

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-518945
(P2004-518945A)

(43) 公表日 平成16年6月24日(2004.6.24)

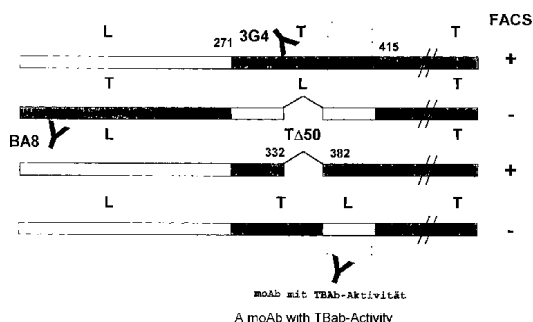
(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53 N	2 G O 5 4
GO 1 N 21/78	GO 1 N 33/53 D	
GO 1 N 33/543	GO 1 N 21/78 C	
GO 1 N 33/577	GO 1 N 33/543 5 1 1 A	
	GO 1 N 33/543 5 4 1 B	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 57 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2002-514366 (P2002-514366)	(71) 出願人 501154389
(86) (22) 出願日 平成13年7月17日 (2001.7.17)	ペー・エル・アー・ハー・エム・エス・アクティエンゲゼルシャフト
(85) 翻訳文提出日 平成14年10月8日 (2002.10.8)	ドイツ・D-16761・ヘーニッヒストルフ・ノイエンドルフシュトラッセ・25
(86) 国際出願番号 PCT/EP2001/008252	
(87) 国際公開番号 W02002/008723	(74) 代理人 100064908
(87) 国際公開日 平成14年1月31日 (2002.1.31)	弁理士 志賀 正武
(31) 優先権主張番号 100 35 706.7	(74) 代理人 100108578
(32) 優先日 平成12年7月21日 (2000.7.21)	弁理士 高橋 詔男
(33) 優先権主張国 ドイツ (DE)	(74) 代理人 100089037
(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR) , JP, US	弁理士 渡邊 隆
	(74) 代理人 100101465
	弁理士 青山 正和
	(74) 代理人 100094400
	弁理士 鈴木 三義
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T S H 受容体に対する阻止自己抗体の選択的決定方法

(57) 【要約】

T S H 受容体 (T S H - R) に対して形成された、患者から得られた生体試料中の自己抗体 (T R A b) の決定方法において、反応混合物中該試料または該試料の少なくとも1つの抗体部分を、選択的競合剤の形の第1免疫試薬の存在下で、T S H - R 調製物の形の第2免疫試薬と反応させ、その際前記選択的競合剤かまたは前記T S H - R 調製物の少なくとも1つが標識されるか標識可能であり、前記T S H - R 調製物と前記選択的競合剤間の結合に基づいて、試料中の求められるT R A b の存在および/または量を決定する方法であって、前記選択的競合剤が、決定すべき甲状腺阻害自己抗体 (T B A b) と競合する前記T S H - R 調製物の結合位置で結合するように選択されることによって、T B A b を選択的に決定することを特徴とする。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

T S H 受容体 (T S H - R) に対して形成された、患者から得られた生体試料中の自己抗体 (T R A b) の決定方法において、

反応混合物中該試料または該試料の少なくとも 1 つの抗体部分を、選択的競合剤の形の第 1 免疫試薬の存在下で、T S H - R 調製物の形の第 2 免疫試薬と反応させ、その際前記選択的競合剤かまたは前記 T S H - R 調製物の少なくとも 1 つが標識されるか標識可能であり、前記 T S H - R 調製物と前記選択的競合剤間の結合に基づいて、試料中の求められる T R A b の存在および / または量を決定する方法であって、

前記選択的競合剤が、決定すべき甲状腺阻害自己抗体 (T B A b) と競合する前記 T S H - R 調製物の結合位置で結合するように選択されることによって、T B A b を選択的に決定することを特徴とする方法。 10

【請求項 2】

選択的競合剤が、抗 T S H - R 抗体またはそのフラグメントであることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

抗 T S H - R 抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

選択的競合剤が、マウスの遺伝的免疫化に引き続いて h T S H - R - c D N A 構造を用いて製造された阻害抗 T S H - R 抗体であることを特徴とする、請求項 1 ないし 3 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 5】

T S H - R 調製物かまたは選択的競合剤から選択された第 1 免疫試薬または第 2 免疫試薬の 1 つが標識されず、固相に固定化されたかまたは固定化可能な形で使用されることを特徴とする、請求項 1 ないし 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

T S H - R 調製物が、組換えにより製造された T S H - R 調製物であり、これが (i) ほぼ完全な組換えヒト T S H - R (h T S H - R) と、(i i) h T S H - R の少なくとも細胞外領域ならびに場合によっては標識化および / または固定化のための配列を含む T S H - R 融合タンパク質、および (i i i) 刺激 T R A b (T S A b) および / または中性 T R A b の結合に必要な T S H - R の細胞外領域の部分配列が不活性部分配列で置き換えられた T S H - R キメラから選択されることを特徴とする請求項 1 ないし 5 のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項 7】

抗 T S H - R 抗体が、h T S H - R のアミノ酸配列のアミノ酸 3 8 2 ~ 4 1 5 の領域のエピトープに結合するように選択されることを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

固定化免疫試薬が、決定すべき T B A b と選択的競合剤が h T S H - R 調製物に結合することを阻害しない固定化抗体を用いて固相で固定化される組換え h T S H - R 調製物であることを特徴とする請求項 5 に記載の方法。 40

【請求項 9】

標識した免疫試薬が、放射性同位元素、化学発光標識、または酵素を用いて標識された選択的競合剤であることを特徴とする、請求項 1 ないし 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

選択的競合剤が固相に固定化され、溶解した形の第 2 免疫試薬として使用した T S H - R 調製物が標識されることを特徴とする、請求項 1 ないし 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

第 1 免疫試薬も第 2 免疫試薬も反応混合物中に分散して存在し、選択的競合剤を形成する第 1 免疫試薬に、蛍光 - または化学発光 - 消光または - 強化に起因する標識方式の一部で 50

ある第1標識成分が結合し、該標識方式の第2標識成分が、第2免疫試薬かまたは選択的にこの第2免疫試薬に結合する、決定すべきTBAbと選択的競合剤のhTSH-R調製物への結合を阻害しない抗体に結合することを特徴とする、請求項1ないし4、6および7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

標識方式が、特にシアニタイプ蛍光色素かまたは化学発光色素との組み合わせで希土類クリプテートかまたは希土類キレートを含むことを特徴とする請求項11に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

10

【発明の属する技術分野】

本発明は、TSH受容体に対する自己抗体(TRAb)の選択されたサブタイプ、則ちいわゆる阻止TRA b (TBA b)の選択的決定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ホルモンTSH(甲状腺刺激ホルモン、サイトロピン)用の受容体であるTSH受容体(TSH-R)は、甲状腺細胞の機能と成長に関して重要な役割を担う。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、このGタンパク質結合糖タンパク質受容体はさらに特に黄体形成ホルモン/コリオゴナドトロピン用の受容体(LH/CG-R)と卵胞刺激ホルモン用の受容体(FSH-R)を含む。このサブファミリーの受容体は、大きいN末端細胞外領域を有し、この領域は配位子結合にとって本質的な意味をもち、該配位子結合に関して、この領域が信号伝達に参与することが示された。TSH-R信号の伝達は、主にアデニル酸シクラーゼの活性化を仲介として成り立ち、このことは細胞内cAMPレベルの上昇を招く。

20

【0003】

TSH-Rに対する大いなる興味の一部は、TSH-Rに対する自己抗体の発現を伴う異なる甲状腺自己免疫疾患での、その第1自己抗原としての役割に由来するものである(TSH-R-自己-A bは、以下ではただTRA bと略す)。その種の甲状腺自己免疫疾患には、特にバセドウ病(バセドウ疾患、英語では、グレース病)と、最も頻繁なヒト自己免疫疾患に属する甲状腺機能亢進を招く自己免疫疾患、ならびに甲状腺機能低下につながり得る橋本病と特発性粘液水腫が属する。

30

【0004】

TSH-Rは、甲状腺細胞の表面に非常に微量(細胞当たり1,000~10,000受容体の規模)に存在する。ヒトTSH受容体(hTSH-R)の化学構造の解明、則ちヒトTSH受容体をコードするDNAの配列ならびにそれから誘導可能な受容体自身のアミノ酸配列の解明は1989年末に成功した(Libert F.等、Biochem. Biophys. Res. Commun. 165:1250~1255; Nagayama Y.等、Biochem. Biophys. Res. Commun. 165:1184~1190参照、EP-A-0433509ないしWO-A-91/09121;ならびにWO-A-91/09137;WO-A-91/10735およびWO-A-91/03483;さらにYuji Nagayama & Basil Rapoportの: Molecular Endocrinology、第6巻No.2、145~156とその中で引用された文献も参照)。それ以来hTSH-Rポリペプチドとそれから選択された部分ペプチドが多数の系で発現し、その際機能性TSH-Rが、則ち一過性でも、例えばアデノウイルス発現系とワクシニアウイルス発現系の使用のもとでの安定細胞系の形でも、哺乳動物の細胞内でのみ製造され得ることが示された。

40

【0005】

hTSH-Rの成功した分子クローン化は、TSHならびにTRA bのTSH-Rとの相互作用で新たな認識を得て、この認識を診断目的でTRA bを決定する場合にも利用できるようにした。比較的新しい学術的認識に鑑みたTRA b決定の現在の状況についての概

50

観は、Nils G. Morgenthalerの論文、New assay systems for thyrotropin receptor antibodies; Curr Opin Endocrinol 1999、6:251~260に見出される。本出願では、分析および反応に関して前述の文面で定義された略語と記号を使用した。前述の文面の内容とその中に挙げられた文献の場所を、本出願の開示内容を補足するために参照されるよう強く望む。

【0006】

前述の文面にもまとめて挙げられているように、TRAbを決定するために現在病院で日々使用可能な定量法は、間接的に操作する競合アッセイのみであり、その場合患者試料中のTRAbの存在に起因する標識bTSHの、豚甲状腺（典型的定量法構造）からの溶解した豚TSH-Rへの結合の障害がまたは、新しい「第二世代」の定量法の場合は、固相、例えばコーティング管に固定した組換えヒトTSH-R (rhTSH-R)への結合の障害が測定に使用される。典型的な定量法とは異なる新方式の固相定量法は、DE 196 51 093かまたはWO 98/26294ないしDE 198 01 319かまたはWO 99/3678ないしJ. Clin. Endocrinol. Metab.、84巻、No. 1、S. 90~97 (1999)に記載される。利用した測定原理に基づいてその種の定量法は、個々のサブタイプ（刺激性、阻害性）を区別することなく、bTSHと競合する所謂TBIIタイプの自己抗体のみを検知する。

10

【0007】

特にTBIIタイプのTRAbを決定する定量法のプロセス・バリエーションに関する特許明細書では、一般的な形式で、TSH阻害の代わりにTSH-Rに対する抗体の障害も測定に、特に追加でTSHの障害のためにも使用できることも述べられ、それは例えばDE 196 51 093、7ないしWO 98/26294に記載される。しかしながらそのようなすべての場合には、個々に現れるTRAb集団の組成の患者による違いが間違っただけの測定結果を招くことなく、常に患者試料中の全ての関連する病原TRAbをできるだけ完全に検知することと、この方法で自己免疫反応に由来する甲状腺疾患を可能な限り洩れなく検知することが重要である。則ち競合アッセイの場合のTRAb決定の臨床の有意性を高めることが重要である。

20

【0008】

自己免疫疾患で現れるTRAbが、バセドウ病患者の場合にも、甲状腺機能減退症を招く刺激自己抗体 (TSAb) を含むのみならず、その他に阻害自己抗体 (TBAb) も存在し得ることが周知である。周知の競合アッセイは、TSAbとTBAbを区別できるのではなく、これらを区別なくTBIIとして検知するものである。

30

【0009】

TSAbとTBAbを区別しようとする場合、このことは自己免疫事象、例えばバセドウ病の場合の精密診察学の意味においては学術的に大きな、また最終的には臨床学的にも大きな興味となり得るが、例えば上述のN. Morgenthalerの文面、Curr. Opin. Endocrinol. 1999、6:251~260でも詳しく理解されるバイオアッセイに立ち戻らなければならない。その種のバイオアッセイでは、その膜内に天然または組換えTSH-Rを含む細胞のcAMP産生が、ある特定の血清ないし自己抗体が存在することによって増大されるか、ないしは細胞内の所与のTSH濃度によって引き起こされたcAMP産生が、血清または自己抗体によって弱められるかが確かめられる。

40

【0010】

病院や研究所で患者の試料を日々検査するためのバイオアッセイがあまりに費用がかかるので、病原刺激TRAbと阻害TRAbをより簡単な方法で区別できるようにする定量法も自由に利用できることが望ましいであろう。免疫沈降ないしそれに起因する差異測定を使用する定量法に関する提案は、非公開出願DE 1994 9184.4ないしDE 100 07792.7に見出される。

【0011】

50

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、特定の T R A b、則ち T B A b を選択的に決定するための鑑別診断学法を成し遂げることであり、その際これは、T B I I を決定するために導入した操作方法を主に利用することができ、それ故臨床業務にも適するものである。

【0012】**【課題を解決するための手段】**

この課題は、一般的形式で請求項 1 に記載の方法によって解決される。

【0013】

請求項 1 に記載の方法の現在有利な好ましい形態は、従属請求項 2 ないし 1 2、ならびに実施形態に則した以下の説明に見出される。

10

【0014】

本願の前述および以下の文面では、使用した試薬ないし分析/生体分子は、通常様々な略語によって表され、専門家には具体的な関連からいくらか違うものと判る場合は別として、それらは常に以下の意味をもつものとして理解される。その際実施した試験と測定を正確に記述するとの理由から特殊な言及がなされるが、記述した結果と結論は記述した特殊な場合にのみ適用されるものではなく、関連する専門知識を考慮に入れずに一般化され得ることを意味するものではない。

【0015】

T S H = 甲状腺刺激ホルモン(サイトロピン)。何も追加せずに略語 T S H で使用される場合は、特定の生産物が問題になるのではなく、ホルモンの結合ないし機能が一般的な形式で議論される。

20

【0016】

1 2 5 I - b T S H = 競合剤として使用した放射性ヨウ素化 b T S H (ウシ T S H)。B . R . A . H . M . S D i a g n o s t i c a G m b H 社の定量法の記載と関連して 1 2 5 I - b T S H は特に、D E 4 2 3 7 4 3 0 C 1 ないし E P 0 6 6 8 7 7 5 B 1 に従って得られる製品、および B . R . A . H . M . S D i a g n o s t i c a G m b H 社の T R A K - A s s a y (登録商標) ないし D Y N O t e s t (登録商標) T R A K h u m a n の成分を表す。

【0017】

T S H - R = T S H 受容体、甲状腺皮膜内に固定された糖タンパク質受容体。さらに何も追加せずに略語 T S H - R を使用する場合、任意の特定の製品に制限されるものではない。故に天然の材料から得られた、例えば豚の T S H - R である場合もある。しかしながら本発明の定量法で使用した T S H - R の場合には、少なくとも「機能性 T S H 受容体」と呼ばれ得る規模で、アミノ酸配列および場合によっては任意の天然の T S H - R の糖化を有する、好ましくは遺伝子工学的に製造した(組換えした)機能受容体ポリペプチド、特に好ましくはヒト T S H - R (h T S H - R) の機能性 T S H - R 受容体を意味する。「機能的な」という特徴は、これが T R A b の結合に関連して意味のある規模で、天然に存在する特にヒトの T S H - R のように振る舞うことを意味する。その際略語 T S H - R は、組換えた完全な、いくらか強く糖化されたポリペプチド、十分な長さの部分配列、またはそれから遺伝子工学で製造した融合生成物を表す。さらに説明することなく単純に T S H - R と呼ばれる製品は膜調製物であり、この膜調製物からその製品は、場合によっては界面活性剤の使用下で、組換えポリペプチドを発現させるために使用した細胞の皮膜を適当に可溶化させることによって、精製された抽出物としても得られる。

30

40

【0018】

T R A b = 生体試料、特にヒト血清または血漿内で検出可能な、任意の特性の T S H 受容体に対する自己抗体 (T S H - R - A u t o - A b)。

【0019】

T S A b = 甲状腺刺激 T R A b。その検出は、特にバセドウ病(英語名: グレーブス病)の診断に関して重要である。

【0020】

50

T B A b = T S H (ならびに場合によっては T S A b) の甲状腺障害 T R A b への作用で、その作用の検出は甲状腺機能減退症に関連付けられ得る。

【 0 0 2 1 】

T B I I = T S H - R 調製物の結合位置において標識 T S H を T R A b と競合させることに起因する競合アッセイで検出可能な T R A b 。これらは T S A b および / または T B A b および / または中性 T R A b であり得る。T B I I タイプの T R A b を決定する商業ベースの定量法は、B . R . A . H . M . S D i a g n o s t i c a G m b H 社の定量法 T R A K - A s s a y (登録商標) と D Y N O t e s t (登録商標) T R A K h u m a n (放射受容体検定) ないし L U M I t e s t (登録商標) T R A K h u m a n (化学発光受容体検定) である。

10

【 0 0 2 2 】

抗 - T S H - R - A b = 本発明の検定では選択的競合剤 (第一免疫試薬) として使用した、場合によっては標識した、または選別標識可能な、T S H - R に対する抗体。プロセスに必要なこの抗体の選択性は、まず第一に選別モノクローナル抗体 (抗 - T S H - R - m o A b) を使用する場合に保証され、その製造と選別は実験の部に記載される。免疫試薬として使用した抗 - T S H - R - A b は、患者試料からの T R A b と略した自己抗体から明白に区別される。

【 0 0 2 3 】

m o A b = モノクローナル抗体。

【 0 0 2 4 】

以下に本発明の方法を、さらに詳しく説明する。実験の部では、障害モノクローナル抗体の製造ならびに患者の血清中の障害自己抗体量を決定するためのその使用を、具体的な操作工程と実施形態に基づいてより詳しく説明する。

20

【 0 0 2 5 】

【 発明の実施の形態 】

患者の血清からの T B I I タイプの T R A b を、T S H - R 製剤の結合位置に関して標識 b T S H と競合させることによって決定することに基づく周知の方法、則ち B . R . A . H . M . S D i a g n o s t i c a G m b H 社の定量法 T R A K - A s s a y (登録商標) と D Y N O t e s t (登録商標) T R A K h u m a n ないし L U M I t e s t (登録商標) T R A K h u m a n で具体化されるような定量法を出発点とする場合に、本発明の方法を非常に容易に表すことができるので、本発明の方法で競合剤として標識 b T S H の代わりに選別標識競合剤を使用でき、この選別標識競合剤は主に患者の血清からの T R A b の明白に定義された狭い従属群、則ち非 T S A b すなわち T B A b のみと競合し、それによって T B A b を選択的決定することが可能となる。

30

【 0 0 2 6 】

その際本発明は好ましくは、固相定量法としてのプロセスを変化させて実施され、これは多くの観点で「第二世代」の T R A b を決定する定量法 (D Y N O t e s t (登録商標) T R A K h u m a n ; L U M I t e s t (登録商標) T R A K h u m a n ; B . R . A . H . M . S D i a g n o s t i c a G m b H 社の各使用説明書を参照) に対応する。このプロセス・バリエーションでは、選別結合剤として使用した免疫試薬、則ち T S H - R 調製物、特に r h T S H - R 調製物は、特殊モノクローナル抗体 (B A 8 ; J . C l i n . E n d o c r i n o l M e t a b 8 4 : 9 0 ~ 9 7 、 1 9 9 9 、 ないし J . I m m u n o l . 1 6 0 : 1 4 5 8 ~ 1 4 6 5 参照) を用いて固定化されると共に競合剤が標識される。一方では周知の b T S H 標識法で使用された全てのマーカーを (1 2 5 I ; 化学発光ラベル、例えばアクリジニウム誘導体の形で) 使用することができるが、本発明の方法ではその他の周知の標識ラベル、例えば酵素標識または蛍光標識も使用することができ、これらは試薬の活性が損失することなく、例えば T S H の場合よりも容易に抗体タイプの免疫反応に付け加えることができる。

40

【 0 0 2 7 】

さらに周知の検出方式も使用できるようになり、その際競合剤として使用した免疫試薬に

50

第一標識成分が結合し、この第一標識成分は統合検出方式の一部であり、その別の部分は別の免疫試薬、例えば別の抗体に結合する。本発明の方法では、第二標識成分と結合した別の抗体が、例えばhTSH-R製剤を固定化する第二世代のTBI I定量法で使用されるような抗体であり得る。両抗体が関与したサンドウィッチ構造の場合には、測定信号、例えば蛍光信号または化学発光信号が特徴的に変化することになり、この変化は両抗体の受容体への結合のスケールを、したがって追求する分析物の濃度を間接的に反映する。そのような方式の例としては、例えばUS-A-4,822,733、EP-0-180492B1またはEP-B1-0539477、およびその中で引用された従来技術で記載される標識方式が挙げられる。

【0028】

10

前述の方式の統合標識方式を起用する場合には、この定量法を均一定量法として仕上げることもでき、その際全ての免疫試薬、分析物および反応生成物は液状反応混合物中に存在するか形成され、その際両標識成分を1つの免疫複合体中に含む反応生成物のみを選別して検知する測定が、直接この反応混合物中で行われる。例としては、再び3つの上述の特許公開と、その中に挙げられた従来技術、ならびに標識TRACE（登録商標）（Time Resolved Amplified Cryptate Emission）ないしKRYPTOR（登録商標）で提供された技術（CIS Diagnostik GmbHの一覧を参照）を参照されたい。

【0029】

固相定量法の場合TSH-Rは、任意の固相、例えば「被覆管」として使用されるポリスチレン管かまたは、例えばポリスチレンから成るマイクロ・タイター・プレート、または粒子、例えば磁性粒子で固定化することができる。適当な固相の使用のもとでの、時間を遅らせたかまたは後から追加した固定化も可能である。

20

【0030】

TSH-Rは、本発明の方法では特殊抗体を用いる以外の方法でも固定化され得る。例えばTSH-R融合生成物が使用され、その際TSH受容体かまたは、非受容体部、例えばピオチニル残基、6ヒスチジン残基から成る、いわゆる6Hisタグかまたは、固定化のために固相に存在する反応パートナー、例えばストレプトアビジン、ニッケルキレートまたは残基固有の抗体との反応に入り得るその他の適当な残基（例えばWO98/20343参照）を有してなる所望の免疫反応に必要なTSH受容体の部分を使用される場合、TSH-Rが競合免疫反応に必要な機能性を保持し、この固定化方式がこの免疫反応を阻害しないことを前提として、そのような固定化方式もTSH-Rに使用することができる。

30

【0031】

固相定量法としては、この方法は「鏡像」と呼ばれ得る実施形態でも実施可能であり、その際競合剤として使用した免疫試薬、則ち例えば阻害モノクローナル抗体が固定化され、例えばDE19801154に記載されるか、前述の特許出願の文面に含まれるような標識可溶化TSH受容体と反応する。固定化競合剤の、患者の試料からのTRAbとの競合は、この場合も使用したマーカーの固相への結合の減少として示される。そのような鏡像定量法のバリエーションは、出願人の上述の特許出願で議論されてはいるが、これまでTRAbを決定する商業ベースの定量法では実際には使用されていない。

40

【0032】

故に定量法基本デザインを、標識bTSHを用いて操作する定量法に類似の周知の方法で、例えば使用した標識方式、使用した固相、ならびに固定化免疫試薬と標識免疫試薬の選択に関して、多彩に変化させることができるかまたは、この定量法が上述の意味でも本発明の方法の範囲をはずれることなく均一定量法として仕上げられ得るのに対して、本発明の方法では、決定すべきTRAbのための競合剤として用いられる免疫試薬が標識したbTSHではなく、その免疫試薬が、TRAbの定義されたタイプ、則ち阻害TRAb（=TBA b）と選択的に競合することを保証する定義された高い特性を有する免疫試薬であるよう強えられる。

【0033】

50

それ故そのような方法を実現可能にするためには、定義された反応性の、TSHのみならず、決定すべきTRAbとも競合するほどの選別免疫試薬を自由に使えるようにすること、則ちそのために必要な親和性をもたなければならないことが前提である。

【0034】

以下の実験の部では、まずモノクローナル抗体の形のその種の特殊な免疫試薬（抗-TSH-R-moAb）が、詳細に述べられる方法に従って製造可能であり、組換えhTSH-Rの、正確にはrhTSH-Rの細胞外領域の共通の結合位置について、患者の血清からのTRAbと競合させられる状態にあることが示される。

【0035】

所望の特性を有する阻害抗-TSH-R-moAbは、以下に記載されるように、遺伝子免疫化に引き続いて、根本的特徴がJ. Immunol. 160: 1458~1465に記載されるような方法によって得られる。 10

【0036】

この方法では適当に選択した実験用動物（マウス）は、hTSH-Rの細胞外領域（ECD）でcDNAを含むcDNA構造を用いて免疫性が与えられる。経験的な免疫化計画に応じた追加免疫注射の後で、この実験用動物からの血清が得られ、細胞、例えばhTSH-Rを発現する形質転換CHO細胞（JP09）ならびに蛍光標識するための抗マウスIgGを使用したFACS（蛍光標示式細胞分取器）分析によってその後、TSH-Rに対して求められる反応性を有する抗体を形成するようになるマウスが選別される。抗体形成の強さは、形質転換細胞により発現した組換えhTSH-Rでのマウス血清の125I-¹²⁵I-bTSHとの競合によって決められる。さらに平行して行われるバイオアッセイで、血清がTSH-R発現細胞中でcAMP産生をいくらか強く促進するか阻害するかどうかについて血清を検査することができる。 20

【0037】

その血清テストによって所望の種類抗体産生を示すマウスを確認した場合には、そのようなマウスを、moAbを製造する周知の技術に従って培養することができ、その際該マウスの脾臓細胞を骨髓腫細胞と融合させ、形成されたハイブリドーマを増殖させ、moAbの産生のための希釈原理に従って培養される。

【0038】

産生したmoAbの性質は、ほぼ血清の性質と類似であることが確かめられるので、所望の性質を有するmoAbを選別することができる。 30

【0039】

以下の実験の部に記載するように、その際激しく阻害する性質を示した産生moAbの1つを競合試験用に選択し、この目的で標識した。標識されたmoAbが患者の血清からのTRAbと選択的に競合することを示すことができた。

【0040】

前述のmoAbの結合のためのエピトープがTSH-Rの細胞外領域（ECD）上のどこに配列しているかを確かめるために、この試験ではさらに適当なキメラを設計し、各キメラへの標識されたmoAbの結合が生じるかまたは生じないかに基づいて、エピトープを局在化することができた。試験したmoAb（抗-TSH-R-Ab）は、このエピトープをめぐって患者試料からのTRAbと競合する。ここで述べた場合にはこのエピトープは、hTSH-Rの周知の配列のアミノ酸382~415の範囲にあった。 40

【0041】

以下で本発明を、moAbを製造および選別するための成功した実験と、選別されたmoAbの1つを用いて実施した競合試験に基づいてより詳しく説明する。

【0042】

【実施例】

材料と方法 - 結果

1. モノクローナル抗体（抗-TSH-R-moAb）の製造と特徴決定

1a. 実験用動物の免疫化と血液試料の獲得

マウスを遺伝的免疫化するための以前の試験 (J . I m m u n o l . 1 6 0 : 1 4 5 8 ~ 1 4 6 5 、 1 9 9 8 年) とは異なって、以下の免疫化試験では生後6週間の雌のNMRIマウス [i c o : N M R I (I O P S : H a n)] を使用した。これらのマウスは、元はスイスのマウスの子孫で、ドイツのTUハノーバーの実験センターにある実験用動物学研究所で拡大飼育条件下で飼われているものである。これらのマウスは、相互の皮膚移植を許容できない。これらは前述の動物保護条件のもとで保持し取り扱った。

【 0 0 4 3 】

0日目にネブタール麻酔下で、PBS中のp c D N A I I I - h T S H - R (J . I m m u n o l . 1 6 0 : 1 4 5 8 ~ 1 4 6 5 、 1 9 9 8 年参照) 1 0 0 μ g を腹側の脛骨筋肉中に注入した。この筋肉には、その5日前に1 0 0 μ l の心臓毒素 (1 0 m M 、 インドコブラの毒から精製、C a l b i o c h e m 、 ラ・ホーヤ、カリフォルニア) を注入した。注射は、その後4週間と8週間ごとに繰り返した。最初の免疫化後12週間で、免疫性を与えられたマウスの右目の後眼毛細管から血液試料を採取した。全てを診断するために、各々そのようにして得られた血清を個々に検査した。

10

【 0 0 4 4 】

1 b . F A C S 分析による血清とハイブリドーマ上澄み液検査
h T S H - R を発現する形質転換C H O 細胞 (J P 0 9 ; B i o c h e m . B i o p h y s . R e s . C o m m u n . 、 1 9 9 0 、 V o l . 1 7 1 、 P . 1 0 4 4 ~ 1 0 5 0 参照) またはコントロールC H O 細胞 (J P 0 2) を、E D T A と E G T A を (各々 5 m M) 含むリン酸緩衝化塩溶液 (P B S 溶液) を有する培養するプレートによって溶解させ、F a l c o n 2 0 5 2 管 (管当たり 2 0 0 , 0 0 0 細胞) に移行させる。この細胞を 5 0 0 g で 4 で 3 分間遠心分離し、上澄み液を反転によって取り出した。続いてこの管を、室温で 3 0 分間 P B S - B S A 、 0 . 1 % の 1 0 0 μ l 、 2 μ l の量の血清、または m o A b s 検査の場合にはハイブリドーマ細胞の培養上澄み液 1 0 μ l と共に培養した。その後この細胞を P B S - B S A 、 0 . 1 % 4 m l で洗浄し、上述のように遠心分離した。それらを暗所の氷上で 3 0 分間、同じ緩衝液中のフルオレセイン複合ガンマ鎖固有ヤギ抗マウス I g G (S I G M A 、 セントリス、M O) を用いて培養した。分析から除外した破損細胞を識別するために、ヨウ化プロピジウム (1 0 μ g / m l) を使用した。この細胞をさらにもう一度洗浄し、P B S - B S A 、 0 . 1 % 2 5 0 μ l 中で再懸濁させた。管当たり 5 0 0 0 細胞の蛍光を、F A C S c a n (登録商標) フロー・サイトフルオロメトリー (B e c t o n D i c k i n s o n 、 エレンボーデゲム、ベルギー) を用いて検査した。

20

30

【 0 0 4 5 】

1 c . マウス血清の T B I I 活性測定
T B I I 活性を測定するために、h T S H - R を発現する無傷の C H O 細胞 (J P 1 9 、 s . o .) を使用した。この目的のために 5 × 1 0 4 細胞 / ウェルの 9 6 ウェルを有するマイクロタイター・プレート上で、N a C l 無しの修飾ハンクス緩衝液 (等張性は 2 8 0 m M のサッカロースで保証された) 0 . 1 m l 中、2 . 5 % の脱脂乳、1 2 5 I - b T S H (3 0 , 0 0 0 c p m ; B . R . A . H . M . S D i a g n o s t i c a G m b H 社の T R A K - A s s a y (登録商標) から成るトレーサー) およびマウス血清を補充して、室温で 4 時間培養した。培養終了時に細胞を素早く等しい氷冷緩衝液中で洗浄し、1 N の N a O H 0 . 2 m l で溶解させ、放射能をガンマカウンターで測定した。その際 T B I I 活性を測定するために、ウェル当たり 3 μ l のマウス血清を使用した。全試験を 3 回繰り返し、結果を結合 C P M (分当たりのカウント) として表す。

40

【 0 0 4 6 】

m o A b s の性質を検査する際には、マウス血清の代わりにハイブリドーマ培養上澄み液を使用した。

【 0 0 4 7 】

1 d . マウス血清の T S A b および T B A b 活性の測定
T S A b ないし T B A b 活性を決定するバイオアッセイの場合には、再び h T S H - R を

50

発現する形質転換CHO細胞(JP26; Biochem. Biophys. Res. Commun. 171; 1044~1050, 1990)を使用した。簡潔に言えば、 5×10^4 細胞/ウェルの96ウェルを有するマイクロタイタープレート上で、5 mMのKCl、0.25 mMのKH₂PO₄、0.5 mMのMgSO₄、0.4 mMのNa₂HPO₄、1 mMのCaCl₂、0.1%のグルコース、2 mMのIBMX、20 mMのヘペスおよび0.3%のBSA中で、3 μ lの量の血清(ウェル当たりの総容積100 μ l)を用いて培養した。37 で4時間培養した。培地中に遊離したcAMPを市販の競合結合定量法を使用して、周知の方法で測定した(Amersham, Bucks, U.K.)。その際TSAb活性を上述の基本条件下で測定し、一方TBAb活性を測定するために、同じ条件下で、また最終濃度200 μ U/mlのbTSH(SIGMA)を添加して行った。全試験では重複試料を検査し、結果をpmol cAMP/mlとして表す。

【0048】

moAbsの性質を検査する際には、マウス血清の代わりにハイブリドーマ培養上澄み液を使用した。

【0049】

1e. モノクローナル抗体の産生と選別

モノクローナル抗体を単離するために、上述の分析でその血清が所望の免疫反応を示した選択したマウスを、5 μ gのECD-6H-GPI(ECDとGPIアンカーを制御するシグナルペプチド間に挿入された6-ヒスチジンタグを有するECD-GPI融合タンパク質)を静脈注射することによって二次免疫化した。

【0050】

その際注入された液体を獲得するために、高い割合のECD-6H-GPIタンパク質(細胞系4648)を発現する形質転換CHO細胞を、3時間PI-PLCを用いて培養した。続いて液状培地を除去し、6-ヒスチジンタグ結合するコバルト樹脂を用いて4 で1時間培養した(Talon(商標)金属親和樹脂、CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, USA)。この樹脂を、10 mMのイミダゾールを含むpH8のトリスNaCl緩衝液で洗浄した。続いて結合したタンパク質を、100 mMのイミダゾールを用いてこの樹脂から溶離した。

【0051】

記載した二次免疫注射の3日後に、1a.に記載したようにpcDNAIII-TSH-Rで免疫化された選択したNMRIマウス(以下の3.を参照)の脾臓細胞をSP2/0骨髓腫細胞と、50%のポリエチレングリコールを使用して5:1の比率で溶解させた。溶解後にこの細胞を、選別培地内の 2×10^5 細胞/ウェルの厚みの、96ウェルを有するマイクロタイター・プレート内に撒いた(ダルベッコの修飾イーグル培地、10%のウシ胎仔血清、2%のニュートリドーマ(ベーリンガー・マンハイム、ベルギー)、10 mMのビルビン酸ナトリウム、2 mMのL-グルタミン、5 mMの -メルカプトエタノール、2.5 U/mlのアンホテリシンB、100 U/mlのペニシリン、100 μ g/mlのストレプトマイシン、100 μ Mのヒポキサンチン、400 μ Mのアミノプテリン、16 μ Mのチミジンを含む)。溶解後10日で、細胞が活性成長を示す間に、培養上澄み液を上述の1b.で述べたようにFACS分析によって、抗-hTSH-R抗体上のJP09細胞を用いて検査した。その上澄み液が所望の免疫反応性を示したハイブリドーマ細胞を、限定希釈することによってクローニングした。ハイブリドーマ・クローンを、さらに腹水としてプリスタン前処理したBALB/cマウス内で培養した。マウス腹水液からIgGを精製するために、セファロース・プロテインAアフィニティー・クロマトグラフィーを使用した。moAbのIgクラスは、マウス-moAb-イソタイプ・キット(IsoStrip(商標)、ベーリンガー・マンハイム、ベルギー)を用いて決定した。

【0052】

以下に述べる競合試験のために、mAb、則ちmoAb23.1を、クロラミンT法に従って、その固有放射能が80 μ Ci/ μ gとなるようにヨウ素化した。

【0053】

10

20

30

40

50

1 f . 選択した m o A b s ないしこれと競合する h T S H - R の E C D 上の T R A b の結合位置の算出

m o A b 2 3 . 1 のような m o A b s から識別される、C O S 細胞により発現した h T S H - R の E C D (細胞外領域) 上でエピトープを局在化させるために、L H 受容体 (L H - R) と h T S H - R の部分配列を有するキメラを製造した。則ち h T S H - R の E C D の部分配列が L H - R の部分配列で置き換えられ、一方 T S H - R の膜貫通蛇行部が各々保持された。図 3 は使用した様々なキメラを示し、その際「L」で表した配列部分は L H - R の E C D 由来のものであり、それ故 T R A b s ないし抗 - T S H - R - m o A b s は結合しないはずであり、一方「T」で表した領域は T S H - R の E C D 由来のものであり、それ故試験した m o A b s が認識可能な部分配列 / 構造を有すると考えられ得る。L - T 5 0 - T と表されたキメラ中では、h T S H - R でのみ存在する h T S H - R の位置 3 3 2 ~ 3 8 2 の 5 0 のアミノ酸が欠けていた。全キメラを p S V L ベクターに挿入し、C O S 細胞中で発現させた。C O S 細胞の細胞表面でのキメラの発現度は、様々な抗 - T S H - R - m o A b s と F A C S 分析を利用して、主に 1 b . に述べたようにして決定した。

10

【 0 0 5 4 】

2 . 自己免疫患者の血清の、選別された 1 2 5 I 標識抗 - T S H - R - m o A b との競合競合試験のために h T S H - R を発現する形質転換 C H O 細胞 (J P 1 9 ; B i o c h e m . B i o p h y s . R e s . C o m m u n . 1 7 1 : 1 0 4 4 ~ 1 0 5 0 , 1 9 9 0 参照) を、96 ウェルを有する白色培養プレート (商標) (パッカー・インストゥルメント・カンパニー、メリデン、コネティカット、U S A) 上に撒き (5 0 , 0 0 0 細胞 / ウェル) 、0 . 1 % の B S A と各競合試験で使用した患者の自己免疫血清 1 0 μ l を含む 5 0 μ l の H a m F 1 2 培地内で、3 7 $^{\circ}$ C で 1 時間培養した。続いて上述の 1 e . で述べたように製造されて 1 2 5 I 標識された抗 - T S H - R - m o A b 2 3 . 1 (1 0 0 , 0 0 0 c p m / ウェル) 5 0 μ l を加えた。1 時間後にこの細胞を 2 回同じ冷緩衝液で洗浄した。M i c r o S c i n t 2 0 (パッカー・インストゥルメント・カンパニー、メリデン、コネティカット) 1 0 0 μ l を加え、J P 1 9 細胞に結びついた放射能をトップカウンタ・マイクロプレート・シンチレーション・カウンター (パッカー・インストゥルメント・カンパニー、メリデン、コネティカット) で測定した。

20

【 0 0 5 5 】

3 . 結果
1 b . ~ 1 d . で述べたマウス血清の試験に基づいて、1 a . に従って免疫化したマウスを選択した。このマウスは、自己免疫甲状腺機能亢進症の明らかな徴候を示した。則ち T 4 (μ g / d l) 1 1 . 5 (コントロール血清は 3 . 8 ~ 4 . 5 の範囲の値を示した) ; T S A b (p m o l / 1 0 0 μ L) 8 . 5 (コントロール血清 < 4) ; T B A b (p m o l / 1 0 0 μ L) 1 0 . 5 (コントロール血清 > 2 2) である。このマウスの脾臓細胞を 1 e による m o A b 産生のために使用した。ハイブリドーマ上澄み液を使用した 1 b による F A C S 分析後に、1 2 の抗 - T S H - R - m o A b を選別および試験した。

30

【 0 0 5 6 】

1 2 の抗 - T S H - R - m o A b から 1 , 9 b , 1 5 , 2 1 , 2 3 , 3 1 , 5 6 , 5 9 , 7 3 , 7 9 の数記号をもつ 1 0 が、1 c . による T B I I テストで求められる T B I I 活性を示し (図 1) 、1 d . によるバイオアッセイで傑出した T B A b 効果を示し (図 2) 、T S A b 活性を示さなかった。上述の 1 0 の m o A b s の T B I I 特性は、B . R . A . H . M . S D i a g n o s t i c a 社製の T R A K - A s s a y (登録商標) を用いた測定によって確認した。残りの 2 つの m o A b (2 8 と 3 7) は T B I I 活性を示さなかった。C H O 細胞と反応したが h T S H - R に対して何ら特異性を示さなかったその他のハイブリドーマ 9 , 2 2 , 3 8 , 1 2 , 1 7 , 5 8 の培養上澄み液を、コントロールとして使用した。

40

【 0 0 5 7 】

1 2 の m o A b (ハイブリドーマ上澄み液) を、さらに S D S - P A G E とウェスタン・

50

プロット検出で試験し、そのためにTSH-Rの細胞外領域をグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカーを用いて発現する集密的細胞GT14を使用した。TBII活性を有する10のmAbsは、GT14細胞表面上に現れた成熟したhTSH-R上の線形エピトープを認識し、その際これらのmAbsの4つ(1、9b、31と56)の場合には、N-デグリコシダーゼFでのTSH-Rのデグリコシル化は結合挙動を損なわなかった。

【0058】

1fによるキメラ使用のもとで、TLT-およびLTLT-キメラ(図3参照)がTBII活性を有する新しいmAbsから認識されなかったことが判明した。そのことから、mAbsから認識されたエピトープが、hTSH-Rの、則ちhTSH-RのECDの極大C末端でのアミノ酸382と415の間のセグメントを含むことが推定できる。

【0059】

2.に従って実施された23.1mAbの、異なるTBII/TSAb-およびTBAb活性を有する40人の患者(No.1~40)の血清からの自己抗体との競合試験から、125I-mAb23.1のJP19細胞への結合を競合させる能力とTBAb活性との間にプラスの相関関係が存在することが判明した。バイオアッセイで非常に強いTSAb活性を有する血清は、それに対して125I-mAb23.1と競合せず、測定したTBII値との競合の相関関係も生じなかった。測定結果を以下の表1ならびに図4に示す。

【0060】

表1では、

(a)%23.1排除を、

$(1 - [125I - mAb23.1 + \text{各患者の血清}(cpm\text{限定})] / [125I - mAb23.1 + \text{標準血清}(cpm\text{限定})]) \times 100$

の値で、

(b)TSAb活性(%)を、

$([\text{患者の血清を用いて測定したcAMP} - \text{標準血清を用いて測定したcAMP}] / \text{標準血清を用いて測定したcAMP}) \times 100$

の値で、

(c)TBAb活性(%)を、

$(1 - [\text{患者の血清を用いて測定したcAMPプラス}200\mu\text{UI/ml bTSH}] / [\text{標準血清を用いて測定したcAMPプラス}200\mu\text{UI/ml bTSH}]) \times 100$

の値で表す。

【0061】

表1と図4から読み取られる結果は、述べられた免疫法と選別法によって、患者の血清からのTSAbと競合しないmAbが得られ、それ故TRA bの量を、患者の血清中の非TSAbタイプから選択的に決定することを認め、その際前述のTRA b従属群の特定量がTBAb活性とプラスの相関関係にあり(図4参照)、それにより競合アッセイを用いて患者の血清中のTBAbを決定することが可能となることを示す。

【表1】

患者の血清

N o .	% 2 3 . 1 排除 (a)	fT4 pmol/l	TSH [mU/l]	TBI [U/l]	TSAb (b) [%]	TBAb (c) [%]
1	100			>405	39%	98%
2	58			>405	87%	86%
3	60			>405	308%	88%
4	38			>405	148%	88%
5	48			>405	175%	84%
6	51			>405	74%	87%
7	32			>405	897%	16%
8	28			>405	1458%	61%
9	0	16,70	0,830	95,40	357%	4%
10	0	27,10	0,002	56,30	333%	18%
11	0	4,70	20,710	56,60	292%	24%
12	0			49,70	1733%	0%
13	0			38,40	4182%	0%
14	0			40,70	1857%	17%
15	0			42,10	8000%	10%
16	0			46,80	10000%	0%
17	0			33,70	1333%	6%
18	0			18,70	1929%	2%
19	0			12,60	225%	3%
20	0	33,10	0,002	14,60	400%	24%
21	0	38,20	0,002	13,40	477%	8%
22	0	24,30	0,002	13,50	450%	16%
23	0	15,80	0,590	10,60	278%	9%
24	0	8,80	0,002	0,47	520%	0%
25	0	19,90	0,080	0,00	210%	0%
26	4	12,60	0,160	0,00	786%	15%
27	3			4,30	3333%	19%
28	48	23,00	0,330	> 405,0	180%	87%
29	100			> 405,0	50%	98%
30	50	22,70	0,002	>405,0	110%	86%
31	32	11,80	7,230	19,00	160%	93%
32	3	7,30	21,770	156,10	160%	0%
33	13	8,40	0,013	>405	1400%	0%
34	0	13,90	0,000	166,30	220%	10%
35	0	17,40	0,000	210,00	410%	0%
36	52	17,90	4,780	>405	160%	93%
37	52	10,60	54,260	320,00	110%	81%
38	100			>405	50%	97%
39	0	14,50	8,320	126,00	110%	0%
40	33	19,70	2,880	>405	160%	88%

10

20

30

【図面の簡単な説明】

【図 1】

T B I I 活性を測定するために、J P 0 9 細胞の形で使用した T S H - R の結合位置で、選別した m o A b を標識した b T S H と競合させた、1 2 の m o A b の特徴付試験の結果を示す図である。

【図 2】

J P 0 9 細胞中の c A M P 産生の刺激減少の意味での m o A b の阻害特性を、T S H によって決定した、図 1 と同じ m o A b のバイオアッセイでの試験結果を示す図である。 40

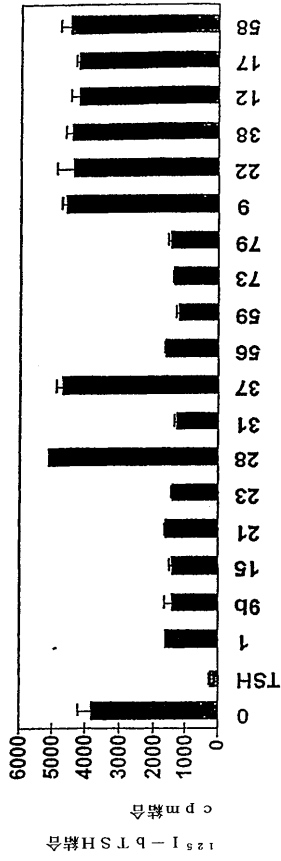
【図 3】

T S H - R の細胞外領域 (E C D) 上の、阻害 m o A b により認識されたエピトープの位置を決定するための、C O S 細胞から発現された T S H - R キメラでの m o A b の結合挙動の決定を示す図である。

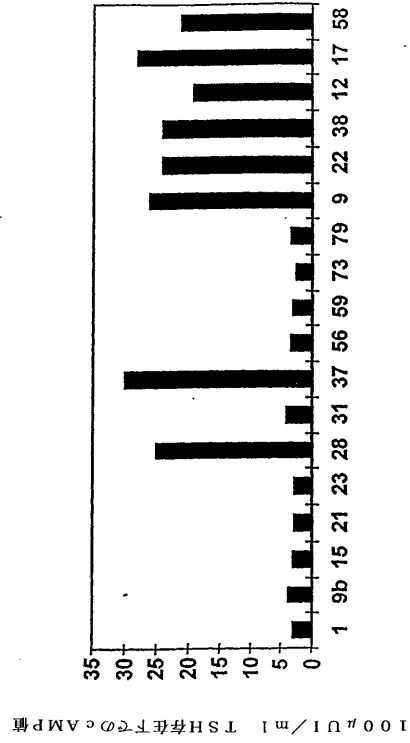
【図 4】

T S H - R 免疫試薬として J P 1 9 細胞を使用し、競合剤として 1 2 5 I - m o A b (m o A b 2 3 . 1) を使用してのバセドウ病患者の血清の測定結果を示す図である。

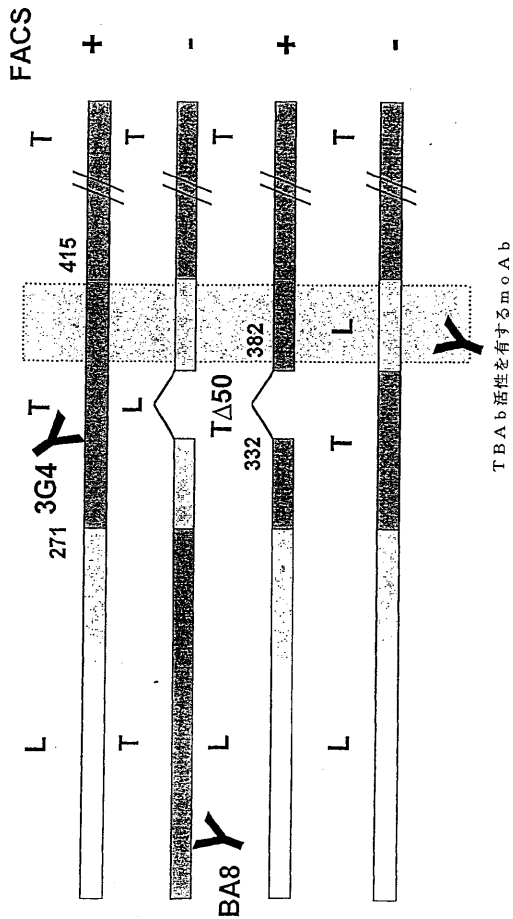
【図1】



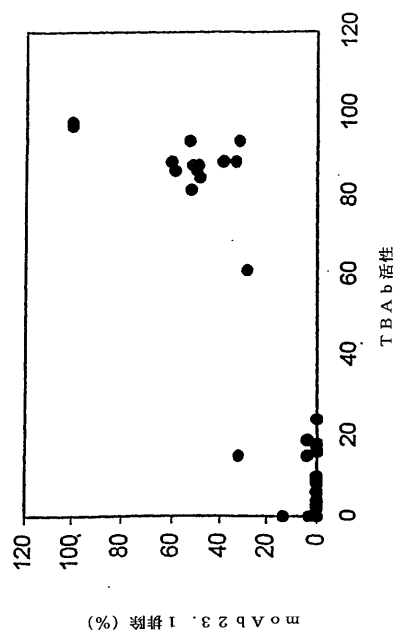
【図2】



【図3】



【図4】



【国際公開パンフレット】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
31. Januar 2002 (31.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/08723 A2

(51) Internationale Patentklassifikation: G01N B-1200 Brüssel (BE), BERGMANN, Andreas [DE/DE]; Baumläuferweg 47, 12351 Berlin (DE), STRUCK, Joachim [DE/DE]; Holsteische Strasse 28, 12161 Berlin (DE), MORGENTHAUER, Nils, G. [DE/DE]; Heiligenseestrasse 121 F, 13503 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/08252

(22) Internationales Anmeldedatum: 17. Juli 2001 (17.07.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität: 100 35 706.7 21. Juli 2000 (21.07.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): B.R.A.H.N.S. DIAGNOSTICA GMBH [DE/DE]; Neundorferstrasse 25, 16761 Henningsdorf (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Amelder (nur für US): COSTAGLIOLA, Sabine [BE/BE]; 31, rue du Manset, B-1080 Brüssel (BE), VASSARI, Gilbert [BE/BE]; 113, avenue Lambert.

(74) Anwälte: ANDRAE, Steffen; Andrae Flach Haag, Balanstrasse 55, 81541 München usw. (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

Veröffentlicht: — ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR THE SELECTIVE DETERMINATION OF BLOCKING AUTO-ANTIBODIES TO THE TSH RECEPTOR

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR SELEKTIVEN BESTIMMUNG VON BLOCKIERENDEN AUTOANTIKÖRPERN GEGEN DEN TSH-REZEPTOR

(57) Abstract: The invention relates to a method for determining auto-antibodies (TRAb) to the TSH receptor (TSH-R), formed in a biological sample obtained from a patient. According to said method, the sample or at least one antibody fraction of the sample is reacted in a known manner in a reaction mixture in the presence of a first immunoreagent in the form of a selective competitor, with a second immunoreagent in the form of a TSH-R preparation. The selective competitor and/or the TSH-R preparation is/are, or can be labelled. The presence and/or quantity of the TRAb sought in the sample is determined by means of the bond between the TSH-R preparation and the selective competitor. According to the invention, the TSH receptor blocking auto-antibody (TBAb) is selectively determined in such a way, that the selective competitor is for the first time chosen to bond at those binding sites of the TSH-R preparation, for which said competitor competes with the TBAb that is to be determined, not however with the TSAb.

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Bestimmung von gegen den TSH-Rezeptor (TSH-R) gebildeten Autoantikörpern (TRAb) in einer von einem Patienten gewonnenen biologischen Probe, bei dem man in an sich bekannter Weise in einer Reaktionsmischung die Probe oder wenigstens eine Antikörperfraktion der Probe in Gegenwart eines ersten Immunreagens in Form eines selektiven Kompetitors mit einem zweiten Immunreagens in Form eines TSH-R-Präparats reagieren läßt, und wobei wenigstens einer von dem selektiven Kompetitor oder dem TSH-R-Präparat markiert oder markierbar ist, und daß man anhand der Bindung zwischen dem TSH-R-Präparat und dem selektiven Kompetitor die Anwesenheit und/oder Menge der gesuchten TRAb in der Probe feststellt, wobei man gemäß der Erfindung selektiv den TSH-Rezeptor blockierende Autoantikörper (TBAb) dadurch bestimmt, daß der selektive Kompetitor erstmals so ausgewählt werden konnte, daß er an solche Bindungsstellen des TSH-R-Präparats bindet, um die er mit den zu bestimmenden TBAb, nicht jedoch mit TSAb konkurriert.

WO 02/08723 A2

WO 02/08723

PCT/EP01/08252

Verfahren zur selektiven Bestimmung von blockierenden Autoantikörpern gegen den TSH-Rezeptor

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur selektiven Bestimmung eines ausgewählten Subtypen von Autoantikörpern gegen den TSH-Rezeptor (TRAb), nämlich sogenannten blockierenden TRAb (TBAb).

Der Rezeptor für das Hormon TSH (thyroidstimulierendes Hormon, Thyreotropin), der TSH-Rezeptor (TSH-R), spielt eine Schlüsselrolle für die Funktion und das Wachstum von Schilddrüsenzellen. Dieser Rezeptor ist ein Glied einer Unterfamilie der G-Protein-gekoppelten Glykoproteinrezeptoren, die außerdem insbesondere noch die Rezeptoren für das luteinisierende Hormon/Choriongonadotrophin (LH/CG-R) und das follikelstimulierende Hormon (FSH-R) umfaßt. Die Rezeptoren dieser Unterfamilie weisen eine große N-terminale extrazelluläre Domäne auf, die für die Ligandenbindung von essentieller Bedeutung ist und für die gezeigt wurde, daß sie an der Signalübermittlung beteiligt ist. Die Übermittlung des TSH-R-Signals wird überwiegend durch die Aktivierung von Adenylatcyclase vermittelt, was zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Niveaus führt.

WO 02/08723

PCT/EP01/08252

2

Ein Teil des großen Interesses an dem TSH-R ist auf seine Rolle als primäres Autoantigen bei verschiedenen Schilddrüsen-Autoimmunerkrankungen zurückzuführen, die vom Auftreten von Autoantikörpern gegen den TSH-R begleitet sind (TSH-R-Auto-Ab bzw. nachfolgend stets nur kurz TRAb). Zu derartigen Schilddrüsen-Autoimmunerkrankungen gehören insbesondere die Basedowsche Krankheit (Morbus Basedow; engl.: Graves' disease), eine zu Schilddrüsenüberfunktion führende Autoimmunerkrankung, die zu den häufigsten menschlichen Autoimmunerkrankungen überhaupt gehört, sowie die Hashimoto Thyreoiditis und das idiopathische Myxödem, die mit einer Schilddrüsenunterfunktion verbunden sein können.

Der TSH-R kommt in der Oberfläche von Schilddrüsenzellen nur in sehr geringen Mengen (in der Größenordnung von 1.000 - 10.000 Rezeptoren pro Zelle) vor. Eine Aufklärung der chemischen Struktur des humanen TSH-Rezeptors (hTSH-R), d.h. der Sequenz der für ihn codierenden DNA sowie der daraus ableitbaren Aminosäuresequenz des Rezeptors selbst, gelang Ende 1989 (vgl. Libert F. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 165: 1250-1255; Nagayama Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 165: 1184-1190; vgl. auch EP-A-0433509 bzw. WO-A-91/09121; sowie WO-A-91/09137; WO-A-91/10735 und WO-A-91/03483; ferner Yuji Nagayama & Basil Rapoport, in: Molecular Endocrinology, Vol. 6 No. 2, S. 145-156 und die darin zitierte Literatur). Seitdem wurden das hTSH-R-Polypeptid und ausgewählte Teilpeptide davon in einer Vielzahl von Systemen exprimiert, wobei sich zeigte, daß ein funktionaler TSH-R nur in Säugetierzellen hergestellt werden kann, und zwar sowohl transient als auch in Form einer stabilen Zelllinie, z.B. unter Verwendung von Adenovirus- und Vacciniavirus-Expressionssystemen.

Das erfolgreiche molekulare Klonieren des hTSH-R hat es ermöglicht, neue Einsichten in die Wechselwirkung von TSH sowie TRAb mit dem TSH-R zu gewinnen und diese Erkenntnisse auch bei der Bestimmung von TRAb für diagnostische Zwecke zu nutzen. Ein Überblick über den gegenwärtigen Stand der Bestimmung von

WO 02/08723

PCT/EP01/08252

3

TRAb im Licht der neueren wissenschaftlichen Erkenntnisse findet sich im Artikel von Nils G. Morgenthaler: New assay systems for thyrotropin receptor antibodies; in Curr Opin Endocrinol 1999, 6:251-260. In der vorliegenden Anmeldung werden für Analyten und Reagenzien die in dem genannten Artikel definierten Abkürzungen und Bezeichnungen verwendet. Auf den Inhalt des genannten Artikels sowie die darin genannten Literaturstellen wird zur Ergänzung des Offenbarungsgehalts der vorliegenden Anmeldung ausdrücklich verwiesen.

Wie auch in dem genannten Artikel zusammenfassend ausgeführt wird, ist der einzige gegenwärtig für den klinischen Alltag verwendbare Assay zur Bestimmung von TRAb ein indirekt arbeitender kompetitiver Assay, bei dem die auf die Anwesenheit von TRAb in einer Patientenprobe zurückzuführende Inhibierung der Bindung von markiertem bTSH an einen solubilisierten porcinen TSH-R aus Schweine-Schilddrüsen (traditioneller Assayaufbau) oder, im Falle eines Assays der neuen "zweiten Generation", an einen an eine Festphase, z.B. Coated Tubes, immobilisierten rekombinanten humanen TSH-R (rhTSH-R) zur Messung genutzt wird. Sich von den traditionellen Assays unterscheidende neuartige Festphasen-Assays sind beschrieben in DE 196 51 093 oder WO 98/26294 bzw. DE 198 01 319 oder WO 99/3678 bzw. in J.Clin.Endocrinol. Metab., Vol.84, No.1, S.90-97 (1999). Aufgrund des angewandten Meßprinzips erfährt ein solcher Assay nur mit bTSH kompetierende Autoantikörper vom sogenannten TBII-Typ, ohne zwischen einzelnen Subtypen (stimulierend, blockierend) zu unterscheiden.

Insbesondere in Patentanmeldungen, die Verfahrensvarianten von Assays zur Bestimmung von TRAb vom TBII-Typ betreffen, wird in allgemeiner Form auch davon gesprochen, daß man statt der Inhibierung von TSH auch die Inhibierung von Antikörpern gegen den TSH-R zur Messung nutzen kann, insbesondere auch zusätzlich zu einer Inhibierung von TSH, wie z.B. in DE 196 51 093.7 bzw. WO 98/26294 beschrieben wird. In allen derartigen Fällen geht es jedoch stets um eine möglichst vollständige Erfassung

WO 02/08723

PCT/EP01/08252

4

aller relevanten pathogenen TRAb in einer Patientenprobe, um auf diese Weise auf Autoimmunreaktionen zurückzuführende Schilddrüsenerkrankungen möglichst lückenlos zu erkennen, ohne daß patientenbedingte Unterschiede der Zusammensetzung der individuell auftretenden TRAb-Populationen zu falsch negativen Meßergebnissen führen, d.h. es geht um eine Erhöhung der klinischen Relevanz von TRAb-Bestimmungen bei kompetitiven Assays.

Es ist inzwischen bekannt, daß die bei Autoimmunerkrankungen auftretenden TRAb auch im Falle von Morbus Basedow Patienten nicht nur stimulierende Autoantikörper (TSAb), die zu einer Hyperthyreose führen, umfassen, sondern daß daneben möglicherweise auch noch blockierende Autoantikörper (TBAb) vorkommen. Die bekannten kompetitiven Assays können nicht zwischen TSAb und TBAb unterscheiden, sondern erfassen diese unterschiedslos als TBII.

Will man zwischen TSAb und TBAb unterscheiden, was im Sinne einer Feindiagnostik des Autoimmungeschehens z.B. bei Morbus Basedow von großem wissenschaftlichem und letztlich auch klinischem Interesse sein kann, muß man auf Bioassays zurückgreifen, auf die z.B. auch in dem o.g. Artikel von N. Morgenthaler in: Curr.Opin.Endocrinol. 1999, 6:251-260 näher eingegangen wird. Bei solchen Bioassays wird ermittelt, ob die cAMP-Produktion von Zellen, die in ihrer Membran einen natürlichen oder rekombinanten TSH-R enthalten, durch die Anwesenheit von bestimmten Seren bzw. Autoantikörpern erhöht wird bzw. ob die durch eine gegebene TSH-Konzentration in der Zelle ausgelöste cAMP-Produktion durch die Seren oder Autoantikörper geschwächt wird.

Da Bioassays für alltägliche Untersuchungen von Patientenproben in Klinik und Labor zu aufwendig sind, wäre es allerdings wünschenswert, auch Assays zur Verfügung zu haben, die eine Unterscheidung von pathogenen stimulierenden und blockierenden TRAb auf einfachere Weise ermöglichen. Ein Vorschlag

WO 02/08723

PCT/EP01/08252

5

für einen derartigen Assay, der Immunpräzipitation bzw. darauf beruhende Differenzmessungen nutzt, findet sich in den unveröffentlichten Anmeldungen DE 199 49 184.4 bzw. DE 100 07 792.7.

Es ist Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein differentialdiagnostisches Verfahren zur selektiven Bestimmung von bestimmten TRAb, und zwar von TBAbs, zu schaffen, bei dem im wesentlichen die eingeführten Arbeitsweisen zur TBII-Bestimmung zur Anwendung kommen können und das sich daher auch für die klinische Praxis eignet.

Diese Aufgabe wird in allgemeiner Form durch ein Verfahren gemäß Anspruch 1 gelöst.

Vorteilhafte, gegenwärtig bevorzugte Ausgestaltungen des Verfahrens gemäß Anspruch 1 finden sich in den Unteransprüchen 2 bis 12 sowie der nachfolgenden Beschreibung unter Berücksichtigung der Ausführungsbeispiele.

Im vorausgehenden und nachfolgenden Text dieser Anmeldung werden die verwendeten Reagenzien bzw. Analyten/Biomoleküle in der Regel durch verschiedene Abkürzungen gekennzeichnet, die stets in den folgenden Bedeutungen zu verstehen sind, es sei denn, es ergibt sich für den Fachmann aus dem konkreten Zusammenhang etwas anderes. Die Verwendung der speziellen Angaben erfolgt dabei aus Gründen der exakten Beschreibung der durchgeführten Versuche und Messungen, bedeutet jedoch nicht, daß die beschriebenen Ergebnisse und Schlußfolgerungen nur für den beschriebenen Spezialfall gelten und nicht unter Heranziehung des relevanten Fachwissens verallgemeinert werden können.

TSH = Thyroidstimulierendes Hormon (Thyreotropin).
Wird die Abkürzung TSH ohne weitere Zusätze verwendet, handelt es sich nicht um ein bestimmtes Produkt, sondern die Bindung bzw. Funktion des Hormons wird in allgemeiner Form disku-

WO 02/08723

PCT/EP01/08252

6

tiert.

¹²⁵I-bTSH = Radioiodiertes, als Kompetitor eingesetztes bTSH (bovines TSH). Im Zusammenhang mit der Beschreibung von Assays der Firma B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH steht ¹²⁵I-bTSH insbesondere für ein Produkt, wie es gemäß DE 42 37 430 C1 bzw. EP 0 668 775 B1 erhalten wird und Bestandteil des TRAK-Assay® bzw. des DYNOTest® TRAK human der Fa. B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH ist.

TSH-R = Der TSH-Rezeptor, ein in der Schilddrüsenmembran verankerter Glykoproteinrezeptor. Wird die Abkürzung TSH-R ohne weitere Zusätze verwendet, ist keine Beschränkung auf irgendein bestimmtes Produkt beabsichtigt. Es kann sich somit auch um einen aus natürlichem Material gewonnenen, z.B. porcinen TSH-R handeln. Bei einem in einem erfindungsgemäßen Assay verwendeten TSH-R handelt es sich jedoch vorzugsweise um ein gentechnisch erzeugtes (rekombinantes) funktionales Rezeptor-Polypeptid, das die Aminosäuresequenz und ggf. Glykosylierung irgendeines natürlich vorkommenden TSH-R, besonders bevorzugt eines humanen TSH-R (hTSH-R), wenigstens in einem solchen Ausmaße aufweist, daß es als "funktionaler TSH-Rezeptor" bezeichnet werden kann. Die Charakterisierung "funktional" bedeutet, daß es sich bezüglich der Bindung von TRAb in signifikantem Ausmaße wie der natürlich vorkommende, insbesondere humane, TSH-R verhält. Die Abkürzung TSH-R kann dabei für das rekombinante vollständige, mehr oder weniger stark glykosylierte Polypeptid, eine Teilsequenz einer ausreichenden Länge oder ein gentechnologisch erzeugtes Fusionsprodukt davon stehen.

WO 02/08723

PCT/EP01/08252

7

Ohne weitere Erläuterungen liegt ein einfach als TSH-R bezeichnetes Produkt als Membranpräparation vor, aus der das Produkt ggf. durch geeignete Solubilisierung der Membranen der zur Expression des rekombinanten Polypeptids verwendeten Zellen unter Verwendung von Detergenzien auch als aufgereinigter Extrakt erhalten worden sein kann.

- TRAb = In biologischen Proben, insbesondere humanem Serum oder Plasma, nachweisbare Autoantikörper gegen den TSH-Rezeptor (TSH-R-Auto-Ab) beliebiger Spezifität.
- TSAb = Die Schilddrüse stimulierende TRAb. Ihr Nachweis ist insbesondere für die Diagnose des Morbus Basedow (englisch: Graves' disease) von Bedeutung.
- TBAb = Die Wirkung von TSH (sowie ggf. auch von TSAb) auf die Schilddrüse blockierende TRAb, deren Nachweis zu einer Hypothyreose in Beziehung gesetzt werden kann.
- TBII = In kompetitiven Assays, die auf einer Konkurrenz von markiertem TSH mit TRAb um die Bindungsstellen einer TSH-R-Präparation beruhen, erfassbare TRAb. Sie können TSAb und/oder TBAb und/oder neutrale TRAb sein. Kommerzielle Assays zur Bestimmung von TRAb vom TBII-Typ sind die Assays TRAK-Assay® und DYNtest® TRAK human (Radiorezeptorassays) bzw. LUMitest® TRAK human (Chemilumineszenzrezeptorassay) der Fa. B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH.
- anti-TSH-R-Ab = In erfindungsgemäßen Assays als selektiver Kompetitor (erstes Immunreagens) einge-

WO 02/08723

PCT/EP01/08252

8

setzte, gegebenenfalls markierte oder selektive markierbare Antikörper gegen den TSH-R. Die für das Verfahren benötigte Selektivität dieser Antikörper wird in erster Linie bei Verwendung selektiver monoklonaler Antikörper (anti-TSH-R-moAb) gewährleistet, deren Herstellung und Selektion im experimentellen Teil beschrieben ist. Die als Immunreagens eingesetzten anti-TSH-R-Ab sind von den als TRAB abgekürzten Autoantikörpern aus Patientenproben klar zu unterscheiden.

moAb = monoklonale Antikörper.

Nachfolgend wird das erfindungsgemäße Verfahren noch näher erläutert. Im experimentellen Teil wird die Herstellung von blockierenden monoklonalen Antikörpern sowie ihre Verwendung zur Bestimmung der Menge blockierender Autoantikörper in Patientenserum anhand einer konkreten Arbeitsvorschrift und eines Ausführungsbeispiels genauer beschrieben. In den Figuren zeigen:

- Fig. 1 die Ergebnisse der Versuche zur Charakterisierung von 12 moAb, bei denen man zur Messung ihrer TBII-Aktivität die selektierten moAb mit markiertem bTSH um Bindungsstellen eines TSH-R, eingesetzt in Form von JP09 Zellen, kompetieren ließ;
- Fig. 2 die Ergebnisse der Untersuchung der gleichen moAb, wie in Fig. 1 in einem Bioassay, in dem die blockierenden Eigenschaften der moAb im Sinne einer Verminderung der Stimulation der cAMP-Produktion in JP09-Zellen durch TSH bestimmt wurde;
- Fig. 3 die Bestimmung des Bindungsverhaltens der moAb an TSH-R-Chimären, die von COS-Zellen exprimiert

WO 02/08723

PCT/EP01/08252

9

werden, und zwar zum Zwecke der Feststellung des Ortes des von dem blockierenden moAb erkannten Epitops auf der extrazellulären Domäne (ECD) des TSH-R;

Fig. 4 die Ergebnisse der Messung von Seren von Morbus Basedow Patienten unter Verwendung von JP19-Zellen als TSH-R-Immunreagens und unter Verwendung eines ^{125}I -moAb (moAb 23.1) als Kompetitor.

Geht man von bekannten Verfahren aus, die auf der Bestimmung von TRAb vom TBII-Typ aus Patientenserum durch Competition mit markiertem bTSH um die Bindungsstellen eines TSH-R-Präparats beruhen, d.h. von Assays, wie sie in den Assays TRAK-Assay[®] und DYNOTest[®] TRAK human bzw. LUMitest[®] TRAK human der B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH verkörpert sind, kann man das erfindungsgemäße Verfahren vereinfacht so darstellen, daß bei dem erfindungsgemäßen Verfahren als Kompetitor anstelle des markierten bTSH ein selektiver markierter Kompetitor verwendet wird, der im wesentlichen nur mit einer engen, eindeutig definierten Untergruppe von TRAb aus dem Patientenserum, nämlich Nicht-TSAb bzw. TBAb, kompetiert und dadurch die selektive Bestimmung von TBAb ermöglicht.

Vorzugsweise wird das erfindungsgemäße Verfahren dabei in einer Verfahrensvariante als Festphasen-Assay durchgeführt, der in vieler Beziehung den Assays zur TRAb-Bestimmung der "zweiten Generation" (DYNOTest[®] TRAK human; LUMitest[®] TRAK human; vgl. die jeweiligen Gebrauchsanweisungen der B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH) entspricht. Bei dieser Verfahrensvariante ist oder wird das als selektiver Binder eingesetzte Immunreagens, d.h. die TSH-R-Präparation, insbesondere eine rhTSH-R-Präparation, mit Hilfe eines speziellen monoklonalen Antikörpers (BA8; vgl. J. Clin. Endocrinol Metab 84: 90-97, 1999 bzw. J.Immunol. 160: 1458-1465) immobilisiert, während der Kompetitor markiert ist. Es können einerseits alle bei den bekannten Verfahren zur Markierung von bTSH verwen-

WO 02/08723

PCT/EP01/08252

10

ten Markierungen (^{125}I ; Chemilumineszenzlabel, z.B. in Form eines Akridiniumderivats) verwendet werden, es können bei dem erfindungsgemäßen Verfahren jedoch auch andere an sich bekannte Markierungslabel zum Einsatz kommen, z.B. Enzymlabel oder Fluoreszenzlabel, die an Immunreagenzien vom Antikörpertyp leichter ohne Aktivitätsverlust des Reagens angefügt werden können als zum Beispiel an TSH.

Es können außerdem auch an sich bekannte Nachweissysteme zur Anwendung kommen, bei denen an das als Kompetitor eingesetzte Immunreagens eine erste Markierungskomponente gebunden ist, die Teil eines komplexen Nachweissystems ist, dessen anderer Teil an ein weiteres Immunreagens, z.B. einen weiteren Antikörper, gebunden ist. Beim erfindungsgemäßen Verfahren kann der weitere, mit der zweiten Markierungskomponente verknüpfte Antikörper zum Beispiel ein Antikörper sein, wie er bei den TBII-Assays der zweiten Generation zur Immobilisierung des hTSH-R-Präparats verwendet wird. Bei der Ausbildung eines Sandwich unter Beteiligung der beiden Antikörper kommt es zu einer charakteristischen Änderung eines Meßsignals, z.B. eines Fluoreszenz- oder Chemilumineszenz-Signals, die das Ausmaß der Bindung beider Antikörper an den Rezeptor und damit indirekt die Konzentration eines gesuchten Analyten widerspiegelt. Als Beispiel für ein solches System können die z.B. in US-A-4,822,733, EP-0-180 492 B1 oder EP-B1-0 539 477 und dem darin zitierten Stand der Technik beschriebenen Markierungssysteme genannt werden.

Wenn man auf ein komplexes Markierungssystem der genannten Art zurückgreift, kann der Assay auch als homogener Assay ausgestaltet sein, bei dem sich alle Immunreagenzien, Analyten und Reaktionsprodukte in einer flüssigen Reaktionsmischung befinden bzw. bilden und bei dem die Messung, die selektiv nur Reaktionsprodukte erfaßt, die beide Markierungskomponenten in einem einzigen Immunkomplex enthalten, direkt in der Reaktionsmischung erfolgt. Als Beispiel ist wiederum auf die drei obigen Patentveröffentlichungen, den darin genannten Stand der

WO 02/08723

PCT/EP01/08252

11

Technik sowie die unter den Marken TRACE® (Time Resolved Amplified Cryptate Emission) bzw. KRYPTOR® angebotene Technologie (vgl. Prospekte der CIS Diagnostik GmbH) zu verweisen.

Im Falle von Festphasen-Assays kann die Immobilisierung des TSH-R kann an eine beliebige Festphase erfolgen, beispielsweise Polystyrolröhrchen, die als "Coated Tubes" verwendet werden, oder an Mikrotiterplatten, zum Beispiel aus Polystyrol, oder an Partikel, beispielsweise Magnetpartikel. Auch eine zeitlich verzögerte bzw. nachträgliche Immobilisierung unter Verwendung geeigneter Festphasen ist möglich.

Der TSH-R kann bei dem erfindungsgemäßen Verfahren auch auf andere Weise als mit Hilfe spezieller Antikörper immobilisiert werden. Setzt man beispielsweise ein TSH-R-Fusionsprodukt ein, bei dem der TSH-Rezeptor oder der für die gewünschte Immunreaktion erforderliche Teil davon mit Nichtrezeptor-Anteilen, beispielsweise einem biotinylierten Rest, einem sog. 6His-tag aus 6-Histidinresten oder einem anderem geeigneten Rest (vgl. z.B. WO 98/20343), der zur Immobilisierung eine Reaktion mit einem an einer Festphase befindlichen Reaktionspartner, z.B. Streptavidin, Nickel-Chelate oder einem für den Rest spezifischen Antikörper, eingehen kann, können auch derartige Immobilisierungssysteme für den TSH-R verwendet werden, vorausgesetzt, daß dieser seine für die kompetierenden Immunreaktionen erforderliche Funktionalität bewahrt und das Immobilisierungssystem diese Immunreaktionen nicht behindert.

Als festphasenassay kann das Verfahren auch in einer als "spiegelbildlich" bezeichnbaren Ausführungsform durchgeführt werden, bei der das als Kompetitor verwendete Immunreagens, d.h. beispielsweise der blockierende monoklonale Antikörper, immobilisiert ist und mit einem markierten solubilisierten TSH-Rezeptor gearbeitet wird, beispielsweise einem, wie er in DE 198 01 154 beschrieben ist bzw. wie er nach der Lehre der genannten Patentanmeldung erhältlich ist. Die Konkurrenz des immobilisierten Kompetitors mit den TRAb aus den Patienten-

WO 02/08723

PCT/EP01/08252

12

proben äußert sich auch in diesem Falle als Verminderung der Bindung des verwendeten Markers an die Festphase. Derartige spiegelbildliche Assay-Varianten werden in den oben genannten Patentanmeldungen der Anmelderin diskutiert, kommen jedoch bisher in kommerziellen Assays zur TRAb-Bestimmung nicht zur praktischen Anwendung.

Während somit das Assay-Grunddesign auf an sich bekannte Weise in Analogie zu Assays, die mit markiertem bTSH arbeiten, vielfältig variiert werden kann, beispielsweise bezüglich des verwendeten Markierungssystems, der verwendeten Festphase sowie der Wahl des immobilisierten und des markierten Immunreagens, oder der Assay auch im obengenannten Sinne als homogener Assay ausgestaltet sein kann, ohne daß der Bereich des erfindungsgemäßen Verfahrens verlassen wird, ist es für das erfindungsgemäße Verfahren zwingend, daß das Immunreagens, das als Kompetitor für die zu bestimmenden TRAb dient, nicht ein markiertes bTSH ist, sondern ein Immunreagens mit einer hohen, definierten Spezifität, die es gewährleistet, daß das Immunreagens selektiv mit einem definierten Typ von TRAb, nämlich blockierenden TRAb (= TBAb), kompetiert.

Um ein solches Verfahren verwirklichen zu können, ist es somit Voraussetzung, ein derartiges selektives Immunreagens einer definierten Reaktivität zur Verfügung zu haben, das nicht nur mit TSH, sondern auch mit den zu bestimmenden TRAb kompetiert, d.h. daß es auch die dafür erforderliche Affinität aufweisen muß.

Im nachfolgenden experimentellen Teil wird erstmals gezeigt, daß ein derartiges spezifisches Immunreagens in Form eines monoklonalen Antikörpers (Anti-TSH-R-moAb) nach einem detailliert beschriebenen Verfahren herstellbar ist und in der Lage ist, mit TBAb aus Patientenseren um gemeinsame Bindungsstellen eines rekombinanten hTSH-R, genauer der extrazellulären Domäne eines rhTSH-R, zu kompetieren.

WO 02/08723

PCT/EP01/08252

13

Blockierende Anti-TSH-R-moAb mit den gewünschten Eigenschaften können, wie nachfolgend beschrieben, im Anschluß an eine genetische Immunisierung nach einem Verfahren erhalten werden, wie es in seinen Grundzügen beschrieben ist in J.Immunol. 160: 1458-1465.

Bei diesem Verfahren wird ein geeignetes ausgewähltes Versuchstier (Maus) mit einem cDNA-Konstrukt, das die cDNA für die extrazelluläre Domäne (ECD) des hTSH-R enthält, immunisiert. Nach einer Boosterinjektion entsprechend einem empirischen Immunisierungsplan werden Seren aus den Versuchstieren gewonnen, und durch FACS (fluorescence-activated cell sorter) Analyse unter Verwendung von Zellen, beispielsweise transformierten CHO-Zellen, die den hTSH-R exprimieren (JP09), sowie Antimäus-IgG zur Fluoreszenzmarkierung, können dann diejenigen Mäuse selektiert werden, bei denen es zur Bildung von Antikörpern mit der gesuchten Reaktivität gegen des TSH-R gekommen ist. Die Stärke der Antikörperbildung kann durch Konkurrenz der Mäuse-Seren mit ^{125}I -bTSH um einen von transformierten Zellen exprimierten rekombinanten hTSH-R bestimmt werden. Außerdem können in einem parallelen Bioassay die Seren darauf untersucht werden, ob sie die cAMP-Produktion in den TSH-R exprimierenden Zellen mehr oder weniger stark fördern oder blockieren.

Hat man eine Maus identifiziert, die nach Maßgabe der Testung ihres Serums eine Antikörperproduktion der gewünschten Art zeigt, kann eine solche Maus nach der an sich bekannten Technik zur Erzeugung von moAb herangezogen werden, indem die Splenozyten der Maus mit Myelom-Zellen fusioniert werden, die gebildeten Hybridome gezüchtet werden und nach dem Verdünnungsprinzip für die Produktion von moAb herangezogen werden.

Die Eigenschaften der erzeugten moAb können im wesentlichen analog wie die Eigenschaften der Seren festgestellt werden, so daß moAb mit den gewünschten Eigenschaften selektiert werden können.

WO 02/08723

PCT/EP01/08252

14

Wie im nachfolgenden experimentellen Teil beschrieben wird, wurde dabei einer der erzeugten moAb, der stark blockierende Eigenschaften zeigte, für Wettbewerbsversuche ausgewählt und zu diesem Zweck markiert. Es konnte gezeigt werden, daß er mit TRAb aus Patientenserum selektiv kompetiert.

Um zu ermitteln, wo das Epitop für die Bindung des genannten moAb auf der extrazellulären Domäne (ECD) des TSH-R angeordnet ist, wurden für diese Untersuchung ferner geeignete Chimären konstruiert, und anhand einer auftretenden oder ausbleibenden Bindung des markierten moAb an die jeweilige Chimäre konnte das Epitop, um das die untersuchten moAb (Anti-TSH-R-Ab) mit den TRAb aus der Patientenprobe konkurrieren, lokalisiert werden. Im beschriebenen Fall lag das Epitop im Bereich der Aminosäuren 382 bis 415 der bekannten Sequenz des hTSH-R.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand der erfolgreichen Experimente zur moAb-Herstellung und -Selektion sowie anhand der mit einem der selektierten moAb durchgeführten Wettbewerbsversuchen näher erläutert.

Materialien und Methoden - Ergebnisse

1. Produktion und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern (anti-TSH-R-moAb)

1a. Immunisierung von Versuchstieren und Gewinnung von Blutproben

Im Unterschied zu den früheren Untersuchungen zur genetischen Immunisierung von Mäusen (J. Immunol. 160:1458-1465, 1998) wurden für die folgenden Immunisierungsversuche 6 Wochen alte weibliche NMRI-Mäuse [ico:NMRI (IOPS:Han)] eingesetzt. Die Mäuse waren ursprünglich Abkömmlinge von Schweizer Mäusen und wurden unter Auszuchtbedingungen im Institut für Versuchstierkunde am Zentralen Labor der TU Hannover, Deutschland gehalten. Die Mäuse tolerieren keine gegenseitigen Hautver-

WO 02/08723

PCT/EP01/08252

15

pflanzungen. Sie wurden unter den vorgeschriebenen Tierschutzbedingungen gehalten und behandelt.

Am Tag 0 wurden ihnen unter Nembutal-Anästhesie 100 µg pcDNAIII-hTSH-R in PBS (vgl. J.Immunol. 160:1458-1465, 1998) in den anterioren Schienbeinmuskel injiziert. In den Muskel waren 5 Tage vorher 100 µl Cardiotoxin (10 mM, aus dem Gift der Naja nigricollis gereinigt, Calbiochem, La Jolla, CA) injiziert worden. Die Injektionen wurden 4 Wochen und 8 Wochen danach jeweils wiederholt. In der 12. Woche nach der ersten Immunisierung wurden den immunisierten Mäusen Blutproben aus den Retroocular-Kapillaren des rechten Auges entnommen. Für alle Bestimmungen wurden die jeweiligen, so gewonnenen Seren individuell untersucht.

1b. Seren- und Hybridom-Überstands-Untersuchungen durch FACS-Analyse

Transformierte CHO-Zellen, die den hTSH-R exprimieren (JP09; vgl. Biochem.Biophys.Res.Comm., 1990, Vol.171, S.1044-1050) oder Kontroll-CHO-Zellen (JP02) wurden von den Platten, auf denen sie gezüchtet wurden, mit einer EDTA und EGTA (jeweils 5 mM) enthaltenden Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS-Lösung) abgelöst und in Falcon 2052-Röhrchen (200.000 Zellen pro Röhrchen) überführt. Die Zellen wurden bei 500 g bei 4°C für 3 min zentrifugiert, und der Überstand wurde durch Inversion entfernt. Anschließend wurden die Röhrchen 30 min bei Raumtemperatur mit 100 µl PBS-BSA, 0,1%, mit einem Gehalt von 2 µl Serum oder, im Falle der Prüfung auf moAbs, 10 µl Kultur-Überstand von Hybridomzellen inkubiert. Die Zellen wurden dann mit 4 ml PBS-BSA, 0,1%, gewaschen und wie oben zentrifugiert. Sie wurden 30 min auf Eis in der Dunkelheit mit einem Fluorescein-konjugierten Gamma-Ketten-spezifischen Ziegen-Anti-Maus-IgG (SIGMA, St. Louis, MO) im gleichen Puffer inkubiert. Zur Erkennung von beschädigten Zellen, die von der Analyse ausgeschlossen wurden, wurde Propidiumjodid (10 µg/ml) verwendet. Die Zellen wurden noch einmal gewaschen und in 250 µl

WO 02/08723

PCT/EP01/08252

16

PBS-BSA, 0,1% resuspendiert. Die Fluoreszenz von 5000 Zellen pro Röhrchen wurde mit Hilfe eines FACScan® Flow Cytofluorometer (Becton Dickinson, Eerenbodegem, Belgien) untersucht.

1c. Messungen der TBII-Aktivität der Mäuseseren

Zur Messung der TBII-Aktivität wurden intakte CHO-Zellen (JP09, s.o.), die den hTSH-R exprimieren, verwendet. Zu diesem Zwecke wurden auf Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen 5×10^4 Zellen/Vertiefung in 0,1 ml modifiziertem Hank's Puffer ohne NaCl (die Isotonie wurde mit 280 mM Saccharose gewährleistet), ergänzt mit 2,5% Magermilch, ^{125}I -bTSH (30.000 cpm; Tracer aus dem TRAK-Assay® der B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH) und Mäuseserum 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Bei der Beendigung der Inkubation wurden die Zellen rasch im gleichen eiskalten Puffer gewaschen und mit 0,2 ml 1 N NaOH solubiliert, und die Radioaktivität wurde in einem Gamma-Counter gemessen. Dabei wurden zur Messung der TBII-Aktivität 3 μl Mäuseserum pro Vertiefung verwendet. Alle Versuche wurden dreifach wiederholt, und die Ergebnisse werden als gebundene CPM (counts per minute) ausgedrückt.

Bei der Prüfung der Eigenschaften von moAbs wurden statt der Mäuseseren Hybridom-Kulturüberstände eingesetzt.

1d. Messungen der TSAb- und TBAb-Aktivität der Mäuseseren

Bei dem Bioassay zur Bestimmung der TSAb- bzw. TBAb-Aktivität wurden wiederum transformierte CHO-Zellen verwendet, die den hTSH-R exprimieren (JP26; Biochem. Biophys. Res. Commun. 171: 1044-1050, 1990) verwendet. Kurz gesagt wurden auf Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen 5×10^4 Zellen/Vertiefung in 5 mM KCl, 0,25 mM KH_2PO_4 , 0,5 mM MgSO_4 , 0,4 mM Na_2HPO_4 , 1 mM CaCl_2 , 0,1% Glucose, 2 mM IBMX, 20 mM Hepes und 0,3% BSA mit einer Menge von 3 μl Serum (Gesamtvolumen 100 μl pro Vertiefung) inkubiert. Die Inkubation erfolgte für 4 h bei 37°C. Das in das Medium freigesetzte cAMP wurde unter Verwendung eines

WO 02/08723

PCT/EP01/08252

17

kommerziellen kompetitiven Bindungsassays auf an sich bekannte Weise gemessen (Amersham, Bucks, U.K.). Dabei wurde die TSAb-Aktivität unter den obigen Grundbedingungen gemessen, während zur Messung einer TBAb-Aktivität unter identischen Bedingungen und unter Zugabe von 200 μ U/ml Endkonzentration von bTSH (SIGMA) gearbeitet wurde. Bei allen Versuchen wurden Duplikatproben untersucht, und die Ergebnisse werden als pmol cAMP/ml ausgedrückt.

Bei der Prüfung der Eigenschaften von moAbs wurden statt der Mäuseseren Hybridom-Kulturüberstände eingesetzt.

1e. Erzeugung und Selektion von monoklonalen Antikörpern

Zur Isolierung monoklonaler Antikörper wurden ausgewählte Mäuse, die bei der oben beschriebenen Analyse ihrer Seren die gewünschte Immunreaktion zeigten, durch intravenöse Injektion von 5 μ g ECD-6H-GPI (einem ECD-GPI-Fusionsprotein mit einem 6-Histidin-Tag, der zwischen die ECD und das Signalpeptid, das den GPI-Anker kontrolliert, inseriert war) geboostert.

Dabei wurden zur Gewinnung der injizierten Flüssigkeit transformierte CHO-Zellen, die einen hohen Anteil an ECD-6H-GPI-Protein (Zelllinie 4648) exprimieren, 3 h mit PI-PLC inkubiert. Das flüssige Medium wurde anschließend entfernt und mit einem Kobaltharz zur Bindung des 6-Histidin-Tags 1 h bei 4°C inkubiert (Talon™ Metal Affinity Resin, CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, USA). Das Harz wurde mit einem Tris-NaCl-Puffer, pH 8, der 10 mM Imidazol enthielt, gewaschen. Anschließend wurden die gebundenen Proteine mit 100 mM Imidazol von dem Harz eluiert.

3 Tage nach der beschriebenen Booster-Injektion wurden Splenocyten einer ausgewählten NMRI-Maus (vgl. nachfolgend unter 3.), die wie unter 1a. beschrieben mit pcDNAIII-TSH-R immunisiert worden war, mit SP2/0 Myelomzellen bei einem Verhältnis von 5:1 unter Verwendung von 50% Polyethylenglykol verschmol-

WO 02/08723

PCT/EP01/08252

18

zen. Nach der Verschmelzung wurden die Zellen in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/Vertiefung in einem selektiven Medium ausgesät (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, das 10% fötales Kälberserum, 2% Nutridoma (Boehringer Mannheim, Belgien), 10 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 5 mM β -Mercaptoethanol, 2,5 U/ml Amphotericin B, 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin, 100 μ M Hypoxanthin, 400 μ M Aminopterin, 16 μ M Thymidin enthielt). 10 Tage nach der Verschmelzung, während die Zellen aktives Wachstum zeigten, wurden die Kulturüberstände wie oben unter 1b. beschrieben durch FACS-Analyse mit JP09-Zellen auf Anti-hTSH-R-Antikörper untersucht. Hybridomzellen, deren Überstände die gewünschte Immunreaktivität zeigten, wurden durch limitierende Verdünnung kloniert. Hybridoma-Klone wurden weiter als Aszites in Pristan-vorbehandelten BALB/c-Mäusen gezüchtet. Zur Reinigung von IgG aus der Mäuse-Aszites-Flüssigkeit wurde eine Sepharose-Protein A-Affinitäts-Chromatographie angewandt. Die Ig-Klasse der moAb wurde mit einem Mäuse-moAb-Isotypier-Kit (IsoStrip™, Boehringer Mannheim, Belgien) bestimmt.

Für die nachfolgend beschriebenen Kompetierungsversuche wurde ein mAb, und zwar der moAb 23.1, nach der Chloramin-T-Methode so iodiert, daß seine spezifische Radioaktivität 80 μ Ci/ μ g betrug.

1f. Ermittlung der Bindungsstellen ausgewählter moAbs bzw. damit kompetierender TRAb auf der ECD eines hTSH-R

Zur Lokalisierung des Epitops auf der ECD (extrazellulären Domäne) eines von COS-Zellen exprimierten hTSH-R, das von moAbs wie dem moAb 23.1 erkannt wird, wurden Chimären mit Teilsequenzen des LH-Rezeptors (LH-R) und des hTSH-R erzeugt. Und zwar wurden Teilsequenzen der ECD des hTSH-R durch Teilsequenzen des LH-R ersetzt, während die Transmembran-Serpentine des TSH-R jeweils beibehalten wurde. Figur 3 zeigt verschiedene der verwendeten Chimären, wobei mit "L" bezeichnete Sequenzabschnitte aus der ECD des LH-R stammen und daher TRAbs

WO 02/08723

PCT/EP01/08252

19

bzw. Anti-TSH-R-moAbs nicht binden sollten, während mit "T" bezeichnete Bereiche aus der ECD des TSH-R stammen und daher potentiell von den untersuchten moAbs erkennbare Teilsequenzen/Strukturen aufweisen können. In der als L-TA50-T bezeichneten Chimäre fehlten die nur bei dem hTSH-R vorkommenden 50 Aminosäuren der Positionen 332-382 des hTSH-R. Alle Chimären wurden in den pSVL-Vektor inseriert und in COS-Zellen exprimiert. Der Expressionsgrad der Chimären in den Zelloberflächen der COS-Zellen wurde unter Verwendung verschiedener Anti-TSH-R-moAbs und FACS Analyse im wesentlichen wie unter 1b. beschrieben bestimmt.

2. **Kompetition von Seren von Autoimmun-Patienten mit dem selektierten ¹²⁵I-markierten Anti-TSH-R-moAb**

Für die Kompetitionsversuche wurden den hTSH-R exprimierende transformierte CHO-Zellen (JP19; vgl. Biochem.Biophys.Res. Commun.171: 1044-1050, 1990) auf weißen CulturPlates™ (Packard Instrument Company, Meriden, Connecticut, USA) mit 96 Vertiefungen ausgesät (50.000 Zellen/Vertiefung) und in 50 µl HamF12-Medium, das 0,1% BSA und 10 µl eines im jeweiligen Kompetitierungsversuch eingesetzten Autoimmunserums eines Patienten enthielt, 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl des wie oben unter 1e. beschrieben hergestellten und ¹²⁵I-markierten Anti-TSH-R-moAb 23.1 (100.000 cpm/Vertiefung) zugesetzt. 1 h später wurden die Zellen zweimal mit dem gleichen kalten Puffer gewaschen. Es wurden 100 µl MicroScint-20 (Packard Instrument Company, Meriden, Connecticut) zugesetzt, und die an die JP19-Zellen gebundene Radioaktivität wurde in einem TopCount Microplate Scintillation Counter (Packard Instrument Company, Meriden, Connecticut) bestimmt.

3. **Ergebnisse**

Aufgrund der unter 1b.-1d. beschriebenen Testung der Mäuseseren wurde eine gemäß 1a. immunisierte Maus ausgewählt, die klare Zeichen für eine Autoimmun-Hyperthyreose zeigte: T₄

WO 02/08723

PCT/EP01/08252

20

($\mu\text{g}/\text{dl}$) 11.5 (Kontrollseren zeigten Werte im Bereich von 3.8 bis 4.5); TSAb ($\text{pmol}/100\mu\text{L}$) 8.5 (Kontrollseren <4); TBAb ($\text{pmol}/100\mu\text{L}$) 10.5 (Kontrollseren >22). Splenocyten dieser Maus wurden zur moAb-Produktion gemäß 1e. verwendet. Nach FACS Analyse gemäß 1b. unter Verwendung der Hybridoma-Überstände wurden 12 Anti-TSH-R-moAbs selektiert und getestet.

Von den 12 Anti-TSH-R-moAb wiesen 10 mit den Zifferbezeichnungen 1, 9b, 15, 21, 23, 31, 56, 59, 73, 79 im o.g. TBII-Test gemäß 1c. die gesuchte TBII-Aktivität auf (Figur 1) und zeigten im Bio-assay gemäß 1d. eine ausgeprägte TBAb-Wirkung (Figur 2) und keinerlei TSAb-Aktivität. Die TBII-Eigenschaft der genannten 10 moAbs wurde durch Messungen mit dem kommerziellen TRAK Assay[®] der Fa. B.R.A.H.M.S Diagnostica bestätigt. Die restlichen beiden moAbs (28 und 37) zeigten keine TBII-Aktivität. Kulturüberstände von anderen Hybridomas 9, 22, 38, 12, 17, 58, die mit CHO-Zellen reagierten, jedoch keine Spezifität für den hTSH-R aufwiesen, dienten als Kontrollen.

Die 12 moAbs (Hybridom-Überstände) wurden ergänzend in SDS-PAGE und Western-Blotting-Untersuchungen geprüft, wozu konfluente Zellen GT14, die die extrazelluläre Domäne des TSH-R mit einem Glycosylphosphatidylinosit (GPI)-Anker exprimieren, verwendet wurden. Die 10 moAbs mit TBII-Aktivität erkannten lineare Epitope auf dem reifen, auf der GT14-Zelloberfläche präsentierten hTSH-R, wobei im Falle von 4 dieser moAbs (1, 9b, 31 und 56) die Deglykosylierung des TSH-R mit N-Deglycosidase F das Bindungsverhalten nicht beeinträchtigte.

Unter Verwendung der Chimären gemäß 1f. ergab sich, daß die TLT- und LTLT-Chimären (vgl. Figur 3) von den neuen moAbs mit TBII-Aktivität nicht erkannt wurden. Daraus kann geschlossen werden, daß das von den moAbs erkannte Epitop ein Segment zwischen den Aminosäuren 382 und 415 des hTSH-R, d.h. am extremen C-Terminus der ECD des hTSH-R, umfaßt.

Die gemäß 2. durchgeführten Wettbewerbsversuche des 23.1 moAb

WO 02/08723

PCT/EP01/08252

21

mit Autoantikörpern aus Seren von 40 Patienten (Nr. 1-40) mit unterschiedlichen TBII/TSAb- und TBAb-Aktivitäten ergaben, daß eine positive Korrelation zwischen der Fähigkeit, die Bindung des ^{125}I -moAb 23.1 an die JP19-Zellen zu kompetieren, und der TBAb-Aktivität bestand. Seren mit sehr starker TSAb-Aktivität im Bioassay kompetierten dagegen nicht mit dem ^{125}I -moAb 23.1, und es ergab sich auch keine Korrelation der Konkurrenz mit den gemessenen TBII-Werten. Die Meßergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 1 sowie in Figur 4 gezeigt.

In Tabelle 1 steht:

- (a) % 23.1 Verdrängung für den Wert
 $(1 - [\text{cAMP gemessen mit dem Patientenserum} + \text{Serum des jeweiligen Patient (cpm gebunden)}] / [\text{cAMP gemessen mit dem Patientenserum} + \text{Normalserum (cpm gebunden)}]) \times 100$
- (b) TSAb Aktivität (%) für den Wert
 $([\text{cAMP gemessen mit dem Patientenserum} - \text{cAMP gemessen mit Normalserum}] / \text{cAMP gemessen mit Normalserum}) \times 100$
- (c) TBAb Aktivität (%) für den Wert
 $(1 - [\text{cAMP gemessen mit dem Patientenserum plus } 200\mu\text{UI/ml bTSH}] / [\text{cAMP gemessen mit Normalserum plus } 200\mu\text{UI/ml bTSH}]) \times 100$

Die der Tabelle 1 und Figur 4 ablesbaren Ergebnisse zeigen, daß nach dem beschriebenen Immunisierungs- und Selektionsverfahren moAb erhalten wurden, die nicht mit TSAb aus Patientenserum kompetieren und es daher gestatten, selektiv den Gehalt von TRAb vom Nicht-TSAb-Typ in einem Patientenserum zu bestimmen, wobei der bestimmte Gehalt der genannten TRAb-Untergruppe positiv mit der TBAb-Aktivität korreliert (vgl. Figur 4) und damit eine Bestimmung von TBAb in Patientenserum mit einem kompetitiven Assay ermöglicht.

WO 02/08723

PCT/EP01/08252

22

Tabelle 1

Patienten- serum Nr.	% ^{23,1} Verdrängung(a)	ft4 pmol/l	TSH [mIU/l]	TBIl [U/l]	TSAb (b) [%]	TBAb (c) [%]
1	100			>405	39%	98%
2	58			>405	87%	86%
3	60			>405	308%	88%
4	38			>405	148%	88%
5	48			>405	175%	84%
6	51			>405	74%	87%
7	32			>405	897%	15%
8	28			>405	1458%	61%
9	0	16,70	0,830	95,40	357%	4%
10	0	27,10	0,002	56,30	333%	18%
11	0	4,70	20,710	56,50	292%	24%
12	0			49,70	1733%	0%
13	0			38,40	4182%	0%
14	0			40,70	1857%	17%
15	0			42,10	8000%	10%
16	0			46,80	10000%	0%
17	0			33,70	1333%	6%
18	0			16,70	1929%	2%
19	0			12,60	225%	3%
20	0	33,10	0,002	14,60	400%	24%
21	0	38,20	0,002	13,40	477%	8%
22	0	24,30	0,002	13,50	450%	16%
23	0	15,80	0,590	10,60	278%	9%
24	0	9,80	0,002	0,47	520%	0%
25	0	19,90	0,080	0,00	210%	0%
26	4	12,60	0,160	0,00	785%	15%
27	3			4,30	3333%	19%
28	48	23,00	0,330	> 405,0	180%	87%
29	100			> 405,0	50%	98%
30	50	22,70	0,002	>405,0	110%	86%
31	32	11,80	7,230	19,00	160%	93%
32	3	7,30	21,770	156,10	160%	0%
33	13	8,40	0,013	>405	1400%	0%
34	0	13,90	0,000	166,30	220%	10%
35	0	17,40	0,000	210,00	410%	0%
36	52	17,90	4,780	>405	160%	93%
37	52	10,60	54,260	320,00	110%	81%
38	100			>405	50%	97%
39	0	14,50	8,320	125,00	110%	0%
40	33	19,70	2,880	>405	160%	88%

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung von gegen den TSH-Rezeptor (TSH-R) gebildeten Autoantikörpern (TRAb) in einer von einem Patienten gewonnenen biologischen Probe, bei dem man in einer Reaktionsmischung die Probe oder wenigstens eine Antikörperfraktion der Probe in Gegenwart eines ersten Immunreagens in Form eines selektiven Kompetitors mit einem zweiten Immunreagens in Form eines TSH-R-Präparats reagieren läßt, und wobei wenigstens einer von dem selektiven Kompetitor oder dem TSH-R-Präparat markiert oder markierbar ist, und daß man anhand der Bindung zwischen dem TSH-R-Präparat und dem selektiven Kompetitor die Anwesenheit und/oder Menge der gesuchten TRAb in der Probe feststellt, dadurch gekennzeichnet, daß man selektiv die Schilddrüse blockierende Autoantikörper (TBAb) dadurch bestimmt, daß der selektive Kompetitor so ausgewählt ist, daß er an solche Bindungsstellen des TSH-R-Präparats bindet, um die er mit den zu bestimmenden TBAb konkurriert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der selektive Kompetitor ein anti-TSH-R-Antikörper oder ein Fragment davon ist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der anti-TSH-R-Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der selektive Kompetitor ein blockierender anti-TSH-R-Antikörper ist, der im Anschluß an eine genetische Immunisierung einer Maus mit einem hTSH-R-cDNA-Konstrukt hergestellt wurde.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß eines von dem ersten oder zweiten Immunreagens, das ausgewählt ist aus dem TSH-R-Präparat oder dem selektiven Kompetitor, unmarkiert und in einer an eine Fest-

WO 02/08723

PCT/EP01/08252

24

phase immobilisierten oder immobilisierbaren Form eingesetzt wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das TSH-R-Präparat ein rekombinant hergestelltes TSH-R-Präparat ist, das ausgewählt ist aus (i) einem rekombinanten, im wesentlichen vollständigen humanen TSH-R (hTSH-R), (ii) einem TSH-R-Fusionsprotein, das wenigstens die extrazelluläre Domäne des hTSH-R sowie gegebenenfalls Sequenzen für die Markierung und/oder Immobilisierung enthält, und (iii) einer TSH-R-Chimäre, bei der solche Teilsequenzen der extrazellulären Domäne des TSH-R, die für die Bindung von stimulierenden TRAb (TSAb) und/oder neutralen TRAb, benötigt werden, durch inaktive Teilsequenzen ersetzt sind.

7. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der anti-TSH-R-Antikörper so ausgewählt ist, daß er an ein Epitop im Bereich der Aminosäuren 382-415 der Aminosäuresequenz des hTSH-R bindet.

8. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das immobilisierte Immunreagens ein rekombinantes hTSH-R-Präparat ist, das mit Hilfe eines konformativen Antikörpers, der die Bindung der zu bestimmenden TBAb und des selektiven Kompetitors an das hTSH-R-Präparat nicht behindert, an eine Festphase immobilisiert ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das markierte Immunreagens der selektive Kompetitor ist, der mit Hilfe eines Radioisotops, eines Chemilumineszenz-Labels oder eines Enzyms markiert ist.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der selektive Kompetitor an eine Festphase immobilisiert ist und daß das als zweites Immunreagens in solubilisierter Form eingesetzte TSH-R-Präparat markiert ist.

WO 02/08723

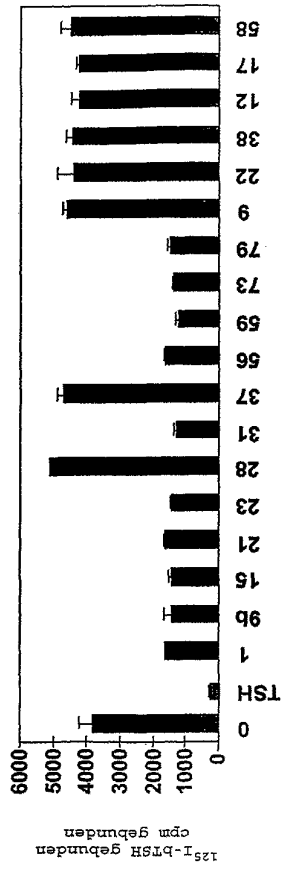
PCT/EP01/08252

25

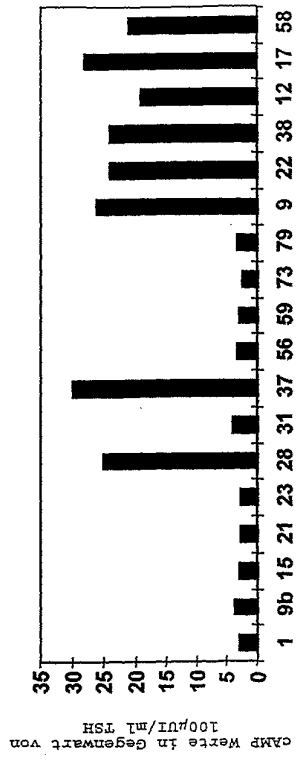
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß sowohl das erste als auch das zweite Immunreagens in der Reaktionsmischung dispergiert vorliegen und daß an das den selektiven Kompetitor bildende erste Immunreagenzien eine erste Markierungskomponente gebunden ist, die Teil eines auf Fluoreszenz- oder Chemilumineszenz-Löschung oder -Verstärkung beruhenden Markierungssystems ist, und daß die zweite Markierungskomponente dieses Markierungssystems an das zweite Immunreagens oder einen selektiv an dieses zweite Immunreagens bindenden Antikörper, der die Bindung der zu bestimmenden TEAb und des selektiven Kompetitors an das hTSH-R-Präparat nicht behindert, gebunden ist.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Markierungssystem Seltenerd-kryptate oder -chelate in Kombination mit einem Fluoreszenz- oder Chemilumineszenz-farbstoff, insbesondere vom Cyanintyp, umfaßt.

Figur 1



Figur 2

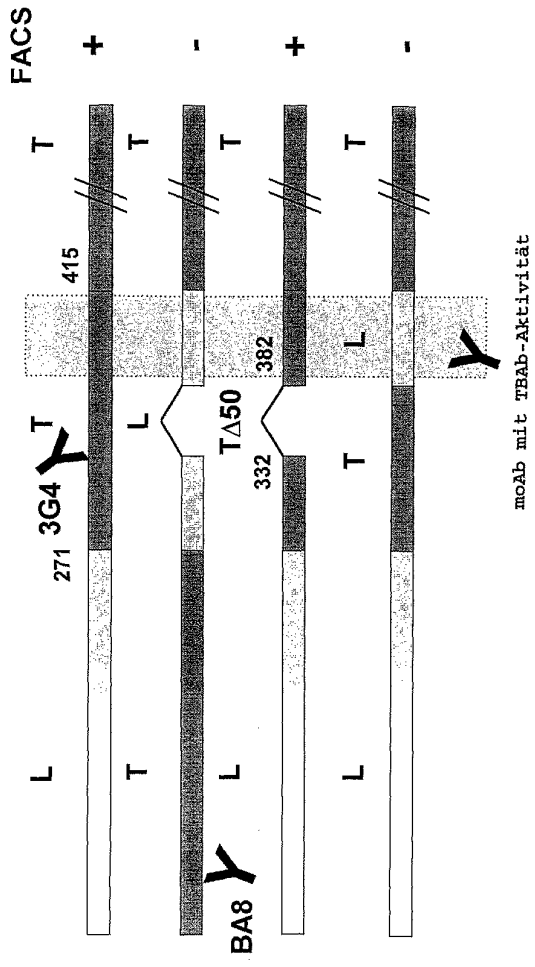


WO 02/08723

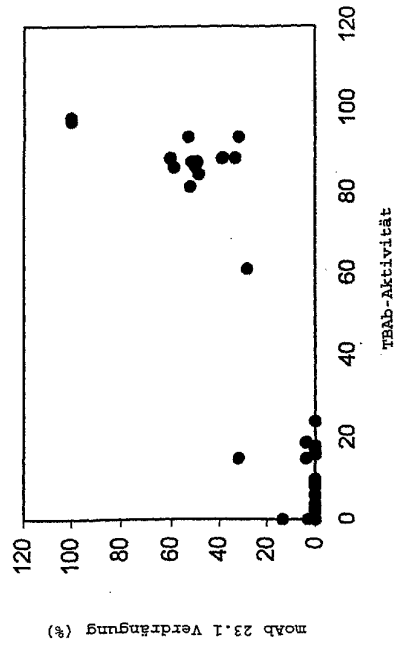
3/4

PCT/EP01/08252

Figur 3



Figur 4



【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
31. Januar 2002 (31.01.2002)

PCT

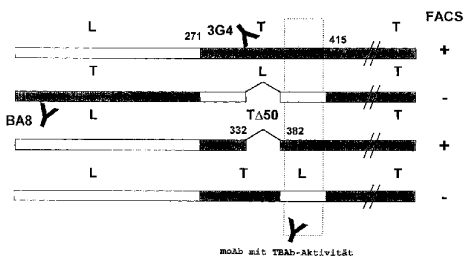
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/008723 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation: G01N 33/76, 33/564
- (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): COSTAGLIOLA, Sabine (BE/BE); 31, rue du Mennot, B-1080 Brüssel (BE); VASSART, Gilbert (BE/BE); 113, avenue Lambeau, B-1200 Brüssel (BE); BERGMANN, Andreas (DE/DE); Baumläuferweg 47, 12351 Berlin (DE); STRUCK, Joachim (DE/DE); Holsteinische Strasse 28, 12161 Berlin (DE); MORGENTHAUER, Nils, G. (DE/DE); Heiligenseestraße 121 F, 13503 Berlin (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/08252
- (22) Internationales Anmeldedatum: 17. Juli 2001 (17.07.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 100 35 706.7 21. Juli 2000 (21.07.2000) DE
- (81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): B.R.A.H.M.S. AKTIENGESELLSCHAFT (DE/DE); Neuendorferstrasse 25, 16761 Henningsdorf (DE).
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE SELECTIVE DETERMINATION OF BLOCKING AUTO-ANTIBODIES TO THE TSH RECEPTOR

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR SELLEKTIVEN BESTIMMUNG VON BLOCKIERENDEN AUTOANTIKÖRPERN GEGEN DEN TSH-REZEPTOR



(57) Abstract: The invention relates to a method for determining auto-antibodies (TRAb) to the TSH receptor (TSH-R), formed in a biological sample obtained from a patient. According to said method, the sample or at least one antibody fraction of the sample is reacted in a known manner in a reaction mixture in the presence of a first immunoreagent in the form of a selective competitor, with a second immunoreagent in the form of a TSH-R preparation. The selective competitor and/or the TSH-R preparation is/are, or can be labelled. The presence and/or quantity of the TRAb sought in the sample is determined by means of the bond between the TSH-R preparation and the selective competitor. According to the invention, the TSH receptor blocking auto-antibody (TBAb) is selectively determined in such a way, that the selective competitor is for the first time chosen to bond at those binding sites of the TSH-R preparation, for which said competitor competes with the TBAb that is to be determined, not however with the TSH-R.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 02/008723 A3

WO 02/008723 A3 

Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 12. Dezember 2002

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Bestimmung von gegen den TSH-Rezeptor (TSH-R) gebildeten Autoantikörpern (TRAb) in einer von einem Patienten gewonnenen biologischen Probe, bei dem man in an sich bekannter Weise in einer Reaktionsmischung die Probe oder wenigstens eine Antikörperfraktion der Probe in Gegenwart eines ersten Immunreagens in Form eines selektiven Kompetitors mit einem zweiten Immunreagens in Form eines TSH-R-Präparats reagieren läßt, und wobei wenigstens einer von dem selektiven Kompetitor oder dem TSH-R-Präparat markiert oder markierbar ist, und daß man anhand der Bindung zwischen dem TSH-R-Präparat und dem selektiven Kompetitor die Anwesenheit und/oder Menge der gesuchten TRAb in der Probe feststellt, wobei man gemäß der Erfindung selektiv den TSH-Rezeptor blockierende Autoantikörper (TBAb) dadurch bestimmt, daß der selektive Kompetitor erstmals so ausgewählt werden konnte, daß er an solche Bindungsstellen des TSH-R-Präparats bindet, um die er mit den zu bestimmenden TBAb, nicht jedoch mit TSAb konkurriert.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP 01/08252
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPK 7 G01N33/76 G01N33/564 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) IPK 7 G01N 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, WPI Data, PAJ, EMBASE, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 26294 A (BRAHMS DIAGNOSTICA GMBH ;STRUCK JOACHIM (DE); BERGMANN ANDREAS (DE) 18. Juni 1998 (1998-06-18) in der Anmeldung erwähnt Seite 3, Zeile 13 -Seite 4, Zeile 3	1-6,8-10
Y	Seite 4, Zeile 9 - Zeile 12 Seite 11, Zeile 25 -Seite 12, Zeile 5 Seite 14, Zeile 13 - Zeile 16 Seite 15, Zeile 10 - Zeile 15 Seite 16, Zeile 15 - Zeile 23 ---	1-4,6, 11,12
A	WO 98 20343 A (BRAHMS DIAGNOSTICA GMBH ;MINICH WALDEMAR B (DE); LOOS ULRICH (DE)) 14. Mai 1998 (1998-05-14) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-10
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" Inter document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 July 2002		Date of mailing of the international search report 26.07.2002
Name and mailing address of the ISA/ Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentean 2 NL - 2266 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Facsimile No. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gundlach, B Telephone No.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 01/08252

C (Confirmation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 199 07 094 C (BRAHMS DIAGNOSTICA GMBH) 13. April 2000 (2000-04-13) das ganze Dokument ---	1-10
A	MORGENTHALER N G: "NEW ASSAY SYSTEMS FOR THYROTROPIN RECEPTOR ANTIBODIES" CURRENT OPINION IN ENDOCRINOLOGY AND DIABETES, PHILADELPHIA, PA, US, Bd. 6, Nr. 4, 1999, Seiten 251-260, XP000944171 ISSN: 1068-3097 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-10
Y	EP 0 298 368 A (ABBOTT LAB) 11. Januar 1989 (1989-01-11) Spalte 4, Absätze 2,3 ---	1-4,6, 11,12
A	EP 0 414 224 A (CANON KK) 27. Februar 1991 (1991-02-27) das ganze Dokument -----	1-4,6, 11,12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP 01/08252
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6 4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
See supplemental sheet FURTHER INFORMATION PCT/ISA/210		
1.	<input checked="" type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest		
	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input checked="" type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 01/08252

FURTHER INFORMATION PCT/ISA/210

The International Searching Authority found that this International Application contains several inventions or groups of inventions, as follows:

1. Claims nos: 1-10 (all in part)
Solid-phase-linked method for determining formed autoantibodies to the TSH receptor, using TSH-R.
 - 1.1 Claims nos: 1-10 (all in part)
Solid-phase-linked method for determining formed autoantibodies to the TSH receptor, using a substantially complete human TSH-R.
 - 1.2 Claims nos: 1-10 (all in part)
Solid-phase-linked method for determining formed autoantibodies to the TSH receptor, using a TSH-R fusion protein.
 - 1.3 Claims nos: 1-10 (all in part)
Solid-phase-linked method for determining formed autoantibodies to the TSH receptor, using a TSH-R-chimera, in which subsequences that are required for the binding of TSAb or neutral TRAb are substituted by inactive subsequences.
2. Claims nos: 1-4, 6, 7 (all in part), 11, 12 (in full)
Method for determining formed autoantibodies to the TSH receptor, using two immunoreagents, both present in dispersed form.

Please note that a complete search was carried out for all the inventions listed under point 1, although said inventions are not necessarily linked by a common inventive concept, without any additional expenditure that would have merited an additional search fee.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members			International Application No PCT/EP 01/08252			
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date			
WO 9826294 A	18-06-1998	DE 19651093 A1	10-06-1998			
		WO 9826294 A1	18-06-1998			
		EP 0943098 A1	22-09-1999			
		JP 2001505999 T	08-05-2001			
WO 9820343 A	14-05-1998	DE 19645729 C1	04-06-1998			
		DE 19728991 A1	11-02-1999			
		WO 9820343 A2	14-05-1998			
		EP 0938679 A2	01-09-1999			
		JP 2001505764 T	08-05-2001			
DE 19907094 C	13-04-2000	DE 19907094 C1	13-04-2000			
		WO 0049050 A2	24-08-2000			
		EP 1153039 A2	14-11-2001			
EP 0298368 A	11-01-1989	US 4954452 A	04-09-1990			
		AT 114191 T	15-12-1994			
		AU 608866 B2	18-04-1991			
		AU 1882688 A	12-01-1989			
		CA 1331560 A1	23-08-1994			
		DE 3852117 D1	22-12-1994			
		DE 3852117 T2	30-03-1995			
		EP 0298368 A2	11-01-1989			
		ES 2066774 T3	16-03-1995			
		JP 1035372 A	06-02-1989			
		JP 2708475 B2	04-02-1998			
		EP 0414224 A	27-02-1991	JP 4072567 A	06-03-1992	
				JP 4072569 A	06-03-1992	
JP 2813894 B2	22-10-1998					
JP 3078656 A	03-04-1991					
AT 139341 T	15-06-1996					
AU 643454 B2	18-11-1993					
AU 6122690 A	28-02-1991					
CA 2023804 A1	24-02-1991					
DE 69027382 D1	18-07-1996					
DE 69027382 T2	09-01-1997					
EP 0414224 A2	27-02-1991					
US 5534441 A	09-07-1996					

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT		Internationale Anmeldelichen PCT/EP 01/08252
A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 601N33/76 601N33/564		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 601N		
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) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Bez. Anspruch Nr.
X	WO 98 26294 A (BRAHMS DIAGNOSTICA GMBH ;STRUCK JOACHIM (DE); BERGMANN ANDREAS (DE) 18. Juni 1998 (1998-06-18) in der Anmeldung erwähnt Seite 3, Zeile 13 -Seite 4, Zeile 3	1-6,8-10
Y	Seite 4, Zeile 9 - Zeile 12 Seite 11, Zeile 25 -Seite 12, Zeile 5 Seite 14, Zeile 13 - Zeile 16 Seite 15, Zeile 10 - Zeile 15 Seite 16, Zeile 15 - Zeile 23	1-4,6,11,12
A	WO 98 20343 A (BRAHMS DIAGNOSTICA GMBH ;MINICH WALDEMAR B (DE); LOOS ULRICH (DE)) 14. Mai 1998 (1998-05-14) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument --- -/--	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifeltfrei erschöpfen 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 ausgestellt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "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 "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindetische Fähigkeit beschränkt werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindetischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist "Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 18. Juli 2002		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 26. 07. 2002
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2240, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Gundlach, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Intern PCT/EP 01/08252
C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 199 07 094 C (BRAHMS DIAGNOSTICA GMBH) 13. April 2000 (2000-04-13) das ganze Dokument ----	1-10
A	MÖRGENTHALER N G: "NEW ASSAY SYSTEMS FOR THYROTROPIN RECEPTOR ANTIBODIES" CURRENT OPINION IN ENDOCRINOLOGY AND DIABETES, PHILADELPHIA, PA, US, Bd. 6, Nr. 4, 1999, Seiten 251-260, XPO00944171 ISSN: 1068-3097 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----	1-10
Y	EP 0 298 368 A (ABBOTT LAB) 11. Januar 1989 (1989-01-11) Spalte 4, Absätze 2,3 ----	1-4,6, 11,12
A	EP 0 414 224 A (CANON KK) 27. Februar 1991 (1991-02-27) das ganze Dokument -----	1-4,6, 11,12

Formblatt PCT/SA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Int. Antrags Aktenzeichen PCT/EP 01/08252
Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)		
Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:		
1.	<input type="checkbox"/>	Ansprüche Nr. _____ weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich _____
2.	<input type="checkbox"/>	Ansprüche Nr. _____ weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich _____
3.	<input type="checkbox"/>	Ansprüche Nr. _____ weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.
Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)		
Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:		
siehe Zusatzblatt		
1.	<input checked="" type="checkbox"/>	Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2.	<input type="checkbox"/>	Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.	<input type="checkbox"/>	Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
4.	<input type="checkbox"/>	Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen enthalten:
Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs		
	<input type="checkbox"/>	Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
	<input checked="" type="checkbox"/>	Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 01 08252

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA 210
<p>Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:</p>	
<p>1. Ansprüche: 1-10 (alle teilweise)</p>	
<p>Festphasen-gebundenes Verfahren zur Bestimmung von gegen TSH-Rezeptor gebildeten Autoantikörpern unter Verwendung von TSH-R</p>	
<p>1.1. Ansprüche: 1-10 (alle teilweise)</p>	
<p>Festphasen-gebundenes Verfahren zur Bestimmung von gegen TSH-Rezeptor gebildeten Autoantikörpern unter Verwendung eines im wesentlichen vollständigen humanen TSH-R</p>	
<p>1.2. Ansprüche: 1-10 (alle teilweise)</p>	
<p>Festphasen-gebundenes Verfahren zur Bestimmung von gegen TSH-Rezeptor gebildeten Autoantikörpern unter Verwendung eines TSH-R-Fusionsproteins</p>	
<p>1.3. Ansprüche: 1-10 (alle teilweise)</p>	
<p>Festphasen-gebundenes Verfahren zur Bestimmung von gegen TSH-Rezeptor gebildeten Autoantikörpern unter Verwendung einer TSH-R-Chimäre, bei der Teilsequenzen, die für die Bindung von TSAb oder neutralen TRAb gebraucht werden, durch inaktive Teilsequenzen ersetzt sind</p>	
<p>2. Ansprüche: 1-4,6,7 (alle teilweise), 11,12 (vollständig)</p>	
<p>Verfahren zur Bestimmung von gegen TSH-Rezeptor gebildeten Autoantikörpern unter Verwendung zweier Immunreagenzien, wobei beide in dispergierter Form vorliegen</p>	
<p>Bitte zu beachten daß für alle unter Punkt 1 aufgeführten Erfindungen, obwohl diese nicht unbedingt durch ein gemeinsames erfinderisches Konzept verbunden sind, ohne Mehraufwand der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, eine vollständige Recherche durchgeführt werden konnte.</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT				Internationale Aktenzeichen PCT/EP 01/08252	
Angaben zu Veröffentlichung				zur selben Patentfamilie gehören	
Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung		
WO 9826294 A	18-06-1998	DE 19651093 A1	10-06-1998		
		WO 9826294 A1	18-06-1998		
		EP 0943098 A1	22-09-1999		
		JP 2001505999 T	08-05-2001		
WO 9820343 A	14-05-1998	DE 19645729 C1	04-06-1998		
		DE 19728991 A1	11-02-1999		
		WO 9820343 A2	14-05-1998		
		EP 0938679 A2	01-09-1999		
		JP 2001505764 T	08-05-2001		
DE 19907094 C	13-04-2000	DE 19907094 C1	13-04-2000		
		WO 0049050 A2	24-08-2000		
		EP 1153039 A2	14-11-2001		
EP 0298368 A	11-01-1989	US 4954452 A	04-09-1990		
		AT 114191 T	15-12-1994		
		AU 608866 B2	18-04-1991		
		AU 1882688 A	12-01-1989		
		CA 1331560 A1	23-08-1994		
		DE 3852117 D1	22-12-1994		
		DE 3852117 T2	30-03-1995		
		EP 0298368 A2	11-01-1989		
		ES 2066774 T3	16-03-1995		
		JP 1035372 A	06-02-1989		
		JP 2708475 B2	04-02-1998		
		EP 0414224 A	27-02-1991	JP 4072567 A	06-03-1992
JP 4072569 A	06-03-1992				
JP 2813894 B2	22-10-1998				
JP 3078656 A	03-04-1991				
AT 139341 T	15-06-1996				
AU 643454 B2	18-11-1993				
AU 6122690 A	28-02-1991				
CA 2023804 A1	24-02-1991				
DE 69027382 D1	18-07-1996				
DE 69027382 T2	09-01-1997				
EP 0414224 A2	27-02-1991				
US 5534441 A	09-07-1996				

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
	G 0 1 N 33/543 5 7 5	
	G 0 1 N 33/577 B	
(74)代理人 100107836		
弁理士 西 和哉		
(74)代理人 100108453		
弁理士 村山 靖彦		
(74)代理人 100110364		
弁理士 実広 信哉		
(72)発明者 サビーヌ・コスタグリオーラ		
ベルギー・B - 1 0 8 0・ブリュッセル・リュ・デュ・メヌエット・3 1		
(72)発明者 ジルベール・ヴァサール		
ベルギー・B - 1 2 0 0・ブリュッセル・アヴニユ・ラムポー・1 1 3		
(72)発明者 アンドレアス・ベルグマン		
ドイツ・1 2 3 5 1・ベルリン・パウムロイファーヴェーク・4 7		
(72)発明者 ヨアヒム・シュトルック		
ドイツ・1 2 1 6 1・ベルリン・ホルシュタイニッシェ・シュトラッセ・2 8		
(72)発明者 ニルス・ゲー・モーゲンターラー		
ドイツ・1 3 5 0 3・ベルリン・ハイリゲンセーシュトラッセ・1 2 1・F		
Fターム(参考) 2G054 AA08 BB05 BB12 CA23 CE02 EA03 EA07 GA04 JA04		

专利名称(译)	选择性测定阻断TSH受体自身抗体的方法		
公开(公告)号	JP2004518945A	公开(公告)日	2004-06-24
申请号	JP2002514366	申请日	2001-07-17
[标]申请(专利权)人(译)	布拉姆斯股份公司		
申请(专利权)人(译)	裴埃尔啊她IMS股份公司		
[标]发明人	サビーヌコスタグリオーラ ジルベールヴァサール アンドレアスベルグマン ヨアヒムシュトルック ニルスゲーモーゲンターラー		
发明人	サビーヌ・コスタグリオーラ ジルベール・ヴァサール アンドレアス・ベルグマン ヨアヒム・シュトルック ニルス・ゲー・モーゲンターラー		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/78 G01N33/543 G01N33/564 G01N33/577 G01N33/76		
CPC分类号	G01N33/76 G01N33/564		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/53.D G01N21/78.C G01N33/543.511.A G01N33/543.541.B G01N33/543.575 G01N33/577.B		
F-TERM分类号	2G054/AA08 2G054/BB05 2G054/BB12 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/EA07 2G054/GA04 2G054/JA04		
代理人(译)	渡边 隆 正和青山 村山彦		
优先权	10035706 2000-07-21 DE		
其他公开文献	JP4729239B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

TSH受体 (TSH-R) 被形成为, 在确定来自患者 (TRAb的) 获得的生物样品中的自身抗体的方法, 所述样品或标本中的反应混合物中的至少一种抗体部分在选择性的竞争者的第一免疫试剂形式的存在, 它与在TSH-R制剂的形式的第二免疫学试剂反应, 的时间的至少一个所述选择性竞争者或TSH-R制备一个是标记的其中所述方法包括基于所述TSH-R制剂与所述选择性竞争剂之间的结合确定样品中所需TRAb的存在和/或量, 其中所述选择性竞争其特征在于, 所述试剂通过选择与所述TSH-R制剂的结合位置结合而选择性地确定TBAb, 所述TSH-R制剂与待测定的甲状腺抑制性自身抗体 (TBAb) 竞争。

患者の血清 No.	% 2 3 . 1 排除 (a)	fT4 pmol/l	TSH [mIU/l]	TBII [U/l]	TSAb (b) [%]	TBAb (c) [%]
1	100			>405	39%	93%
2	58			>405	87%	86%
3	60			>405	308%	88%
4	38			>405	148%	83%
5	48			>405	175%	84%
6	51			>405	74%	87%
7	32			>405	497%	15%
8	28			>405	1459%	61%
9	0	16,70	0,830	95,40	357%	4%
10	0	27,10	0,002	55,30	333%	18%
11	0	4,70	20,710	68,60	292%	24%
12	0			49,70	173%	0%
13	0			38,40	4182%	0%
14	0			40,70	1857%	17%
15	0			42,10	8000%	10%
16	0			45,80	10000%	0%
17	0			33,70	1383%	6%
18	0			18,70	1929%	2%
19	0			12,60	226%	3%
20	0	33,10	0,002	14,60	400%	24%
21	0	38,20	0,002	13,40	477%	8%
22	0	11,80	7,230	19,00	160%	83%
23	0	15,80	0,890	10,60	278%	9%
24	0	8,80	0,002	0,47	520%	0%
25	0	19,90	0,060	0,00	210%	0%
26	4	12,60	0,160	0,00	786%	15%
27	3			4,30	3333%	19%
28	48	23,00	0,330	>405,0	180%	87%
29	100			>405,0	50%	98%
30	50	22,70	0,002	>405,0	110%	86%
31	32	11,80	7,230	19,00	160%	83%
32	3	7,30	21,770	156,10	160%	0%
33	13	8,40	0,013	>405	1400%	0%
34	0	13,90	0,000	166,30	220%	10%
35	0	17,40	0,000	>405	410%	0%
36	82	17,80	4,780	>405	160%	93%
37	52	10,60	54,260	330,00	110%	81%
38	100			>405	50%	97%
39	0	14,50	8,320	125,00	110%	0%
40	33	19,70	2,890	>405	160%	88%