配列の導入および統合を指す。したがって、「安定した形質転換体」は、安定した形質転換体由来のゲノムDNAが、関心のある1つ以上の異種ヌクレオチド配列を含有するが、一過性の形質転換体由来のゲノムDNAが、関心のある異種ヌクレオチド配列を含有しないという点で、一過性の形質転換体と区別される。細胞の安定した形質転換は、1つ以上の、関心のあるヌクレオチド配列に対して結合することができる核酸配列との、細胞のゲノムDNAのサザンブロットハイブリダイゼーションによって検出されてもよい。その代わりに、細胞の安定した形質転換はまた、関心のあるヌクレオチド配列を増幅するための、細胞のゲノムDNAのポリメラーゼ連鎖反応によって検出されてもよい。

【0022】

「TBI」、「甲状腺障害免疫グロブリン」、「甲状腺障害抗体」(「TBAb」)、「チロトロピン受容体障害抗体」、「TSH結合抑制免疫グロブリン」、「チロトロピン結合抑制免疫グロブリン」(「TBII」)、「阻害性チロトロピン受容体抗体」(「TSHRAb」)は、甲状腺刺激ホルモン受容体(「TSH受容体」または「TSHR」または「チロトロピン受容体」とも呼ばれる)上のエピトープに対して特異的に結合し、かつその甲状腺刺激ホルモン(TSH)リガンドに対するこの受容体の結合を抑制する(つまり低下させる)抗体を指すために区別なく使用される。TBIは、K1-70モノクローナル抗体によって例証される。

【0023】

「TSI」、「甲状腺刺激免疫グロブリン」、「甲状腺刺激抗体」(「TSAb」)、「刺激性チロトロピン受容体抗体」(「TSHRAb」)は、甲状腺刺激ホルモン受容体(「TSH受容体」または「TSHR」または「チロトロピン受容体」とも呼ばれる)上のエピトープに対して特異的に結合し、かつその甲状腺刺激ホルモン(TSH)リガンドに対するこの受容体の結合を刺激する(つまり増加させる)抗体を指すために区別なく使用される。甲状腺刺激抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであってもよい。したがって、「甲状腺刺激モノクローナル抗体」および「モノクローナル甲状腺刺激抗体」は、M22抗体によって例証されるように、TSH結合部位内のTSHRのエピトープに対して結合するモノクローナル甲状腺刺激抗体を区別なく指す。

【0024】

「甲状腺刺激ホルモン」(「TSH」)は、以前に記載されるように、例示的なアミノ酸配列を有するヒトTSH(hTSH)およびウシTSH(bTSH)によって例証される(Szkudlinskiら(1996)Nat. Biotechnol. 14:1257-1263)。

【0025】

「抗体」および「免疫グロブリン」は、糖タンパク質(たとえばIgG、IgM、IgA、IgE、IgDなど)および/または抗原に対して結合するための「可変ドメイン」(「FV領域」とも呼ばれる)を含有するその一部分を指す。一実施形態において、抗体が、「ポリクローナル抗体」、つまり形質細胞(たとえばBリンパ球)の1つを超えるクローンによって産生される免疫グロブリンである。他の実施形態において、抗体が、「モノクローナル抗体」(「MAb」)、つまり、ハイブリドーマ細胞の1つのクローンによって産生される免疫グロブリンである。他の実施形態において、抗体が、対象によって産生される「自己抗体」であり、同じ対象によって産生される抗原(「自己」抗原)と結合することができる。

【 0 0 2 6 】

分子に関してなされる場合の「抗原」および「免疫原」は、特異的な液性免疫応答（可溶性抗体応答を誘起することを含む）および／または細胞性免疫応答（CTL 応答を誘起することを含む）を誘導することができる任意の物質を指す。

【 0 0 2 7 】

「特異的に結合する」および「特異的な結合」は、分子（たとえばペプチド）に対する抗体の結合またはペプチドに対する細胞（たとえばT細胞）の結合に関してなされる場合、相互作用が分子上の特定の構造の存在に依存性である、分子上の1つ以上のエピトープとの抗体または細胞の相互作用を指す。たとえば、抗体が、分子上のエピトープ「A」に対して特異的である場合、標識された「A」および抗体を含有する反応における、エピトープA（または遊離非標識A）を含有するタンパク質の存在は、抗体に対して結合する、標識されたAの量を低下させるであろう。一実施形態において、分子に対して抗体が結合するレベルが、「IC50」、つまり、所与の生物学的プロセスまたはプロセスの構成成分（たとえば酵素、抗体、細胞、細胞受容体、微生物など）の50%の抑制をもたらす、物質（たとえば抑制剤、アンタゴニストなど）の濃度を指す「最大抑制濃度の半分」を使用して決定される。それは、アンタゴニスト物質の効力の基準として共通して使用される。

10

【 0 0 2 8 】

本明細書において使用される場合、「サンプル」および「検体」は、化学反応混合物などのような任意の組成物、生物学的および／または環境的供給源由来の組成物、ならびにこれらの組成物と接触するサンプリングデバイス（たとえばスワブ）を含むように、それらの最も広い意味で使用される。「生物学的サンプル」は、体液（尿、血液、プラズマ、糞便、脳脊髄液（CSF）、精液、痰、および唾液など）ならびに固体組織を含む、対象から得られるものを含む。生物学的サンプルはまた、細胞（細胞株、単離された細胞が組織からの単離後に培養されるかどうかにかかわらず、組織から単離された細胞、組織学のおよび／または免疫組織化学的分析のために固定された細胞などのような固定細胞など）、組織（生検材料など）、細胞抽出物、組織抽出物、ならびに細胞および／または組織から単離された核酸（たとえばDNAおよびRNA）などをも含む。これらの例は、例証であり、本発明に適用可能なサンプルのタイプを限定するものとして解釈されないものとする。

20

30

【 0 0 2 9 】

「コントロールサンプル」は、ある現象についてこの変動する1つ以上の変数について原因となる有意性を推測するために、1つ以上の特定の変数以外、コントロールおよび他のサンプルにおいて同じ条件を維持することによって、他のサンプルと比較するために使用されるサンプルを指す。たとえば、「ポジティブコントロールサンプル」は、現象が起こることが期待されるコントロールサンプルである。たとえば、「ネガティブコントロールサンプル」は、現象が起こることが期待されないコントロールサンプルである。

【 0 0 3 0 】

「標準サンプル」は、他のサンプル（試験サンプルなど）を評価するためにレファレンスとして使用されるサンプルを指す。たとえば、それぞれが既知濃度および／または量のTSHを含有する1つ以上の標準サンプルは、試験サンプルにおけるTSHの濃度および／または量を評価するためのレファレンスとして使用されてもよい。

40

【 0 0 3 1 】

用語「低下させる」、「抑制する」、「小さくする」、「抑える」、「減少させる」、および文法上の等価物（「より低い」、「より小さな」などを含む）は、第1のサンプルにおける（または第1の対象における）任意の分子（たとえばアミノ酸配列および核酸配列、抗体など）、細胞、ならびに／または現象（たとえば遺伝子の発現のレベル、疾患症状、甲状腺刺激ホルモン（TSH）リガンドの、その甲状腺刺激ホルモン受容体（TSH受容体）に対する結合などのような、2つの分子の結合のレベル、2つの分子の結合の特異度、2つの分子の結合の親和性、疾患症状、疾患に対する特異度、疾患に対する感度、

50

結合の親和性、酵素活性など)の、第2のサンプルと比べた(または第2の対象に比べた)レベルに関する場合、第1のサンプルにおける(または第1の対象における)分子、細胞、および/または現象の量が、任意の当技術分野により許容されている、分析についての統計的方法を使用すると、統計的に有意な任意の量だけ、第2のサンプルにおける(または第2の対象における)ものよりも低いことを意味する。一実施形態において、第1のサンプルにおける(または第1の対象における)分子、細胞、および/または現象の量が、第2のサンプルにおける(または第2の対象における)同じ分子、細胞、および/または現象の量よりも、少なくとも10%低い、少なくとも25%低い、少なくとも50%低い、少なくとも75%低い、および/または少なくとも90%低い。他の実施形態において、第1のサンプルにおける(または第1の対象における)分子、細胞、および/または現象の量が、第2のサンプルにおける(または第2の対象における)同じ分子、細胞、および/または現象の量よりも、これらに限定されないが、10%~100%、20%~100%、30%~100%、40%~100%、50%~100%、60%~100%、70%~100%、80%~100%、および90%~100%低いなどのように、5%~100%の任意の数のパーセンテージだけ低い。一実施形態において、第1のサンプル(または第1の対象)が、限定されないが、本発明の組成物および/または方法を使用して操作されたサンプル(または対象)によって例証される。さらなる実施形態において、第2のサンプル(または第2の対象)が、限定されないが、本発明の組成物および/または方法を使用して操作されていないサンプル(または対象)によって例証される。代替の実施形態において、第2のサンプル(または第2の対象)が、限定されないが、第1の対象と比較して、異なる投薬量でおよび/または異なる期間および/または異なるルートの投与によって、本発明の組成物および/または方法を使用して操作されたサンプル(または対象)によって例証される。一実施形態において、第1および第2のサンプル(または対象)が、本発明の組成物および/または方法の異なるレジメン(たとえば投薬量、期間、投与のルートなどの)の効果が、一方のサンプル(または対象)について決定することが求められる場合などのように、同じであってもよい。他の実施形態において、第1および第2のサンプル(または対象)が、一方のサンプル(対象)、たとえば、臨床試験に参加している患者および入院中の他の個人に対する、本発明の組成物および/または方法の効果を比較する場合などのように、異なってもよい。

【0032】

用語「増加させる」、「上昇させる」、「上げる」、および文法上の等価物(「より高い」、「より大きな」などを含む)は、第1のサンプルにおける(または第1の対象における)任意の分子(たとえばアミノ酸配列および核酸配列、抗体など)、細胞、ならびに/または現象(たとえば遺伝子の発現のレベル、疾患症状、甲状腺刺激ホルモン(TSH)リガンドの、その甲状腺刺激ホルモン受容体(TSH受容体)に対する結合などのような、2つの分子の結合のレベル、2つの分子の結合の特異度、2つの分子の結合の親和性、疾患症状、疾患に対する特異度、疾患に対する感度、結合の親和性、酵素活性など)の、第2のサンプルと比べた(または第2の対象に比べた)レベルに関する場合、第1のサンプルにおける(または第1の対象における)分子、細胞、および/または現象の量が、任意の当技術分野により許容されている、分析についての統計的方法を使用すると、統計的に有意な任意の量だけ、第2のサンプルにおける(または第2の対象における)ものよりも高いことを意味する。一実施形態において、第1のサンプルにおける(または第1の対象における)分子、細胞、および/または現象の量が、第2のサンプルにおける(または第2の対象における)同じ分子、細胞、および/または現象の量よりも、少なくとも10%大きい、少なくとも25%大きい、少なくとも50%大きい、少なくとも75%大きい、および/または少なくとも90%大きい。これは、限定を伴うことなく、第2のサンプルにおける(または第2の対象における)同じ分子、細胞、および/または現象の量よりも少なくとも10%大きい、少なくとも15%大きい、少なくとも20%大きい、少なくとも25%大きい、少なくとも30%大きい、少なくとも35%大きい、少なくとも40%大きい、少なくとも45%大きい、少なくとも50%大きい、少なくとも55%大き

い、少なくとも60%大きい、少なくとも65%大きい、少なくとも70%大きい、少なくとも75%大きい、少なくとも80%大きい、少なくとも85%大きい、少なくとも90%大きい、および/または少なくとも95%大きい、第1のサンプルにおける(または第1の対象における)分子、細胞、および/または現象の量を含む。一実施形態において、第1のサンプル(または第1の対象)が、これに限定されないが、本発明の組成物および/または方法を使用して操作されたサンプル(または対象)によって例証される。さらなる実施形態において、第2のサンプル(または第2の対象)が、これに限定されないが、本発明の組成物および/または方法を使用して操作されていないサンプル(または対象)によって例証される。代替の実施形態において、第2のサンプル(または第2の対象)が、これに限定されないが、第1の対象と比較して、異なる投薬量でおよび/または異なる期間および/または異なるルートの投与によって、本発明の組成物および/または方法を使用して操作されたサンプル(または対象)によって例証される。一実施形態において、第1および第2のサンプル(または対象)が、本発明の組成物および/または方法の異なるレジメン(たとえば投薬量、期間、投与のルートなどの)の効果が、一方のサンプル(または対象)について決定することが求められる場合などのように、同じであってもよい。他の実施形態において、第1および第2のサンプル(または対象)が、一方のサンプル(対象)、たとえば、臨床試験に参加している患者および入院中の他の個人に対する、本発明の組成物および/または方法の効果を比較する場合などのように、異なってもよい。

10

【0033】

20

用語「実質的に低下していない」は、第1のサンプルにおける(または第1の対象における)任意の分子(たとえばアミノ酸配列および核酸配列、抗体など)、細胞、ならびに/または現象(たとえば遺伝子の発現のレベル、疾患症状、甲状腺刺激ホルモン(TSH)リガンドの、その甲状腺刺激ホルモン受容体(TSH受容体)に対する結合などのような、2つの分子の結合のレベル、2つの分子の結合の特異度、2つの分子の結合の親和性、疾患症状、疾患に対する特異度、疾患に対する感度、結合の親和性、酵素活性など)の、第2のサンプルと比べた(または第2の対象に比べた)レベルに関する場合、第1のサンプルにおける(または第1の対象における)分子、細胞、および/または現象の量が、第2のサンプルにおける(または第2の対象における)量の91%~100%であることを意味する。

30

【0034】

用語「改変する」および「修飾する」は、任意の分子および/または現象のレベルに関する場合、上昇および/または減少を指す。

【0035】

「実質的に同じ」は、第1のサンプルにおける(または第1の対象における)任意の分子(たとえばアミノ酸配列および核酸配列、抗体など)、細胞、ウイルス、ならびに/または現象(たとえば遺伝子の発現のレベル、疾患症状、甲状腺刺激ホルモン(TSH)リガンドの、その甲状腺刺激ホルモン受容体(TSH受容体)に対する結合などのような、2つの分子の結合のレベル、2つの分子の結合の特異度、2つの分子の結合の親和性、疾患症状、疾患に対する特異度、疾患に対する感度、結合の親和性、酵素活性など)の、第2のサンプルと比べた(または第2の対象に比べた)レベルに関する場合、第1のサンプルにおける(または第1の対象における)分子、細胞、および/または現象の量が、任意の当技術分野により許容されている、分析についての統計的方法を使用すると、第2のサンプルにおける(または第2の対象における)量と異ならないことを意味する。一実施形態において、第1のサンプルにおける(または第1の対象における)分子、細胞、および/または現象の量が、第2のサンプルにおける(または第2の対象における)量の90%~100%(たとえば90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、および100%)である。

40

【0036】

任意の数の範囲に対する本明細書における言及は、その範囲によって包含される、それ

50

ぞれの数値（分数および整数を含む）を明確に含む。例証するために、また、限定を伴うことなく、「少なくとも50」の範囲に対する本明細書における言及は、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60などの整数および分数50.1、50.2、50.3、50.4、50.5、50.6、50.7、50.8、50.9などを含む。さらなる例証において、「50未満」の範囲に対する本明細書における言及は、整数49、48、47、46、45、44、43、42、41、40などおよび分数49.9、49.8、49.7、49.6、49.5、49.4、49.3、49.2、49.1、49.0などを含む。さらに他の例証において、「5～10」の範囲に対する本明細書における言及は、5、6、7、8、9、および10のそれぞれの整数ならびに5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9などのようなそれぞれの分数を含む。

10

【0037】

発明の説明

本発明は、甲状腺ホルモン阻害免疫グロブリン（TBI）を検出するための組成物および方法を提供する。本発明の方法は、TBIに対して高感度であり、かつ特異的であり、TBIおよび甲状腺刺激免疫グロブリン（TSI）の両方の二重検出に使用されてもよい。本発明の組成物および方法は、TBIおよび/またはTSIの存在と関連する疾患の診断に、疾患および/または処置レジメン、治療薬、ワクチンなどの進行をモニターするのに、ならびに臨床医が処置決定を下すのを支援するのに有用である。

【0038】

20

本発明は、（A）甲状腺阻害免疫グロブリン（TBI）の検出のためのアッセイ、（B）甲状腺阻害免疫グロブリン（TBI）および甲状腺刺激免疫グロブリン（TSI）の二重検出のためのアッセイ、ならびに（C）キットの下で、さらに記載される。

【0039】

A．甲状腺阻害免疫グロブリン（TBI）の検出のためのアッセイ

【0040】

本発明は、試験サンプルにおける甲状腺ホルモン阻害免疫グロブリン（TBI）を検出するための方法であって、a）i）1）cAMP誘導性プロモーターに対して作動可能に連結されたレポーター遺伝子（たとえばルシフェラーゼ遺伝子）および2）構成的プロモーターに対して作動可能に連結されたキメラTSH受容体（TSHR）遺伝子を含む、1つ以上の発現ベクターにより安定してトランスフェクトされたトランスジェニック細胞であって、細胞が、細胞膜上にキメラTSHRを発現する、トランスジェニック細胞、ii）甲状腺刺激ホルモン（TSH）（たとえばbTSH）、およびiii）コントロールサンプル、ならびにiv）試験サンプル（たとえば、TBIを含有することが疑われる）を提供するステップ、b）トランスジェニック細胞およびTSHを、i）第1のサンプルをもたらすコントロールサンプルおよびii）第2のサンプルをもたらす試験サンプルと接触させるステップであって、接触が、キメラTSHRに対するTSHの結合のための条件下にある、ステップ、ならびにc）第1のサンプルおよび第2のサンプルにおけるレポーター遺伝子の発現のレベルを測定するステップであって、第1のサンプルと比較した、第2のサンプルにおけるレポーター遺伝子の発現のレベルの低下が、試験サンプルにおけるTBIの存在を示す、ステップを含む方法を提供する。

30

40

【0041】

一実施形態において、本発明のTBIアッセイは、甲状腺阻害免疫グロブリンが、例示的なCHO-MC4細胞上に発現されるTSH受容体（TSHR）に対して結合する甲状腺刺激ホルモン（TSH）と競合する、細胞ベースの免疫グロブリン競合アッセイである。いくつかの実施形態において、TBIアッセイが、CHO-MC4細胞、細胞増殖培地、bTSH、Thyretain（商標）反応バッファー（Quidel Corp. & Diagnostic Hybrids, Inc., Ohio, USA）、ルシフェラーゼ基質、および患者血清サンプルを使用することを含む。本発明のTBIアッセイの試薬および構成成分は、当業者に入手可能である（Thyretain（商標）アッセイ；Q

50

uidel Corp. & Diagnostic Hybrids, Inc.)。

【0042】

本発明のアッセイは、実施例1において例証される。本発明のTBIアッセイの例示的なCHO-MC4細胞は、キメラヒト/ラットTSHRおよび糖タンパク質ホルモンアルファサブユニットプロモーターによって駆動されるルシフェラーゼレポーター遺伝子を発現する、遺伝子的に操作されたチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞である。CHO-MC4細胞は、Thyretain(商標)アッセイ(Quidel Corp. & Diagnostic Hybrids, Inc.)において使用される。

【0043】

本発明の方法は、グレーブス病、橋本甲状腺炎(Endoら(1978)J. Clin. Endocrinology & Metabolism 46(5):734-739; Takasuら(1987)J. Clin. Endocrinology & Metabolism 64(2):239-245); 甲状腺機能低下症(Takasuら(1984)J. Clin. Endocrinology & Metabolism 59(1):142-146); 新生児甲状腺機能低下症(Isekiら(1983)57(2):384-387; Matsuuraら(1980)The New England Journal of Medicine 303(13):738-741); 非甲状腺腫性甲状腺機能低下症(Arikawara(1985)J. Clin. Endocrinology & Metabolism 60(5):953-959); 甲状腺機能正常または甲状腺機能低下自己免疫性甲状腺炎(Chiovatoら(1990)71:40-45); 原発性粘液水腫(Drexhageら(1980)Nature 289:594-596; Konishiら(1983)J. Clin. Endocrinology & Metabolism 57(3):544-549); および特発性粘液水腫(Kohnら(2003)Autoimmunity 36:331-337)などのような、TBIの存在と関連する疾患の診断に有用である。

【0044】

本発明の方法はまた、疾患および/または処置レジメン、治療薬、ワクチンなどの進行をモニターするのにならびに臨床医が処置決定を下すのを支援する際にも有用である。

【0045】

当技術分野は、本発明においても使用されるMC4キメラ受容体を使用する、甲状腺ホルモン自己抗体についてのアッセイを記載している(2008年8月7日に公開された米国特許出願公開第2008-0187942号明細書)。しかしながら、当技術分野のアッセイは、MC4キメラ受容体が、刺激抗体に対してのみ反応性であり、かつ、甲状腺ホルモン阻害抗体の結合が、排除されているおよび/または低下しているという見解に基づいて、甲状腺ホルモン刺激(阻害ではなく)免疫グロブリン(TSI)を測定するように設計されたものなので、本発明の方法は、驚くべきものである。さらに、当技術分野は、TSIを検出するその方法の特異度が、刺激自己抗体に対して優先的に結合する(つまり阻害自己抗体とは対照的に)ことによって、野生型受容体よりも大きな特異度をもたらすキメラMC4受容体を発現する細胞を使用することの結果であると述べた。また、当技術分野は、TSIを検出するその方法の感度が、刺激自己抗体に対して優先的に結合する(つまり阻害自己抗体とは対照的に)ことによって、野生型受容体よりも大きな感度をもたらすキメラMC4受容体を発現する細胞を使用することの結果であると述べた。

【0046】

TBIを検出する際の本発明の方法の驚くべき側面に加えて、本発明の方法は、TBIを検出するのに高感度であることの驚くべき利点を提供する。したがって、一実施形態において、TBIを検出するための本発明の方法が、野生型TSHRを発現する細胞で、キメラTSHRを発現するトランスジェニック細胞を置換するステップを含む方法においてTBIを検出する場合のTBI IC₅₀の5~15分の一の(最も好ましくは7.5分の一の)TBI IC₅₀を有する。本明細書におけるデータは、CHO-MC4細胞によって発現されるキメラTSHRが、TBIを検出する際に、野生型TSHRよりも有用

であることを実証する（実施例 2 および 4）。たとえば、本明細書におけるデータは、野生型 TSHR を発現する H10 細胞と比較して、キメラ TSHR を発現する CHO-MC4 細胞を使用する場合、TBI を検出する際に、感度がより高く、CHO-MC4 細胞の IC₅₀ が、H10 細胞の 7.5 分の一であったことを実証する。

【0047】

TBI を検出するための本発明の感度に関しての他の驚くべき利点は、本発明の方法が、抗 TBI モノクローナル抗体と TBI の特異的な結合を検出するステップを含む方法において（ELISA アッセイにおいてなど）TBI を検出する場合の TBI IC₅₀ の 10 ~ 30 分の一の（最も好ましくは 22 分の一の）TBI IC₅₀ を有することである。本明細書におけるデータは、CHO-MC4 細胞を使用する本発明の TBI アッセイの IC₅₀ が、1.344 ng/ml であり、これは、TRA b アッセイの 22 分の一であることを示す（実施例 3 および 4）。

10

【0048】

TSH 受容体（TSHR）がラットルテオトロピン-絨毛性ゴナドトロピン（LH-CG）受容体に対して連結されている、先行技術のキメラ受容体 TSHR-LH/CGR が、TSI に対して高感度であるが、TBI に対して非常に感度が悪いことが報告されたので、本発明の方法について上記に議論される感度は、少なくとも部分的に驚くべきものである（Tahara ら（1991）BBRC 179:70-77; Tahara ら（1997）Thyroid 7(6):867-877）。さらに、先行技術は、本発明の例示的なトランスジェニック細胞（たとえば CHO-MC4 細胞および RD-MC4 細胞）によって発現される MC4 キメラ受容体 TSHR-LH/CGR が、TSI に対するエピトープを保持するが、TBI に対するエピトープを欠いたことを示唆した（Kohn ら（2003）Autoimmunity 36:331-337; Sanders ら（2011）J. Molecular Endocrinol. 46:81-99）。

20

【0049】

必須ではないが、一実施形態において、本発明の方法が、d) 第 1 のサンプルと比較した、第 2 のサンプルにおけるレポーター遺伝子（たとえばルシフェラーゼ遺伝子）の発現のレベルの低下を検出するステップをさらに含む。

【0050】

また、必要とされるわけではないが、一実施形態において、本発明の方法が、試験サンプルにおける TBI のレベルを決定するステップをさらに含む。これは、たとえば、1) 試験サンプルと接触させた後の、レポーター遺伝子の発現のレベルを、2) それぞれが既知濃度の TSH を含有する 1 つ以上の標準サンプルとトランスジェニック細胞を接触させた後の、レポーター遺伝子の発現のレベルと比較することによって行われてもよい。

30

【0051】

本発明の方法のさらに驚くべき側面は、それらが、TBI 特異的であるということである。サンプルにおける TBI の存在を検出するための方法は、「TBI に対して特異的である」または「TBI 特異的である」とも表され、ここで、方法は、その受容体（キメラ TSHR などのような TSHR）に対する TSH の特異的な結合の、TBI による抑制を検出するステップを含み、TBI による抑制のレベルは、1 つ以上の黄体形成ホルモン（LH）、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）、および卵胞刺激ホルモン（FSH）の存在によって、実質的に改変されない（つまり、1% ~ 10% 増加しないまたは 1% ~ 10% 減少しない）。

40

【0052】

たとえば、本明細書におけるデータは、3 つの糖タンパク質ホルモン LH、hCG、および FSH が、それらの最も高い、生物学的に正常な範囲の濃度でおよびそれらの最も高い、生物学的に正常範囲の濃度の 2 倍で本発明の TBI アッセイにおいて試験された場合に、実質的な交差反応性も、TSHR との TSH の結合の TBI 抑制への干渉もなかったという点で、本発明の TBI アッセイが、b TSH に対して特異的であったことを実証する（実施例 5）。より詳細には、本発明のアッセイが、TBI による 86% の抑制を検出

50

したが、LH、hCG、およびFSHのいずれか1つと共にTBIを含有する混合物は、81%～84%の範囲の抑制を検出した。

【0053】

本発明のアッセイにおけるTSHの濃度の範囲を限定することを意図するものではないが、一実施形態において、TSHが、100mIU/ml未満の、より好ましくは、0.2mIU/ml～100mIU/mlの濃度を有する。図1Bは、TSH濃度が、100mIU/mlに等しいまたはそれよりも低い場合、生物発光遺伝子（たとえばルシフェラーゼ遺伝子）の発現およびTSH濃度の関係が、直線的であることを示す。

【0054】

本発明の方法において使用されるトランスジェニック細胞が、任意の特定のレポーター遺伝子を含有するには意図されない。しかしながら、一実施形態において、レポーター遺伝子が、レニラルシフェラーゼアミノ酸配列の配列番号03を含むタンパク質などのような生物発光タンパク質を発現する。

【0055】

本発明の方法において使用されるトランスジェニック細胞が、任意の特定のタイプに限定されるには意図されない。しかしながら、一実施形態において、トランスジェニック細胞が、CHO-MC4細胞およびRD-MC4細胞によって例証される細胞を含む。

【0056】

一実施形態において、本発明の方法が、TSHを、甲状腺刺激モノクローナル抗体（M22など）および/または甲状腺刺激ポリクローナル抗体で置き換えることによって実行されてもよい（図9）。本明細書におけるデータは、本発明のTBIアッセイが、bTSHおよび/または甲状腺刺激免疫グロブリン（TSI）による刺激を阻害する、例示的なサンプル18HMの能力を検出することができることを実証する（図10）。

【0057】

B. 甲状腺阻害免疫グロブリン（TBI）および甲状腺刺激免疫グロブリン（TSI）の二重検出のためのアッセイ

【0058】

本発明は、試験サンプルにおける甲状腺ホルモン阻害免疫グロブリン（TBI）および甲状腺ホルモン刺激免疫グロブリン（TSI）を検出するための方法であって、a) i) 1) cAMP誘導性プロモーターに対して作動可能に連結されたレポーター遺伝子（たとえばルシフェラーゼ遺伝子）および2) 構成的プロモーターに対して作動可能に連結されたキメラTSH受容体（TSHR）遺伝子を含む、1つ以上の発現ベクターにより安定してトランスフェクトされたトランスジェニック細胞であって、細胞が、細胞膜上にキメラTSHRを発現する、トランスジェニック細胞、ii) 甲状腺刺激ホルモン（TSH）、ならびにiii) コントロールサンプル、iv) 試験サンプル（たとえば、TBIおよび/またはTSIを含有することが疑われる）を提供するステップ、b) トランスジェニック細胞およびTSHを、i) 第1のサンプルをもたらしコントロールサンプルおよびii) 第2のサンプルをもたらし試験サンプルと接触させるステップであって、接触が、キメラTSHRに対するTSHの結合のための条件下にある、ステップ、ならびにc) 接触前および接触後の、トランスジェニック細胞におけるレポーター遺伝子の発現のレベルを測定する（たとえばルシフェラーゼ酵素活性から結果として生じる生物発光を検出することによって）ステップであって、i) 第1のサンプルと比較した、第2のサンプルにおけるレポーター遺伝子の発現のレベルの低下が、試験サンプルにおけるTBIの存在を示し、ii) 第1のサンプルと比較した、第2のサンプルにおけるレポーター遺伝子の発現のレベルの上昇が、試験サンプルにおけるTSIの存在を示す、ステップを含む方法を提供する。

【0059】

実施例6～8における、本明細書におけるデータは、血清サンプルにおける検出を含む、TBIおよびTSIの両方を検出するための、本発明のアッセイの使用を実証する（表8）。

10

20

30

40

50

【0060】

本発明のTBIおよびTSIの両方の二重検出のための方法は、疾患および/または処置の進行をモニターするための、ならびに臨床医が処置決定を下すのを支援するための、グレーブス病および甲状腺機能亢進症などのような、TSIの存在と関連する疾患の診断に有用である。

【0061】

トランスジェニック細胞を任意の特定のタイプに限定することを意図するものではないが、一実施形態において、トランスジェニック細胞が、CHO-MC4細胞およびRD-MC4細胞によって例証される細胞を含む。

【0062】

C. キット

【0063】

本発明は、本発明の方法を実施するのを支援するためのキットを提供する。一実施形態において、キットが、i) 1つ以上の発現ベクターにより安定してトランスフェクトされたトランスジェニック細胞であって、該発現ベクターが、1) cAMP誘導性プロモーターに対して作動可能に連結されたレポーター遺伝子および2) 構成的プロモーターに対して作動可能に連結されたキメラTSH受容体(TSHR)遺伝子を含み、該細胞が、細胞膜上にキメラTSHRを発現する、トランスジェニック細胞、ならびにii) 甲状腺ホルモン阻害免疫グロブリン(TBI)を検出するためにトランスジェニック細胞を使用するための説明書を含む。

【0064】

用語「キット」は、試薬および他の材料の組み合わせに関して使用される。キットは、緩衝剤、タンパク質安定化試薬、シグナル産生系(たとえば生物発光および/または蛍光生成系)、抗体、コントロールサンプルなどのような試薬ならびに試験容器(たとえばマイクロタイタープレートなど)を含んでいてもよいことが、企図される。

【0065】

一実施形態において、キットが、甲状腺ホルモン阻害免疫グロブリン(TBI)を含有するポジティブコントロールサンプルを含む。他の実施形態において、キットが、甲状腺刺激ホルモン(TSH)を含む。

【0066】

TBIおよびTSIの両方の二重検出が所望される場合、キットは、試験サンプルにおける甲状腺ホルモン刺激免疫グロブリン(TSI)を検出するための説明書をさらに含んでいてもよい。他の実施形態において、キットが、甲状腺ホルモン刺激免疫グロブリン(TSI)を検出するために含有するポジティブコントロールサンプルをさらに含んでいてもよい。

【実施例】

【0067】

実験

以下の実施例は、本発明のある好ましい実施形態および態様を実証し、かつさらに例証するために提供され、その範囲を限定するものとして解釈されないものとする。

【0068】

続く実験の開示において、以下の略語が適用される: eq(等価物); M(モル濃度); μ M(マイクロモル濃度); N(正常); mol(モル); mmol(ミリモル); μ mol(マイクロモル); nmol(ナノモル); g(グラム); mg(ミリグラム); μ g(マイクログラム); ng(ナノグラム); またはL(リットル); ml(ミリリットル); μ l(マイクロリットル); μ (マイクロ); m(ミリ); IU(国際単位); cm(センチメートル); mm(ミリメートル); μ m(マイクロメートル); nm(ナノメートル); (摂氏度); sec. またはs(秒(複数可)); min. およびm(分(複数可)); MW(分子量); 甲状腺刺激ホルモンまたはチロトロピン(TSH); bTSH(ウシTSH); TSI(甲状腺刺激免疫グロブリン); TSA b(甲状腺刺激

10

20

30

40

50

抗体) ; EDTA (エチレンジアミン四酢酸) ; RLU/sec (1秒当たりの相対光単位 (relative light unit)) ; GMまたはPM (増殖培地またはプランティング培地 (Planting Medium)) ; SM (飢餓培地) ; HBSS (ハンクス平衡塩類溶液) ; MEM (イーグル最小必須培地) ; FBSまたはFCS (ウシ胎児血清またはウシ胎仔血清) ; DMSO (ジメチルスルホキシド) ; CHO (チャイニーズハムスター卵巣細胞) ; CHO-R (ヒトTSH受容体によりトランスフェクトされたCHO細胞) ; CHO-Rluc (cre - ルシフェラーゼレポーター遺伝子複合体によりトランスフェクトされたCHO-R細胞) ; Oxoid (Oxoid, Basingstoke, England) ; BBL (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, ME) ; DIFCO (Difco Laboratories, Detroit, Nil) ; 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) ; ならびに Promega (Promega Corp., Madison, WI) .

【0069】

以下の方法において、これらの方法において使用される溶液はすべて、無菌であり (TSH、コントロール、患者検体を除いて)、無菌的に処理した。操作はすべて、無菌条件下で、バイオセーフティーキャビネット中で行った。細胞培養培地 (たとえばHamのF-12、MEMなど) は、LTIから購入したが、非必須アミノ酸などのような添加試薬は、Sigmaから購入した。

【0070】

細胞のフリーザーバイアルは、温度のサイクリングが生存能力の損失をもたらし得るので、本発明の方法における解凍および使用の直前まで、それらの - 80 (またはそれ未満の) 保存温度から暖めてはならない。それが、室温で不安定であるジチオトレイトールを含有するので、5 × 細胞溶解溶液は、1 × 溶液の調製のために必要とされる容量を取り出すのに十分な長さだけ、その - 20 保存温度から取り出されるべきである。それもまた、ジチオトレイトールを含有するので、還元されたルシフェラーゼ基質溶液は、使用の直前まで - 20 で凍結させたまま保つべきであり、使用の時に、それは、取り出され、解凍され、かつ室温に達するように、25 ~ 37 の水浴中に置かれてもよい。

【0071】

一般に、ウェル (たとえばマイクロタイタープレートなど) から液体を除去する場合、液体は、ウェルから、バイオセーフティーフード中の入れ物の中に廃棄されてもよい。残留液は、無菌の吸収性のふきん上で、プレートを逆さまに置くことによって、流出させ、除去することができる。または、液体は、吸引器上で、細いチップを使用して、吸引によって除去されてもよい。吸引が使用される場合、プレートは、液体がウェルからあふれないように、急な角度で保持され、吸引器チップは、液体を除去するために、ウェルの側面の下の方、ほぼ底に向けられ、最小限の残留物のみが残る。しかしながら、吸引器によって細胞が容易に除去され得るので、細胞単層の乱れを防ぐように注意を払わなければならない。

【0072】

下記の方法において示されるように、必要とされるわけではないが、検体、標準物質、およびコントロールを三通り実行することが推奨される。溶液3 (Solution 3) の粘着性の性質およびウェルにおいて適切な混合を実現する際の困難さのために、合計三通りの容量が、これらの試薬の + 10 % (33 μl) であり、必要とされる三通りの容量 + 10 % (330 μl) の溶液3に移し、徹底的に混合し、110 μl を三通りのウェルに移した場合に、最良の再現性が、実現された。

【 0 0 7 3 】

細胞単層（たとえばマイクロタイタープレートのウェル内で）の調製において、細胞が、ウェル内で均一に分布させることが好ましい。したがって、不均一な細胞分布を回避するために、ウェルの中への細胞懸濁液の移動は、防振性のバイオセイフティーフードにおいて実行されるべきである。プレート中のウェルがすべて、細胞を収容した後、プレートをカバーし、30分間、堅い防振性の表面上に注意深く置き、細胞を、ウェルの底にそのまま付着させた。これは、細胞の均一な分布がウェルのそれぞれにおいて存在することを確実にするのを助ける。

【 0 0 7 4 】

実施例 1

サンプルにおける T B I を検出するための方法

【 0 0 7 5 】

甲状腺刺激免疫グロブリンを検出するための、キメラ T S H 受容体 (T S H R) および C R E 依存性ルシフェラーゼを発現する、安定してトランスフェクトされた細胞株 (C H O - M C 4) (T S I バイオアッセイ、T h y r e t a i n (商 標)) は、以前に記載されている (2 0 0 8 年 8 月 7 日に公開された米国特許出願公開第 2 0 0 8 - 0 1 8 7 9 4 2 号明細書) 。補完的な甲状腺障害抗体 (T B I) バイオアッセイを開発するために、発明者らは、キメラ T S H R の性能を野生型 (w t) T S H R と比較した。

【 0 0 7 6 】

w t またはキメラ T S H R および C R E 依存性ルシフェラーゼを発現する C H O 細胞を単離した。細胞を、15 ~ 18 時間、37 °C で増殖させ、次いで、b T S H、T S I、T B I、および / または患者血清と共にインキュベートした。ルシフェラーゼ発現は、3 時間のインキュベーション後に測定した。障害活性は、b T S H のみによる誘導と比べた、ルシフェラーゼ発現の抑制パーセントとして定義した。

【 0 0 7 7 】

キメラおよび w t 細胞株の両方は、用量依存的な方式で、b T S H に応じたルシフェラーゼの誘導を示したが、異なるレベルの感度および最大の誘導を示した。w t T S H R 発現細胞株は、0 . 8 ~ 5 0 m I U / L の b T S H の濃度に対して応答したのに対して、キメラ T S H R 発現細胞株は、より広い動的な範囲 (1 . 6 ~ 2 0 0 m I U / L) を有し、8 倍高いレベルまで誘導された。両方の細胞株は、グレーブス病を有する患者由来の血清中の T S I を検出した。細胞株を T S I または b T S H により刺激した場合、ルシフェラーゼ発現は、増加性の濃度の障害 M A b、K 1 - 7 0 (R S R、C a r d i f f、U . K .) または T B I を含有する血清の追加によって、用量依存的な方式で低下した。キメラ細胞株は、K 1 - 7 0 の 5 0 % 抑制濃度 (I C 5 0) がキメラ細胞株で 3 ~ 5 分の一であったという点で、より高感度であった。また、w t 細胞とは対照的に、キメラ細胞株は、T B I ポジティブ血清により試験した場合に、3 ~ 4 倍高い抑制活性を示し、段階希釈障害血清により S 字形用量 - 応答曲線を一樣に示した。

【 0 0 7 8 】

結果は、w t と比較して、キメラ T S H R 細胞株が、より良好に働き、刺激および障害バイオアッセイの両方を開発するための特有の媒介物となることを示す。

【 0 0 7 9 】

A . 血清サンプルにおける T B I を検出するための例示的なプロトコール :

1 . 1 枚の黒色平 / 透明底 9 6 ウェルプレートを、1 0 0 μ l / ウェルの細胞付着溶液によりコーティングする (たとえば米国特許出願公開第 2 0 0 8 - 0 1 8 7 9 4 2 号明細書において記載されており、Q u i d e l C o r p . & D i a g n o s t i c H y b r i d s , I n c . , O h i o , U S A から T h y r e t a i n (商 標) 細胞付着溶液として市販で入手可能である) 。溶液を 3 0 秒間、ウェル上でそのままにし、次いで、溶液をデカントする。

2 . 5 m l の T h y r e t a i n (商 標) 増殖培地に、C H O M C 4 細胞の 1 本のフリーザーバイアルを追加する (たとえば米国特許出願公開第 2 0 0 8 - 0 1 8 7 9 4 2 号明

10

20

30

40

50

細書において記載されており、Quidel Corp. & Diagnostic Hybrids, Inc.、Ohio、USAからThyretain (商標) 増殖培地として市販で入手可能である)。

3. 48ウェルフォーマット中に100 μ l / ウェルで細胞を置く (プレートの一番上および一番下の行ならびにプレートの左手および右手の最初の2列を抜かす)。

4. 37 で16 ~ 18時間、細胞のプレートをインキュベートする。

5. 一晩の増殖期間の終わりに、コンフルエンスについて細胞を顕微鏡で調査し、細胞に混入物がないことを確認する。プレートをインキュベーターに戻す。

6. 400 μ IU / ml bTSH (これは、それぞれのウェルにおいてbTSHの100 μ IU / ml 最終濃度を可能にするであろう) を調製する。これが作業用ストックとなる。

10

7. bTSHによりそれぞれのサンプルの1:11希釈液を調製する - - 40 μ Lのそれぞれのサンプル、220 μ Lの400 μ IU / ml bTSH、および180 μ L Thyretain (商標) 反応バッファー (たとえば米国特許出願公開第2008-0187942号明細書において記載されており、Quidel Corp. & Diagnostic Hybrids, Inc.、Ohio、USAからThyretain (商標) 反応バッファーとして市販で入手可能である)。

8. 反応バッファーにおいて、正常血清を1:11に希釈することによって、ブランクコントロールを調製する (40 μ L血清および400 μ L反応バッファー)。

9. 40 μ Lの正常血清、220 μ Lの400 μ IU / ml bTSH、および180 μ L Thyretain (商標) 反応バッファーを希釈することによって、bTSHコントロールを調製する。注: プレートはまた、好ましくは、Thyretain (商標) 反応バッファーのみを含有する反復ウェルを含有する。

20

10. インキュベーターからプレートを取り出し、100 μ l / ウェルのThyretain (商標) 反応バッファーにより細胞をすすぎ、次いで、それを細胞に再度供給する。

11. 100 μ l / ウェルで三通り、細胞に、調製したサンプルを追加する。

12. 3時間、37 で、細胞をインキュベートする。

13. 3時間のインキュベーション後に、すべてのウェルの内容物をデカントする。

14. それぞれのウェルに75 μ l / ウェルBright-Glo (商標) を追加する。

15. 10分間、室温で細胞をインキュベートし、次いで、Veritas (商標) プレート読み取り装置上でプレートを読み取る。

30

【0080】

B. TBIアッセイにおける例示的なTSH濃度:

【0081】

図1は、CHO-MC4細胞を使用する、bTSH用量応答曲線を示す。図1Aは、0.2 mIU / ml ~ 400 mIU / ml 濃度範囲のbTSHの段階2倍希釈によるルシフェラーゼ誘導を示し、図1Bは、0.2 mIU / ml ~ 100 mIU / ml のより狭い濃度のbTSHによるルシフェラーゼ誘導を示す。S / Bの比は、ルシフェラーゼのシグナル対バックグラウンド比を指し、これは、様々な実験から生成されるルシフェラーゼ活性 (RLUで測定されるもの) を標準化する。

40

【0082】

図1Aは、ルシフェラーゼ誘導が、bTSHの濃度と共に増加することを示す。bTSH濃度が100 mIU / ml に等しいまたはそれよりも低い場合、ルシフェラーゼ誘導およびbTSH濃度の関係は、直線的である。bTSHの濃度が、100 mIU / ml よりも高い場合、ルシフェラーゼ活性の上昇は、下がり、誘導は、次第に、プラトーに近づくが、完全にはプラトーに達しない。図1Bは、bTSH濃度が、100 mIU / ml に等しいまたはそれよりも低い場合の、図1Aの直線部分を拡大したものである。R² (係数値) は、1に近い。

【0083】

TBIアッセイにおいて、甲状腺障害抗体は、細胞膜上に位置するTSH受容体の結合

50

について、b T S Hと競合する。そのため、b T S Hの濃度は、アッセイ感度の決定のための重要な構成成分となる。図1 Bにおいて示される、ルシフェラーゼ誘導のための直線的な範囲のb T S H濃度は、b T S Hのより高い非直線的な濃度よりも、高い検出感度を有する。b T S Hの濃度の直線的な範囲内で、最も高い濃度が、アッセイのための1つの最適な濃度として使用されてもよい。直線的な濃度はすべて、同じb T S H検出感度を有するが、より高いb T S H濃度は、より大きなシグナル対バックグラウンド比を意味する。

【0084】

実施例2

キメラT S H Rは、T B Iを検出する際に、野生型T S H Rよりも有用である

10

【0085】

A . M C 4およびT S H R w t細胞(H 1 0)における、K 1 - 7 0甲状腺障害モノクローナル抗体(M A b)による、甲状腺障害免疫グロブリン(T B I)アッセイの検出感度の比較

【0086】

0 . 1 ~ 1 0 0 n g / m lの段階希釈甲状腺障害M A b K 1 - 7 0を、C H O - M C 4細胞またはH 1 0細胞においてT B Iアッセイにより試験した。結果を図3に示す。

【0087】

すべてのサンプルデータは、1 : 1 1希釈正常血清を有する反応バッファのバックグラウンドR L Uにより標準化した。抑制パーセンテージ(%)は、(b T S HコントロールR L U - サンプルR L U) / b T S HコントロールR L Uとして計算した。

20

【0088】

結果は、C H O - M C 4細胞が、H 1 0細胞よりも、K 1 - 7 0に対して、はるかに高い検出感度を有することを示す。C H O - M C 4細胞のI C ₅₀は、H 1 0細胞よりも7 . 5分の一であった。

【0089】

B . M C 4およびH 1 0細胞における、阻害抗体含有血清によるT B Iアッセイの検出感度の比較

【0090】

あるT B Iポジティブな患者の血清を、1 : 2 2 ~ 1 : 9 0 , 0 0 0に段階希釈し、M C 4またはH 1 0細胞においてT B Iアッセイによって試験した。結果を図4に示す。

30

【0091】

結果は、C H O - M C 4細胞における血清希釈液の抑制パーセンテージのS字形曲線を示し、これは、前の実験におけるK 1 - 7 0のものに類似している。しかしながら、それは、H 1 0細胞において同じ曲線を示さなかった。

【0092】

この結果は、C H O - M C 4細胞が、H 1 0細胞よりも、T B Iの検出においてより高感度であることを確認するものである。

【0093】

実施例3

40

本発明のT B Iアッセイの感度は、K r o n u s (商標) E L I S Aアッセイなどのような競合的結合方法よりも高い

【0094】

発明者らは、本発明のT B Iアッセイを、K r o n u s (商標) E L I S Aアッセイ(T R A bアッセイ)などのような先行技術の競合的結合方法と比較するために、甲状腺障害モノクローナル抗体K 1 - 7 0用量応答曲線の比較を行った。本実験において、K 1 - 7 0甲状腺刺激モノクローナル抗体を、C H O - M C 4細胞におけるT B IアッセイおよびT R A bアッセイ(K r o n u s (商標))の両方について試験する。結果を図5に示す。

【0095】

50

結果は、CHO-MC4細胞によるTBIアッセイの IC_{50} が、 1.344 ng/ml であることを示し、これは、TRAbアッセイよりも22分の一であり、CHO-MC4細胞が、TRAbアッセイよりも高いTBI検出感度を有することを示す。

【0096】

実施例4

本発明のTBIアッセイの感度

【0097】

以下のデータは、他のアッセイと、TBIを検出する際の本発明アッセイの感度を比較する。

【0098】

【表1】

表1. TBIポジティブ血清サンプルの希釈液の応答

希釈液	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%

【0099】

【表2】

表2. 甲状腺阻害モノクローナル抗体K1-70の用量応答

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%

【0100】

【表3】

表3. TBIおよびTRAbアッセイについての、TBIポジティブ血清希釈液の結果の比較

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

【0101】

【表4】

表4. TBIおよびTRAbアッセイについての、甲状腺阻害モノクローナル抗体K1-70用量応答の比較

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

【0102】

実施例5

本発明のTBIアッセイの特異度

【0103】

表5および6は、糖タンパク質ホルモンサブファミリー - 黄体形成ホルモン(LH)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)、および卵胞刺激ホルモン(FSH)を伴う、本発明のTBIアッセイについての特異度試験の結果を示す。実験において、それぞれのホルモンの2つの濃度について試験した。一方の濃度は、正常範囲内の最も高いレベルとし、他方は、その濃度の2倍とする。K1-70甲状腺阻害モノクローナル抗体は、ポジティブコントロールとして使用し、ホルモンは、反応バッファー中のK1-70と共に試験した。

【0104】

ヒトにおけるそれぞれのホルモンの正常範囲は、以下のとおりである：LH $5 \sim 20\text{ mIU/ml}$ ；hCG $0.1 \sim 8000\text{ mIU/ml}$ ；FSH $1.4 \sim 116.3\text{ mIU/ml}$ 。

【0105】

10

20

30

40

50

【表 5】

表5. CHO-MC4細胞において、最も高い正常範囲濃度により試験した、糖タンパク質ホルモンを伴うルシフェラーゼ誘導

		RLU	抑制%
TBIポジティブ	2.5ng K1-70	5532	86%
FSH 116.3 mIU/ml	2.5ng K1-70	6101	81%
	反応バッファー	16489	0%
LH 20 mIU/ml	2.5ng K1-70	6102	81%
	反応バッファー	17263	-5%
hCG 8000 mIU/ml	2.5ng K1-70	5998	82%
	反応バッファー	17502	-7%

10

【0106】

【表 6 - 1】

表6. CHO-MC4細胞において、最も高い正常範囲濃度の2倍により試験した、糖タンパク質ホルモンを伴うルシフェラーゼ誘導

		RLU	抑制%
TBIポジティブ	2.5ng K1-70	5532	86%
FSH 232.6 mIU/ml	2.5ng K1-70	5811	83%
	反応バッファー	16272	1%
LH 40 mIU/ml	2.5ng K1-70	5773	84%
	反応バッファー	17368	-6%
hCG 16000 mIU/ml	2.5ng K1-70	5947	82%
	反応バッファー	16483	0%

20

【0107】

データは、3つの糖タンパク質ホルモンをTBIアッセイにおいて試験した場合、実質的な交差反応性または干渉がなかったことを実証する。これらの結果は、TBIアッセイが、bTSHに対して非常に特異的であることを示す。

30

【0108】

実施例 6

本発明の二重バイオアッセイ方法は、TBIおよびTSIの両方をうまく検出することができる

【0109】

ここで、発明者らは、キメラTSH受容体(TSHR)を発現し、かつ2008年8月7日に公開された米国特許出願公開第2008-0187942号明細書において記載される、同じトランスジェニック細胞CHO細胞株(CHO-MC4)を使用して、甲状腺刺激免疫グロブリン(TSI)および甲状腺阻害免疫グロブリン(TBI)の両方を検出するためのアッセイについて記載する。

40

【0110】

方法：阻害活性を検出するために、CHO-MC4細胞を、抗TSHR阻害MAbまたはヒト血清サンプルと混合したウシTSH(bTSH)により誘導した。阻害活性は、bTSHのみによる誘導と比べた、ルシフェラーゼ発現の抑制パーセントとして定義した。MAb K1-70およびM-22は、RSR(Cardiff, U.K.)から購入した。すべてのサンプルはまた、TSHR自己抗体(TRAb)(ELISA、Kronus(商標))およびTSI(Thyretain(商標))についても測定した。

【0111】

結果：bTSHにより刺激されたCHO-MC4細胞のルシフェラーゼ発現は、用量依

50

存的な方式で、阻害M A b K 1 - 7 0 に応じて減少した。5 0 の甲状腺機能正常コントロール血清は、7 ~ 5 2 % の抑制を示し、発明者らが、5 0 % 抑制について事前の9 5 パーセントイルカットオフを確立するのを可能にした。自己免疫性甲状腺機能低下症を有する患者由来のT R A b ポジティブおよびT S I ネガティブ血清は、ルシフェラーゼ発現をバックグラウンドレベル(1 0 0 % の抑制)まで低下させた。階段希釈実験は、1 : 2 0 0 までのこれらのサンプルにおける阻害活性の力価を実証した。T B I バイオアッセイは、K 1 - 7 0 M A b によるT R A b アッセイよりも、2 0 倍を超えて高感度であり、1 . 3 4 + / - 0 . 0 9 n g / m l のI C 5 0 対 2 9 . 7 3 + / - 3 . 2 7 n g / m l のI C 5 0 を示した。

【0 1 1 2】

10

T B I バイオアッセイはまた、T S I を検出することもできた。刺激M A b (M - 2 2) またはT S I ポジティブ血清を使用すると、発明者らは、b T S H のみで見られるものを上回るルシフェラーゼ発現、つまりネガティブな抑制を観察した。両方のアッセイにおけるM - 2 2 刺激活性についての用量 - 応答は、それぞれ、T S I およびT B I アッセイにおける0 . 1 4 n g / m l および0 . 1 6 n g / m l の5 0 % 有効濃度(E C 5 0) と本質的に同一であった。両方のアッセイにおいて試験したT S I ポジティブ血清の階段希釈もまた、等価な用量 - 応答曲線を示した。

【0 1 1 3】

A . 段階希釈M 2 2 またはT S I ポジティブ患者血清によるT B I アッセイ

【0 1 1 4】

20

甲状腺刺激モノクローナル抗体M 2 2 またはT S I ポジティブ血清を段階希釈し、C H O - M C 4 細胞を使用し、本発明のT B I アッセイを使用して試験した。結果は図6である。図6は、本発明のT B I アッセイが、甲状腺刺激免疫グロブリン(T S I) を検出することができることを両方の希釈曲線が実証することを示す。

B . 1 7 1 T S I ポジティブ血清サンプルを使用するT S I およびT B I アッセイの間の相関

【0 1 1 5】

本実験において、1 7 1 T S I ポジティブ血清を調製し、T S I またはT B I アッセイで同時に試験した。結果を図7に示す。

【0 1 1 6】

30

結果は、T S I およびT B I アッセイの間の高い相関を示し($R^2 = 0.9$)、T B I アッセイが、T S I ポジティブ血清を検出するために使用することができることを示す。

【0 1 1 7】

実施例7

本発明の二重バイオアッセイ方法は、甲状腺を刺激するものおよび甲状腺の刺激を阻害するものに、抗T S H R 自己抗体を区別することができる

【0 1 1 8】

本実験において、甲状腺刺激モノクローナル抗体M 2 2 および甲状腺阻害モノクローナル抗体K 1 - 7 0 を、1 0 0 : 0、9 0 : 1 0、8 0 : 2 0 ~ 0 : 1 0 0 などのような様々な比とともに混合し、C H O - M C 4 細胞を使用して、本発明のT B I アッセイで試験した。結果を図8に示す。

40

【0 1 1 9】

図8は、混合物中のK 1 - 7 0 の部分が、0 から1 0 0 % に増加すると(またはM 2 2 が1 0 0 から0 パーセントに)、T B I 抑制%は、マイナス1 0 0 % からプラス1 0 0 % まで次第に増加する。このことにより、T B I アッセイにおいて、それが、ネガティブな抑制が結果として生じるように、甲状腺刺激抗体を検出することができるだけでなく、阻害抗体をも示すことを示す。

【0 1 2 0】

実施例8

T B I および / またはT S I を検出するための本発明の二重バイオアッセイの感度

50

【 0 1 2 1 】

以下の結果は、血清サンプルにおける T B I および / もしくは T S I を検出するための (表 6) またはモノクローナル抗体 M 2 2 および K 1 - 7 0 を使用した場合の (表 5 および 7)、本発明の二重バイオアッセイの感度を示す。

【 0 1 2 2 】

【 表 6 - 2 】

表6. 様々な比の甲状腺刺激モノクローナル抗体M22および甲状腺阻害モノクローナル抗体K1-70による TBIアッセイ

	*M22のみ										**K1-70のみ
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%

* 0.8 ng/ml M22 **5 ng/ml K1-70

10

【 0 1 2 3 】

【 表 7 】

表7. TSIポジティブ血清サンプルによるTBIおよびTSIの間の比較

	TSIポジティブ血清サンプル											
希釈液	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%

20

【 0 1 2 4 】

【 表 8 】

表8. 甲状腺刺激モノクローナル抗体M22によるTBIおよびTSIの間の比較

	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%

【 0 1 2 5 】

上記の本明細書において言及される刊行物および特許はすべて、参照によって本明細書において組み込まれる。本発明の記載される方法および系の様々な修飾および変形は、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、当業者らに明らかになるであろう。本発明は、特定の好ましい実施形態に関して記載したが、主張される本発明がそのような特定の実施形態に不当に限定されないことが理解されたい。実際、当業者らに明らかな、本発明を実行するための記載されるモードの様々な修飾は、以下の請求項の範囲内にあることが意図される。

30

【図3】

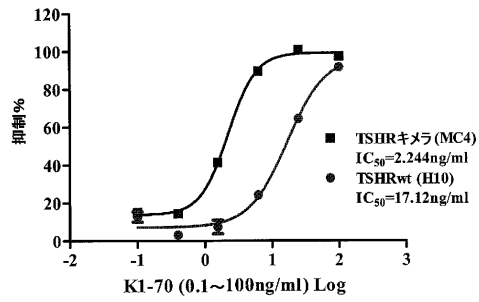


Figure 3

【図5】

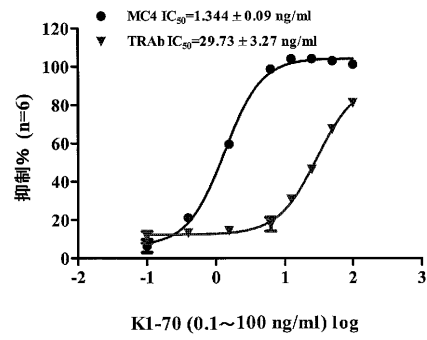


Figure 5

【図4】

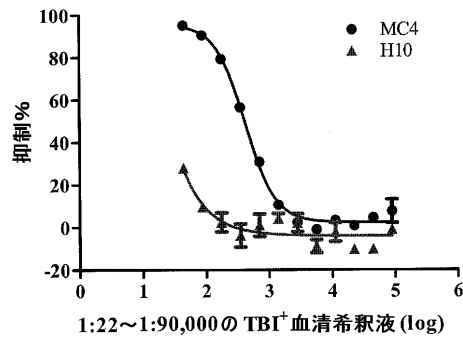
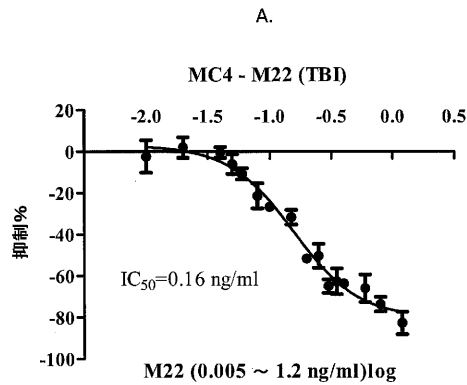


Figure 4

【図6】



B.

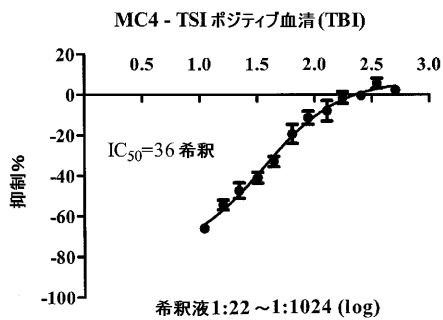


Figure 6

【図7】

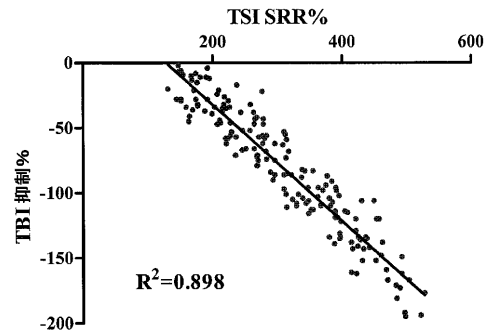


Figure 7

【図8】

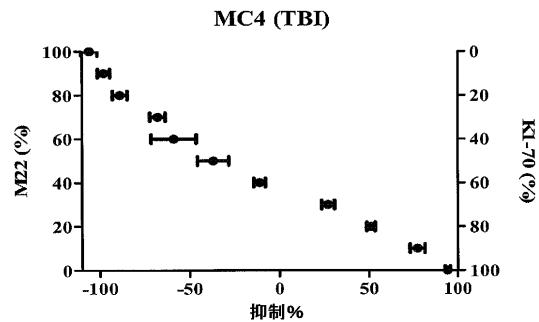


Figure 8

【 図 9 】

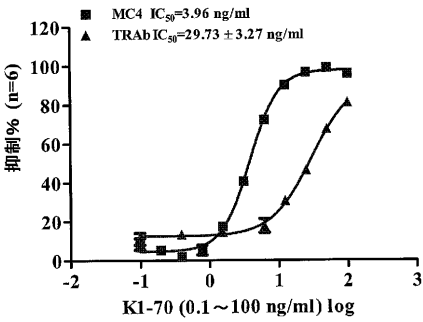
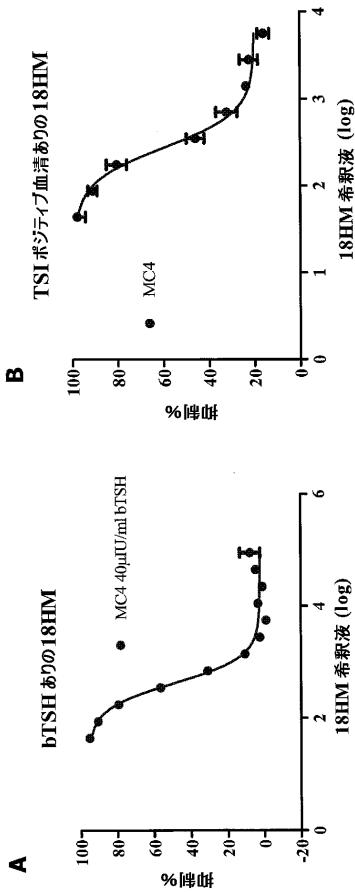


Figure 9

【 図 10 】



【 配列表 】

0005908590000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 リ, ユンシェン

アメリカ合衆国 オハイオ 45701, アセンズ, マリガン ロード 62

(72)発明者 オリボ, ボール ディー.

アメリカ合衆国 ミズーリ 63105, セント ルイス, ウェスト ポロ ドライブ 639

(72)発明者 キム, ジェキュン

アメリカ合衆国 オハイオ 45701, アセンズ, ノース シャノン アベニュー 20

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 米国特許出願公開第2009/0325177(US, A1)

N. J. JORDAN, A luminescent bioassay for thyroid blocking antibodies, Clinical Endocrinology, 2001年, Vol.54, Pages 355-364

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/02

C12N 15/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

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	JP5908590B2	公开(公告)日	2016-04-26
申请号	JP2014529656	申请日	2011-09-09
申请(专利权)人(译)	Kuideru公司		
当前申请(专利权)人(译)	Kuideru公司		
[标]发明人	リユンシェン オリボポールディー キムジェキユン		
发明人	リ, ユンシェン オリボ, ポール ディー. キム, ジェキユン		
IPC分类号	C12Q1/02 C12N15/09 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/564 G01N33/566 G01N33/76 G01N2333/723 G01N2333/726 G01N2800/046		
FI分类号	C12Q1/02 C12N15/00.ZNA.A G01N33/53.N		
代理人(译)	夏木森下 飯田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	13/228705 2011-09-09 US		
其他公开文献	JP2014529993A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了用于检测抑制甲状腺激素的免疫球蛋白 (TBI) 的组合物和方法。该方法对TBI敏感且特异，可用于TBI和TSI的双重检测。该组合物和方法可用于诊断与TBI和/或TSI的存在相关的疾病，监测疾病和/或治疗方案，治疗剂，疫苗等的进展，以及临床医生做出治疗决定它很有用。

(21) 出願番号	特願2014-529656 (P2014-529656)	(73) 特許権者	504195071
(86) (22) 出願日	平成23年9月9日 (2011. 9. 9)		クイデル コーポレーション
(65) 公表番号	特表2014-529993 (P2014-529993A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
(43) 公表日	平成26年11月17日 (2014. 11. 17)		21, サン ディエゴ, マクケラー
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/050976		コート 10165
(87) 国際公開番号	W02013/036239	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成25年3月14日 (2013. 3. 14)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	平成26年8月8日 (2014. 8. 8)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	13/228, 705		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成23年9月9日 (2011. 9. 9)	(74) 代理人	100181674
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		(74) 代理人	230113332
			弁理士 山本 健策

最終頁に続く