

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4729239号
(P4729239)

(45) 発行日 平成23年7月20日 (2011.7.20)

(24) 登録日 平成23年4月22日 (2011.4.22)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 21/78 C
GO 1 N 33/577 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 1 1 A
	GO 1 N 33/543 5 4 1 B
請求項の数 12 (全 15 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-514366 (P2002-514366)	(73) 特許権者	501154389
(86) (22) 出願日	平成13年7月17日 (2001.7.17)		ベー・エル・アー・ハー・エム・エス・ゲ
(65) 公表番号	特表2004-518945 (P2004-518945A)		ーエムペーハー
(43) 公表日	平成16年6月24日 (2004.6.24)		ドイツ・D-16761・ヘーニッヒスト
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/008252		ルフ・ノイエンドルフシュトラーセ・25
(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
審査請求日	平成20年5月28日 (2008.5.28)	(74) 代理人	100108578
(31) 優先権主張番号	100 35 706.7		弁理士 高橋 詔男
(32) 優先日	平成12年7月21日 (2000.7.21)	(74) 代理人	100089037
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		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】 TSH受容体に対する阻止自己抗体の選択的決定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

TSH受容体(TSH-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(TRAb)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、TSH-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TSH-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TSH-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TRAb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(TBAb)と競合する前記TSH-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、TBAbを選択的に決定することを特徴とする方法。

【請求項2】

選択的競合剤が、抗TSH-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TSH-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、hTSH-R-cDNA構造を用いたマウスの遺伝的免疫化により製

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。

【請求項 5】

T S H - R 調製物が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。

10

【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。

20

【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 T B A b と選択的競合剤の h T S H - 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。

30

【請求項 12】

標識方式が、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】

40

【発明の属する技術分野】

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

【0002】

【従来の技術】

ホルモン T S H (甲状腺刺激ホルモン、サイトロロピン) 用の受容体である T S H 受容体 (T S H - 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 (L H / C G - R) と卵胞刺激ホルモン用の受容体 (F S H - R) を含む。このサブフ

50

アミリーの受容体は、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關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。

【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-Abは、以下ではただTRAb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、グレーブス病)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る得る橋本病と特発性粘液水腫が属する。

10

【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。

20

【0005】

hTSH-Rの成功した分子クローン化は、TSHならびにTRAb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TRAb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TRAb決定の現在の状況についての概観は、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。

30

【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への結合の阻害かまたは、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)への結合の阻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TBI Iタイプの自己抗体のみを検知する。

40

【0007】

特にTBI I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

50

許明細書では、一般的な形式で、TSH阻害の代わりにTSH-Rに対する抗体の阻害も測定に、特に追加でTSHの阻害のためにも使用できることも述べられ、それは例えばDE19651093.7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。

【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。

10

【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。

20

【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DE19949184.4ないしDE10007792.7に見出される。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、特定のTRAb、則ちTBAb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、TBII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。

30

【0012】

【課題を解決するための手段】

この課題は、一般的な形式で請求項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12、ならびに実施形態に則した以下の説明に見出される。

40

【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】

TSH = 甲状腺刺激ホルモン(サイトロピン)。何も追加せずに略語TSH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

50

形式で議論される。

【0016】

125I - bTSH = 競合剤として使用した放射性ヨウ素化bTSH (ウシTSH)。B. R. A. H. M. S Diagnostics GmbH社の定量法の記載と関連して125I - bTSHは特に、DE4237430C1ないしEP0668775B1に従って得られる製品、およびB. R. A. H. M. S Diagnostics GmbH社のTRAK - Assay (登録商標)ないしDYNObest (登録商標) TRAK humanの成分を表す。

【0017】

TSH - R = TSH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TSH - 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TSH - 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TSH - Rの場合には、少なくとも「機能性TSH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TSH - 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TSH - R (hTSH - R)の機能性TSH - R受容体を意味する。「機能的な」という特徴は、これがTRAb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TSH - Rのように振る舞うことを意味する。その際略語TSH - 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TSH - 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。

【0018】

TRAb = 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TSH受容体に対する自己抗体(TSH - R - Auto - Ab)。

【0019】

TSAb = 甲状腺刺激TRAb。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】

TBA b = TSH (ならびに場合によってはTSAb)の甲状腺阻害TRAb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。

【0021】

TBII = TSH - R調製物の結合位置において標識TSHをTRAb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TRAb。これらはTSAbおよび/またはTBA bおよび/または中性TRAbであり得る。TBIIタイプのTRAbを決定する商業ベースの定量法は、B. R. A. H. M. S Diagnostics GmbH社の定量法TRAK - Assay (登録商標)とDYNObest (登録商標) TRAK human (放射受容体検定)ないしLUMItest (登録商標) TRAK human (化学発光受容体検定)である。

【0022】

抗 - TSH - R - Ab = 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、TSH - 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 - TSH - R - m o Ab)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 - TSH - R - Abは、患者試料からのTRAbと略した自己抗体から明白に区別される。

【0023】

m o Ab = モノクローナル抗体。

【0024】

10

20

30

40

50

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、阻害モノクローナル抗体の製造ならびに患者の血清中の阻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。

【0025】

【発明の実施の形態】

患者の血清からのTBI IタイプのTRAbを、TSH-R製剤の結合位置に関して標識bTSH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 Diagnostica GmbH社の定量法TRAK-Assay（登録商標）とDYNOTest（登録商標）TRAK humanないしLUMITest（登録商標）TRAK human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bTSH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TRAbの明白に定義された狭い従属群、則ち非TSA bすなわちTBA bのみと競合し、それによってTBA bを選択的決定することが可能となる。

10

【0026】

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TRAbを決定する定量法（DYNOTest（登録商標）TRAK human；LUMITest（登録商標）TRAK human；B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH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TSH-R調製物、特にrhTSH-R調製物は、特殊モノクローナル抗体（BA8；J.Clin.Endocrinol Metab 84：90～97、1999、ないしJ.Immunol. 160：1458～1465参照）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bTSH標識法で使用された全てのマーカを（125I；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TSH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。

20

【0027】

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。

30

【0028】

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。

40

【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

50

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。

【0030】

T S H - 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 T S H - R 融合生成物が使用され、その際 T S H 受容体かまたは、非受容体部、例えばビオチニル残基、6 ヒスチジン残基から成る、いわゆる 6 H i s 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 W O 9 8 / 2 0 3 4 3 参照）を有してなる所望の免疫反応に必要な T S H 受容体の部分を使用される場合、T S H - 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 T S H - R に使用することができる。

10

【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 D E 1 9 8 0 1 1 5 4 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 T S H 受容体と反応する。固定化競合剤の、患者の試料からの T R A b 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 T R A b 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。

20

【0032】

故に定量法基本デザインを、標識 b T S H 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 T R A b のための競合剤として用いられる免疫試薬が標識した b T S H ではなく、その免疫試薬が、T R A b の定義されたタイプ、則ち阻害 T R A b (= T B A 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いられる。

30

【0033】

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、T S H のみならず、決定すべき T R A b と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 - T S H - R - m o A b ）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 h T S H - R の、正確には r h T S H - 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 T B A b 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 - T S H - R - m o A b 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 . I m m u n o l . 1 6 0 : 1 4 5 8 ~ 1 4 6 5 に記載されるような方法によって得られる。

40

【0036】

この方法では適当に選択した実験用動物（マウス）は、h T S H - R の細胞外領域（E C D）で c D N A を含む c D N A 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 h T S H - R を発現する形質転換 C H O 細胞（J P 0 9）ならびに蛍光標識するための抗マウス I g G を使用した F A C S（蛍光標示式細胞分取器）分析によってその後、T S H - 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 h T S H - R でのマウス血清の 1 2 5 I

50

- b T S H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 T S H - R 発現細胞中で c A M P 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。

【 0 0 3 7 】

その血清テストによって所望の種類の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、m o A b 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、m o A b の産生のための希釈原理に従って培養される。

【 0 0 3 8 】

産生した m o A b 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 m o A b を選別することができる。

10

【 0 0 3 9 】

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 m o A b 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 m o A b が患者の血清からの T R A b と選択的に競合することを示すことができた。

【 0 0 4 0 】

前述の m o A b の結合のためのエピトープが T S H - R の細胞外領域 (E C D) 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 m o A b 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 m o A b (抗 - T S H - R - A b) は、このエピトープをめぐって患者試料からの T R A b と競合する。ここで述べた場合にはこのエピトープは、h T S H - R の周知の配列のアミノ酸 3 8 2 ~ 4 1 5 の範囲にあった。

20

【 0 0 4 1 】

以下で本発明を、m o A b 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 m o A b 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。

【 0 0 4 2 】

【実施例】

材料と方法 - 結果

1 . モノクローナル抗体 (抗 - T S H - R - m o A b) の製造と特徴決定

1 a . 実験用動物の免疫化と血液試料の獲得

30

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 N M R I 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 T U ハノーバーの実験センターにある実験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、P B S 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 1 2 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。

40

【 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

50

alcon 2052管(管当たり200,000細胞)に移行させる。この細胞を500g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30分間PBS-BSA、0.1%の100 μ l、2 μ lの量の血清、またはmoAbs検査の場合にはハイブリドーマ細胞の培養上澄み液10 μ lと共に培養した。その後この細胞をPBS-BSA、0.1%4ml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30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IgG(SIGMA、セントルイス、MO)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(10 μ g/ml)を使用した。この細胞をさらにもう一度洗浄し、PBS-BSA、0.1%250 μ l中で再懸濁させた。管当たり5000細胞の蛍光を、FACScan(登録商標)フロー・サイトフルオロメトリ-

10

【0045】

1c. マウス血清のTBII活性測定

TBII活性を測定するために、hTSH-Rを発現する無傷のCHO細胞(JP19、s.o.)を使用した。この目的のために5 \times 10⁴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、NaCl無しの修飾ハックス緩衝液(等張性は280mMのサッカロースで保証された)0.1ml中、2.5%の脱脂乳、125I-bTSH(30,000cpm;B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH社のTRAK-Assay(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、1NのNaOH0.2ml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TBII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回繰り返して、結果を結合CPM(分当たりのカウント)として表す。

20

【0046】

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。

【0047】

1d. マウス血清のTSAbおよびTBAb活性の測定

TSAbないしTBAb活性を決定するバイオアッセイの場合には、再びhTSH-Rを発現する形質転換CHO細胞(JP26;Biochem.Biophys.Res.Comm.171;1044~1050、1990)を使用した。簡潔に言えば、5 \times 10⁴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、5mMのKCl、0.25mMのKH₂PO₄、0.5mMのMgSO₄、0.4mMのNa₂HPO₄、1mMのCaCl₂、0.1%のグルコース、2mMのIBMX、20mMのヘブスおよび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。

30

40

【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。

50

【 0 0 5 0 】

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、10mM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、100mMのイミダゾールを用いてこの樹脂から溶離した。

【 0 0 5 1 】

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NMRIMマウス（以下の3.を参照）の脾臓細胞をSP2/0骨髄腫細胞と、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2x10⁵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）、10mMのピルビン酸ナトリウム、2mMのL-グルタミン、5mMのβ-メルカプトエタノール、2.5U/mlのアンホテリシンB、100U/mlのペニシリン、100μg/mlのストレプトマイシン、100μMのヒポキサンチン、400μMのアミノプテリン、16μM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。

【 0 0 5 2 】

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

【 0 0 5 3 】

1f. 選択したmoAbsないしこれと競合するhTSH-RのECD上のTRAbの結合位置の算出

moAb23.1のようなmoAbsから識別される、COS細胞により発現したhTSH-RのECD（細胞外領域）上でエピトープを局在化させるために、LH受容体（LH-R）とhTSH-Rの部分配列を有するキメラを製造した。則ちhTSH-RのECDの部分配列がLH-Rの部分配列で置き換えられ、一方TSH-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LH-RのECD由来のものであり、それ故TRAbsないし抗-TSH-R-moAbsは結合しないはずであり、一方「T」で表した領域はTSH-RのECD由来のものであり、それ故試験したmoAbsが認識可能な部分配列/構造を有すると考えられ得る。L-T50-Tと表されたキメラ中では、hTSH-Rでのみ存在するhTSH-Rの位置332~382の50のアミノ酸が欠けていた。全キメラをpSVLベクターに挿入し、COS細胞中で発現させた。COS細胞の細胞表面でのキメラの発現度は、様々な抗-TSH-R-moAbsとFACS分析を利用して、主に1b.に述べたようにして決定した。

【 0 0 5 4 】

2. 自己免疫患者の血清の、選別された125I標識抗-TSH-R-moAbとの競合競合試験のためにhTSH-Rを発現する形質転換CHO細胞（JP19; Biochem. Biophys. Res. Commun. 171: 1044~1050, 1990参照）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

10

20

30

40

50

ト・カンパニー、メリデン、コネティカット、USA)上に撒き(50,000細胞/ウェル)、0.1%のBSAと各競合試験で使用した患者の自己免疫血清10 μ lを含む50 μ lのHamF12培地内で、37 $^{\circ}$ Cで1時間培養した。続いて上述の1e.で述べたように製造されて125I標識された抗-TSH-R-moAb23.1(100,000cpm/ウェル)50 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。MicroScint20(パッカード・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)100 μ lを加え、JP19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(パッカード・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。

【0055】

10

3. 結果

1b.~1d.で述べたマウス血清の試験に基づいて、1a.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T4(μ g/dl)11.5(コントロール血清は3.8~4.5の範囲の値を示した);TSAb(pmol/100 μ L)8.5(コントロール血清<4);TBAb(pmol/100 μ L)10.5(コントロール血清>22)である。このマウスの脾臓細胞を1eによるmoAb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1bによるFACS分析後に、12の抗-TSH-R-moAbを選別および試験した。

【0056】

12の抗-TSH-R-moAbから1,9b,15,21,23,31,56,59,73,79の数記号をもつ10が、1c.によるTBIIテストで求められるTBII活性を示し(図1)、1d.によるバイオアッセイで傑出したTBAb効果を示し(図2)、TSAb活性を示さなかった。上述の10のmoAbsのTBII特性は、B.R.A.H.M.S Diagnostics社製のTRAK-Assay(登録商標)を用いた測定によって確認した。残りの2つのmoAb(28と37)はTBII活性を示さなかった。CHO細胞と反応したがhTSH-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9,22,38,12,17,58の培養上澄み液を、コントロールとして使用した。

20

【0057】

12のmoAb(ハイブリドーマ上澄み液)を、さらにSDS-PAGEとウェスタン・ブ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moAbs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moAbs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。

30

【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moAbsから認識されなかったことが判明した。そのことから、moAbs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。

40

【0059】

2.に従って実施された23.1moAb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-moAb23.1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-moAb23.1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】

50

表 1 では、

(a) % 2 3 . 1 排除を、

$(1 - [1 2 5 \text{ I} - \text{m o A b } 2 3 . 1 + \text{各患者の血清 (c p m 限定) }] / [1 2 5 \text{ I} - \text{m o A b } 2 3 . 1 + \text{標準血清 (c p m 限定) }]) \times 1 0 0$

の値で、

(b) T S A b 活性 (%) を、

$([\text{患者の血清を用いて測定した c A M P} - \text{標準血清を用いて測定した c A M P}] / \text{標準血清を用いて測定した c A M P}) \times 1 0 0$

の値で、

(c) T B A b 活性 (%) を、

$(1 - [\text{患者の血清を用いて測定した c A M P プラス } 2 0 0 \mu \text{ U I} / \text{m l } \text{ b T S H}] / [\text{標準血清を用いて測定した c A M P プラス } 2 0 0 \mu \text{ U I} / \text{m l } \text{ b T S H}]) \times 1 0 0$

の値で表す。

【 0 0 6 1 】

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 T S A b と競合しない m o A b が得られ、それ故 T R A b の量を、患者の血清中の非 T S A b タイプから選択的に決定することを認め、その際前述の T R A b 従属群の特定量が T B A b 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 T B A b を決定することが可能となることを示す。

【表 1】

10

20

患者の血清

N o .	% 2 3 . 1 排除 (a)	fT4 pmol/l	TSH [mU/l]	TBI [U/l]	TSAb (b) [%]	TBAAb (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	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	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	125,00	110%	0%
40	33	19,70	2,880	>405	160%	88%

10

20

30

【図面の簡単な説明】

【図1】 TBI活性を測定するために、JP09細胞の形で使用したTSH-Rの結合位置で、選別したmAbを標識したbTSHと競合させた、12のmAbの特徴付試験の結果を示す図である。

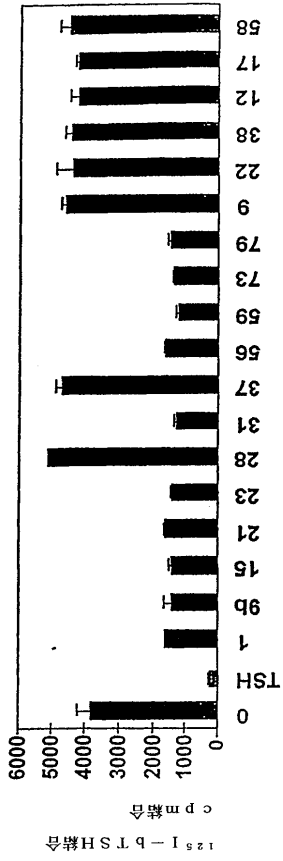
【図2】 JP09細胞中のcAMP産生の刺激減少の意味でのmAbの阻害特性を、TSHによって決定した、図1と同じmAbのバイオアッセイでの試験結果を示す図である。

40

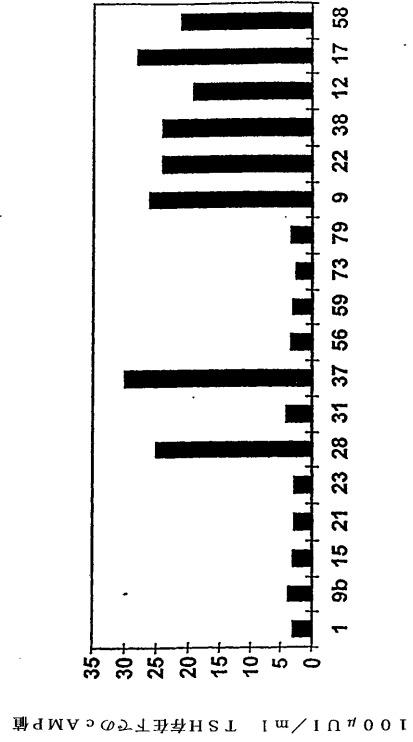
【図3】 TSH-Rの細胞外領域(ECD)上の、阻害mAbにより認識されたエピトープの位置を決定するための、COS細胞から発現されたTSH-RキメラでのmAbの結合挙動の決定を示す図である。

【図4】 TSH-R免疫試薬としてJP19細胞を使用し、競合剤として125I-mAb(mAb23.1)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。

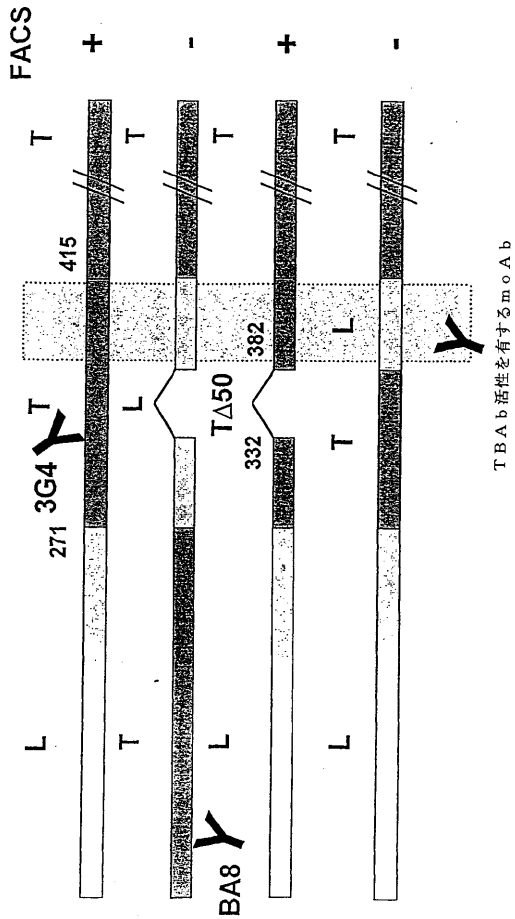
【図1】



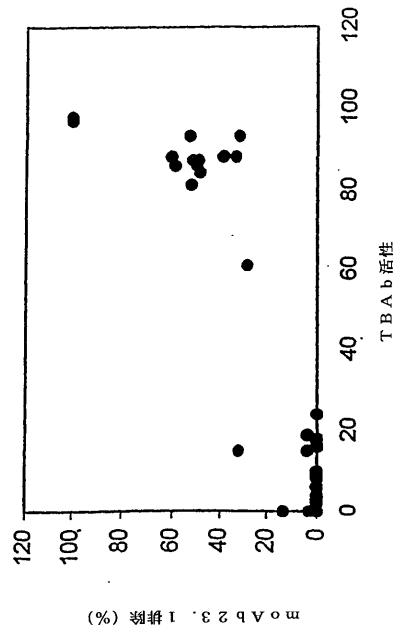
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 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・ホルシュタイニツシェ・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

審査官 白形 由美子

(56)参考文献 特開平08 - 2 2 8 7 6 9 (J P , A)

国際公開第99 / 0 6 4 8 6 5 (W O , A 1)

国際公開第98 / 0 2 6 2 9 4 (W O , A 1)

遠藤登代志, 甲状腺疾患 TSHレセプター-抗体 診断・予後判定上の有用性と限界 , Med.Pract. ,
 1 9 9 9 年, Vol.16 No.6 , Page.941-944

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 33/48 - G01N 33/98

G01N 21/78

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

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	JP4729239B2	公开(公告)日	2011-07-20
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		
当前申请(专利权)人(译)	裴埃尔啊她IMS有限公司		
[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 G01N33/577 G01N33/564 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		
代理人(译)	渡边 隆 正和青山 村山彦		
审查员(译)	白形 由美子		
优先权	10035706 2000-07-21 DE		
其他公开文献	JP2004518945A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在一种测定从患者获得的生物样品中的自身抗体 (TRAb) 的方法中, 所述生物样品针对TSH受体 (TSH-R), 所述样品或所述样品的至少一个抗体部分在反应混合物中形成, 在存在选择性竞争物形式的第一免疫试剂的情况下, 其与TSH-R制剂形式的第二免疫试剂反应, 其中所述选择性竞争剂或至少一种所述TSH-R制剂基于TSH-R制剂和选择性竞争剂之间的结合确定样品中寻找的TRAb的存在和/或量的方法, 一种选择性竞争剂, 其特征在于它通过选择与所述TSH-R制剂的结合位点结合而选择性地选择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。到。

【 图 2 】

