

(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2017-519992

(P2017-519992A)

(43) 公表日 平成29年7月20日 (2017.7.20)

| (51) Int.Cl.                        | F I                   | テーマコード (参考) |
|-------------------------------------|-----------------------|-------------|
| <b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>       | GO 1 N 33/53 N        | 4 B O 6 3   |
| <b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>      | GO 1 N 33/543 5 4 1 A | 4 H O 4 5   |
| <b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>       | GO 1 N 33/543 5 4 5 A |             |
| <b>CO 7 K 19/00 (2006.01)</b>       | C 1 2 Q 1/02 Z N A    |             |
| <b>CO 7 K 14/705 (2006.01)</b>      | CO 7 K 19/00          |             |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁) 最終頁に続く |                       |             |

|               |                              |          |                         |
|---------------|------------------------------|----------|-------------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2016-574174 (P2016-574174) | (71) 出願人 | 516376330<br>ルース, ウルリヒ  |
| (86) (22) 出願日 | 平成27年6月17日 (2015.6.17)       |          | LOOS, Ulrich            |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成29年2月14日 (2017.2.14)       |          | ドイツ連邦共和国, 89081 ウルム,    |
| (86) 国際出願番号   | PCT/EP2015/063627            |          | ヴィリ=エックシュタイン=ヴェーク 9     |
| (87) 国際公開番号   | W02015/193387                | (74) 代理人 | 100139594<br>弁理士 山口 健次郎 |
| (87) 国際公開日    | 平成27年12月23日 (2015.12.23)     | (74) 代理人 | 100185915<br>弁理士 長山 弘典  |
| (31) 優先権主張番号  | 14173341.0                   | (74) 代理人 | 100194973<br>弁理士 尾崎 祐朗  |
| (32) 優先日      | 平成26年6月20日 (2014.6.20)       | (74) 代理人 | 100090251<br>弁理士 森田 憲一  |
| (33) 優先権主張国   | 欧州特許庁 (EP)                   |          |                         |
| (31) 優先権主張番号  | 102014011653.0               |          |                         |
| (32) 優先日      | 平成26年8月11日 (2014.8.11)       |          |                         |
| (33) 優先権主張国   | ドイツ (DE)                     |          |                         |

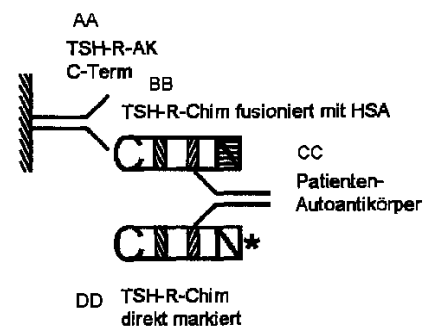
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TSH受容体に対する自己抗体の検出

## (57) 【要約】

本発明は、抗サイトロロピン受容体自己抗体を検出するための自動診断装置上で使用できるブリッジアッセイに関し、このアッセイにおいて、使用されるキメラTSH受容体は、キメラTSH受容体の細胞外部分を含み、N末端で培養細胞からのキメラTSH受容体の分泌を引き起こすタンパク質に融合されており、そしてアンカーキメラTSH受容体は常磁性粒子上に固定化される。

Abb.1



AA C-terminal TSH-R antibody  
BB Chimeric TSH-R fused to HSA  
CC Patient's autoantibodies  
DD Chimeric TSH-R directly marked

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

患者サンプルを、固相に結合した一次 T S H 受容体キメラと接触させて、前記患者サンプル中に存在する可能性がある、T S H 受容体に対する刺激型自己抗体を前記一次 T S H 受容体キメラに結合させ、  
得られた免疫複合体を二次 T S H 受容体キメラと反応させて、前記患者サンプル中に存在する可能性がある、T S H 受容体に対する刺激型自己抗体を前記二次 T S H 受容体キメラにさらに結合させ、そして  
前記自己抗体を含有する免疫複合体を検出するための反応を実行する、  
診断分析器で実施可能な、T S H 受容体に対する刺激型自己抗体の検出方法であって、  
常磁性粒子が前記固相として使用されていること、  
前記一次及び前記二次 T S H 受容体キメラが、T S H 受容体に対して刺激型の自己抗体に関する結合性エピトープを含み、そして、T S H 受容体の細胞外空間適切タンパク質への分泌に適したタンパク質と N 末端で融合していること、並びに  
前記二次 T S H 受容体キメラが、形成された前記免疫複合体を検出するためのシグナリングアミノ酸配列又は別のシグナリングマーカを含むこと  
を特徴とする、前記検出方法。

10

## 【請求項 2】

前記一次及び／又は前記二次 T S H 受容体キメラが、ヒト血清タンパク質、特にアルブミンと N 末端で融合していることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 3】

前記二次 T S H 受容体キメラが、分泌型アルカリホスファターゼと C 末端又は N 末端で融合していることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記 T S H 受容体キメラが、前記 T S H 受容体の細胞外ドメインの 21～260 番のアミノ酸又は配列番号 5 と 85 % 同一でありそして T S H 受容体刺激型の自己抗体に結合するタンパク質を含有することを特徴とする、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記 T S H 受容体キメラが、T S H 受容体の細胞外ドメインのアミノ酸 21～418 番、特にアミノ酸 21～330 番を含有することを特徴とし、遮断型又は中間型抗体に関する前記結合性エピトープが、遮断型又は中間型自己抗体に対する結合を示さない他の受容体の相当する配列に置換可能である、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の方法。

30

## 【請求項 6】

前記 T S H 受容体キメラが、配列番号 4 と少なくとも 85 % 同一であり、又は配列番号 6 と少なくとも 85 % 同一であり、又は配列番号 7 と少なくとも 85 % 同一であることを特徴とする、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 7】

シグナル放射性マーカが、分泌型アルカリホスファターゼ、ホタル若しくはガウシアルシフェラーゼ、又はペルオキシダーゼであることを特徴とする、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の方法。

40

## 【請求項 8】

シグナル放射性マーカが、アクリジン若しくはルテニウム化合物、又はフルオレセインイソチオシアネート化合物であることを特徴とする、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 9】

刺激型自己抗体の検出の場合には、T S H 受容体中の遮断型又は中間型抗体に関する結合性配列が、他のそれぞれのタイプの自己抗体に結合を示さない他の受容体の配列に置換されていることを特徴とする、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 10】

T S H 受容体に対する刺激型自己抗体に関する結合性エピトープを含有しており、そし

50

て配列番号 2、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、又は配列番号 7 と少なくとも 85 % 同一である、血清タンパク質と N 末端で融合された T S H 受容体キメラ。

【請求項 1 1】

T S H 受容体に対する刺激型自己抗体に関する結合性エピトープを含有しておりそして配列番号 2、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、又は配列番号 7 と少なくとも 85 % 同一であり、診断分析器上のブリッジアッセイにおいて常磁性粒子上に固定化されている、血清タンパク質と N 末端で融合された T S H 受容体キメラの、甲状腺ホルモン受容体 (T S H 受容体) に対する自己抗体を検出するためのさらなる T S H 受容体キメラと共にの使用。

【請求項 1 2】

常磁性粒子上に固定化された、血清タンパク質と N 末端で融合している野生型 T S H 受容体の細胞外部分を含む融合タンパク質の、甲状腺ホルモン受容体 (T S H 受容体) に対する自己抗体を決定するためのブリッジアッセイにおける使用。

【請求項 1 3】

常磁性粒子上に固定化された、分泌型アルカリホスファターゼ (S E A P) 又は別の分泌性タンパク質と N 又は C 末端で融合している野生型 T S H 受容体の細胞外部分を含む融合タンパク質の、甲状腺ホルモン受容体 (T S H 受容体) に対する自己抗体を決定するためのブリッジアッセイにおける使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、甲状腺ホルモン受容体に対する自己抗体又は自己免疫抗体の診断分析器上で実行可能な検出方法、T S H 受容体の細胞外部分を含むタンパク質から少なくとも部分的に形成されそしてブリッジアッセイにおける常磁性粒子上に固定化された T S H 受容体キメラの、前記方法におけるさらなる T S H 受容体キメラと共にの使用、並びに修飾された T S H 受容体キメラに関する。

【背景技術】

【0002】

T S H 受容体 (T S H - R) は甲状腺細胞の機能及び増殖において鍵となる役割を果たす。この受容体は G タンパク質結合糖タンパク質受容体のサブファミリーの一員であり、またそれは黄体形成ホルモン／絨毛性ゴナドトロピン (L H / C G R) 及び卵胞刺激ホルモン (F S H R) の受容体を含む。このサブファミリーの受容体は大きな N 末端細胞外ドメインを有し、それは、リガンド結合に関して必須の意義を持ち、そしてシグナル伝達に参与していることが示されている。T S H R シグナルの伝達は主にアデニル酸シクラーゼの活性化を介してなされ、その結果、細胞内 c A M P レベルの増加がもたらされる。

【0003】

T S H 受容体の主要な興味の一部は、それが、T S H 受容体に対する自己抗体の出現を伴う甲状腺自己免疫疾患の主要な自己抗原としての役割を果たしていることに帰す。このような甲状腺自己免疫疾患は、甲状腺機能亢進症をもたらす自己免疫疾患でありそして最も多発するヒトの自己免疫疾患の一つであるバセドー氏病を含む。バセドー氏病はアデニル酸シクラーゼの活性化及びその結果もたらされる c A M P の増加により引き起こされる。その結果、甲状腺機能亢進症、甲状腺腫形成、そして時には目の変化がもたらされる。しかしながら、T S H 受容体に対する自己抗体は遮断型特性を有し、それによりアデニル酸シクラーゼ及び c A M P を阻害する。この場合には甲状腺の機能亢進が生じる。刺激型及び遮断型の自己抗体が疾患をもつ患者に同時に生じることもまた可能であり、この場合、原則として刺激型自己抗体の寄与が優勢である。

【0004】

前記自己免疫抗体の検出のために、これまでかなりの期間、c A M P 増加を測定するバイオアッセイが使用されてきた。前記測定方法は非常に時間を要する。更に、このバイオアッセイは、擬陽性の結果を生じる可能性があるので、信頼性に欠ける。前記の記載の範

10

20

30

40

50

囲において、この型の測定方法は、TSH受容体に対する自己抗体の*in-vitro*決定方法から、型を判別するためのバイオアッセイであると説明される。市販の自己抗体の*in-vitro*検出方法では、ブタ甲状腺膜から抽出されたTSH受容体を用いられている（第一世代*in-vitro*方法）。TSH受容体に対する自己抗体の検出用の他の試験では、完全なヒト組換えTSH受容体タンパク質（野生型）が競合試験で使用されている。

#### 【0005】

Thyroid, Vol. 7 (1997) 867-877は、TSH受容体における刺激型及び遮断型自己抗体のエピトープを記載している。刺激型自己抗体に関する機能性エピトープの大部分は受容体タンパク質のアミノ酸8～168に存在し、そして遮断型自己抗体に関する機能性エピトープの大半は受容体タンパク質のアミノ酸261～370の範囲に存在している。活性測定には、前記のバイオアッセイが使用される。

#### 【0006】

WO01/27634A1は、異なる特異性を有する自己抗体の同時的な検出に関する定量的方法を最初に提供しており、それは迅速な再現性及び高精度での実行が可能である。この目的のために、TSH受容体キメラが使用され、それは自己抗体が結合する個々の配列が、Gタンパク質結合受容体のクラスに由来する他の受容体の相当する配列と置換しているという点で野生型受容体とは異なる。TSH受容体キメラは、別の点では、完全なTSH受容体を含む。しかし、測定コストが高い。遠心による分離は、前記方法を通常的に使用するには余りに面倒である。また、TSH受容体キメラが非常に安定であることはないことから、前記試験は氷浴又は4℃で行わなければならない。同様の技術はWO01/63296A1に教示されており、その中で検出用サンドイッチ技術の使用が提案されている。しかし、ここで提案されている試験材料を用いたのでは、原則として、非特異的結合が非常に高いことが明らかになった。前記の二つの特許出願に記載されている知見に基づく自己抗体検出用試験は、市場では入手できない。

#### 【0007】

WO00/00590A1には、一般的に診断及び治療に適しているC末端がトランケートされたTSH受容体が記載されている。WO2007/036511A1には、TSH受容体に対する自己抗体を検出するためのいわゆるブリッジアッセイが記載されており、これは初めて自動装置で実施することができるものである。このブリッジアッセイを行うためには、TSH受容体キメラを2種類使用し、シグナル生成受容体キメラはTSH受容体の細胞外領域のみを含み、そしていわゆるアンカー受容体キメラはホロ酵素である。2014年の春から、この方法は、甲状腺ホルモン受容体に対する自己抗体の自動診断のために世界中で提供され、いわゆるImmulate（登録商標）分析器で行われる。アンカー受容体は、例えば固相としての直径約6mmのプラスチック粒子上に結合する。

#### 【発明の概要】

#### 【0008】

WO2007/036511A1の方法を、常磁性粒子を固相として作用する全自動分析装置へ適用することもまた望ましい。WO2007/036511A1のTSH受容体キメラを用いた試験及びTSH受容体の細胞外ドメインのみを含む2種類のTSH受容体を用いた試験のいずれを用いても、常磁性粒子を用いて作用する全自動分析装置において、例えばADVIA Centaur分析器又はARCHITECT分析器において、検出方法を実行することを可能にはできない。

#### 【0009】

WO2007/036511A1に記載されたブリッジアッセイを実施するための2種類の細胞外TSH受容体キメラ（トランケートされたTSH受容体キメラ）をアンカーとして及びシグナル受容体として使用すると、TSH受容体に対する自己抗体を検出するための感度及び特異性が低すぎる 것이示された。このTSH受容体キメラの群を用いて実施した測定は、実施例3（比較例）に示すように、再現性がないことが判明した。

#### 【0010】

しかし、WO 2007/036511 A1に記載されている方法と全く同じ正確さ及び有効性を有する甲状腺ホルモン受容体に対する自己抗体を検出しそしてさらに常磁性粒子を固相として使用する全自動分析器でも可能である方法を提供することが非常に望ましい。

#### 【0011】

この問題は、診断分析器で実施可能な、TSH受容体に対する刺激型自己抗体の検出方法によって解決され、この方法において、患者サンプルを、固相に結合した一次TSH受容体キメラと接触させて、患者サンプル中に存在する可能性がある、TSH受容体に対する刺激型自己抗体を一次TSH受容体キメラに結合させ、得られた免疫複合体を、二次TSH受容体キメラと反応させて、患者サンプル中に存在する可能性がある、TSH受容体に対する自己抗体を二次TSH受容体キメラにさらに結合させ、そして常磁性粒子が固相として使用されている自己抗体含有免疫複合体を検出するための反応を実行し、ここで、一次及び二次TSH受容体キメラが、TSH受容体に対して、遮断型又は中間型ではなく刺激型の自己抗体に関する結合性エピトープを含み、そして、TSH受容体の細胞外空間への分泌に適したタンパク質とN末端で融合しており、そして二次TSH受容体キメラが、形成された免疫複合体を検出するためのシグナリングアミノ酸配列又は別のシグナリングマーカを含む。

#### 【0012】

本発明のさらなる主題は、TSH受容体の細胞外空間への分泌に適したタンパク質とN末端で融合したTSH受容体キメラであり、このTSH受容体キメラは、TSH受容体に対する刺激型自己抗体に関する結合性エピトープを含有するが遮断型及び中間型自己抗体に関する結合性エピトープを有しない。前記のアミノ酸配列の例は、配列番号2、配列番号3、配列番号4、又は配列番号6と少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、そして特に好ましくは少なくとも95%同一であるものである。

#### 【0013】

また、本発明のさらなる主題は、TSH受容体キメラの使用であり、このTSH受容体キメラは、TSH受容体の細胞外空間への分泌に適したタンパク質とN末端で融合しており、そして、TSH受容体に対する、遮断型又は中間型のものではなく刺激型自己抗体に関する結合性エピトープを含有する。前記アミノ酸配列の例は、甲状腺ホルモン受容体（TSH受容体）に対する自己抗体を検出するためのさらなるTSH受容体キメラと共に、診断分析器上のブリッジアッセイにおいて常磁性粒子上に固定化されており、配列番号2、配列番号3、配列番号4、又は配列番号6と少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、そして特に好ましくは少なくとも95%同一であるものである。

#### 【0014】

本発明のさらなる主題は、TSH受容体に対する自己抗体の定量的決定のための方法における、細胞外空間へのTSH受容体の分泌に適したタンパク質、例えば、血清タンパク質とN末端で融合したTSH受容体の野生型の細胞外ドメインの使用である。

#### 【0015】

最後に、本発明の主題は、甲状腺ホルモン受容体（TSH受容体）に対する自己抗体を決定するためのブリッジアッセイにおける、アルブミン分泌型アルカリホスファターゼ（SEAP）又は別の分泌タンパク質、例えば血清とN末端又はC末端で融合した野生型TSH受容体の細胞外部分を含む、常磁性粒子上に固定化された融合タンパク質の使用である。

#### 【0016】

驚くべきことに、TSH受容体に対する自己抗体検出用のブリッジアッセイにおいて、2種類のランケートされたTSH受容体キメラを使用することが初めて可能になった。したがって、初めて、完全TSH受容体又は完全TSH受容体キメラから、野生型受容体又は受容体キメラの細胞外ドメインのみが、ブリッジアッセイにおいて、本質的に用いられる。驚くべきことに、受容体の細胞外部分がTSH受容体の細胞外空間への分泌に適したタンパク質と融合している場合、自己抗体のアンカー受容体としての、常磁性粒子上に

固定化された T S H 受容体の細胞外部分を含むタンパク質である結合された一次 T S H 受容体と、シグナル受容体としての、T S H 受容体の細胞外部分を含むタンパク質である二次 T S H 受容体キメラとが、T S H 受容体に対する自己抗体を検出するのに適していることが証明された。本発明により使用される T S H 受容体キメラは、高い貯蔵安定性、輸送安定性、容器安定性、及び高いアッセイ安定性もまた有する。これらの記載は、T S H 受容体の細胞外空間への分泌に適したタンパク質と N 末端で融合した野生型 T S H 受容体の細胞外ドメイン由来の融合タンパク質にも適用される。

【発明を実施するための形態】

【0017】

T S H 受容体は細胞質から細胞膜を経て細胞外空間に伸びている。受容体タンパク質の細胞外の一部は、T S H 及び自己抗体に対する結合部位を有する。

10

【0018】

T S H 受容体タンパク質由来の本発明による受容体キメラは、本質的に T S H 受容体の細胞外部分のみを含む。本質的には、T S H 受容体の膜部分のアミノ酸の 40 未満、好ましくは 30 又は 20 未満、特に好ましくは 10 未満及び 0 に至るまでが存在することを意味する。これは、本発明による方法において使用される、いわゆる一次 T S H 受容体キメラ及び付加的に使用されるいわゆる二次 T S H 受容体キメラにも適用される。これは、野生型の T S H 受容体を有するタンパク質を用いた場合にも適用される。T S H 受容体キメラは、例えば、T S H 受容体の N 末端部分から記載して 21 ~ 418 のアミノ酸、好ましくは T S H 受容体キメラの細胞外ドメインの 21 ~ 380、特に好ましくは 21 ~ 350 又は 330 を含むことができる。しかし、21 ~ 260 のアミノ酸のみを含有する T S H 受容体の細胞外ドメインも、本発明に用いることができる。より少ないアミノ酸の細胞外ドメインが使用される場合、エピトープの結合挙動及び T S H 受容体キメラの安定性が変化する。同様に、野生型の T S H 受容体の細胞外ドメインを有するタンパク質にも適用される。この場合、我々は、野生型とは、刺激型、遮断型、又は中間型の自己抗体に結合するためのアミノ酸配列のいずれもが置換されていない、T S H 受容体の細胞外ドメインを意味すると理解する。

20

【0019】

本発明による T S H 受容体キメラのアミノ酸数が多すぎると、生産の間における、生成に使用される組換え細胞から細胞外空間への T S H 受容体キメラの分泌が悪くなる。

30

【0020】

一次及び場合により二次 T S H 受容体キメラは、受容体の細胞質部分のアミノ酸配列をさらに含むことができる。これに対する好ましい選択肢は、T S H 受容体の細胞質部分の 698 ~ 725 のアミノ酸又はその部分配列である。また、これは、一次 T S H 受容体キメラを常磁性粒子上に固定化するために有利であることが証明された高度に免疫原性のアミノ酸配列である。

【0021】

本発明の方法を実施するためには、受容体キメラの細胞外部分又は野生型 T S H 受容体の細胞外ドメインが、受容体キメラの分泌を引き起こすタンパク質と融合することが必須であることが判明した。前記のタンパク質は、例えば、哺乳動物の血清タンパク質である。アルブミンが好ましく使用される。融合は、好ましくは N 末端で行われる。本発明により使用される一次 T S H 受容体キメラは、特に好ましくは、血清タンパク質を含有する。好ましくは、アルブミンが使用され、これは、T S H 受容体の細胞外ドメインとの融合後に T S H 受容体キメラを安定化させ、そして受容体キメラが生成される細胞から本発明で使用される T S H 受容体キメラを分泌させる結果となる。野生型 T S H 受容体の細胞外ドメインと血清タンパク質との融合タンパク質についても同様である。本発明により使用される一次 T S H 受容体キメラはまた、T S H 受容体キメラの安定化及び細胞からの分泌を確実にするものである限り、血清タンパク質、特にアルブミンタンパク質の一部の配列のみを含むこともできる。この手段により、T S H 受容体に安定性が付与される。

40

【0022】

50

本発明により使用される二次TSH受容体キメラは、本発明により使用される一次TSH受容体キメラと本質的に同じ構造を有する。本発明の方法における二次TSH受容体キメラがシグナルエミッターの機能を有することから、それは、その点に関して、一次TSH受容体キメラ（アンカー受容体）とは異なるものでなければならない。このために、それはマーカーを有する。マーカーは、二次TSH受容体キメラにN末端又はC末端で融合させることができる。好ましくは、マーカーは、二次TSH受容体キメラにC末端で融合される。本発明の好ましい実施態様によれば、シグナルTSH受容体キメラは、N末端分泌型アルカリホスファターゼを有する。分泌型アルカリホスファターゼを、検出反応にも使用することができる。検出が別の反応を介して行われたい限り。二次TSH受容体キメラのC末端部分のさらなる検出用修飾を省略することができる。

10

#### 【0023】

したがって、好ましくは、本発明によるTSH受容体キメラは、細胞質部分が完全に又は部分的に存在せず、そしてTSH野生型受容体の膜部分が好ましくは完全に存在しないものである。本発明のTSH受容体キメラの細胞外の一部を、以下に説明するように修飾することがさらに好ましい。

#### 【0024】

刺激型自己抗体を検出する場合には、好ましくは、TSH受容体に対する遮断型又は中間型自己抗体に結合する配列を置換している受容体キメラが用いられる。

#### 【0025】

置換のために、好ましくは、特定の2つの他のタイプの自己抗体について本質的に結合を示さない別の受容体の相当する配列が使用される。前記の相当する配列は、例えば、ラットのLG-CG受容体の配列であることができる。結果として、本発明に従って使用されるTSH受容体キメラにおいて、刺激型、中間型及び／又は遮断型自己抗体が結合するエピトープを置換することができる。これらの受容体キメラは、Biochem. Biophys. Res. Commun. (1991), 179:70-77又はWO01/27634A2に従い構築することができる。TSH受容体キメラの作製に関する両文献を参照のこと。

20

#### 【0026】

刺激型自己抗体の検出の場合、TSH受容体タンパク質中の遮断型抗体及び中間型抗体に関する結合配列は、それぞれの他の型の自己抗体の結合を引き起こさない別の受容体の配列に置換される。刺激型自己抗体を検出するために使用されるキメラにおいて、TSH受容体のアミノ酸261～370は、好ましくは、ラットLH-CGRの相当するアミノ酸261～329によって置換されることができる。

30

#### 【0027】

本発明によるTSH受容体キメラとTSH受容体タンパク質の野生型の細胞外ドメインを有する相当する融合タンパク質とに特に有利であるのは、それらが細胞由来のTSH受容体キメラの分泌のためのアミノ酸配列と融合していることであり、従って、組換え細胞におけるそれらの産生の間、それらは細胞外空間に分泌される。TSH受容体キメラを得るための細胞の崩壊はもはや必要ではない。このように、本発明により使用されるべきTSH受容体キメラは、本質的に、タンパク質を得るための細胞崩壊の場合に生じる細胞成分の汚染なく、高純度で得ることができる。

40

#### 【0028】

本発明により使用される二次TSH受容体キメラ又は野生型TSH受容体（シグナル受容体）の細胞外ドメインを有する相当する融合タンパク質を、検出のために修飾することができ、例えば、所望のアッセイ設計に応じて、それをマーカーと融合させることができる。標識は、検出可能なシグナルを直接的又は間接的に提供するような性質を有することができる。本発明の意味における直接標識は、免疫複合体の検出のために検出可能なシグナルを直接提供するマーカーを用いたTSH受容体キメラの標識である。本発明の意味における間接標識は、例えば、TSH受容体キメラと検出に適した二次標識抗体によって認識される免疫原性ペプチド配列との融合であることができる。

50

## 【0029】

マーカーを、融合又は化学結合によって、TSH受容体キメラ、又は野生型TSH受容体の細胞外ドメインを有する相当する融合タンパク質、又は二次抗体と結合させることができる。適切な標識は、例えば、アルカリホスファターゼ（AP）、分泌型アルカリホスファターゼ（SEAP）、ホタル若しくはガウシアルシフェラーゼ及びペルオキシダーゼなどの酵素、又はアクリジン色素、蛍光若しくはバイオ／化学発光物質などの色素を介してもたらされる。前記酵素の場合、それらをコードするヌクレオチド配列を、好ましくは、二次TSH受容体キメラ（シグナル受容体）のヌクレオチド配列と融合する。適切な標識は、例えば、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ビオチン化及びストレプトアビジンを用いてさらにもたらされる。好ましい実施態様では、二次TSH受容体キメラは、検出のために分泌型アルカリホスファターゼとN末端で融合することができる。

10

## 【0030】

さらに好ましい実施態様では、二次TSH受容体キメラは、アクリジン染料を用いてC末端で直接標識されている。

## 【0031】

本発明による方法において、いわゆる一次TSH受容体キメラ、又は野生型TSH受容体の細胞外ドメインを有する相当する融合タンパク質は、免疫複合体形成中に常磁性固相に結合される。TSH受容体キメラのこの固相への結合は、例えば、TSH受容体キメラのC末端エピトープに対する固定化抗体を介してもたらしすることができる。前記の抗体は、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体であることができる。例えば、固定化抗体は、一次TSH受容体キメラの細胞質部分のアミノ酸698-725に対するものであることができる。

20

## 【0032】

二次抗体をまた、TSH受容体キメラに対する自己抗体の結合を検出するために使用することができる。二次抗体を、固定化抗体に加えて存在させることができる。それは、モノクローナル又はポリクローナル抗体であることができる。

## 【0033】

適切な固相は常磁性粒子、例えば、常磁性チューブ、常磁性プレートレット、及び常磁性粒子を含むが、常磁性粒子の他の形態も含む。このような常磁性粒子は当業者に公知であり、例えば、Invitrogen Dynal ASの商標名Dynabeads（登録商標）として市販されている。本発明により固相として使用される常磁性粒子は、例えば0.5  $\mu\text{m}$ ～5  $\mu\text{m}$ の直径を有することができる。粒子は、常磁性又は超常磁性であることができる。

30

## 【0034】

本発明のTSH受容体キメラは、凍結乾燥して保存することができる。それらは、モノクローナル又はポリクローナル抗体を介して固相に結合した凍結乾燥形態で保存することができる。検出反応のために、凍結乾燥成分の再構成は、アッセイ緩衝液に溶解することによって行われる。

## 【0035】

本発明によるTSH受容体キメラ、又は野生型TSH受容体の細胞外ドメインを有する相当する融合タンパク質（以下、野生型変異体と称する）は、溶解形態（アッセイ及びリザーバ安定性）において高い安定性を有する。4℃では、それらは6～7日間安定したままであり、そして診断分析器のキャリブレーション後にさらに2～3週間使用することができる。37℃の温度で、本発明による溶解されたTSH受容体キメラは、6時間の間安定したままである。これらの条件は、成分が4℃で保存されている診断分析器において本発明による検出方法の実行のために適している一方で、試験反応は37℃でも問題なく進行することができ、したがって特にAdvia Centaur分析器もまた適している。これとは対照的に、ホローTSH受容体キメラは、4℃で6日まで、24℃で48時間まで、そして37℃で3時間のみ安定したままである。

40

## 【0036】

50



本発明の方法を実施するためには、いずれの場合にも、患者サンプルを、一次固定化 T S H 受容体キメラ（アンカー受容体）、及び二次 T S H 受容体キメラ（シグナル受容体）又はその野生型変異体で処理し、そして関連する自己抗体について試験する。

【0037】

本発明による方法の実施態様の例を、図面を参照して以下に説明する。

【図面の簡単な説明】

【0038】

図 1 及び 2 は、本発明の方法の生成物として常磁性粒子上に固定された免疫複合体を図式的に示す。

【0039】

図 3、特に 3. 1 及び 3. 2 は、本発明による方法において使用可能な一次 T S H 受容体キメラ（アンカー受容体）を図式的に示す。これは、ヒトアルブミン及び h T S H R アンカーエピトープの配列と融合したラット L H / C G 受容体による部分配列置換を有する部分配列 h T S H R のコンストラクトである。切断部位が記載されている。アミノ酸の番号は、ホロ受容体のそれぞれのアミノ酸又は塩基に関する。

【0040】

比較例の結果を図 4 に示す。結果を比較例において説明する。

【0041】

図 5 は、振盪なしでの 37℃ 及び 4℃ のインキュベーションにおけるアンカー抗体を用いた常磁性粒子上に固定されたアンカー受容体のアッセイ安定性を示す。3 時間及び 3. 75 時間後のそれぞれにおいて、アンカー受容体の約 80% 又はそれ以上がまだ損なわれていない。

【0042】

図 6 は、66. 5 IU / L による患者血清の希釈系列の直線性を示す。測定を本発明による方法によって行った。相対光単位 R L U を y 軸上に設定し、自己抗体の濃度を、x 軸上の 1 リットルあたりの国際単位として測定した。

【0043】

図 7 は、E P 1 9 2 9 3 1 1 B 1 の s T R A B - D E R A ブリッジアッセイを用いてキャリブレーションした標準シリーズの測定値を示す。キャリブレーションは、マイクロタイタープレート試験における値を用いて行った。この結果は、本発明によるブリッジアッセイにより、高い直線性もまた達成されることを示している。

【0044】

図 8 は、本発明による方法の機能的感度を証明するために役立つ。ここでの機能的感度は、アッセイ間変動の 20% の限界に相当する。114 の血清及び 17 の血清プール（多重決定、n = 3 ~ 7）の決定に基づいて、暫定的機能的感度は約 1. 9 MB（マグネットビーズ）\_\_ U / L である。手作業により増加したアッセイの変動を考慮に入れると、機能的感度は、代わりに、アッセイ間変動の限界を 30% として評価することができる。この場合、その値は約 1. 7 MB \_\_ U / L である。したがって、本発明による方法は非常に良好な感度を有する。

【0045】

図 9 は、磁気ビーズアッセイ（MB 値）及び s T R A b 値（114 の血清及び 17 の血清プールからの 463 の個々の結果）を用いた結果間の良好な相関を示す。

【0046】

配列番号 1 は、T S H 受容体キメラの細胞外部分、及び非翻訳配列を含むヒト血清アルブミンと N 末端で融合した T S H 受容体キメラの細胞質アミノ酸配列を有するアンカー受容体のヌクレオチド配列を示す。

【0047】

配列番号 2 は、配列番号 1 のアミノ酸配列を示す。配列番号 1 及び 2（一次 T S H 受容体キメラ又はアンカー受容体）において、ヌクレオチド 1 ~ 618（アミノ酸 1 ~ 206）は、H S A ペプチド配列を表し、ヌクレオチド 619 ~ 1553（アミノ酸 207 ~ 5

10

20

30

40

50

16) は、キメラのアミノ酸 21～330 の TSHR 配列を表し、ヌクレオチド 1345～1553 (アミノ酸 446～516) は、キメラのアミノ酸 261～330 の LHR 配列を表し、そしてヌクレオチド 1554～1637 (アミノ酸 516～543) は、(TSH 受容体のヌクレオチド 743～763 によってコードされる) TSH 受容体の細胞質部分由来の高度に免疫原性のエピトープを表す。

#### 【0048】

配列番号 3 は、TSH 受容体の細胞外部分の一部配列を示す。配列番号 5 において、アミノ酸 1～240 は、TSH 受容体の細胞外部分のアミノ酸 21～260 を表す (ECD 260)。

#### 【0049】

配列番号 4 は、TSH 受容体キメラの細胞外部分のさらなる部分配列を示す。配列番号 4 において、アミノ酸 1～310 は、TSH 受容体の細胞外部分のアミノ酸 21～330 を表し、ここで、アミノ酸 241～310 は、ラット LH-CGR の相当するアミノ酸 261～330 で置換されている (ECD330)。

#### 【0050】

配列番号 5 は、野生型 TSH 受容体の細胞外部分由来の融合タンパク質、及び非翻訳配列を含むヒト血清アルブミンと N 末端で融合した細胞質のアミノ酸配列のヌクレオチド配列を示す。

#### 【0051】

配列番号 6 は、野生型 TSH 受容体の細胞外部分由来の融合タンパク質のアミノ酸配列、及び非翻訳配列を含むヒト血清アルブミンと N 末端で融合した細胞質のアミノ酸配列を示す。

#### 【0052】

以下、マイクロタイタープレートのマトリックスとしての常磁性マイクロビーズ上の刺激型 TSH-R 自己抗体の直接決定のための本発明によるインビトロアッセイの実装が記載される。

#### 【0053】

図 3 に示すように、融合タンパク質を生産するための遺伝子工学により、固相としての常磁性マイクロビーズ上のアンカー受容体としてコンストラクトを生成し、これは中央にアミノ酸 (AA) 21～330 による TSHR ECD (細胞外ドメイン) を含有する。これは、AA 261～330 を相当する LH/CGR 配列によって置換して結果的に遮断型抗体もまた測定されないキメラとして存在する。C 末端では、AA 698～725 の細胞質 TSHR 配列が融合しており、これにモノクローナル抗体を結合させ常磁性マイクロビーズ上に固定する。N 末端では、ヒト血清アルブミン (AA 1-206) の部分配列が融合される。この HSA-ECD330-キメラは、培地中の培養細胞から融合タンパク質全体を放出するための分泌タンパク質として働く。その結果、自己抗体結合のためのアンカー受容体の製造がより容易になる。この分泌された受容体キメラは、細胞からの抽出後に細胞成分による汚染によって汚染された完全な野生型キメラとは、高い純度である点で異なる。分泌の利点と同様に、この融合タンパク質は、常磁性マイクロビーズ上にカップリングすると、緩衝液中及び緩衝液と患者血清の混合物中での安定性が著しく高いことが初めて示されることができ。驚くべきことに、ヒト血清アルブミン (HSA) は、常磁性マイクロビーズと抗体を介して結合した TSHR コンストラクトとからなるカップリング生成物が 4℃ で数日間溶解した状態で分析装置上で安定 (機能性) を維持することから、特に重要である。これらは、固相として常磁性マイクロビーズを使用するアッセイのための必要な前提条件である。これらの溶解条件下では、抽出物として存在する完全なキメラ野生型受容体は非常に迅速にその機能を失い、したがって溶液中における常磁性マイクロビーズに結合した分析装置には適していない。驚いたことに、HSA は、融合構築物 HSA-ECD330-キメラの安定性に関与している。

#### 【0054】

第二アッセイ工程では、患者の血清を緩衝液中で、記載のカップリング生成物 HSA-

10

20

30

40

50

E C D 3 3 0 キメラを用いてインキュベートする。次いで、常磁性マイクロビーズを磁石上に結合させ、その結果、測定の感度に影響を及ぼす因子が洗浄によって除去される。

#### 【0055】

第三アッセイ工程では、組み換え技術により作製された融合タンパク質として存在する検出受容体を反応容器に加える。それは、アミノ酸261～266がまた相当するLH／CG配列によって置換されているキメラとして、中心にECDを含む。検出受容体は、SEAP（AA1～520）とN末端で融合されている。形成された反応複合体は、図1及び図2に模式的に示すように現れる。液体（試料、試薬、洗浄緩衝液）を反応容器から除去するとき、磁石は常に活性化される。定量化は、SEAP活性化を介した化学発光によって行うことができ、あるいは、検出受容体をアクリジニウムエステルで標識することができる。

10

#### 【0056】

本発明の一実施態様によれば、刺激型自己抗体に結合するためのTSH受容体として、TSH受容体キメラの代わりに、野生型受容体の細胞外ドメインを有するTSH受容体タンパク質をTSH受容体として用いる測定を行い、刺激型自己抗体の決定を行うこともできる。刺激型自己抗体のTSH受容体キメラによる測定で決定された値は、それによって決定された測定値から差し引くことができる。このようにして、非刺激型自己抗体、例えば、遮断型及び中間型自己抗体もまた捕捉される。これは、甲状腺自己免疫疾患の臨床診断にとって重要であることができる。

#### 【0057】

20

治療を必要とする重度の甲状腺機能低下症を明らかに有している患者由来の遮断型自己抗体を有する血清の分析に本発明による方法を用いる場合、これらは本発明による方法では検出できない。これはまた、本発明による方法の特異性を指摘する。

#### 【0058】

本発明は、以下の実施例によってさらに説明される。

#### 【0059】

《実施例1（TSH受容体キメラの取得）》

材料

TSH受容体キメラをクローニングするために、D. L. Segaloff博士（アイオワ大学、米国）のプラスミドpcDNA3-rLHR（B9）を用いた。

30

#### 【0060】

部分配列をラットLH-CGRの相当する配列に置換したTSH受容体キメラを、Biochem Biophys Res Commun（1991）179：70-77の記載に従い構築した。この場合、TSHRアミノ酸261～370を、相当するラットLH-CGRのアミノ酸261～329で置換した。

#### 【0061】

本発明のTSH受容体キメラ及びその野生型変異体を、通常の試薬を用いた通常のクローニング法により製造した。

#### 【0062】

細胞抽出物としての融合タンパク質HSA2-TSHR ECD-B-330-mAb1又はTSHR／LH-CGR-SEAPの取得及び発現

40

コンフルエントで安定したCHO-K1及びHEK293細胞をそれぞれプレート中で増殖させる。上清（約8mg／mL総タンパク質）を集め、-70℃に保った。このようにして得られた上清を、それぞれHSA2-TSHR ECD-B-330-mAb1、TSHR-SEAP又はTSHR／LH-CGR-SEAPとして決定方法に使用することができる。

#### 【0063】

分泌された細胞外融合TSHRキメラの獲得

融合TSH-Rキメラのトランケートされた細胞外ドメインは、それらを発現する細胞から培養上清中に分泌される。分泌された受容体タンパク質は、アッセイ緩衝液中で規定

50

された希釈の形態で実験に直接使用される。例えば、培養上清 5 mL 由来の細胞外 SEA P-TSH-R キメラ B 10  $\mu$ L を、1 回の測定につき 1 : 10 の最終希釈で使用する。

#### 【0064】

常磁性粒子へのアンカー抗体のカップリング

トシル化 Dynabeads (登録商標) M-280 (Invitrogen Dynabeads) 10 mg (330  $\mu$ L) を回収し、毎回 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 9.5) 1 mL で 2 回洗浄し、次いで 30  $\mu$ L のホウ酸緩衝液に再懸濁する。このために、以下の手順を各々の洗浄工程で使用する：磁石を活性化し、そして溶液を常磁性粒子から除去する。次に磁石を失活させ、そして常磁性粒子に 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 9.5) を 1 mL 加え、そして数秒間よく振り混ぜる。これに続いて、磁石の活性化及び常磁性粒子からの洗浄溶液の除去が行われる。抗体 4.3  $\mu$ g (0.43  $\mu$ g 抗体/mg Dynabeads (登録商標)) の添加を行う。このために、抗 TSHR クローン 3D7 を回収し、そしてホウ酸緩衝液で 30  $\mu$ L に希釈する。さらに、0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 9.5) で処理した 3 M アンモニウムサルフェート溶液の Dynabeads (登録商標) 100  $\mu$ L 当たり 30  $\mu$ L を添加し、完全に混合する。これに続いて、室温で 20 時間より長く (一晚) インキュベートし、そしてオーバーヘッドシェーカーで振とうする。次に、上記のように毎回ホウ酸緩衝液 1 mL で 2 回洗浄し、そして新たに調製した遮断型緩衝液 (ホウ酸緩衝液、0.5% BSA、0.05% Tween 20) 0.5 mL を添加する。分散液を振とうしながら 37°C で 2 時間インキュベートする。次に、新しく調製した洗浄緩衝液 (PBS (pH 7.4)、0.1% BSA、0.1% Tween 20) 1 mL を用いて Dynabeads (登録商標) を上記のように 2 回洗浄する。次いで、上清を除去し、そしてアンカー抗体と結合した Dynabeads (登録商標) を洗浄緩衝液 500 mg 中に 20 mg/mL の濃度で再懸濁する。

#### 【0065】

常磁性粒子上への一次 TSH 受容体 キメラ (アンカー受容体) のカップリング

緩衝液 (PBS (pH 7.4)、0.1% BSA、0.1% Tween 20) 中においてアンカー抗体とカップリングした 20 mg/mL の Dynabeads (登録商標) を含む溶液 30  $\mu$ L を洗浄緩衝液 1 mL (PBS (pH 7.4)) で 4 回洗浄し、次に、本発明によるアンカー受容体 (HSA と N 末端で融合しそしてモノクローナル抗体と C 末端で融合した細胞外 TSH 受容体 キメラ) の培養上清 100  $\mu$ L を添加した。得られた溶液を振とうしながら室温で 1 時間インキュベートする。次に、上清を除去し、Dynabeads (登録商標) を洗浄バッファー 1 mL で 2 回洗浄し、洗浄バッファー 30  $\mu$ L に再懸濁し、4°C で保存する。

#### 【0066】

《実施例 2 (本発明による試験の性能)》

血清又は血漿サンプルは、3 時間以内に静脈血から産生される。4°C で 7 日間又は -20°C で 1 ~ 2 年間の保存が可能である。二次抗体 (上記参照) を -20°C に保ち、そして試験に使用する前に室温で解凍する。TSH 受容体 キメラをマイクロタイタープレート上に凍結乾燥して保存し、そして使用前にタンパク質安定化剤を含む緩衝液中で再構成する。

#### 【0067】

2 mL の反応容器で、洗浄緩衝液 (PBS (pH 7.4)、0.1% BSA) 中においてアンカー受容体と結合した Dynabeads (登録商標) 20 mg/mL を含む溶液 30  $\mu$ L を 50  $\mu$ L に希釈する。患者サンプルから 50  $\mu$ L の血清又は血漿を添加した後、反応容器を激しく振とうしながら 37°C で 10 分間インキュベートする。次の数回の洗浄工程は、先に記載したように毎回 1 mL の洗浄緩衝液を用いて磁石の活性化/不活性化と共に行う。洗浄緩衝液で 1 : 5 に希釈した本発明のシグナル受容体溶液 (分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP) と N 末端で融合させた細胞外 TSH 受容体 キメラ) 100  $\mu$ L を添加した後、37°C で 10 ~ 20 分激しく振とうさせた。次に、先に記載したよう

に、洗浄緩衝液 1 mL を用いて数回の洗浄工程を実施した。この後、未希釈の 1, 2-ジオキセタン含有基質溶液 (A P-x (A B) f r o m p · j · k . G m b H、クライnbrリッターズドルフ、ドイツ) 100  $\mu$ L を添加し、反応容器を光から保護して室温で 30 分間振とうさせた。生物/化学発光をチューブルミノメーターで計測する。このために、磁石が活性化され、溶液が常磁性粒子から除去され、そして測定チューブに移される。測定管はチューブ照度計に置かれ、チューブ照度計の指示に従って行われる生物/化学発光の測定が行われる。

#### 【0068】

s T R A b-D E R A 較正標準シリーズの挙動

標準シリーズを作成するために、標準化された濃度の自己抗体を用いた W H O 9 0 / 6 7 2 標準溶液を使用した。標準の出発溶液は 100 I U / L を含み、これを標準曲線を作成するために希釈した。ヌル値として、T X B W 緩衝液中の自己抗体を有さないボランティアからの血清を使用した。

10

#### 【0069】

刺激型自己抗体に結合するために使用される T S H 受容体キメラを、抗体を介して D y n a b e a d s (登録商標) 上に固定し、凍結乾燥して貯蔵し、使用前にタンパク質安定化剤を含有する緩衝液中で再構成する。トリトン X-100 洗浄緩衝液 (T X W B) は、0.1% T X-100、50 mM T r i s / H C l (p H 8.0)、100 mM N a C l を含有する。血清希釈緩衝液は、T X W B 中に 5% のグルコース及び 5% の粉乳を含む。

20

#### 【0070】

1 ウェルあたり 50  $\mu$ L のサンプル溶液 (標準及びヌルサンプルの希釈液) を希釈緩衝液で 1:2 に希釈し、そしてマイクロタイタープレート上で室温 (約 22  $^{\circ}$ C) で 90 分間インキュベートする。それらを毎回 300  $\mu$ L の T X W B で 4 回洗浄する。これに続いて、酵素 S E A P と融合させた細胞外 T S H 受容体キメラの直径 10 cm の培養皿からの培養上清 5 mL の 1:100 希釈物 10  $\mu$ L を T X W B 90  $\mu$ L に添加する。これを 37  $^{\circ}$ C で 30 分間振とう (300~400 rpm) しながらインキュベートする。次いで、これを 300  $\mu$ L の T X W B で 4 回洗浄する。生物/化学発光は、T r o p i x (登録商標) (A p p l i e d B i o s y s t e m s、F o s t e r C i t y、カリフォルニア州、米国からの E C L (e n h a n c e d c h e m i l u m i n e s c e n c e) 用試薬) を使用して、B e r t h o l d G m b H (バート・ヴィルトバート、シュヴァルツヴァルト、ドイツ国) の C e n t r o l (登録商標) I A L B 296 マイクロタイタープレート測定装置で測定する。

30

#### 【0071】

検出限界は約 0.2 I U / L である。相対光単位 (R L U = R e l a t i v e L i g h t U n i t) と、少なくとも 40 I U / L まで及ぶ刺激型自己抗体の範囲の標準濃度との間に多項式関数が存在する。

#### 【0072】

《実施例 3 (比較例)》

この実施例では、一方では、ランケートされた 2 つの T S H 受容体キメラと、他方では純粋なホロ受容体キメラが、E P 1 9 2 9 3 1 1 B 1 によるシグナル受容体としてのアンカー受容体及びランケートされた受容体キメラ (E C D) として使用された。アンカー受容体キメラをマイクロタイタープレートのプラスチック壁に固定化した。

40

#### 【0073】

アンカー抗体 (10.75 mM クエン酸; 69 mM H E P E S ; 50% グリセロール; p H 7.0) を、マイクロタイタープレート (M T P 96 ウェル) 上の 10  $\mu$ g / mL のカルボネート緩衝液 (100 mM N a C O 3 / N a H C O 3 (p H 9.6)) 中で 4  $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。アッセイ緩衝液 (0.1% T r i t o n X-100; 50 mM トリス-H C l (p H 8.) ; 100 mM N a C l) で 4 回洗浄 (300  $\mu$ L / ウェル) した後、遊離 M T P 表面のブロッキングを、ブロッキング溶液 (5% 粉乳; カルボ

50

ネート緩衝液中5%グルコース)を用いて37℃で1時間行う。これに続いて、アッセイ緩衝液中でアンカー受容体を用いた固相のコーティングを振とう(300rpm)しながら37℃で1時間行う。ホロ受容体キメラを、500μg/mL(受容体キメラに応じて最大2000μg/mL)の総タンパク質濃度で使用する細胞抽出物(1%Triton X-100; 150mM NaCl; 50mM トリス-HCl (pH8.0); Complete(登録商標)プロテアーゼ阻害剤)として使用する。クローン依存的に規定された上清の生産後に、分泌されたECD受容体キメラを、細胞培養上清(RPMI 1640; 10%FCS; 1%ペニシリン/ストレプトマイシン[10,000U、10,000μg/mL])として、アッセイ緩衝液中で10~100%の濃度で使用する。これに続いて、アッセイ緩衝液で4回洗浄(300μL/ウェル)する。必要に応じて、MTPの凍結乾燥が可能である。このために、アンカー受容体インキュベーション後の洗浄は、アッセイ緩衝液を用いて2回のみ、次いで凍結乾燥緩衝液(50mM HEPES-NaOH (pH6.5); 0.1%Triton X-100; 5%粉ミルク; 3%Karlion)を用いて2回行われる。最後の洗浄工程は、延長されたMTPインキュベーション時間(5~10分)で行われる。MTPは直ちに窒素気相(-180℃~-130℃)でショック凍結し(最小インキュベーション30分)、次に凍結乾燥する(0.011mbar/-60℃、MTPの数に応じて4~24時間)。

#### 【0074】

(必要に応じて、アッセイ緩衝液中における乾燥MTPの5~10分間の再構成後に)患者血清を、振とう(300rpm)しながらアッセイバッファーで1:2に希釈して90分間20~24℃でインキュベートする。非結合物質を除去するために、これらをアッセイ緩衝液で4回洗浄する。検出受容体のインキュベーションは、振盪(300rpm)しながら30分間、分泌型ECD受容体キメラを用いて37℃で、ホロ受容体キメラを用いて20~24℃でアッセイ緩衝液中で行う。使用した濃度は、クローン依存的に規定された上清の生産後に、ホロ受容体キメラの細胞抽出物及びクローンに依存して分泌されたECD受容体キメラ10~100%を有する全タンパク質1000μg/mL(受容体キメラに依存して最大3000μg/mL)である。これに続いて毎回ウェルあたり300μLのアッセイ緩衝液で4回洗浄する。基質(1.0エタノールアミン中135μM CDP-Star又は代替的にAP基質1:1.5~3 (pH9.8); 0.5mM MgCl<sub>2</sub>; 0.0001%キシレンシアノール)を添加して、振とう(300rpm)しながら20~24℃で30分間インキュベーションして検出を行い、その後マイクロタイタープレートルミノメーターで定量する。

#### 【0075】

検出受容体キメラの安定性測定は、様々な時間のプレインキュベーションにより行われ、その後ブリッジアッセイの使用が続き、この検出受容体キメラは、その適用が基礎とされる、すなわち固相上での疑似親和性クロマトグラフィーに結合するブリッジアッセイをする目的で扱われる。

#### 【0076】

比較の測定結果は、マイクロタイタープレート実験である。結果を図5に示す。マイクロタイタープレートにアンカー受容体キメラ(ホロ受容体キメラ又はECD受容体キメラ(比較))が結合した抗体を4℃でコーティングした。患者の血清とのインキュベーションは室温で行った。

#### 【0077】

最後に、図4で得られた測定値曲線は2つの校正曲線であり、この中で、縦軸にプロットされた商B/B<sub>0</sub>(結合/非結合)を使用して結果において非特異的結合を排除した。標準化されたサンプルの自己抗体単位は、横軸に示されている。

#### 【0078】

太字で示した曲線は、固相(ホロ受容体キメラ)に結合した一次TSH受容体キメラと、第二のランケットされたTSH受容体キメラ(ECD受容体キメラ)を有する実施態様を示し、これは、シグナル受容体としてのホロ受容体の細胞外部分のみを含有している

10

20

30

40

50

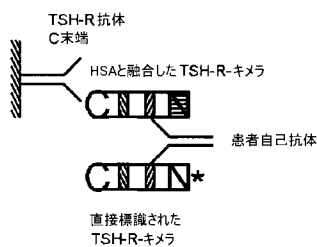
。通常表示された曲線の場合、固相上に結合された一次TSH受容体キメラ（ホロ受容体キメラ）の代わりに、トランケートされた受容体キメラ（ECD受容体キメラ）がアンカー受容体キメラとして同様に使用される。

#### 【0079】

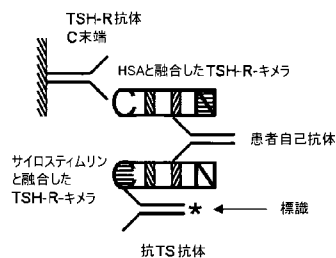
2つの曲線の経過の比較は、ホロ及びトランケートされた受容体キメラに対する自己抗体の結合挙動における著しい差異を示す。2つのECD受容体キメラ（アンカー及びシグナル受容体がECD受容体キメラである）の試料の測定値の曲線は、「ギザギザ」であり、再現性がなく、必要な感度及び特異性をもたらさない。特に、広い濃度範囲には適していない。したがって、アンカー受容体及びさらなるホロ受容体キメラとしてのホロ受容体キメラの使用は、マイクロタイタープレート実験又は自動装置の測定には適していない。

10

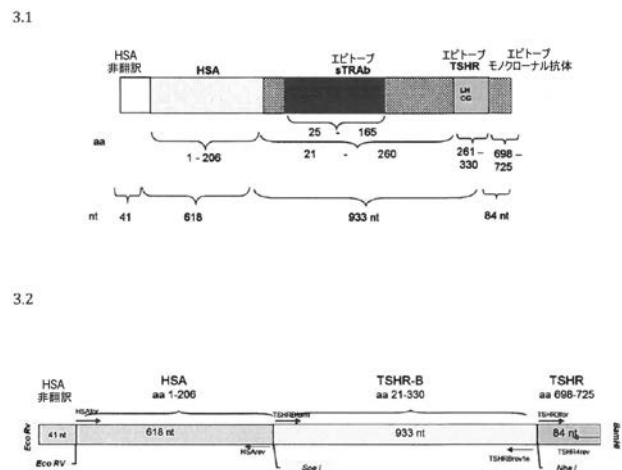
【図1】



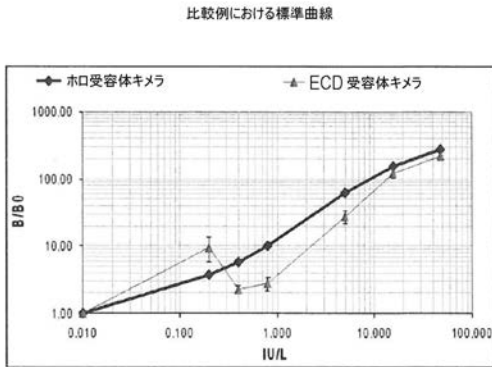
【図2】



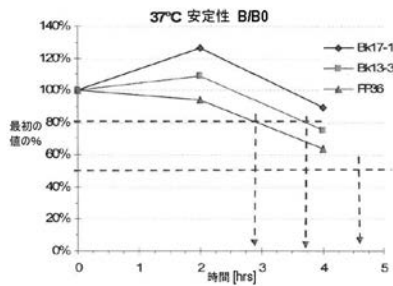
【図3】



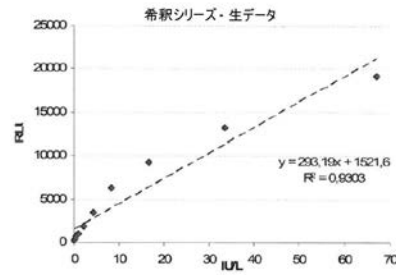
【図 4】



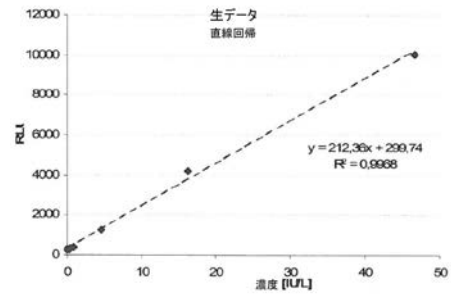
【図 5】



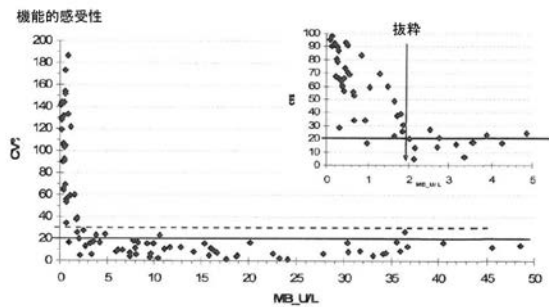
【図 6】



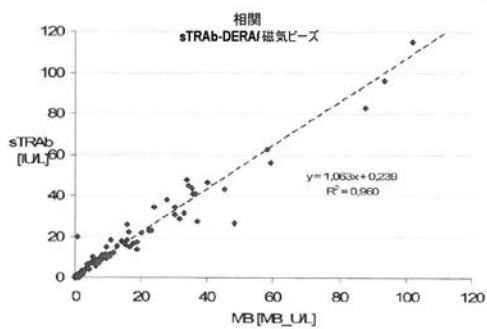
【図 7】



【図 8】



【図 9】





【配列表】

2017519992000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2015/063627

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/564 C07K14/72 G01N33/543  
ADD.

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)

G01N C07K

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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                  | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | WO 2007/036511 A1 (LOOS ULRICH [DE])<br>5 April 2007 (2007-04-05)<br>cited in the application<br>page 11, line 4 - page 16, line 8; figures<br>1-3; sequences 1,2,6<br>-----                                                                                                                                                        | 1-13                  |
| A         | TAHARA K ET AL: "EPITOPES FOR THYROID<br>STIMULATING AND BLOCKING AUTOANTIBODIES ON<br>THE EXTRACELLULAR DOMAIN OF THE HUMAN<br>THYROTROPIN RECEPTOR",<br>THYROID, MARY ANN LIEBERT, NEW YORK, NY,<br>US,<br>vol. 7, no. 6,<br>1 December 1997 (1997-12-01), pages<br>867-877, XP000993366,<br>ISSN: 1050-7256<br>figure 1<br>----- | 1-13                  |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family 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 application or patent 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

"B" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 September 2015

Date of mailing of the international search report

21/09/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fleitmann, J

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/063627

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 2007036511 A1                          | 05-04-2007          | AT 462977 T                | 15-04-2010          |
|                                           |                     | CN 101322033 A             | 10-12-2008          |
|                                           |                     | EP 1929311 A1              | 11-06-2008          |
|                                           |                     | HK 1117595 A1              | 19-11-2010          |
|                                           |                     | JP 5405111 B2              | 05-02-2014          |
|                                           |                     | JP 2009510397 A            | 12-03-2009          |
|                                           |                     | JP 2013231736 A            | 14-11-2013          |
|                                           |                     | US 2009325310 A1           | 31-12-2009          |
|                                           |                     | WO 2007036511 A1           | 05-04-2007          |
| -----                                     |                     |                            |                     |

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2015/063627

| <b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b><br>INV. G01N33/564 C07K14/72 G01N33/543<br>ADD.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                     |
| <b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b><br>Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)<br>G01N C07K                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                     |
| Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                     |
| Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)<br>EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                     |
| <b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                     |
| Kategorie*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile                                                                                                                                                                                                                                      | Betr. Anspruch Nr.                                  |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | WO 2007/036511 A1 (LOOS ULRICH [DE])<br>5. April 2007 (2007-04-05)<br>in der Anmeldung erwähnt<br>Seite 11, Zeile 4 - Seite 16, Zeile 8;<br>Abbildungen 1-3; Sequenzen 1,2,6<br>-----                                                                                                                                                   | 1-13                                                |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | TAHARA K ET AL: "EPITOPES FOR THYROID<br>STIMULATING AND BLOCKING AUTOANTIBODIES ON<br>THE EXTRACELLULAR DOMAIN OF THE HUMAN<br>THYROTROPIN RECEPTOR",<br>THYROID, MARY ANN LIEBERT, NEW YORK, NY,<br>US,<br>Bd. 7, Nr. 6,<br>1. Dezember 1997 (1997-12-01), Seiten<br>867-877, XP000993366,<br>ISSN: 1050-7256<br>Abbildung 1<br>----- | 1-13                                                |
| <input type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                     |
| * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :<br>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist<br>"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist<br>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)<br>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht<br>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist<br>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist<br>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden<br>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist<br>"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                     |
| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Absendedatum des internationalen Recherchenberichts |
| 9. September 2015                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 21/09/2015                                          |
| Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde<br>Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Bevollmächtigter Bediensteter<br><br>Fleitmann, J   |

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2015/063627

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie | Datum der<br>Veröffentlichung |
|----------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 2007036511 A1                                   | 05-04-2007                    | AT 462977 T                       | 15-04-2010                    |
|                                                    |                               | CN 101322033 A                    | 10-12-2008                    |
|                                                    |                               | EP 1929311 A1                     | 11-06-2008                    |
|                                                    |                               | HK 1117595 A1                     | 19-11-2010                    |
|                                                    |                               | JP 5405111 B2                     | 05-02-2014                    |
|                                                    |                               | JP 2009510397 A                   | 12-03-2009                    |
|                                                    |                               | JP 2013231736 A                   | 14-11-2013                    |
|                                                    |                               | US 2009325310 A1                  | 31-12-2009                    |
|                                                    |                               | WO 2007036511 A1                  | 05-04-2007                    |
| -----                                              |                               |                                   |                               |

---

フロントページの続き

|                         |                |             |
|-------------------------|----------------|-------------|
| (51)Int.Cl.             | F I            | テーマコード (参考) |
| C O 7 K 17/14 (2006.01) | C O 7 K 14/705 |             |
|                         | C O 7 K 17/14  |             |

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 ルース, ウルリヒ

ドイツ連邦共和国, 8 9 0 8 1 ウルム, ヴィリ=エックシュタイン=ヴェーク 9

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ79 QR48 QS33 QS39 QX01  
4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA70 EA50

|                |                                                                                                                                                                                 |         |            |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 检测针对TSH受体的自身抗体                                                                                                                                                                  |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2017519992A</a>                                                                                                                                                   | 公开(公告)日 | 2017-07-20 |
| 申请号            | JP2016574174                                                                                                                                                                    | 申请日     | 2015-06-17 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 露丝·乌尔里希<br>乌尔里希·洛斯                                                                                                                                                              |         |            |
| [标]发明人         | ルースウルリヒ                                                                                                                                                                         |         |            |
| 发明人            | ルース,ウルリヒ                                                                                                                                                                        |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/53 G01N33/543 C12Q1/02 C07K19/00 C07K14/705 C07K17/14                                                                                                                    |         |            |
| CPC分类号         | C07K14/723 G01N33/54326 G01N33/564 G01N33/76                                                                                                                                    |         |            |
| FI分类号          | G01N33/53.N G01N33/543.541.A G01N33/543.545.A C12Q1/02.ZNA C07K19/00 C07K14/705 C07K17/14                                                                                       |         |            |
| F-TERM分类号      | 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QS33 4B063/QS39 4B063/QX01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA70 4H045/EA50 |         |            |
| 代理人(译)         | 山口健次郎<br>森田健一                                                                                                                                                                   |         |            |
| 优先权            | 2014173341 2014-06-20 EP<br>102014011653 2014-08-11 DE                                                                                                                          |         |            |
| 其他公开文献         | JP6654580B2<br>JP2017519992A5                                                                                                                                                   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>                                                                                                                                                       |         |            |

# 摘要(译)

本发明涉及可用于自动化诊断装置上以检测抗促甲状腺素受体自身抗体的桥联测定，其中所使用的嵌合TSH受体包含嵌合TSH受体的细胞外部分。，N末端融合至引起嵌合TSH受体从培养细胞分泌的蛋白质，并且锚定嵌合TSH受体固定在顺磁性颗粒上。

Abb.1

