

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 330**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/00** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**C12Q 1/02** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**C12N 15/09** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2010 E 10794054 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015 EP 2450430**

54 Título: **Método de análisis biológico para anticuerpo contra el receptor de la hormona estimuladora tiroidea, kit de medición para el anticuerpo, y célula modificada genéticamente novedosa para su uso en el método de análisis biológico o en el kit de medición**

30 Prioridad:

**30.06.2009 JP 2009155183**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**21.04.2015**

73 Titular/es:

**OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)  
9, Kanda-Tsukasa-machi 2-chome Chiyoda-ku  
Tokyo 101-8535, JP**

72 Inventor/es:

**ARAKI, NAOHIRO**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 534 330 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

**Método de análisis biológico para anticuerpo contra el receptor de la hormona estimuladora tiroidea, kit de medición para el anticuerpo, y célula modificada genéticamente novedosa para su uso en el método de análisis biológico o en el kit de medición**

### Campo técnico

La presente invención se refiere a un kit que comprende una célula que expresa un receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSHR), un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, y a métodos para el diagnóstico de la enfermedad de la tiroides y para el diagnóstico de hipotiroidismos utilizando la célula.

### Técnica anterior

Una hormona estimuladora de la tiroides (TSH) producida por la glándula pituitaria se une a un receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSHR) presente en la glándula tiroides para promover la secreción de una hormona tiroidea. Puesto que la hormona tiroidea es una hormona que potencia el metabolismo sistémico, el aumento anormal o la disminución anormal de la acción de esta hormona afecta de diversas maneras a la mente y al cuerpo, causando la enfermedad de la tiroides. Por ejemplo, en relación con la enfermedad de Graves, un anticuerpo estimulador de la tiroides (TSAb) se produce en el cuerpo, y este anticuerpo, en lugar de TSH, estimula excesivamente el TSHR de manera que las funciones de la glándula tiroides se incrementan y aparecen síntomas tales como agrandamiento de la glándula tiroides, exoftalmos y taquicardia. Por otro lado, entre los hipotiroidismos, hay algunas enfermedades en las que se produce un anticuerpo de bloqueo de la estimulación de la tiroides (TSBAb) de manera que las funciones de la glándula tiroides se reducen y aparecen síntomas tales como un aumento de peso, depresión y fatiga general.

Hasta ahora, el análisis de estos autoanticuerpos (TSAb y TSBAb) contenidos en la sangre se ha utilizado para el diagnóstico de la enfermedad de Graves y el hipotiroidismo.

Los ejemplos representativos de un método de medición de los autoanticuerpos han sido referidos como sigue:

un método de análisis de radiorreceptores (método TBII) que utiliza una TSH marcada con radioisótopo o un anticuerpo monoclonal contra TSHR, en el que dicha TSH marcada con radioisótopo o dicho anticuerpo monoclonal contra TSHR inhibe competitivamente la unión del autoanticuerpo en el suero de un paciente a TSHR de modo que se puede medir una cantidad de autoanticuerpo unido; y

un método de análisis biológico (método TSAb) para medir una cantidad de TSAb, en el que células de la glándula tiroides porcina son tratadas con un anticuerpo que se une a TSHR y la cantidad de TSAb se determina midiendo un aumento en la concentración de AMPc en las células de la glándula tiroides utilizando AMPc marcado con radioisótopo (Biobliografías no de Patente 1 y 2).

El documento WO 2009/045292 describe un análisis para autoanticuerpos del receptor de TSH basado en células transfectadas con TSHR (es decir células CHO). Estos análisis utilizan niveles de luciferasa inducida por AMPc como criterio de valoración.

Literatura no de patente 1: Methods in Enzymology, 74, 405-420 (1981)

Literatura no de patente 2: J Clin Endocrinol Metab. Mayo de 1986; 62 (5): 855-62

### Compendio de la invención

#### Problema técnico a resolver

Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición para la medición de TSAb y/o TSBAb y una composición para el diagnóstico de una enfermedad de la tiroides, que puede ser manipulada más convenientemente que los métodos convencionales sin el uso de un radioisótopo que requiere técnicas o equipos especiales. Además, un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método para el diagnóstico de una enfermedad de la tiroides utilizando la composición.

#### Solución al Problema

El autor de la presente invención utiliza una proteína sensible al calcio para medir la cantidad de entrada de iones de calcio en una célula estimulada por AMPc que se forma por la unión de un anticuerpo estimulador de la tiroides (TSAb) a un receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSHR). Como resultado, el autor de la presente invención ha medido correctamente la cantidad de TSAb sin utilizar un radioisótopo. Además, el autor de la presente invención también ha medido correctamente la cantidad de un anticuerpo de bloqueo de la estimulación de la tiroides (TSBAb) utilizando principios similares, y, en consecuencia completado la presente invención.

Específicamente, la presente invención se refiere a un kit para el diagnóstico de una enfermedad de la tiroides, que comprende una célula que expresa un receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSHR), un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, en donde la proteína sensible al calcio es una proteína que emite luminiscencia en la respuesta al calcio. Además, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico de enfermedad de la tiroides que comprende las siguientes etapas (1), (2) y (3) o (1'), (2) y (3):

- (1) preparar una mezcla que contiene una célula comprendida en el kit como se definió anteriormente, un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio, un medio exento de  $\text{Ca}^{2+}$  o un medio exento de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , TSH y una muestra derivada de la sangre de un sujeto de ensayo; o (1') preparar una mezcla que contiene una célula comprendida en el kit como se definió anteriormente, un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio, un medio exento de  $\text{Ca}^{2+}$  o un medio exento de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  y una muestra derivada de la sangre de un sujeto de ensayo;
- (2) añadir una disolución que contiene  $\text{Ca}^{2+}$  a la mezcla preparada en (1) o (1'); y
- (3) medir la luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida desde la célula.

Además, la presente invención también se refiere a un método para el diagnóstico del hipotiroidismo, que comprende las siguientes etapas (1) a (3):

- (1) preparar una mezcla que contiene una célula comprendida en el kit como se definió anteriormente, un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio, un medio que contiene  $\text{Ca}^{2+}$ , TSH y una muestra derivada de la sangre de un sujeto de ensayo;
- (2) añadir una disolución que contiene forskolina a la mezcla preparada en (1); y
- (3) medir la luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida desde la célula.

### Efectos ventajosos de la invención

La presente invención elimina la necesidad de procedimientos complicados acompañados del uso de radioisótopos. Por lo tanto, la medición de la cantidad de un anticuerpo estimulador de la tiroides (TSAb) y la cantidad de un anticuerpo de bloqueo de la estimulación de la tiroides (TSBAb) contenido en una muestra biológica y el diagnóstico de una enfermedad de la tiroides se puede lograr mediante procedimientos sencillos y seguros.

### Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La Figura 1 muestra que la luminiscencia emitida desde las células CHO que expresan TSHR humano, el canal CNG modificado y aequorina modificada depende de una concentración de TSH bovina (bTSH).

[Figura 2] La Figura 2 muestra una cantidad de luminiscencia emitida desde las células CHO que expresan TSHR humano, el canal CNG modificado y aequorina modificada, en presencia de una dosis baja de bTSH.

[Figura 3] La Figura 3 muestra los efectos de una concentración de un sustrato luminiscente para la aequorina y el tiempo de incubación en una cantidad de luminiscencia emitida desde las células CHO que expresan TSHR humano, el canal CNG modificado y aequorina modificada.

[Figura 4] La Figura 4 muestra los efectos de una cantidad de plásmido de expresión de TSHR introducido sobre la cantidad de luminiscencia emitida desde las células CHO que expresan TSHR humano, el canal CNG modificado y aequorina modificada.

[Figura 5] La Figura 5 muestra una relación entre una concentración de células CHO que expresan TSHR humano, el canal CNG modificado y aequorina modificada, y la cantidad de luminiscencia de las células.

[Figura 6] La Figura 6 muestra la relación entre la concentración de células CHO que expresan TSHR humano, el canal CNG modificado y aequorina modificada, y la cantidad de luminiscencia de las células, donde se indica la cantidad de luminiscencia como un valor relativo que se calcula en el supuesto de que el valor relativo para cada blanco es 1.

[Figura 7] La Figura 7 muestra los efectos de una concentración de  $\text{CaCl}_2$  añadido sobre la cantidad de luminiscencia emitida desde las células CHO que expresan TSHR humano, el canal CNG modificado y aequorina modificada.

[Figura 8] La Figura 8 muestra que un kit de acuerdo con la presente invención es capaz de cuantificar un anticuerpo estimulador de la tiroides (TSAb).

[Figura 9] La Figura 9 muestra que un kit de acuerdo con la presente invención es capaz de detectar un anticuerpo de bloqueo de la estimulación de la tiroides (TSBAb).

[Figura 10] La Figura 10 muestra que un kit de acuerdo con la presente invención utiliza la desensibilización de células para ser capaz de detectar un anticuerpo de bloqueo de la estimulación de la tiroides (TSBAb).

[Figura 11] La Figura 11 muestra que un kit de acuerdo con la presente invención es capaz de detectar un anticuerpo estimulador de la tiroides (TSAb) con una mayor sensibilidad en comparación con un producto convencional (kit de autoanticuerpos estimulador de la tiroides; kit TSAb "YAMASA" (R)).

[Figura 12] La Figura 12 muestra el curso temporal de una cantidad de luminiscencia emitida desde las células CHO que expresan TSHR humano, el canal CNG modificado y aequorina modificada.

[Figura 13] La Figura 13 muestra la dependencia de la concentración de un anticuerpo de bloqueo.

[Figura 14] La Figura 14 muestra que la adición de la disolución de forskolina permite que un anticuerpo de bloqueo sea detectado de una manera dependiente de la dosis.

[Figura 15] La Figura 15 muestra el cambio en una cantidad de luminiscencia en función del tiempo de incubación con un anticuerpo estimulador (TSAb).

[Figura 16] La Figura 16 muestra el cambio en una cantidad de luminiscencia en función del tiempo de incubación con un anticuerpo de bloqueo (TSBAb).

[Figura 17] La Figura 17 muestra el cambio en una cantidad de luminiscencia inducida por la adición de forskolina en función del tiempo de incubación con un anticuerpo de bloqueo (TSBAb).

[Figura 18] La Figura 18 muestra un plásmido pmCNGa2.

[Figura 19] La Figura 19 muestra un plásmido pcDNA mt sAEQ.

[Figura 20] La Figura 20 muestra un histograma de los valores de TSAb de 48 individuos normales medidos por medio de un kit de acuerdo con la presente invención.

[Figura 21] La Figura 21 muestra la distribución de los valores de TSAb en muestras de suero derivadas de diversas enfermedades de la tiroides medidos por medio de un kit de acuerdo con la presente invención.

### Descripción de las realizaciones

Se describe una célula que expresa un receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSHR), un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, en donde la proteína sensible al calcio es una proteína que emite luminiscencia en respuesta al calcio.

El receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSHR) puede ser cualquier receptor al que se une una hormona estimuladora de la tiroides (TSH), e incluye receptores que activan la adenilato ciclasa para aumentar el AMPc. El origen del TSHR no está particularmente limitado con tal de que sea un mamífero. El origen puede ser, por ejemplo, un ser humano, un ratón, un bóvido, una rata o un cerdo. Por otra parte, el TSHR puede tener uno o varios aminoácidos modificados (añadidos, sustituidos, suprimidos) adecuadamente en la secuencia de aminoácidos, o el TSHR puede ser una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de 70% o más, 80% o más, 85% o más, 90% o más, 95% o más, 98% o más, o 99% o más con la secuencia de aminoácidos del TSHR natural; se une a TSH; y tiene la función de aumentar el AMPc a través de la activación de la adenilato ciclasa. El TSHR puede ser una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1. Además, el TSHR puede ser una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de 70% o más, 80% o más, 85% o más, 90% o más, 95% o más, 98% o más, o 99% o más con la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1; se une a TSH; y tiene la función de aumentar el AMPc a través de la activación de la adenilato ciclasa.

Alternativamente, el TSHR puede ser una proteína quimérica de TSHR con un receptor análogo a TSHR, por ejemplo, un receptor de la hormona del cuerpo lúteo, un receptor de la hormona estimuladora del folículo o un receptor de gonadotropina coriónica humana. Estas proteínas quiméricas se pueden preparar mediante la sustitución de una porción distinta de los residuos de aminoácidos 8-89 o 8-165 en TSHR por una porción apropiada del receptor de la hormona del cuerpo lúteo, el receptor de la hormona estimuladora del folículo o el receptor de gonadotropina coriónica humana. Por ejemplo, para preparar la proteína quimérica del receptor de la hormona del cuerpo lúteo TSHR, residuos de aminoácidos 90-165 en TSHR se pueden sustituir por el segmento Mc2 de un receptor de LH-CG, y los residuos de aminoácidos 261 a 370 en el TSHR se pueden sustituir adicionalmente por el segmento MC4 del receptor de LH-CG.

Según se utiliza en la presente memoria, la TSH no está particularmente limitada siempre que se derive de un mamífero. La TSH se puede derivar de, por ejemplo, un ser humano, un ratón, un bóvido, una rata, o un cerdo. La TSH puede tener uno o varios aminoácidos modificados (añadidos, sustituidos, suprimidos) adecuadamente en la secuencia de aminoácidos, o puede ser una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de 70% o más, 80% o más, 85% o más, 90% o más, 95% o más, 98% o más, o 99% o más con la secuencia de aminoácidos de TSH naturales; se une a TSHR; y tiene la función de aumentar el AMPc a través de la activación de la adenilato ciclasa.

El canal de calcio dependiente de AMPc es un canal que cambia la cantidad de entrada de iones de calcio en una célula en respuesta a cambios en la concentración de AMPc, e incluye canales que aumentan la cantidad de entrada de iones de calcio en una célula en respuesta al aumento en la concentración de AMPc. Los ejemplos del canal de calcio dependiente de AMPc incluyen un canal de calcio CNG (canal iónico regulado por nucleótidos cíclicos). Opcionalmente, el canal de calcio dependiente de AMPc puede tener uno o varios aminoácidos modificados (añadidos, sustituidos, suprimidos) en la secuencia de aminoácidos y puede ser modificada (incluyendo sustituida, añadida, y suprimida) de manera que presenta, por ejemplo, mayor sensibilidad al AMPc que al GMPc. El canal de calcio CNG puede ser una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de 70% o más, 80% o más, 85% o más, 90% o más, 95% o más, 98% o más, o 99% o más con la secuencia de aminoácidos del canal de calcio CNG natural y aumenta la cantidad de entrada de iones de calcio en una célula en respuesta al aumento en la concentración de AMPc. Los ejemplos de la modificación incluyen la sustitución de la cisteína 460<sup>a</sup> en un canal de calcio CNG de ratón por triptófano, la sustitución del ácido glutámico 583<sup>a</sup> en un canal de calcio CNG de ratón por metionina, la sustitución de la treonina 537<sup>a</sup> en un canal de calcio CNG bovino por serina, metionina,

valina, o alanina, y combinaciones de los mismos. Estas sustituciones ilustradas anteriormente no se limitan a las especies animales en las que las sustituciones se encuentran respectivamente, y también son aplicables a la sustitución de aminoácidos en los sitios correspondiente en otras especies de animales. Por ejemplo, la treonina en un canal de calcio CNG de ratón correspondiente a la treonina 537a en el canal de calcio CNG bovino puede ser sustituida por serina, metionina, valina, o alanina. Tal sustitución se puede realizar en una o más posiciones. Por ejemplo, se lleva a cabo la sustitución de la cisteína 460a en el canal de calcio CNG de ratón por triptófano, y también se puede realizar la sustitución del ácido glutámico 583a por metionina. El canal de calcio CNG puede consistir en una subunidad  $\alpha$  y/o una subunidad  $\beta$ . Puede ser de cualquier constitución, por ejemplo, consistiendo en al menos una subunidad seleccionada del grupo que consiste en una subunidad  $\alpha_2$ , una subunidad  $\alpha_3$ , una subunidad  $\alpha_4$ , y una subunidad  $\beta_{1b}$ . Además, la subunidad puede ser modificada como se ha descrito anteriormente.

El origen del canal de calcio CNG no está particularmente limitado con tal de que sea un mamífero. El origen puede ser, por ejemplo, un ser humano, un ratón, un bóvido, una rata o un cerdo. El canal de calcio CNG puede ser una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2. Además, el canal de calcio CNG puede ser una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de 70% o más, 80% o más, 85% o más, 90% o más, 95% o más, 98% o más, o 99 % o más con la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 y aumenta la cantidad de la entrada de iones de calcio en una célula en respuesta al aumento en la concentración de AMPc.

La proteína sensible al calcio es una proteína cuya estructura cambia en respuesta al calcio y que emite luminiscencia en respuesta al calcio.

Los ejemplos de la proteína sensible al calcio incluyen aequorina, Cameleon (Invitrogen Corp.), Casel2 (Evrogen), Clitina, obelina, mitrocomina, mineopsina, berovina, una proteína que comprende dos GFP que difieren en color, unidas a calmodulina sensible al calcio y una secuencia parcial de miosina cadena ligera quinasa unida a la misma, una proteína que comprende calmodulina sensible a calcio unida entre los residuos 144a y 146a en la secuencia de aminoácidos de GFP, y una proteína de la sonda Núm. G3-85 o Al-2 descrita en la Patente Japonesa Abierta a la Inspección Pública Núm. 2002-153279, y sus apoproteínas, si las hubiera, (p. ej., apoaequorina).

La secuencia de aminoácidos de la proteína sensible al calcio se puede ser modificada (añadida, sustituida, suprimida) apropiadamente de acuerdo con el propósito o puede ser modificada para incrementar la cantidad de luminiscencia y/o para mejorar una razón SN. La modificación incluye la adición, sustitución y delección de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos. La proteína sensible al calcio incluye proteínas que consisten en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de 70% o más, 80% o más, 85% o más, 90% o más, 95% o más, 98% o más, o 99% o más con la secuencia de aminoácidos de la proteína sensible al calcio natural y emitir luminiscencia en respuesta al calcio. Por ejemplo, la proteína sensible al calcio puede ser modificada de tal manera que su gen está optimizado para el uso de codones humanos y tiene una señal de direccionamiento mitocondrial.

La proteína sensible al calcio puede ser una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3. Además, la proteína sensible al calcio puede ser una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de 70% o más, 80% o más, 85% o más, 90% o más, 95% o más, 98% o más, o 99 % o más con la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3 y emite luminiscencia en respuesta al calcio.

La célula que expresa un receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSHR), un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio que expresa transitoria o establemente cada uno de los receptores de hormona estimuladora de la tiroides (TSHR), el canal de calcio dependiente de AMPc y la proteína sensible al calcio. La célula no está particularmente limitada y puede ser una línea celular tal como una célula CHO, una célula HEK293, o una célula 3T3. Por ejemplo, la célula que expresa un receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSHR), un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio puede ser una célula CHO que expresa establemente cada proteína, en donde el TSHR tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1, el canal de calcio dependiente de AMPc es un canal de calcio CNG modificado que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 y la proteína de calcio sensible es apoaequorina modificada que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3. Además, la célula que expresa un receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSHR), un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio puede ser, por ejemplo, una célula CHO que expresa establemente TSHR, el canal de calcio dependiente de AMPc y la proteína sensible al calcio, cada uno de los cuales es una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de 70% o más, 80% o más, 85% o más, 90% o más, 95% o más, 98% o más, o 99% o más con la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de los SEQ ID NO: 1-3 y mantiene las funciones del receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSHR), el canal de calcio dependiente de AMPc o la proteína sensible al calcio.

Por otra parte, se puede utilizar una célula que expresa de forma natural una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en el receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSHR), el canal de calcio dependiente de AMPc y la proteína sensible al calcio. En este caso, la célula que expresa un receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSHR), un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio también se puede preparar forzando a la célula para que exprese transitoriamente o establemente la proteína o

5 proteínas que no se expresan en el célula. Los ejemplos de tales células incluyen una célula derivada de la glándula tiroides de que expresa manera endógena el TSHR (por ejemplo, FRTL-5 o Nthy-ori 3-1) que es forzada a expresar transitoriamente o establemente cada uno de los canales de calcio dependientes de AMPc y la proteína sensible al calcio y una célula derivada de tejido olfativo que expresa endógenamente el canal de calcio CNG que es forzada a expresar transitoriamente o establemente cada uno de los TSHR y la proteína sensible al calcio.

10 La célula que expresa un receptor de hormona estimuladora de la tiroides (TSHR), un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio puede ser criopreservada. La criopreservación se puede realizar a una temperatura apropiada, por ejemplo, -20°C o -80°C, en una disolución de criopreservación de células. La disolución de criopreservación de células no está limitada e incluye CELLBANKER (R) (Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd.), BAMBANKER (R) (Lymphotec Inc.), Cellvation (R) (CELOX LABORATORIES, Inc.), CryoStor (R) (BIOLIFE SOLUTIONS Ltd.). Las células pueden ser criopreservadas en un gran número para el mismo lote de modo que el error de medición derivado de células entre las composiciones o kits se reduce drásticamente. Como resultado, la reproducibilidad de los resultados de la medición se puede mejorar. Por otra parte, la célula que expresa un receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSHR), un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible a calcio mantiene una sensibilidad suficiente para detectar un anticuerpo estimulador de la tiroides (TSAb) y un anticuerpo de bloqueo de la estimulación de la tiroides (TSBAb) presentes en la sangre humana, incluso después de ser criopreservados y descongelados utilizando un baño caliente. Por otra parte, después de la descongelación, la célula es transferida simplemente a un recipiente adecuado y cultivada durante aproximadamente 2 horas, y el estado de la célula no se deteriora por el reactivo añadido para la detección de TSAb y TSBAb, o por componentes derivados de sangre humana.

25 La composición descrita que comprende la célula que expresa un receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSHR), un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio (por ejemplo, una disolución acuosa que comprende la célula que expresa un receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSHR), un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible a calcio) se puede utilizar para analizar la cantidad de un anticuerpo estimulador de la tiroides y/o la cantidad de un anticuerpo de bloque de la estimulación de la tiroides, para el diagnóstico de enfermedad de la tiroides, para determinar un ser humano que tiene un alto riesgo de desarrollar una enfermedad de la tiroides, y/o para determinar el efecto terapéutico en un ser humano bajo tratamiento de la enfermedad de la tiroides. Según se utiliza en la presente memoria, la enfermedad de la tiroides incluye el hipertiroidismo y el hipotiroidismo. El hipertiroidismo incluye la enfermedad de Graves, y el hipotiroidismo incluye la enfermedad de Hashimoto. Según se utiliza en la presente memoria, la enfermedad de Hashimoto incluye el hipotiroidismo, que es positivo para TSBAb en sangre, la tiroiditis atrófica libre de bocio, la tiroiditis atrófica causada por TSAB y el mixedema.

35 La célula que expresa un receptor de hormona estimuladora de la tiroides (TSHR), un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio es la descrita anteriormente.

El anticuerpo estimulador de la tiroides (TSAb) es un anticuerpo capaz de actuar como un agonista de TSHR y se puede encontrar en la sangre de un paciente de enfermedad de Graves.

40 El anticuerpo de bloqueo de la estimulación de la tiroides (TSBAb) es un anticuerpo capaz de unirse a TSHR y actuar como un antagonista de TSHR e incluye, por ejemplo, anticuerpos que inhiben competitivamente la unión de TSH a TSHR. El anticuerpo bloqueador de la estimulación de la tiroides (TSBAb) se puede encontrar en la sangre de un paciente de hipotiroidismo, por ejemplo, en la sangre de un paciente con enfermedad de Hashimoto.

45 El anticuerpo estimulador de la tiroides (TSAb) o el anticuerpo de bloqueo de la estimulación de la tiroides (TSBAb) presente en una muestra biológica se pueden medir mediante el uso de la siguiente mecanismo de acción:

(1) Cuando el anticuerpo estimulador de la tiroides (TSAb) está presente en la muestra biológica TSAb aumenta el AMPc a través de la acción sobre TSHR de la célula anterior. Como resultado, el canal de calcio CNG se activa de modo que se incrementa la entrada de calcio en la célula. De este modo, la proteína sensible al calcio emite luminiscencia. Esto significa que la presencia de TSAb en la muestra está representada por la luminiscencia de la proteína sensible al calcio como un resultado.

(2) Cuando el anticuerpo de bloqueo de la estimulación de la tiroides (TSBAb) está presente en la muestra biológica

55 (a) El método que utiliza la inhibición competitiva de TSH tras la adición junto con TSH, TSBAb inhibe competitivamente la unión de la TSH a TSHR. Como resultado, la acción de TSH se inhibe para evitar el aumento de la concentración de AMPc y por lo tanto también a prevenir el aumento mediado por el canal del calcio CNG de la entrada de calcio. Por lo tanto, se reduce la luminiscencia de la proteína sensible al calcio. Esto significa que la presencia de TSBAb en la muestra está representada por la supresión de la luminiscencia de la proteína sensible al calcio como un resultado.

60 (b) El método que utiliza la desensibilización de los canales de calcio CNG tras la adición junto con TSH, TSBAb inhibe competitivamente la unión de la TSH a TSHR. Como resultado, la acción de TSH es inhibida para evitar el aumento en la concentración de AMPc. En este caso, si TSBAb está ausente, la concentración de AMPc se aumenta por la acción de TSH para activar el canal de calcio CNG. Sin embargo, después del tiempo establecido, el canal de calcio CNG es desensibilizado y, por tanto, no

responde a la forskolina (o agente de aumento de la concentración de AMPc) recién agregada. Por consiguiente, si TSBAb está ausente en la muestra, no se produce la entrada de calcio en la célula. Esto significa que la ausencia de TSBAb está representada por la supresión de la luminiscencia de la proteína sensible al calcio como un resultado. Por otro lado, si TSBAb está presente en la muestra, el canal de calcio CNG no es desensibilizado. Por lo tanto, la luminiscencia de la proteína sensible al calcio no se reduce.

Mediante el uso de la composición anterior, basándose en el mecanismo de acción descrito anteriormente, se puede detectar un anticuerpo estimulador de la tiroides y/o un anticuerpo de bloqueo estimulador de la tiroides en una muestra biológica; se pueden comparar las concentraciones de un anticuerpo estimulador de la tiroides y/o un anticuerpo de bloqueo estimulador de la tiroides entre dos muestras biológicas; o se pueden medir las cantidades relativas de un anticuerpo estimulador de la tiroides y/o un anticuerpo de bloqueo de la estimulación de la tiroides en dos muestras biológicas. Además, mediante el uso de la composición anterior también se pueden medir las concentraciones de un anticuerpo estimulador de la tiroides y/o un anticuerpo de bloqueo de la estimulación de la tiroides en una muestra biológica.

Según se utiliza en la presente memoria, la muestra biológica incluye muestras derivadas de organismos tales como sangre y una muestra preparada a partir de sangre e incluye, por ejemplo, sangre humana, una muestra preparada a partir de sangre humana, sangre canina, una muestra preparada a partir de sangre canina, la sangre felina, y una muestra preparada a partir de sangre felina.

Mediante el uso de la composición anterior, se puede medir un anticuerpo estimulador de la tiroides y/o un anticuerpo de bloqueo estimulador de la tiroides en la sangre humana. Por lo tanto, un sujeto de ensayo puede ser diagnosticado de enfermedad de la tiroides o no.

Cuando se utiliza el mecanismo de acción descrito anteriormente en (1), la enfermedad de Graves puede diagnosticarse utilizando la composición anterior. Por ejemplo, la enfermedad de Graves se puede diagnosticar mediante la medición de la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida desde la célula tratada con una muestra de sangre de un sujeto de ensayo y la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida desde la célula tratada con la misma cantidad de una muestra de sangre (patrón) de un individuo normal que la de la muestra de sangre del sujeto de ensayo. En este caso, cuando la cantidad de luminiscencia emitida desde la célula tratada con la muestra de sangre del sujeto de ensayo es mayor que la emitida desde la célula tratada con la muestra de sangre (patrón) de la persona normal, se puede determinar que la concentración en suero de un anticuerpo estimulador de la tiroides (TSAb) del sujeto de ensayo es mayor que la del individuo normal. Por lo tanto, se puede diagnosticar la enfermedad de Graves el sujeto de ensayo.

Por otra parte, se miden de antemano las cantidades respectivas de luminiscencia (valores integrados) emitida desde las células tratadas con muestras de sangre de una gran población de individuos normales, por ejemplo, de 50 a 100 individuos normales, y se pueden calcular la media de las mismas y la desviación típica (DT). Cuando la cantidad de luminiscencia emitida desde la célula tratada con una muestra de sangre de un sujeto de ensayo es superior a la media + nDT (p. ej., n = 1, 2, 3, 4, o 5) de las cantidades de luminiscencia (valores integrados) emitida desde las células tratadas con las muestras de sangre de la población de individuos normales, se puede determinar que la concentración en suero de un anticuerpo estimulador de la tiroides del sujeto de ensayo es más alta que la de los individuos normales. Por lo tanto, se puede diagnosticar la enfermedad de Graves el sujeto de ensayo.

En la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones, un valor obtenido de la "muestra derivada de la sangre de un individuo normal" puede ser, por ejemplo, un valor medido de una muestra de sangre (patrón) de un individuo normal o un valor obtenido de antemano a partir de los valores medidos de una población de individuos normales, a menos que se especifique lo contrario.

Alternativamente, se puede calcular la cantidad de luminiscencia (valor integrado) emitida desde la célula tratada con una muestra de sangre de un sujeto de ensayo/la cantidad de luminiscencia (valor integrado) emitida desde la célula tratada con una muestra de sangre de un individuo normal  $\times 100$  (%) (en lo sucesivo, este valor calculado se define como un valor calculado A). Las cantidades respectivas de luminiscencia (valores integrados) emitida desde las células tratadas con las respectivas muestras de sangre de una gran población de individuos normales y una gran población de pacientes con enfermedad de Graves sin tratar (p. ej., de 50 a 100 individuos por población) se miden de antemano, y se puede ajustar un valor de corte de tal manera que una tasa positiva verdadera de la enfermedad de Graves y/o una tasa negativa verdadera (es decir, ser un individuo normal) son, por ejemplo, 80% o más, 90% o más, 92% o más, 94% o más, 96% o más, o 98% o más, respectivamente. Cuando el valor calculado A es mayor que el valor de corte, se puede diagnosticar la enfermedad de Graves en el sujeto de ensayo. El valor de corte se puede ajustar apropiadamente dependiendo de las propiedades de una población diana, tales como la edad y el sexo y se puede ajustar a, por ejemplo, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190% o 200%.

Además, también se utiliza un patrón de anticuerpo (TSAb) (por ejemplo, NIBSC 90/672 o 65/122), y su concentración se puede diluir seriadamente para preparar una curva de calibración. Con referencia a la curva de calibración, la concentración real en suero de un anticuerpo (TSAb) se calcula a partir de la cantidad medida de luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida desde la célula tratada con una muestra de sangre de un sujeto de ensayo. Esta concentración se puede comparar con la concentración en suero medida previamente de un anticuerpo (TSAb) en cada una de una gran población de individuos normales y una gran población de pacientes

con enfermedad de Graves sin tratar (p. ej., de 50 a 100 individuos por población), o datos conocidos referidos en un documento para diagnosticar o no la enfermedad de Graves en el sujeto de ensayo. Por ejemplo, cuando la concentración es superior a la media + nDT (p. ej.,  $n = 1, 2, 3, 4, \text{ o } 5$ ) de las concentraciones en suero de (TSAb) de la población de individuos normales, se puede diagnosticar la enfermedad de Graves en el sujeto de ensayo.

5 Para la medición de la cantidad de luminiscencia, se prefiere para medir el valor integrado por el tiempo dado. Por ejemplo, el valor integrado se puede medir durante 5 s, 10 s, 15 s, 20 s, 30 s, 40 s, 50 s, o 1 min.

Además, cuando se utiliza el mecanismo de acción descrito anteriormente en (2)(a), el hipotiroidismo (incluyendo la enfermedad de Hashimoto) se puede diagnosticar utilizando la composición anterior. Por ejemplo, el hipotiroidismo se puede diagnosticar mediante la medición de la cantidad de luminiscencia inducida por TSH de la proteína sensible al calcio en la célula tratada con una muestra de sangre de un sujeto de ensayo y la cantidad de luminiscencia inducida por TSH de la proteína sensible al calcio en la célula tratada con la misma cantidad de una muestra de sangre (patrón) de un individuo normal que la de la muestra de sangre del sujeto de ensayo. En este caso, cuando la cantidad de luminiscencia emitida desde la célula tratada con la muestra de sangre del sujeto de ensayo es menor que la emitida desde la célula tratada con la muestra de sangre (patrón) de la persona normal, se puede determinar que la concentración en suero de un anticuerpo de bloqueo de la estimulación de la tiroides (TSBAb) del sujeto de ensayo es mayor que la del individuo normal. Por lo tanto, se puede diagnosticar el hipotiroidismo en el sujeto de ensayo.

Por otra parte, se miden de antemano las cantidades respectivas de luminiscencia inducida por TSH (valores integrados) de las proteínas sensibles al calcio en las células tratadas con muestras de sangre de una gran población de individuos normales, por ejemplo, de 50 a 100 individuos normales, y se pueden calcular la media de las mismas y la desviación típica (DT). Cuando la cantidad de luminiscencia inducida por TSH de la célula tratada con una muestra de sangre de un sujeto de ensayo es menor que la media - nDT (por ejemplo,  $n = 1, 2, 3, 4, \text{ o } 5$ ) de las cantidades de luminiscencia inducida por TSH (valores integrados) de las células tratadas con las muestras de sangre de la población de individuos normales, se pueden determinar que la concentración en suero de un anticuerpo de bloqueo de la estimulación de la tiroides (TSBAb) en el sujeto de ensayo es mayor que en los individuos normales. Por lo tanto, se puede diagnosticar el hipotiroidismo el sujeto de ensayo.

Alternativamente, se puede calcular la cantidad de luminiscencia (valor integrado) emitida desde la célula tratada con una muestra de sangre de un sujeto de ensayo/la cantidad de luminiscencia (valor integrado) emitida desde la célula tratada con una muestra de sangre de un individuo normal  $\times 100$  (%) (en lo sucesivo, este valor calculado se define como un valor calculado B). Las cantidades respectivas de luminiscencia (valores integrados) atribuidas a las respectivas muestras de sangre de una gran población de individuos normales y una gran población de pacientes de hipotiroidismo no tratados (por ejemplo, de 50 a 100 individuos por población) se miden de antemano, y se fija un valor de corte de tal manera que una tasa positiva verdadera de hipotiroidismo y/o una tasa negativa verdadera (es decir, ser un individuo normal) son, por ejemplo, 80% o más, 90% o más, 92% o más, 94% o más, 96% o más, o 98% o más, respectivamente. Cuando el valor calculado B es menor que el valor de corte, también se puede diagnosticar el hipotiroidismo el sujeto de ensayo. El valor de corte se puede ajustar apropiadamente dependiendo de las propiedades de una población diana, tales como la edad y sexo y se puede ajustar a, por ejemplo, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90%.

Además, también se utiliza un patrón de anticuerpo (TSBAb) que tiene una concentración conocida, y su concentración se puede diluir seriadamente para preparar una curva de calibración. Con referencia a la curva de calibración, la concentración real en suero de un anticuerpo (TSBAb) se calcula a partir de la cantidad medida de la luminiscencia inducida por TSH de la proteína sensible al calcio en la célula tratada con una muestra de sangre de un sujeto de ensayo. Esta concentración se puede comparar con la concentración en suero medida previamente de un anticuerpo (TSBAb) en cada una de una gran población de individuos normales y una gran población de pacientes hipotiroidismo no tratados (p. ej., de 50 a 100 individuos por población), o datos conocidos referidos en un documento para diagnosticar o no el hipotiroidismo en el sujeto de ensayo. Por ejemplo, cuando la concentración es superior a la media + nDT (por ejemplo,  $n = 1, 2, 3, 4, \text{ o } 5$ ) de las concentraciones en suero de (TSBAb) de la población de individuos normales, se puede diagnosticar el hipotiroidismo en el sujeto de ensayo.

Para la medición de la cantidad de luminiscencia, se prefiere para medir el valor integrado por el tiempo dado. Por ejemplo, el valor integrado se puede medir durante 5 s, 10 s, 15 s, 20 s, 30 s, 40 s, 50 s, o 1 min.

Además, cuando se utiliza el mecanismo de acción descrito anteriormente en (2)(b), se puede diagnosticar el hipotiroidismo (incluyendo la enfermedad de Hashimoto) utilizando la composición anterior. Por ejemplo, el hipotiroidismo se puede diagnosticar mediante la medición de la cantidad de luminiscencia inducida por forskolina de la proteína sensible al calcio en la célula tratada con una muestra de sangre de un sujeto de ensayo y la cantidad de luminiscencia inducida por forskolina de la proteína sensible al calcio en la célula tratada con la misma cantidad de una muestra de sangre (patrón) de un individuo normal que la de la muestra de sangre del sujeto de ensayo. En este caso, cuando la cantidad de luminiscencia emitida desde la célula tratada con la muestra de sangre del sujeto de ensayo es mayor que la emitida desde la célula tratada con la muestra de sangre (patrón) de la persona normal, se puede determinar que la concentración en suero de un anticuerpo de bloqueo de la estimulación de la tiroides (TSBAb) del sujeto de ensayo es mayor que la del individuo normal. Por lo tanto, se puede diagnosticar el hipotiroidismo en el sujeto de ensayo.

Por otra parte, se miden de antemano las cantidades respectivas de luminiscencia inducida por forskolina (valores



- integrados) de las proteínas sensibles al calcio en las células tratadas con muestras de sangre de una gran población de individuos normales, por ejemplo, de 50 a 100 individuos normales, y se pueden calcular la media de las mismas y la desviación típica (DT). Cuando la cantidad de luminiscencia inducida por forskolina de la célula tratada con una muestra de sangre de un sujeto de ensayo es superior a la media + nDT (por ejemplo, n = 1, 2, 3, 4, o 5) de las cantidades de luminiscencia inducida por forskolina (valores integrados) de las células tratadas con las muestras de sangre de la población de individuos normales, se puede determinar que la concentración en suero de un anticuerpo de bloqueo de la estimulación de la tiroides (TSBAb) del sujeto de ensayo es más alta que la de los individuos normales. Por lo tanto, también se puede diagnosticar el hipotiroidismo en el sujeto de ensayo.
- Alternativamente, se puede calcular la cantidad de luminiscencia (valor integrado) emitida desde la célula tratada con una muestra de sangre de un sujeto de ensayo/la cantidad de luminiscencia (valor integrado) emitida desde la célula tratada con una muestra de sangre de un individuo normal  $\times 100$  (%) (en lo sucesivo, este valor calculado se define como un valor calculado C). Las cantidades respectivas de luminiscencia (valores integrados) atribuidas a las respectivas muestras de sangre de una gran población de individuos normales y una gran población de pacientes de hipotiroidismo no tratado (por ejemplo, de 50 a 100 individuos por población) se miden de antemano, y se ajusta un valor de corte de tal manera que una verdadera tasa positiva de hipotiroidismo y/o una tasa negativa verdadera (es decir, ser un individuo normal) son, por ejemplo, 80% o más, 90% o más, 92% o más, 94% o más, 96% o más, o 98% o más, respectivamente. Cuando el valor calculado C es mayor que el valor de corte, también se puede diagnosticar el hipotiroidismo en el sujeto de ensayo. El valor de corte se puede ajustar apropiadamente dependiendo de las propiedades de una población diana, tales como la edad y sexo y se puede ajustar a, por ejemplo, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800% o 900%.
- Además, también se utiliza un patrón de anticuerpo (TSBAb) que tiene una concentración conocida, y su concentración se puede diluir seriadamente para preparar una curva de calibración. La concentración real en suero de un anticuerpo (TSBAb) se calcula a partir de la luminiscencia inducida por forskolina medida de la proteína sensible al calcio en la célula tratada con una muestra de sangre de un sujeto de ensayo. Esta concentración se puede comparar con la concentración en suero medida previamente de un anticuerpo (TSBAb) en cada una de una gran población de individuos normales y una gran población de pacientes hipotiroidismo no tratados (por ejemplo, de 50 a 100 individuos por población), o datos conocidos referidos en un documento para diagnosticar o no el hipotiroidismo en el sujeto de ensayo. Por ejemplo, cuando la concentración es superior a la media + nDT (por ejemplo, n = 1, 2, 3, 4, o 5) de las concentraciones en suero de (TSBAb) de la población de individuos normales, se puede diagnosticar el hipotiroidismo en el sujeto de ensayo.
- Para la medición de la cantidad de luminiscencia, se prefiere para medir el valor integrado por el tiempo dado. Por ejemplo, el valor integrado se puede medir durante 5 s, 10 s, 15 s, 20 s, 30 s, 40 s, 50 s, o 1 min.
- Por otra parte, se puede determinar un ser humano que tiene un alto riesgo de desarrollar una enfermedad de la tiroides, por ejemplo, un ser humano que tiene un alto riesgo de desarrollar la enfermedad de Graves o hipotiroidismo, utilizando la composición anterior.
- Por ejemplo, cuando la concentración en suero de un anticuerpo estimulador de la tiroides medida utilizando la composición anterior en el examen médico es menor que el valor numérico de un paciente con la enfermedad de Graves y más alto que el valor numérico de un individuo normal, se puede determinar que esta persona es un ser humano que tiene un alto riesgo de desarrollar la enfermedad de Graves. Cuando la concentración en suero de un anticuerpo de bloqueo de la estimulación de la tiroides es menor que el valor numérico de hipotiroidismo y mayor que el valor numérico de un individuo normal, se puede determinar que esta persona es un ser humano que tiene un alto riesgo de desarrollar hipotiroidismo. Por otra parte, cuando la concentración de suero de un anticuerpo estimulador de la tiroides medida utilizando la composición anterior en el examen médico se incrementa gradualmente con el tiempo, se puede determinar que esta persona es un ser humano que tiene un alto riesgo de desarrollar la enfermedad de Graves. Cuando la concentración en suero de un anticuerpo de bloqueo de la estimulación de la tiroides se incrementa gradualmente con el tiempo, se puede determinar que esta persona es un ser humano que tiene un alto riesgo de desarrollar hipotiroidismo.
- Además, también se puede determinar la eficacia del tratamiento para un ser humano en tratamiento de enfermedad de la tiroides, por ejemplo, un ser humano con la enfermedad de Graves o hipotiroidismo bajo tratamiento de las mismas utilizando la composición anterior.
- Por ejemplo, la concentración de un anticuerpo estimulador de la tiroides o un anticuerpo de bloqueo de la estimulación de la tiroides de muestras de sangre tomadas del mismo individuo, tanto antes como después del tratamiento, y el cambio dependiente del tiempo en la concentración se pueden medir utilizando la composición anterior para determinar la presencia o ausencia de eficacia del tratamiento. Cuando la concentración en suero del anticuerpo estimulador de la tiroides medida utilizando la composición anterior es menor después del tratamiento que antes del tratamiento, se puede determinar que el tratamiento de la enfermedad de Graves es eficaz. Cuando la concentración de suero del anticuerpo de bloqueo de la estimulación de la tiroides medida utilizando la composición anterior es menor antes del tratamiento que después del tratamiento, se puede determinar que el tratamiento del hipotiroidismo es eficaz.

La presente invención proporciona un kit que comprende la célula que expresa un receptor de la hormona

estimuladora de la tiroides (TSHR), un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio y puede comprender adicionalmente al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un medio para el cultivo celular, una disolución de detección, un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio o una disolución acuosa del mismo, una disolución de separación de anticuerpos, una placa para el cultivo celular o un tubo de ensayo, TSH o una disolución acuosa de la misma, un anticuerpo anti-TSH y un suero de control de IgG humana normal. Por ejemplo, cada sustancia que constituye el kit está empaquetada individualmente, y estos paquetes se pueden colocar en un mismo recipiente, tal como una caja de preparar un kit. La célula que expresa un receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSHR), un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio se puede preparar de manera adecuada y se prepara, por ejemplo, a una concentración de  $3 \times 10^4$  células/ml a  $3 \times 10^6$  células/ml. La célula puede ser preparada, por ejemplo, suspendiéndola a una concentración de  $3 \times 10^6$  células/ml en una disolución acuosa. Cuando se utiliza una placa de 96 pocillos como placa para el cultivo celular, la célula se puede cultivar en placa a una concentración de, por ejemplo,  $3 \times 10^3$  células a  $3 \times 10^5$  células por pocillo de la placa de 96 pocillos. El medio para el cultivo celular no está limitado siempre que pueda mantener la célula. El medio de cultivo celular puede estar exento de  $\text{Ca}^{2+}$  o exento de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ .

La disolución de detección puede contener  $\text{CaCl}_2$ , Azul de tripano, un catión que es capaz de causar la luminiscencia de aequorina y puede ser sustituido por calcio (p. ej., un ion de cadmio o un ión de estroncio), un ion de magnesio, un ion de zinc, un ion de ácido sulfúrico y/o un ion de ácido carbónico. Las concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  y azul de tripano pueden ser ajustadas apropiadamente por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la concentración de  $\text{CaCl}_2$  es de 9 a 18 mM, y la concentración de azul de tripano es de 0,001 a 0,010%. La disolución de detección es, por ejemplo, una disolución acuosa que contiene  $\text{CaCl}_2$  9 mM y azul de tripano al 0,002%. La concentración final de  $\text{CaCl}_2$  cuando se mide la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio se puede ajustar a 3 a 6 mM. Además, la disolución de detección puede contener un catión que puede ser sustituido por calcio, un ion de magnesio, un ion de zinc, un ion de ácido sulfúrico y/o un ion de ácido carbónico, por ejemplo, disolviendo el catión que puede ser sustituido por calcio, el ión magnesio, el ión zinc, el ion de ácido sulfúrico y/o el ion de ácido carbónico en la disolución de detección.

El sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio incluye coelenterazina o un derivado de coelenterazina que sirve como sustrato luminiscente para la aequorina. El derivado de coelenterazina incluye ViviRen (R), (Promega Corp.). La concentración de ViviRen se puede ajustar apropiadamente y es, por ejemplo, 0,6 a 30 mM. La disolución acuosa del sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio es, por ejemplo, una disolución acuosa de ViviRen 4 mM (Promega Corp.).

La concentración final de ViviRen cuando se mide la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio se puede ajustar a 0,24 a 12 mM.

La disolución de separación del anticuerpo no está limitada con tal que se puedan recoger un anticuerpo estimulador de la tiroides y un anticuerpo de bloqueo estimulador de la tiroides de una muestra de sangre. La disolución de separación anticuerpo puede contener PEG6000 de 10 a 30%. La disolución de separación anticuerpo puede ser, por ejemplo, una disolución acuosa que contiene PEG6000 al 30%.

Los ejemplos de la placa para el cultivo celular incluyen las que permiten la medición de la cantidad de luminiscencia utilizando un luminómetro, por ejemplo, una placa de 96 pocillos que permite el cultivo de células.

El tubo de ensayo no está particularmente limitado y puede ser seleccionado apropiadamente por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar un tubo de ensayo adecuado para un aparato para medir la luminiscencia emitida por la proteína sensible al calcio.

La TSH no está limitada con tal que se pueda utilizar como un agonista de TSHR. La TSH puede ser utilizada como control positivo. La TSH puede ser, pero no está limitada a, TSH bovina. La TSH puede ser preparada apropiadamente por los expertos en la técnica y puede ser ajustada de 0,01 a 100 mU/ml. Por ejemplo, la TSH bovina se prepara en forma de una disolución acuosa de 1 mU/ml. La concentración final de TSH bovina cuando se mide la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio se puede ajustar de 0,6 mU/ml a 6 mU/ml. La concentración final de TSH bovina cuando se mide la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio es, por ejemplo, de 100 mU/ml. Por otra parte, se puede utilizar TSA b en lugar de o además de la TSH. El TSA b puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal.

El suero de control de IgG humana normal se puede ser utilizado como control negativo y puede ser preparado apropiadamente por los expertos en la técnica.

El anticuerpo anti-TSH puede ser un anticuerpo policlonal o puede ser un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo anti-TSH puede ser un anticuerpo derivado de un mamífero apropiado e incluye un anticuerpo de ratón anti-TSH, un anticuerpo de rata anti-TSH, un anticuerpo de conejo anti-TSH y un anticuerpo de cabra anti-TSH. El anticuerpo anti-TSH puede ser modificado apropiadamente por los expertos en la técnica. Por otra parte, también se selecciona apropiadamente la TSH que sirve como un antígeno. La TSH que sirve como antígeno incluye TSH humana, TSH de ratón, TSH de rata, TSH de conejo, TSH felina y TSH canina. Los ejemplos del anticuerpo anti-TSH utilizado en el kit de la presente invención incluyen un anticuerpo policlonal de cabra anti-TSH humana. La concentración del anticuerpo anti-TSH puede ser ajustada apropiadamente por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la concentración de una disolución de anticuerpo anti-TSH empaquetada en el kit se puede ajustar de 0,01 g/ml a 100 mg/ml. La concentración final del anticuerpo monoclonal anti-TSH cuando se mide la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio puede ser, por ejemplo, de 0,05 a 5,48 g/ml.

Entre los pacientes de hipotiroidismo, hay un paciente cuya cantidad de TSH en la sangre es un valor alto. En este

caso, la proteína sensible al calcio en la célula emite luminiscencia debido a la TSH. Por lo tanto, se puede diagnosticar la enfermedad de Graves en este paciente, aunque él o ella sea un paciente de hipotiroidismo. Sin embargo, se añade una muestra de sangre derivada del paciente de hipotiroidismo que tiene una alta cantidad de TSH junto con el anticuerpo anti-TSH a la célula para neutralizar la TSH derivada del paciente. Por lo tanto, se puede evitar el diagnóstico incorrecto de la enfermedad de Graves en el paciente. Por otra parte, la cantidad de luminiscencia emitida desde la proteína sensible al calcio se puede comparar entre el caso en el que se añade el anticuerpo anti-TSH junto con la muestra de sangre derivada del paciente a la célula de la presente invención y el caso en el que la muestra de sangre derivada del paciente se añade a la célula de la presente invención sin la adición del anticuerpo anti-TSH, y de este modo se puede obtener información sobre la cantidad de TSH de la sangre del paciente. Un médico puede diagnosticar más correctamente la enfermedad de la tiroides mediante la combinación de la información con los síntomas clínicos de la paciente.

Además, el kit de la presente invención contiene adicionalmente el suero de un paciente con la enfermedad de la tiroides, por ejemplo, los sueros de un paciente con la enfermedad de Graves y/o un paciente con hipotiroidismo. Un suero de este tipo se puede utilizar como un control o un patrón para el cálculo de la concentración en el diagnóstico de la enfermedad de la tiroides, en la evaluación de un riesgo de desarrollar la enfermedad, o en la evaluación de la eficacia del tratamiento de la enfermedad.

Además, el kit de la presente invención puede contener una sustancia que activa la adenilato ciclasa, por ejemplo, forskolina. La presencia o ausencia de un anticuerpos de bloqueo de la estimulación de la tiroides en una muestra derivada de la sangre de un sujeto de ensayo se pueden determinar mediante la adición de la muestra junto con TSH a la célula, el cultivo de la célula durante el tiempo dado, y a continuación la adición de forskolina a la misma. Por otra parte, también se puede medir la concentración de un anticuerpo de bloqueo de la estimulación de la tiroides de la muestra. Como resultado, se puede diagnosticar el hipotiroidismo (por ejemplo, la enfermedad de Hashimoto), se puede determinar un ser humano que tiene un riesgo de desarrollar hipotiroidismo (por ejemplo, la enfermedad de Hashimoto), o se puede determinar el efecto terapéutico en un paciente que ha sufrido el tratamiento del hipotiroidismo (por ejemplo, la enfermedad Hashimoto).

El kit de acuerdo con la presente invención también es útil como coadyuvante de diagnóstico que ayuda a un médico a diagnosticar la enfermedad de Graves y/o el hipotiroidismo en vista de los síntomas clínicos del paciente y/o otros resultados de los exámenes. Por ejemplo, la medición de la cantidad de un anticuerpo estimulador de la tiroides (TSA<sub>b</sub>) en una muestra de sangre de un paciente que exhibe hipertiroidismo utilizando la composición o el kit de acuerdo con la presente invención puede ser útil para el diagnóstico diferencial entre la enfermedad de Graves y el hipertiroidismo destructivo (p. ej., la tiroiditis indolora o tiroiditis subaguda).

También se proporciona un método para diagnosticar la enfermedad de Graves, que comprende las siguientes etapas (A) a (C):

- (A) preparar una mezcla que contiene una célula como se ha definido anteriormente, un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio, un medio exento de  $\text{Ca}^{2+}$  y una muestra derivada de la sangre de un sujeto de ensayo;
- (B) añadir una disolución que contiene  $\text{Ca}^{2+}$  a la mezcla preparada en (A); y
- (C) medir la luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida desde la célula.

El medio exento  $\text{Ca}^{2+}$  utilizado en la etapa (A) del método puede ser seleccionada apropiadamente por los expertos en la técnica y puede ser un medio exento de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ .

La disolución que contiene  $\text{Ca}^{2+}$  utilizada en la etapa (B) del método puede ser seleccionada apropiadamente por los expertos en la técnica y puede ser, por ejemplo, una disolución de  $\text{CaCl}_2$ . La disolución que contiene  $\text{Ca}^{2+}$  puede contener adicionalmente un catión que puede ser sustituido por calcio (p. ej., un ion de cadmio o un ión de estroncio), un ion de magnesio, un ion de zinc, un ion de ácido sulfúrico y/o un ion de ácido carbónico.

La mezcla preparada en la etapa (A) del método puede contener adicionalmente un anticuerpo anti-TSH. El anticuerpo anti-TSH que contiene en la mezcla preparada en la etapa (A) del método puede evitar que se diagnostique incorrectamente la enfermedad de Graves en un paciente de hipotiroidismo cuya cantidad de TSH en la sangre es un valor alto.

El orden de adición de las sustancias descritas en la etapa (A) del método se puede ser ajustado apropiadamente por los expertos en la técnica.

Por ejemplo, se proporciona un método para el diagnóstico de la enfermedad de Graves, que comprende las siguientes etapas:

- (1) cultivar una célula que expresa un receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSHR), un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, en un medio exento de  $\text{Ca}^{2+}$  con un suplemento de un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio;
- (2) añadir una muestra derivada de sangre de un sujeto de ensayo a la célula cultivada, que se cultiva adicionalmente; y

(3) añadir una disolución de  $\text{CaCl}_2$  a la célula cultivada, y la medir la luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida desde la célula.

En el método, la célula puede ser criopreservada. En este caso, la célula puede ser descongelada mediante una operación suave tal como un baño templado. La célula descongelada se puede cultivar en un medio exento de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  complementado con un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio. El sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio incluye coelenterazina y ViviRen (R).

El medio exento de  $\text{Ca}^{2+}$  no está limitado, siempre y cuando la célula se pueda mantener. Por ejemplo, se utilizan  $\text{NaCl}$  130 mM,  $\text{KCl}$  5 mM,  $\text{HEPES}$  20 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM,  $\text{NaHCO}_3$  4,8 mM,  $\text{PEG6000}$  al 5%, pH 7,4. Además, el medio exento de  $\text{Ca}^{2+}$  puede ser un medio exento de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ . La célula se puede sembrar a una concentración apropiada en un recipiente apropiado y se siembra, por ejemplo, a una concentración de 3 a  $30 \times 10^4$  células/ml y 90  $\mu\text{l}$ /pocillo en una placa de 96 pocillos compatible con un luminómetro. El tiempo de incubación en la etapa (1) puede ser cualquier tiempo, siempre y cuando sea igual o superior a 2 horas. El tiempo de incubación se puede establecer en 2-8 horas y es, por ejemplo, de 3 horas. En general, para la recuperación del daño causado por subcultivo y el aumento de la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio tal como la aequorina, las células son cultivadas generalmente durante aproximadamente 12-24 horas después de la siembra de las células. En la presente invención, se ha confirmado que incluso si las células se cultivan durante aproximadamente 2 horas, la muerte celular causada por los aditivos no es inducida y la proteína sensible al calcio exhibe una fuerte luminiscencia. Se ha confirmado que incluso aproximadamente 2 horas después de la siembra de las células, se puede detectar una fuerte luminiscencia de la proteína sensible a calcio, por ejemplo, empleando aequorina como proteína sensible al calcio, optimizando su secuencia de ADN para el codón humano, e introduciendo una señal de direccionamiento mitocondrial, y empleando adicionalmente ViviRen (R) como sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio.

La muestra derivada de sangre añadida en la etapa (2) se prepara mediante la adición de una disolución acuosa de  $\text{PEG}$  a la sangre de un sujeto de ensayo y recolectando una fracción precipitada. Por ejemplo, se utiliza  $\text{PEG6000}$  al 30% como disolución acuosa de  $\text{PEG}$ . Además, en algunos casos, también se pueden utilizar una muestra derivada de la sangre de paciente con la enfermedad de Graves como control positivo y/o una muestra de sangre derivada de un individuo normal como control negativo y añadir cada una a la célula en la etapa (2), respectivamente. El tiempo de incubación en la etapa (2) no está limitado y se puede ajustar a 30-60 min, por ejemplo, 30 min. Como resultado, el AMPc se acumula en la célula. Por lo tanto, se puede medir una fuerte luminiscencia, más estable, que en ausencia de cultivo después de la adición de la muestra inmediatamente después de la adición de la disolución de  $\text{CaCl}_2$ .

Con tal que los tiempos de incubación en las etapas (2) y (3) se encuentran dentro del plazo de aproximadamente 4 horas en total, no se requiere llevar a cabo el cultivo estéril debido al corto tiempo.

En la etapa (2), se puede añadir adicionalmente un anticuerpo anti-TSH a la célula cultivada. El anticuerpo anti-TSH puede ser un anticuerpo policlonal o puede ser un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo anti-TSH puede ser un anticuerpo derivado de un mamífero apropiado e incluye un anticuerpo de ratón anti-TSH, un anticuerpo de rata anti-TSH, un anticuerpo de conejo anti-TSH y un anticuerpo de cabra anti-TSH. El anticuerpo anti-TSH puede ser modificado apropiadamente por los expertos en la técnica. Por otra parte, la TSH que sirve como antígeno también se selecciona apropiadamente. La TSH que sirve como antígeno incluye TSH humana, TSH de ratón, TSH de rata, TSH de conejo, TSH felina y TSH canina. Los ejemplos del anticuerpo anti-TSH utilizado en el método de la presente invención incluyen un anticuerpo policlonal de cabra anti-TSH humana.

La disolución que contiene  $\text{CaCl}_2$  utilizada en la etapa (3) puede contener adicionalmente un catión que puede ser sustituido por calcio (p. ej., un ion de cadmio o un ion de estroncio), un ion de magnesio, un ion de zinc, un ion de ácido sulfúrico y/o un ion de ácido carbónico. Las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , el catión que puede ser sustituido por el calcio, el ion de magnesio, el ion zinc, el ion de ácido sulfúrico y el ion de ácido carbónico que puede estar contenido en la disolución de  $\text{CaCl}_2$  pueden ser ajustadas apropiadamente por los expertos en la técnica, de manera que la célula pueda ser mantenida y la proteína sensible al calcio tal como la aequorina emita apropiadamente luminiscencia.

En la etapa (3), la luminiscencia es emitida por la proteína sensible al calcio tal como la aequorina inmediatamente después de la adición de la disolución de  $\text{CaCl}_2$  y se puede medir por medio de un método que es bien conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se utiliza un luminómetro capaz de realizar de forma automática y continua la agitación y de medición (PerkinElmer Inc., ARVO-Sx), y la cantidad de luminiscencia se puede medir mediante la integración de los valores de luminiscencia durante 15-30 s después de agitar. El aparato que se puede utilizar en la medición de la cantidad de luminiscencia puede ser seleccionado apropiadamente por los expertos en la técnica.

Como resultado de llevar a cabo el método, cuando la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio (por ejemplo, aequorina) emitida desde la célula tratada con la muestra derivada de la sangre de un sujeto de ensayo es mayor que la emitida desde la célula tratada con una muestra derivada de la sangre de un individuo normal, se puede diagnosticar la enfermedad de Graves en el sujeto de ensayo. Por otra parte, la concentración en suero de un anticuerpo puede ser determinada y comparada con una concentración patrón de anticuerpo de un paciente con la enfermedad de Graves y/o un individuo normal para diagnosticar o no la enfermedad de Graves en el sujeto de ensayo.

Por ejemplo, se miden la cantidad de luminiscencia emitida desde la célula tratada con una muestra de sangre de un sujeto de ensayo y la cantidad de luminiscencia emitida desde la célula tratada con la misma cantidad de una muestra de sangre (patrón) de un individuo normal que la de la muestra de sangre del sujeto de ensayo. Cuando la cantidad de luminiscencia emitida desde la célula tratada con la muestra de sangre del sujeto de ensayo es mayor que la emitida desde la célula tratada con la muestra de sangre (patrón) de un individuo normal, se puede determinar que la concentración en suero de un anticuerpo estimulador de la tiroides (TSAb) del sujeto de ensayo es mayor que la del individuo normal. Por lo tanto, se puede diagnosticar la enfermedad de Graves en el sujeto de ensayo.

Por otra parte, se miden de antemano las cantidades respectivas de luminiscencia (valores integrados) de las células tratadas con las muestras de sangre de una gran población de individuos normales, por ejemplo, de 50 a 100 individuos normales, y se puede calcular la media de las mismas y la desviación típica (DT). Cuando la cantidad de luminiscencia emitida desde la célula tratada con una muestra de sangre de un sujeto de ensayo es superior a la media + nDT (por ejemplo, n = 1, 2, 3, 4, o 5) de las cantidades de luminiscencia (valores integrados) emitida desde las células tratadas con las muestras de sangre de la población de individuos normales, se puede determinar que la concentración en suero de un anticuerpo estimulador de la tiroides del sujeto de ensayo es más alta que la de los individuos normales. Por lo tanto, se puede diagnosticar la enfermedad de Graves en el sujeto de ensayo.

Además, se puede calcular la cantidad de luminiscencia (valor integrado) emitida desde la célula tratada con una muestra de sangre de un sujeto de ensayo/la cantidad de luminiscencia (valor integrado) emitida desde la célula tratada con una muestra de sangre de un individuo normal  $\times 100$  (%) (este valor calculado se define como un valor calculado D). Las cantidades respectivas de luminiscencia (valores integrados) emitida desde las células tratadas con las respectivas muestras de sangre de una gran población de individuos normales y una gran población de pacientes con enfermedad de Graves sin tratar (por ejemplo, de 50 a 100 individuos por población) se miden de antemano, y se ajusta un valor de corte de tal manera que una tasa positiva verdadera de la enfermedad de Graves y/o una tasa negativa verdadera (es decir, ser un individuo normal) son cada una, por ejemplo, 80% o más, 90% o más, 92% o más, 94% o más, 96% o más, o 98% o más. Cuando el valor D calculado es mayor que el valor de corte, también se puede diagnosticar la enfermedad de Graves en el sujeto de ensayo. El valor de corte se puede ajustar apropiadamente dependiendo de las propiedades de una población diana, tales como la edad y sexo y se puede ajustar a, por ejemplo, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190% o 200%.

Además, también se utiliza un patrón de anticuerpo (TSAb) (por ejemplo, NIBSC 90/672 o 65/122), y su concentración se puede diluir seriadamente para preparar una curva de calibración. Con referencia a la curva de calibración, la concentración real en suero de un anticuerpo (TSAb) se calcula a partir de la cantidad medida de la luminiscencia de la proteína sensible al calcio en la célula tratada con una muestra de sangre de un sujeto de ensayo. Esta concentración se puede comparar con la concentración en suero medida previamente de un anticuerpo (TSAb) de cada una de una gran población de individuos normales y una gran población de pacientes con enfermedad de Graves tratados (p. ej., de 50 a 100 individuos por población), o datos conocidos referidos en un documento para diagnosticar o no la enfermedad de Graves en el sujeto de ensayo. Por ejemplo, cuando la concentración es superior a la media + nDT (por ejemplo, n = 1, 2, 3, 4, o 5) de las concentraciones en suero de (TSAb) de la población de individuos normales, la enfermedad de Graves también se puede diagnosticar en el sujeto de ensayo.

Por otra parte, como resultado de llevar a cabo el método, cuando la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio (por ejemplo, aequorina) emitida desde la célula tratada con la muestra derivada de la sangre de un sujeto de ensayo es mayor que la emitida desde la célula tratada con una muestra derivada de la sangre de un individuo normal y es menor que la emitida desde la célula tratada con una muestra derivada de la sangre de paciente con la enfermedad de Graves, se puede determinar que el sujeto de ensayo es un ser humano que tiene un alto riesgo de desarrollo de la enfermedad de Graves. Alternativamente, la concentración en suero de un anticuerpo se puede determinar y comparar con una concentración patrón de anticuerpo de un paciente de la enfermedad de Graves y/o un individuo normal para diagnosticar si el sujeto de ensayo es un ser humano que tiene un alto riesgo de desarrollar o no la enfermedad de Graves.

Además, en la etapa (2), las muestras tomadas antes y después del tratamiento del mismo paciente con la enfermedad de Graves se añaden como muestra derivada de la sangre de un sujeto de ensayo. La cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio (por ejemplo, aequorina) emitida desde la célula puede compararse entre las muestras para determinar la eficacia del tratamiento. Como resultado del ensayo, cuando la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio tales como aequorina es menor en la muestra tomada después del tratamiento que en la muestra tomada antes del tratamiento, se puede determinar que el tratamiento es eficaz.

La presente invención también proporciona un método para el diagnóstico del hipotiroidismo, que comprende las siguientes etapas (A) a (C):

- (A) preparar una mezcla que contiene una célula como se ha definido anteriormente, un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio, un medio exento de  $\text{Ca}^{2+}$ , TSH o un anticuerpo monoclonal TSAb estimulador y una muestra derivada de la sangre de un sujeto de ensayo;
- (B) añadir una disolución que contiene  $\text{Ca}^{2+}$  a la mezcla preparada en (A); y
- (C) cuantificar la luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida desde la célula.

El medio exento de  $\text{Ca}^{2+}$  utilizado en la etapa (A) del método puede ser seleccionado apropiadamente por los expertos en la técnica y puede ser un medio exento de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ .

La disolución que contiene  $\text{Ca}^{2+}$  utilizada en la etapa (B) del método puede ser seleccionada apropiadamente por los expertos en la técnica y puede ser, por ejemplo, una disolución de  $\text{CaCl}_2$ . Además, la disolución que contiene  $\text{Ca}^{2+}$  puede contener adicionalmente un catión que puede ser sustituido por calcio (p. ej., un ion de cadmio o un ión de estroncio), un ion de magnesio, un ion de zinc, un ion de ácido sulfúrico, y/o un ion de ácido carbónico.

El orden de adición de las sustancias descritas en la etapa (A) del método puede ser ajustado apropiadamente por los expertos en la técnica.

Por ejemplo, se proporciona un método para el diagnóstico de hipotiroidismo (p. ej., enfermedad de Hashimoto), que comprende las siguientes etapas:

(1) cultivar una célula que expresa un receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSHR), un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, en un medio exento de  $\text{Ca}^{2+}$  con un suplemento de un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio;

(2) añadir una muestra derivada de la sangre de un sujeto de ensayo junto con la TSH a la célula cultivada, que es cultivada adicionalmente; y

(3) añadir una disolución de  $\text{CaCl}_2$  a la célula cultivada, y medir la luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida desde la célula.

Las etapas (1) - (3) pueden ser llevadas a cabo apropiadamente por los expertos en la técnica con referencia al método para el diagnóstico de la enfermedad de Graves descrito anteriormente.

En algunos casos, en la etapa (2), se pueden utilizar una muestra derivada de la sangre de un individuo normal como control negativo y/o una muestra derivada de la sangre de un paciente hipotiroidismo como control positivo, y cada una de ellas puede ser añadida a la célula, respectivamente. Por otra parte, el tiempo de incubación en la etapa (2) no está limitado y se puede ajustar a 30-120 min, por ejemplo, 30 min. Además, en la etapa (2), la TSH puede ser TSH bovina. En algunos casos, se puede añadir TSAb en lugar de o además de TSH. El TSAb puede ser un anticuerpo monoclonal.

Como resultado de llevar a cabo el método, cuando la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio (por ejemplo, aequorina) emitida desde la célula tratada con la muestra derivada de la sangre de un sujeto de ensayo es menor que la emitida desde la célula tratada con una muestra derivada de la sangre de un individuo normal, se puede diagnosticar el hipotiroidismo en el sujeto de ensayo. Por otra parte, la concentración en suero de un anticuerpo puede ser determinada y comparada con una concentración patrón de anticuerpos de un paciente de hipotiroidismo y/o un individuo normal para diagnosticar o no el hipotiroidismo en el sujeto de ensayo. Por ejemplo, se miden la cantidad de luminiscencia emitida desde la célula tratada con una muestra de sangre de un sujeto de ensayo y la cantidad de luminiscencia emitida desde la célula tratada con la misma cantidad de una muestra de sangre (patrón) de un individuo normal como la de la muestra de sangre del sujeto de ensayo. Cuando la cantidad de luminiscencia emitida desde la célula tratada con la muestra de sangre de un sujeto de ensayo es menor que la emitida desde la célula tratada con la muestra de sangre (patrón) de un individuo normal, se puede determinar que la concentración en suero de un anticuerpo de bloqueo de la estimulación de la tiroides (TSBAb) del sujeto de ensayo es mayor que la del individuo normal. Por lo tanto, se puede diagnosticar el hipotiroidismo en el sujeto de ensayo.

Por otra parte, las cantidades respectivas de luminiscencia inducida por TSH (valores integrados) de las proteínas sensibles al calcio en las células tratadas con muestras de sangre de una población de un gran número de individuos normales, por ejemplo, de 50 a 100 individuos normales, se miden de antemano, y se pueden calcular una media de las mismas y la desviación típica (DT). Cuando la cantidad de luminiscencia inducida por TSH de la célula tratada con una muestra de sangre de un sujeto de ensayo es menor que la media - nDT (p. ej.,  $n = 1, 2, 3, 4,$  o 5) de las cantidades de luminiscencia inducida por TSH (valores integrados) de las células tratadas con las muestras de sangre de la población de individuos normales, se pueden determinar que la concentración en suero de un anticuerpo de bloqueo de la estimulación de la tiroides (TSBAb) del sujeto de ensayo es más alta que la de los individuos normales. Por lo tanto, también se puede diagnosticar el hipotiroidismo en el sujeto de ensayo.

Además, se puede calcular la cantidad de luminiscencia (valor integrado) en la célula tratada con una muestra de sangre de un sujeto de ensayo/la cantidad de luminiscencia (valor integrado) de la célula tratada con una muestra de sangre de un individuo normal  $\times 100$  (%) (en lo sucesivo, este valor calculado se define como un valor calculado E). Las cantidades respectivas de luminiscencia (valores integrados) atribuidas a las respectivas muestras de sangre de una gran población de individuos normales y una gran población de pacientes hipotiroidismo no tratados (por ejemplo, de 50 a 100 individuos por población) se miden de antemano, y un se fija un valor de corte de tal manera que una tasa positiva verdadera de hipotiroidismo y/o una tasa negativa verdadera (es decir, ser un individuo normal) son cada una, por ejemplo, 80% o más, 90% o más, 92% o más, 94% o más, 96% o más, o 98% o más. Cuando el valor E calculado es menor que el valor de corte, también se puede diagnosticar el hipotiroidismo en el sujeto de ensayo. El valor de corte se puede ajustar apropiadamente dependiendo de las propiedades de una población diana, tales como la edad y sexo y se puede ajustar a, por ejemplo, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%,

70%, 80%, o 90%.

Además, también se utiliza un patrón de anticuerpo (TSBAb) que tiene una concentración conocida, y su concentración se puede diluir seriadamente para preparar una curva de calibración. Con referencia a la curva de calibración, la concentración real en suero de un anticuerpo (TSBAb) se calcula a partir de la cantidad medida de la luminiscencia emitida desde la célula tratada con una muestra de sangre de un sujeto de ensayo. Esta concentración se puede comparar con la concentración de suero medida previamente de un anticuerpo (TSBAb) de cada una de una gran población de individuos normales y una gran población de pacientes hipotiroidismo no tratados (p. ej., de 50 a 100 individuos por población), o datos conocidos referidos en un documento para diagnosticar o no el hipotiroidismo en el sujeto de ensayo. Por ejemplo, cuando la concentración es superior a la media + nDT (por ejemplo, n = 1, 2, 3, 4, o 5) de las concentraciones en suero de (TSBAb) en la población de individuos normales, también se puede diagnosticar el hipotiroidismo en el sujeto de ensayo.

Por otra parte, como resultado de llevar a cabo el método, cuando la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio (por ejemplo, aequorina) emitida desde la célula tratada con la muestra derivada de la sangre de un sujeto de ensayo es menor que la emitida desde la célula tratada con una muestra derivada de la sangre de un individuo normal y es mayor que la emitida desde la célula tratada con una muestra derivada de la sangre de un paciente de hipotiroidismo, se puede determinar que el sujeto de ensayo es un ser humano que tiene un alto riesgo de desarrollar hipotiroidismo. Alternativamente, la concentración en suero de un anticuerpo puede ser determinada y comparada con una concentración patrón de anticuerpos en un paciente de hipotiroidismo y/o un individuo normal para determinar que el sujeto de ensayo es un ser humano que tiene un alto riesgo de desarrollar o no hipotiroidismo. Además, en la etapa (2), las muestras tomadas antes y después del tratamiento del mismo paciente de hipotiroidismo se añaden como muestra derivada de la sangre de un sujeto de ensayo. La cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio (por ejemplo, aequorina) emitida desde la célula puede compararse entre las muestras para determinar la eficacia del tratamiento. Como resultado del ensayo, cuando la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio tal como la aequorina es mayor en la muestra tomada después del tratamiento que en la muestra tomada antes del tratamiento, se puede determinar que el tratamiento es eficaz.

Además se proporciona un método para el diagnóstico del hipotiroidismo, que comprende las siguientes etapas (A) a (C):

- (A) preparar una mezcla que contiene una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio, un medio que contiene  $\text{Ca}^{2+}$ , TSH o un anticuerpo monoclonal TSAb estimulador y una muestra derivada de la sangre de un sujeto de ensayo;
- (B) añadir forskolina a la mezcla preparada en (A); y
- (C) cuantificar la luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida desde la célula.

El medio que contiene  $\text{Ca}^{2+}$  utilizado en la etapa (A) del método puede ser seleccionado apropiadamente por los expertos en la técnica y puede ser, por ejemplo, un medio que contiene  $\text{CaCl}_2$ . Además, el medio que contiene  $\text{Ca}^{2+}$  puede contener adicionalmente un catión que puede ser sustituido por calcio (por ejemplo, un ion de cadmio o un ión de estroncio), un ion de magnesio, un ion de zinc, un ion de ácido sulfúrico, y/o un ion de ácido carbónico. Las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , el catión que puede ser sustituido por el calcio, el ion de magnesio, el ión zinc, el ion de ácido sulfúrico y el ion de ácido carbónico que puede estar contenido en el medio que contiene  $\text{Ca}^{2+}$  pueden ser ajustadas apropiadamente por los expertos en la técnica, de manera que la célula pueda ser mantenida y la proteína sensible al calcio tal como la aequorina emita apropiadamente luminiscencia.

El orden de adición de las sustancias descritas en la etapa (A) del método puede ser ajustado apropiadamente por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se proporciona un método para el diagnóstico de hipotiroidismo (por ejemplo, enfermedad de Hashimoto), que comprende las siguientes etapas:

- (1) cultivar una célula que expresa un receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSHR), un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, en un medio que contiene  $\text{Ca}^{2+}$  tratado con un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio;
- (2) añadir una muestra derivada de la sangre de un sujeto de ensayo junto con TSH a la célula cultivada, que es cultivada adicionalmente; y
- (3) añadir forskolina a la célula cultivada, y la medir la luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida desde la célula.

Las etapas (1) - (3) pueden ser llevadas a cabo apropiadamente por los expertos en la técnica con referencia al método para el diagnóstico de la enfermedad de Graves descrito anteriormente.

En algunos casos, en la etapa (2), se pueden utilizar una muestra derivada de la sangre de un individuo normal como control negativo y/o una muestra derivada de la sangre de un paciente hipotiroidismo como control positivo puede ser utilizado y cada una de ellas se puede añadir a la célula, respectivamente. Por otra parte, el tiempo de incubación en la etapa (2) no está limitado y se puede ajustar a 10-120 min, por ejemplo, 10 min. Además, en la etapa (2), la TSH puede ser TSH bovina. En algunos casos, se puede añadir TSAb en lugar de o además de TSH. El TSAb puede ser un anticuerpo monoclonal.

En la etapa (3), la concentración de forskolina puede ser ajustada apropiadamente por los expertos en la técnica.

Como resultado de llevar a cabo el método, cuando la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio (por ejemplo, aequorina) emitida desde la célula tratada con la muestra derivada de la sangre de un sujeto de ensayo es mayor que la emitida desde la célula tratada con una muestra derivada de la sangre de un individuo normal, se puede diagnosticar el hipotiroidismo en el sujeto de ensayo. Por otra parte, la concentración en suero de un anticuerpo puede ser determinada y comparada con una concentración patrón de anticuerpos en un paciente de hipotiroidismo y/o un individuo normal para diagnosticar o no el hipotiroidismo en el sujeto de ensayo. Por ejemplo, se miden la cantidad de luminiscencia emitida desde la célula tratada con una muestra de sangre de un sujeto de ensayo y la cantidad de luminiscencia emitida desde la célula tratada con la misma cantidad de una muestra de sangre (patrón) de un individuo normal como la de la muestra de sangre del sujeto de ensayo. Cuando la cantidad de luminiscencia emitida desde la célula tratada con la muestra de sangre de un sujeto de ensayo es mayor que la emitida desde la célula tratada con la muestra de sangre (patrón) de un individuo normal, se puede determinar que la concentración en suero de un anticuerpo de bloqueo de la estimulación de la tiroides (TSBA<sub>b</sub>) del sujeto de ensayo es mayor que la del individuo normal. Por lo tanto, se puede diagnosticar el hipotiroidismo en el sujeto de ensayo.

Por otra parte, se miden de antemano las cantidades respectivas de luminiscencia (valores integrados) de las células tratadas con muestras de sangre de una población de un gran número de individuos normales, por ejemplo, de 50 a 100 individuos normales, y se pueden calcular una media de las mismas y la desviación típica (DT). Cuando la cantidad de luminiscencia emitida desde la célula tratada con una muestra de sangre de un sujeto de ensayo es superior a la media + nDT (por ejemplo, n = 1, 2, 3, 4, o 5) de las cantidades de luminiscencia (valores integrados) emitidas desde las células tratadas con las muestras de sangre de la población de individuos normales, se puede determinar que la concentración en suero de un anticuerpo de bloqueo de la estimulación de la tiroides (TSBA<sub>b</sub>) del sujeto de ensayo es más alta que la de los individuos normales. Por lo tanto, también se puede diagnosticar el hipotiroidismo en el sujeto de ensayo.

Además, se puede calcular la cantidad de luminiscencia (valor integrado) emitida desde la célula tratada con una muestra de sangre de un sujeto de ensayo/la cantidad de luminiscencia (valor integrado) emitida desde la célula tratada con una muestra de sangre de un individuo normal × 100 (%) (en lo sucesivo, este valor calculado se define como un valor calculado F). Las cantidades respectivas de luminiscencia (valores integrados) atribuidas a las respectivas muestras de sangre de una gran población de individuos normales y una gran población de pacientes hipotiroidismo no tratados (por ejemplo, de 50 a 100 individuos por población) se miden de antemano, y un se fija un valor de corte de tal manera que una tasa positiva verdadera de hipotiroidismo y/o una tasa negativa verdadera (es decir, ser un individuo normal) son cada una, por ejemplo, 80% o más, 90% o más, 92% o más, 94% o más, 96% o más, o 98% o más. Cuando el valor F calculado es mayor que el valor de corte, también se puede diagnosticar el hipotiroidismo en el sujeto de ensayo. El valor de corte se puede ajustar apropiadamente dependiendo de las propiedades de una población diana, tales como la edad y sexo y se puede ajustar a, por ejemplo, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800% o 900%.

Además, también se utiliza un patrón de anticuerpo (TSBA<sub>b</sub>) que tiene una concentración conocida, y su concentración se puede diluir seriadamente para preparar una curva de calibración. Con referencia a la curva de calibración, la concentración real en suero de un anticuerpo (TSBA<sub>b</sub>) se calcula a partir de la cantidad medida de la luminiscencia emitida desde la célula tratada con una muestra de sangre de un sujeto de ensayo. Esta concentración se puede comparar con la concentración de suero medida previamente de un anticuerpo (TSBA<sub>b</sub>) de cada una de una gran población de individuos normales y una gran población de pacientes hipotiroidismo no tratados (por ejemplo, de 50 a 100 individuos por población), o datos conocidos referidos en un documento para diagnosticar o no el hipotiroidismo en el sujeto de ensayo. Por ejemplo, cuando la concentración es superior a la media + nDT (por ejemplo, n = 1, 2, 3, 4, o 5) de las concentraciones en suero de (TSBA<sub>b</sub>) de la población de individuos normales, también se puede diagnosticar el hipotiroidismo en el sujeto de ensayo.

Por otra parte, como resultado de llevar a cabo el método, cuando la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio (por ejemplo, aequorina) emitida desde la célula tratada con la muestra derivada de la sangre de un sujeto de ensayo es mayor que la emitida desde la célula tratada con una muestra derivada de la sangre de un individuo normal y es menor que la emitida desde la célula tratada con una muestra derivada de la sangre de un paciente hipotiroidismo, se puede determinar que el sujeto de ensayo es un ser humano que tiene un alto riesgo de desarrollar hipotiroidismo. Alternativamente, la concentración en suero de un anticuerpo puede ser determinada y comparada con una concentración patrón de anticuerpo de un paciente de hipotiroidismo y/o un individuo normal para determinar que el sujeto de ensayo es un ser humano que tiene un alto riesgo de desarrollar o no hipotiroidismo.

Además, en la etapa (2), las muestras tomadas antes y después del tratamiento del mismo paciente de hipotiroidismo se añaden como muestra derivada de la sangre de un sujeto de ensayo. La cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio (por ejemplo, aequorina) emitida desde la célula puede compararse entre las muestras para determinar la eficacia del tratamiento. Como resultado del ensayo, cuando la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio tal como aequorina es menor en la muestra tomada después del tratamiento que en la muestra tomada antes del tratamiento, se puede determinar que el tratamiento es eficaz.

En lo sucesivo, la presente invención se describirá adicionalmente con referencia a los Ejemplos.



## Ejemplos

### 1. Detalles sobre el método de construcción de células congeladas

5 La secuencia de ADNc de un receptor de la hormona estimuladora de la tiroides humana (Núm. GenBank NM\_000369) (SEQ ID NO: 5) se amplificó mediante el método de PCR a partir de una biblioteca de ADNc derivada de la glándula tiroides humana y se clonó en pUC18. El ADNc de hTSHR clonado en pUC18 se escindió con BamHI y se volvió a clonar en un vector de pZeoSV2 (Invitrogen Corp.) para preparar pZeoSV2 hTSHR.

10 La secuencia de ADNc de un canal de calcio dependiente de nucleótidos cíclicos (Núm. GenBank BC048775) (SEQ ID NO: 4) se amplificó mediante el método de PCR a partir de una biblioteca de ADNc derivado de células epiteliales olfativas de ratón y se clonó en un vector de expresión de 1994 pb (pCMVSPORT, Invitrogen Corp.) para preparar pmCNGα2 (Figura 18). Además, para mejorar la selectividad de AMPc y la sensibilidad al mismo, se preparó un constructo pmCNGα2MW que expresaba un canal de calcio dependiente de nucleótidos cíclicos modificados (SEQ ID NO: 6) en el que la cisteína 460<sup>a</sup> (C) estaba sustituida por triptófano (W) y el ácido glutámico 583<sup>a</sup> (E) estaba sustituido por metionina (M) mediante el método de mutación puntual por PCR. Por otra parte, se trató una secuencias de ADNc de apoaeguorina sintética (676 pb) (SEQ ID NO: 7) que se había optimizado para el uso de codones en seres humanos mediante el método de elongación de oligo ADN, y que tenía una señal de direccionamiento mitocondrial con las enzimas de restricción KpnI y NheI y se clonó en pcDNA3.1 (Invitrogen Corp.) tratado con KpnI y NheI para preparar un vector de expresión de apoaeguorina pcDNA mt sAEQ (Figura 19). Las células CHO se sembraron a una concentración de células de  $1,0 \times 10^5$  células/ml en una placa de petri de  $10\text{-cm}^2$ . Al día siguiente, las células fueron transfectadas con  $1 \mu\text{g}$  de pZeoSV2 hTSHR,  $2 \mu\text{g}$  de pmCNGα2MW, y  $2 \mu\text{g}$  de pcDNA mt sAEQ por placa de Petri utilizando FuGENE6 (TM) (Roche Applied Science). Al día siguiente, las células se disociaron de la placa de Petri por medio de la adición de  $400 \mu\text{l}$  de una disolución de Versene (EDTA) a la placa de Petri y se suspendieron en un medio DMEM/F12 que contenía  $10 \text{ ml}$  de cFCS al 5%. La suspensión obtenida se centrifugó a  $1000 \text{ rpm}$  durante  $5 \text{ min}$ . A continuación, el sedimento se disolvió a una concentración de  $2\text{-}5 \times 10^6$  células/ml en  $1 \text{ ml}$  de CELLBANKER y se almacenó a  $-80^\circ\text{C}$ .

### 2. Curva dependiente de la concentración y sensibilidad de detección mínima de TSH (bTSH) obtenida utilizando células congeladas

30 Se descongeló  $1 \text{ ml}$  ( $3 \times 10^6$  células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 en un baño caliente y se suspendió en  $10 \text{ ml}$  de un tampón de muestra (NaCl  $130 \text{ mM}$ , KCl  $5 \text{ mM}$ , HEPES  $20 \text{ mM}$ ,  $\text{MgCl}_2$   $1 \text{ mM}$ ,  $\text{NaHCO}_3$   $4,8 \text{ mM}$ , PEG6000 al 5%, pH 7,4). Después de la centrifugación a  $1000 \text{ rpm}$  durante  $5 \text{ min}$ , se añadieron  $10 \text{ ml}$  de un tampón de muestra al precipitado obtenido, y se añadieron  $7,5 \mu\text{l}$  de ViviRen  $4 \text{ mM}$  (Promega Corp.) a la misma. La mezcla se sembró a una concentración de  $90 \mu\text{l/pocillo}$  en una placa de  $96$  pocillos. Después del cultivo a  $37^\circ\text{C}$  durante  $3$  horas en una atmósfera de  $\text{CO}_2$ , se añadió a esto ( $n = 6$ ) bTSH diluido seriadamente con PBS a una concentración de  $10 \mu\text{l/pocillo}$ , y las células se cultivaron durante  $30 \text{ min}$ . A continuación, se añadió una disolución de  $\text{CaCl}_2$   $3 \text{ mM}$  a esto a una concentración de  $50 \mu\text{l/pocillo}$ , y se midió la cantidad de luminiscencia utilizando un luminómetro (PerkinElmer Inc., ARVO-Sx; en lo sucesivo, se utilizó el mismo modelo en los Ejemplos). Se muestra una curva dependiente de la concentración bTSH en la Figura 1.

45 Como se muestra en la Figura 2 (vista aumentada del intervalo de baja concentración), la cantidad mínima detectable para bTSH fue de  $0,16 \mu\text{U/ml}$  de manera que el valor detectado fue susceptible de ser discriminado significativamente del valor que se calcula por el valor del blanco +  $3\text{SD}$ . Además, dado que aequorina realiza una reacción luminiscente, se obtuvo una elevada relación de señal con respecto al blanco (razón S/N) (es decir, unos  $100 \mu\text{U/ml}$  de bTSH, razón S/N de aproximadamente  $45$  veces ( $9000000/200000$ )) mediante el método de la presente invención.

50 Como se muestra en la Figura 2 (vista aumentada del intervalo de baja concentración), la cantidad mínima detectable para bTSH fue de  $0,16 \mu\text{U/ml}$  de manera que el valor detectado fue susceptible de ser discriminado significativamente del valor que se calcula por valor del blanco +  $3\text{SD}$ . Por lo tanto, la sensibilidad fue de un orden de magnitud mayor que la de la kit disponible existente de YAMASA CORP: cantidad mínima detectable para bTSH,  $1 \mu\text{U/mL}$  (Atsuo Nagata, et al.: Clinical Endocrinology, 41: 1023, 1993). Por otra parte, dado que la aequorina realiza una reacción luminiscente, la elevada relación de señal con respecto a blanco (S/N), (es decir, unos  $100 \mu\text{U/ml}$  de bTSH, razón S/N de aproximadamente  $45$  veces ( $9000000/200000$ )), obtenida mediante el método de la presente invención fue muy superior a la del kit YAMASA ( $100 \mu\text{U/ml}$  de bTSH, SN = 7).

### 3. Estudio de reproducibilidad

60 Se diluyó un patrón TASb derivado de pacientes con enfermedad de Graves humana: MRC Research Standard B 1966 Long-acting Thyroid Stimulator (NIBSC: National Institute for Biological Standards and Control, código 65/122) con suero de un individuo normal para preparar las muestras de control H ( $1,88 \text{ mU LAST/ml}$ ), M ( $1,25 \text{ mU LAST/ml}$ ) y L ( $0,94 \text{ mU LAST/ml}$ ). Se añadieron  $150 \mu\text{l}$  de PEG600 al 30% a  $50 \mu\text{l}$  de cada suero de control preparado, y las mezclas se agitaron y después se dejaron en reposo a  $4^\circ\text{C}$  durante  $5 \text{ min}$ . Después de centrifugación a  $3000 \text{ rpm}$  a

4°C durante 20 min, los precipitados obtenidos se disolvieron por separado en 400 µl de un tampón de muestra para preparar soluciones de muestras. Se descongeló 1 ml ( $3 \times 10^6$  células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 se descongeló en un baño caliente y se suspendió en 10 ml de un tampón de muestra. Después de centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, se añadieron 10 ml de un tampón de muestra al precipitado obtenido, y a esto se le añadieron 7,5 µl de ViviRen 4 mM. La mezcla se sembró a una concentración de 80 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos. Después del cultivo a 37°C durante 3 h en una atmósfera de CO<sub>2</sub>, se añadieron a esto por separado las muestras preparadas (n = 2) a una concentración de 20 µl/pocillo, y las células se cultivaron durante 30 min. A continuación, se añadió a esto una disolución de CaCl<sub>2</sub> 9 mM a una concentración de 50 µl/pocillo, y la cantidad de luminiscencia se midió utilizando un luminómetro. La comparación se realizó en cada uno de los casos en los que seis de las muestras L, M y H fueron purificadas y analizadas simultáneamente (reproducibilidad entre rondas), el caso en el que las muestras L, M, y H fueron purificadas y analizadas independientemente en 10 días diferentes (reproducibilidad entre rondas), y el caso en el que las muestras L, M, y H de diferentes lotes de producción fueron purificadas y analizadas el mismo día (reproducibilidad entre lotes). Además de la adición a las muestras de análisis, H (576 TSAb%), M (342 TSAb%), y L (197 TSAb%) puntuadas por separado utilizando el kit YAMASA se añadieron a la placa, y se dibujó una curva de calibración. Un valor determinado a partir de la línea de regresión obtenida se definió como una concentración de la muestra (TSAb% basándose en el kit YAMASA) (YAMASA TSAb% = Valor de la muestra/Valor del suero de un individuo normal  $\times$  100 (%)).

[Tabla 1]

	Reproducibilidad entre series			Reproducibilidad entre rondas			Reproducibilidad entre lotes		
n	6			10			3		
	L	M	H	L	M	H	L	M	H
Valor máximo	242	387	587	248	333	583	190	343	543
Valor mínimo	186	293	471	188	280	470	171	307	492
Media	217	364	525	202	309	512	183	322	512
DT	20	37	40	18	15	36	11	19	27
CV (%)	9	10	8	9	5	7	6	6	5

Se confirmó que el método de la presente invención producía una alta reproducibilidad debido a que el sistema de análisis tenía una alta sensibilidad y una alta razón S/N. Por otra parte, 5-6% CV demostró que el método de la presente invención tenía una alta reproducibilidad entre lotes. El sistema de análisis con poca diferencia entre los diferentes lotes se podría construir utilizando células CHO y condiciones de transfección optimizadas.

Se ha informado de que el valor CV de la reproducibilidad del kit TSAb disponible de YAMASA CORP. era de 10-15%, lo que demuestra una alta reproducibilidad del método de la presente invención.

Por otra parte, puesto que el kit existente se produce por congelación de células de la glándula tiroideas derivadas de tejido porcino, su problema es que la variación entre lotes es grande debido a las diferencias individuales entre los cerdos de los que deriva el tejido (CV entre lotes: 10-19%). Por el contrario, se confirmó que el método de la presente invención tenía una alta reproducibilidad incluso entre los diferentes lotes.

#### 4. Estudio sobre el tiempo de incubación después de la adición de sustrato (ViviRen) para la luminiscencia de aequorina

Se descongeló 1 ml ( $3 \times 10^6$  células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 en un baño caliente y se suspendió en 10 ml de un tampón de muestra. Después de la centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, se añadieron 10 ml de un tampón de muestra al precipitado obtenido, y se añadieron a esto 7,5 µl de ViviRen 4 mM. Después de la adición, 30 min, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 h, la mezcla se sembró a una concentración de 90 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos. Se añadió a esto bTSH diluido seriadamente con PBS a una concentración de 10 µl/pocillo, y las células se cultivaron durante 30 min. A continuación, se añadió a esto una disolución de CaCl<sub>2</sub> 9 mM a una concentración de 50 µl/pocillo, y la cantidad de luminiscencia se midió utilizando un luminómetro. Se demostró que la cantidad de luminiscencia alcanzaba una meseta a las 2 horas de la adición de ViviRen (véase la Figura 3).

#### 5. Estudio sobre la cantidad de plásmido receptor utilizado en la transfección

Se sembraron 10 ml de células CHO que tenían una concentración de  $1 \times 10^5$  células/ml en una placa de Petri de 10 cm<sup>2</sup> y se cultivaron durante 1 día. A continuación, se mezclaron 3 µg de pcDNA mt sAEQ, 1 µg de pmCNGα2MW, y de 0 a 1 µg del plásmido pZeoSV2 TSHR y se mezclaron adicionalmente con 600 µl de DMEM/F12 y 18 µl de FuGENE6 (Roche Applied Science), y se realizó la transfección. Después de un cultivo adicional durante la noche, se retiró el medio, y las células se lavaron con 10 ml de PBS. A continuación, se añadieron a esto 800 µl de

Versene, y las células se cultivaron a 37°C durante 5 min y luego se suspendieron en 10 ml de DMEM/F12 cFCS. Después de centrifugar a 1000 rpm durante 5 min, el precipitado se disolvió en 10 ml de DMEM/F12 cFCS, y a esto se le añadieron 6,5 µl de ViviRen 4 mM. Después del cultivo a 37°C durante 3 h, el medio fue reemplazado por PBS, y la disolución de cultivo se sembró a una concentración de 90 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos. Treinta minutos después de la adición de una serie de concentración de bTSH, se añadió a esto una disolución de CaCl<sub>2</sub> 3 mM a una concentración de 50 µl/pocillo, y la cantidad de luminiscencia se midió utilizando un luminómetro.

Se demostró que se requería el plásmido receptor en una cantidad de 1 µg/placa en la transfección para obtener la cantidad óptima de luminiscencia (véase la Figura 4).

#### 6. Optimización de la concentración celular

Se descongeló 1 ml ( $3 \times 10^6$  células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 en un baño caliente y se suspendió en 10 ml de un tampón de muestra. Después de la centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, se añadieron 10 ml de un tampón de muestra al precipitado obtenido. Se preparó una serie de células cuya concentración celular se había ajustado a concentraciones de  $3 \times 10^3$  células/ml a  $3 \times 10^5$  células/ml. A esto se le añadieron 7,5 µl de ViviRen 4 mM, y la mezcla se sembró a una concentración de 90 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos. Después del cultivo a 37°C durante 3 h en una atmósfera de CO<sub>2</sub>, se añadió a esto bTSH diluido seriadamente con PBS a una concentración de 10 µl/pocillo, y las células se cultivaron durante 30 min. A continuación, se añadió a esto una disolución de CaCl<sub>2</sub> 9 mM a una concentración de 50 µl/pocillo, y se midió la cantidad de luminiscencia utilizando un luminómetro.

Como se muestra en las Figuras 5 y 6, la cantidad de luminiscencia aumentó de una manera dependiente de la concentración celular. Se demostró que  $3 \times 10^5$  células/ml era la concentración óptima, basándose en el valor relativo donde cada valor en blanco se define como 1.

#### 7. Estudio sobre la concentración de la disolución de detección de CaCl<sub>2</sub> añadida

Se descongeló 1 ml ( $3 \times 10^6$  células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 en un baño caliente y se suspendió en 10 ml de un tampón de muestra. Después de centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, se añadieron 10 ml de un tampón de muestra al precipitado obtenido, y se añadieron a esto 7,5 µl de ViviRen 4 mM. La mezcla se sembró a una concentración de 90 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos. Después del cultivo a 37°C durante 3 h en una atmósfera de CO<sub>2</sub>, se añadió a esto bTSH diluido seriadamente con PBS a una concentración de 10 µl/pocillo, y las células se cultivaron durante 30 min. A continuación, se añadió a esto una disolución de detección de CaCl<sub>2</sub> (concentraciones finales: 0 a 30 mM) a una concentración de 50 µl/pocillo, y se midió la cantidad de luminiscencia utilizando un luminómetro.

Se demostró que las concentraciones de CaCl<sub>2</sub> óptimas eran de 3 a 6 mM a las cuales se obtienen un valor bajo en el fondo (0) y una cantidad de luminiscencia elevada en la muestra (véase la Figura 7).

#### 8. Estudio de linealidad de la dilución utilizando suero control con anticuerpo estimulador

Se descongeló 1 ml ( $3 \times 10^6$  células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 en un baño caliente y se suspendió en 10 ml de un tampón de muestra. Después de centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, se añadieron 10 ml de un tampón de muestra al precipitado obtenido, y se añadieron a esto 7,5 µl de ViviRen 4 mM. La mezcla se sembró a una concentración de 80 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos. Las células se cultivaron a 37°C durante 3 h en una atmósfera de CO<sub>2</sub>. Las fracciones de IgG de una serie de suero de control positivo (que se adhería a Roche NIBSC 90/672; 40 UI/ml, 13 UI/ml, 8 UI/ml, y 4 UI/ml) purificadas y diluidas con PEG6000 al 30% se diluyeron por separado 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, o 1/32 veces con un tampón de muestra, y cada disolución se añadió a una concentración de 20 µl/pocillo. Después del cultivo durante 30 minutos, se añadió a esto una disolución de CaCl<sub>2</sub> 9 mM a una concentración de 50 µl/pocillo, y se midió la cantidad de luminiscencia utilizando un luminómetro.

Como se muestra en la Figura 8, se confirmó que la cantidad de luminiscencia aumentaba con la linealidad.

#### 9. Estudio sobre el método para detectar el anticuerpo de bloqueo de la estimulación tiroidea (TSBAb)

Se descongeló 1 ml ( $3 \times 10^6$  células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 en un baño caliente y se suspendió en 10 ml de un tampón de muestra. Después de la centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, se añadieron 10 ml de un tampón de muestra al precipitado obtenido, y se añadieron a esto 7,5 µl de ViviRen 4 mM. La mezcla se sembró a una concentración de 90 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos. Después del cultivo a 37°C durante 3 h en una atmósfera de CO<sub>2</sub>, se añadieron al mismo por separado una fracción de anticuerpo de bloqueo de la estimulación tiroidea derivada de un paciente con hipotiroidismo (TSBAb) y una fracción de IgG derivada de suero de un individuo normal purificada con PEG6000 al 30% a una concentración de 10 µl/pocillo. Al mismo tiempo, se añadió adicionalmente a esto bTSH (concentraciones finales: 100 µU a 2,5µU/ml) a una concentración de 10 µl/pocillo. Después del cultivo durante 30 minutos, se añadió a esto una disolución de CaCl<sub>2</sub> 9 mM a una concentración de 50 µl/pocillo, y la cantidad de luminiscencia se midió utilizando un luminómetro.

Se demostró que 90% o más de la luminiscencia era inhibida en la fracción de anticuerpo derivado de paciente con hipotiroidismo en presencia de 2,5 a 10 µU/ml de bTSH (véase la Figura 9). Aproximadamente el 50% de inhibición

se observó en la presencia de 100  $\mu\text{U/mL}$  de bTSH, lo que demuestra la inhibición competitiva de acuerdo con la concentración de bTSH competidor (véase la Figura 9).

Cuando se detecta el anticuerpo de bloqueo, se observa generalmente una reducción de la señal en presencia de bTSH. Se sabe que los métodos convencionales tienen la desventaja de que la relación S/N es tan baja como 5 a 10 veces y el intervalo de medición se estrecha debido a la baja razón S/N. Por el contrario, el método de la presente invención tiene un amplio intervalo de medición de manera que la razón S/N en presencia o ausencia de bTSH es 50 veces. Por lo tanto, el anticuerpo de bloqueo se puede detectar con una elevada sensibilidad.

10. Estudio sobre el método para la detección de anticuerpos de bloqueo de la estimulación tiroidea (TSBAb) por medio de desensibilización celular

Se descongeló 1 ml ( $3 \times 10^6$  células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 en un baño caliente y se suspendió en 10 ml de un tampón de muestra. Después de centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, se añadieron 10 ml de un medio DMEM/F12 cFCS que contenía calcio al precipitado obtenido, y a esto se le añadieron 7,5  $\mu\text{l}$  de ViviRen 4 mM. La mezcla se sembró a una concentración de 90  $\mu\text{l/pocillo}$  en una placa de 96 pocillos. Después del cultivo a 37°C durante 3 h en una atmósfera de  $\text{CO}_2$ , se añadieron por separado a esto una fracción de anticuerpo de bloqueo de la estimulación tiroidea derivada de un paciente con hipotiroidismo (TSBAb) y una fracción de IgG derivada de suero de un individuo normal purificada con PEG6000 al 30% a una concentración de 10  $\mu\text{l/pocillo}$ . Al mismo tiempo, se añadió adicionalmente bTSH (concentraciones finales: 100  $\mu\text{U}$  a 2,5  $\mu\text{U/ml}$ ) a una concentración de 10  $\mu\text{l/pocillo}$ . Después del cultivo durante 30 min, se añadió a esto una disolución de forskolina  $10^{-4}$  M a una concentración de 50  $\mu\text{l/pocillo}$ , y se midió la cantidad de luminiscencia utilizando un luminómetro.

En la Figura 10, no se observó diferencia entre el anticuerpo de bloqueo y las muestras individuales normales debido a la desensibilización insuficiente en la presencia de bTSH con concentraciones de 5  $\mu\text{U}$  o inferiores. Sin embargo, en la presencia de 100  $\mu\text{U}$  de bTSH, la cantidad de luminiscencia se redujo en el suero de individuo normal, y se observó un aumento de la cantidad de luminiscencia en presencia del anticuerpo de bloqueo, lo que demuestra que de acuerdo con el método de la presente invención, la presencia o ausencia del anticuerpo de bloqueo puede ser detectada utilizando la desensibilización.

[Mecanismo de la luminiscencia en presencia o ausencia de anticuerpo de bloqueo de acuerdo con el método de la presente invención]

En estas condiciones, el calcio está presente en el medio en el momento de la adición de bTSH a las células; por lo tanto la reacción luminiscente se produce inmediatamente después de la adición de bTSH en ausencia del anticuerpo de bloqueo como se observa en sueros de individuos normales. Por el contrario, en presencia del anticuerpo de bloqueo (TSBAb), TSBAb inhibe la acción de bTSH, de manera que no se produce reacción luminiscente. En este estado, tras la subsiguiente adición de forskolina, que activa la adenilato ciclasa, se forma AMPc para provocar la luminiscencia sin la mediación de un receptor de TSH. Sin embargo, en ausencia de TSBAb, las células ya están desensibilizadas por la reacción luminiscente que ya se ha producido a través de la adenilato ciclasa activada por bTSH. Por lo tanto, la luminiscencia no se produce ni siquiera por la adición de más forskolina como segundo estímulo. Por el contrario, en presencia de TSBAb, el anticuerpo de bloqueo impide que bTSH active la adenilato ciclasa. Por lo tanto, tras la subsiguiente adición de forskolina, se forma AMPc que ocasiona una reacción luminiscente.

[Discusión]

Los métodos convencionales para la detección de un anticuerpo de bloqueo se indican mediante el % de inhibición con respecto a un individuo normal. Sin embargo, el problema de la indicación que utiliza el % de inhibición es la falta de fiabilidad cuantitativa en un intervalo de concentración elevada de 90% o más.

El método de la presente invención, que utiliza la acción de desensibilización de células y forskolina puede estar indicado por el aumento en la cantidad de luminiscencia con respecto a un individuo normal. Por lo tanto, el límite superior no está definido, y la presencia o ausencia del anticuerpo de bloqueo puede ser detectada con la linealidad, incluso en un intervalo de concentración elevada.

11. Comparación de la sensibilidad con kit existentes que utilizan un patrón de anticuerpo estimulador

Se descongeló 1 ml ( $3 \times 10^6$  células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 en un baño caliente y se suspendió en 10 ml de un tampón de muestra. Después de centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, se añadieron 10 ml de un tampón de muestra al precipitado obtenido, y a esto se le añadieron 7,5  $\mu\text{l}$  de ViviRen 4 mM. La mezcla se sembró a una concentración de 90  $\mu\text{l/pocillo}$  en una placa de 96 pocillos. Se diluyó MRC Research Standard B 1966 (NIBSC 65/122) con suero de un individuo normal para preparar una serie de concentración. Se añadieron 150  $\mu\text{l}$  de PEG6000 30% a 50  $\mu\text{l}$  de cada muestra de control en la serie preparada, y las mezclas se agitaron y luego se dejaron en reposo a 4°C durante 5 min. Después de la centrifugación a 3000 rpm a 4°C durante 20 min, los precipitados obtenidos se disolvieron por separado en 50  $\mu\text{l}$  de un tampón de muestra para preparar soluciones de muestra. Después del cultivo a 37°C durante 3 h en una atmósfera de  $\text{CO}_2$ , las soluciones de muestra se añadieron

a esto por separado a una concentración de 10  $\mu$ l/pocillo, y las células se cultivaron durante 30 min. A esto se le añadió disolución de detección de  $\text{CaCl}_2$  9 mM a una concentración de 50  $\mu$ l/pocillo, y se midió la cantidad de luminiscencia utilizando un luminómetro.

También se muestran los valores medidos por separado utilizando el kit YAMASA existente utilizando la glándula tiroidea porcina. El kit YAMASA existente dio como resultado 200 TSAB% a 0,94 mU LAST/ml y no pudo detectar concentraciones por debajo del umbral de sensibilidad. Por el contrario, se confirmó que el método de la presente invención era capaz de detectar el anticuerpo estimulador con 2018 TSAB% a 0,94 mU LAST/ml y con 242 TSAB% incluso a 0,06 mU LAST/ml y era capaz de detectar el anticuerpo estimulador con una gran sensibilidad que es aproximadamente 16 veces mayor que la de el kit existente (véase la Figura 11).

12. Estudio sobre el cambio dependiente del tiempo en la luminiscencia utilizando el kit que emplea células congeladas

Se descongeló 1 ml ( $3 \times 10^6$  células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 en un baño caliente y se suspendió en 10 ml de un tampón de muestra ( $\text{NaCl}$  130 mM,  $\text{KCl}$  5 mM, HEPES 20 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM,  $\text{NaHCO}_3$  4,8 mM, PEG6000 al 5%, pH 7,4). Después de la centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, se añadieron 10 ml de un tampón de muestra al precipitado obtenido, y se añadieron a esto 7,5  $\mu$ l de ViviRen 4 mM (Promega Corp.). La mezcla se sembró a una concentración de 90  $\mu$ l/pocillo en una placa de 96 pocillos. Después del cultivo a 37°C durante 3 h en una atmósfera de  $\text{CO}_2$ , se añadieron por separado las muestras H (valor elevado), M (valor medio), y L (valor bajo) purificadas con PEG6000 al 30% ( $n = 6$ ) a una concentración de 10  $\mu$ l/pocillo. Después de cultivar durante 30 minutos, se añadió a esto una disolución de  $\text{CaCl}_2$  9 mM a una concentración de 50  $\mu$ l/pocillo y se agitó durante 3 s. A continuación, se midió la cantidad de luminiscencia a lo largo del tiempo durante 13 s utilizando un luminómetro. Como resultado, como se muestra en la Figura 12, se observó una luminiscencia relativamente estable tan pronto como se añadió la disolución de  $\text{CaCl}_2$ .

13. Estudio sobre la fiabilidad cuantitativa del anticuerpo de bloqueo de la estimulación tiroidea (TSBAb)

(1) Método para la detección de anticuerpo de bloqueo de la estimulación tiroidea (TSBAb) utilizando la inhibición competitiva contra bTSH

Se descongeló 1 ml ( $3 \times 10^6$  células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 en un baño caliente y se suspendió en 10 ml de un tampón de muestra ( $\text{NaCl}$  130 mM,  $\text{KCl}$  5 mM, HEPES 20 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM,  $\text{NaHCO}_3$  4,8 mM, PEG6000 al 5%, pH 7,4). Después de la centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, se añadieron 10 ml de un tampón de muestra al precipitado obtenido, y a esto se le añadieron 7,5  $\mu$ l de ViviRen 4 mM (Promega Corp.). Después del cultivo a 37°C durante 3 h en una atmósfera de  $\text{CO}_2$ , se mezclaron 90  $\mu$ l de la disolución de células con 10  $\mu$ l de cada muestra en una serie de diluciones de un anticuerpo de bloqueo derivado de un paciente con hipotiroidismo purificado con PEG6000 al 30%, y se cultivaron durante 30 min. A continuación, se añadió a esto una disolución de  $\text{CaCl}_2$  9 mM a una concentración de 50  $\mu$ l/pocillo y se midió la cantidad de luminiscencia utilizando un luminómetro. Como se muestra en la Figura 13, el anticuerpo de bloqueo de la estimulación tiroidea (TSBAb) se detectó cuantitativamente utilizando esta célula congelada.

(2) Dependencia de la concentración del método para detectar anticuerpo de bloqueo de la estimulación tiroidea (TSBAb) utilizando la desensibilización celular

Se descongeló 1 ml ( $3 \times 10^6$  células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 en un baño caliente y se suspendió en 10 ml de un tampón de muestra ( $\text{CaCl}_2$  3 mM,  $\text{NaCl}$  130 mM,  $\text{KCl}$  5 mM, HEPES 20 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM,  $\text{NaHCO}_3$  4,9 mM, PEG6000 al 5%, pH 7,4). Después de la centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, se añadieron 10 ml de un tampón de muestra al precipitado obtenido, y a esto se le añadieron 7,5  $\mu$ l de ViviRen 4 mM (Promega Corp.). La mezcla se sembró a una concentración de 90  $\mu$ l/pocillo en una placa de 96 pocillos. Cada muestra de una serie de diluciones de anticuerpo de bloqueo derivado de un paciente con hipotiroidismo purificado con PEG6000 al 30% se añadió a esto a una concentración de 10  $\mu$ l/pocillo, y, adicionalmente, se añadió a esto una disolución de bTSH (concentración final: 100  $\mu$ l/ml) a una concentración de 10  $\mu$ l/pocillo. Después del cultivo a 37°C durante 30 min en una atmósfera de  $\text{CO}_2$ , se añadió a esto una disolución de forskolina  $10^{-4}$  M a una concentración de 50  $\mu$ l/pocillo, y se midió la cantidad de luminiscencia utilizando un luminómetro.

Como se muestra en la Figura 14, se detectó el anticuerpo de bloqueo de la estimulación tiroidea (TSBAb) de una manera dependiente de la concentración utilizando esta célula congelada.

14. Estudio sobre la duración de la acción (tiempo de incubación) del anticuerpo estimulador de la tiroidea (TSAb) o del anticuerpo de bloqueo de la estimulación tiroidea (TSBAb)

(1) Método para la detección de anticuerpo estimulador (TSAb)

Se descongeló 1 ml ( $3 \times 10^6$  células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 en un baño caliente y se suspendió en 10 ml de un tampón de muestra ( $\text{NaCl}$  130 mM,  $\text{KCl}$  5 mM, HEPES 20 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM,  $\text{NaHCO}_3$  4,8 mM, PEG6000 al 5%, pH 7,4). Después de la centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, se

añadieron 10 ml de un tampón de muestra al precipitado obtenido, y a esto se le añadieron 7,5 µl de ViviRen 4 mM (Promega Corp.).

La mezcla se sembró a una concentración de 90 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos. Se añadieron por separado a esto muestras de suero de individuos con valor elevado (H), valor medio (M), valor bajo (L), y normal (N) purificadas con PEG6000 al 30% a una concentración de 10 µl/pocillo. Después del cultivo durante 30 minutos a 1,5 h, se añadió a esto una disolución de CaCl<sub>2</sub> 9 mM a una concentración de 50 µl/pocillo, y se midió la cantidad de luminiscencia utilizando un luminómetro.

Como se muestra en la Figura 15, la cantidad de luminiscencia alcanzó una meseta después de 30 min a 1-h de duración de la acción del anticuerpo estimulador (TSAb) sobre la célula de acuerdo con la presente invención.

(2) Estudio sobre la duración de la acción en el método para la detección del anticuerpo de bloqueo de la estimulación tiroidea (TSBAb) utilizando la inhibición competitiva contra bTSH

Se descongeló 1 ml ( $3 \times 10^6$  células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 en un baño caliente y se suspendió en 10 ml de un tampón de muestra (NaCl 130 mM, KCl 5 mM, HEPES 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 4,8 mM, PEG6000 al 5%, pH 7,4). Después de la centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, se añadieron 10 ml de un tampón de muestra al precipitado obtenido, y a esto se le añadieron 7,5 µl de ViviRen 4 mM (Promega Corp.). La mezcla se sembró a una concentración de 90 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos, y las células se cultivaron durante 3 h. Una muestra de suero derivado de un paciente con hipotiroidismo y una muestra de suero de un individuo normal purificadas con PEG6000 al 30% se añadieron por separado a esto a una concentración de 10 µl/pocillo, y, además, se añadió a esto una disolución de bTSH (concentración final: 10 µU/ml) a una concentración de 10 µl/pocillo. Después de cultivar durante 10 minutos a 2 horas, se añadió a esto una disolución de CaCl<sub>2</sub> 9 mM a una concentración de 50 µl/pocillo, y la cantidad de luminiscencia se midió utilizando un luminómetro.

Como se muestra en la Figura 16, la cantidad de luminiscencia alcanzó una meseta después de una duración de 30 min de acción de bTSH (que compite con el anticuerpo de bloqueo (TSBAb)) sobre la célula de acuerdo con la presente invención.

(3) Método para la detección de anticuerpo de bloqueo de la estimulación de la tiroides (TSBAb) utilizando la desensibilización de células

Se descongeló 1 ml ( $3 \times 10^6$  células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 en un baño caliente y se suspendió en 10 ml de un medio independiente de CO<sub>2</sub> (Núm. Cat 18045, Invitrogen Corp.). Después de una centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, se añadieron 10 ml de un medio independiente de CO<sub>2</sub> al precipitado obtenido, y se añadieron a esto 7,5 µl de ViviRen 4 mM (Promega Corp.). La mezcla se sembró a una concentración de 90 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos, y las células se cultivaron durante 3 h. Se añadieron por separado a esto una muestra de suero derivado de un paciente con hipotiroidismo y una muestra de suero de un individuo normal purificadas con PEG6000 al 30% a una concentración de 10 µl/pocillo, y, además, se añadió a esto una disolución bTSH (concentración final: 100 µU/ml) a una concentración de 10 µl/pocillo. Después de cultivar durante 10 min a 2 h, se añadió a esto una disolución de forskolina  $10^{-4}$  M a una concentración de 50 µl/pocillo, y se midió la cantidad de luminiscencia utilizando un luminómetro.

Como se muestra en la Figura 17, la cantidad de luminiscencia alcanzó una meseta después de una duración de 10 min de acción de bTSH (que compite con el anticuerpo de bloqueo (TSBAb)) sobre la célula de acuerdo con la presente invención.

#### 15. Análisis que utiliza diversas muestras de pacientes con enfermedades de la tiroides

Se utilizaron las células congeladas preparadas en 1 y un kit de diagnóstico para la enfermedad de Graves proporcionado por la presente invención que contenía un medio para el cultivo celular, una disolución de lavado de células, ViviRen, una disolución de calcio, un anticuerpo anti-hTSH de cabra, un suero de control y una placa de 96 pocillos descrita más abajo para estudiar la actividad de TSAb en suero en diferentes grupos de pacientes con enfermedades de la tiroides. Específicamente, se utilizaron los sueros de 198 pacientes con enfermedad de Graves no tratada, 18 pacientes con hipotiroidismo, 48 individuos normales, 2 casos de enfermedad de Plummer, 6 casos de tiroiditis postparto, 22 casos de tiroiditis indolora y 22 casos de tiroiditis subaguda, todos los cuales habían sido clínicamente y definitivamente diagnosticados, (véase la Tabla 2). Se añadieron 150 µl de PEG6000 al 30% a 50 µl del suero de cada paciente, y las mezclas se agitaron y a continuación se dejaron reposar a 4°C durante 5 min. Después de una centrifugación a 3000 rpm a 4°C durante 20 min, los precipitados obtenidos se disolvieron por separado en 400 µl de un medio para el cultivo de células (PEG6000 al 5%, medio independiente de CO<sub>2</sub> (cloruro de calcio, D-pantotenato de calcio, L-glutamina, libre de rojo fenol, Invitrogen Corp.)) para preparar soluciones de las muestras. Las soluciones de las muestras se añadieron por separado (n = 2) a una concentración de 10 µl/pocillo a una placa de 96 pocillos. Se descongeló 1 ml ( $3 \times 10^6$  células/ml) de las células congeladas en un baño caliente y se suspendió en 10 ml de una disolución de lavado celular (medio independiente de CO<sub>2</sub>). Tras la centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, se añadieron 12 ml de un medio para el cultivo de células al precipitado obtenido para preparar una disolución celular. Se añadieron 7,5 µl de ViviRen 4 mM a la disolución celular, y la mezcla se sembró a una concentración de 90 µL/pocillo en una placa de 96 pocillos. Después de cultivar durante 4 h, se le añadió a esto una disolución de calcio 3 mM a una concentración de 100 µl/pocillo, y se midió la cantidad de luminiscencia utilizando

un luminómetro. Entre los pacientes con hipotiroidismo, hay un paciente que tiene un valor elevado de hTSH en suero. De este modo, para neutralizar la acción de hTSH, se añadieron 1,2 µl de un anticuerpo policlonal anti-hTSH de cabra (Meridian Life Science, Inc.) al medio para el cultivo celular, y se realizó un análisis en estas condiciones. Se calculó un valor medido para cada paciente basándose en una curva de calibración de un punto obtenida definiendo, como 1800, el valor medido de un suero de control que contenía NIBSC 65/122 diluido (1,874 mU LAST/ml) con un suero de un individuo normal. Por otra parte, se analizaron los sueros de los mismos pacientes que antes utilizando el kit existente (kit TSAb, YAMASA CORP.) de acuerdo con las instrucciones incluidas en el kit. Se ajustó un valor de corte de TSAb a partir de los valores de TSAb del suero de individuos normales. La distribución de la frecuencia de los valores de TSAb en suero de 48 individuos normales se muestra en la Figura 20. La media de los valores en los individuos normales fue de  $124 \pm 34$ , mostrando una distribución normal. El valor de corte se ajustó a la media + 3DT = 180.

El valor de TSAb de cada enfermedad de tiroides se muestra en la Figura 21. 195 de los 198 pacientes con enfermedad de Graves no tratados resultaron positivos (98%). 3 casos de hipotiroidismo resultaron positivos, y cada uno de los casos de tiroiditis indolora y tiroiditis postparto resultaron positivos. En la tabla 3, se estudió una razón positiva de enfermedad de Graves utilizando 198 pacientes con enfermedad de Graves no tratada en el kit existente y el kit de la presente invención. La razón de verdaderos positivos del kit existente fue 68%, y la del kit proporcionado por la presente invención fue 98%, demostrando que el kit de la presente invención era bastante superior en sensibilidad para la detección de la enfermedad de Graves al kit existente.

[Tabla 2]

Enfermedad	n	Kit existente			Kit proporcionado por la presente invención		
		Positivo	Negativo	Razón de verdaderos positivos	Positivo	Negativo	Razón de verdaderos positivos
Enfermedad de Graves no tratada (EG)	198	134	64	68	195	3	98
Hipotiroidismo (Hipo)	18	3	15		3	15	
Individuo normal (Normal)	48	0	48		0	48	
Enfermedad de Plummer (PL)	2	0	2		0	2	
Tiroiditis postparto (PPT)	6	0	6		1	5	
Tiroiditis indolora (PT)	22	0	22		1	21	
Tiroiditis subaguda (SAT)	22	0	22		0	22	

[Tabla 3]

		Diagnóstico clínico-definido				Diagnóstico clínico-definido			
		Positivo	Negativo	Total		Positivo	Negativo	Total	
Kit existente (TSAb porcino)	Positivo	134	3	137	Kit proporcionado por la presente invención	Positivo	195	5	200
	Negativo	64	115	179		Negativo	3	113	116
	Total	198	118	316		Total	198	118	316
Razón de verdaderos positivos	68%			Razón de verdaderos positivos	98%				
Razón de verdaderos negativos	97%			Razón de verdaderos negativos	96%				
Tasa de Concordancia	79%			Tasa de concordancia	97%				

**Aplicabilidad Industrial**

La presente invención puede proporcionar un método y un kit para la determinación de un anticuerpo del receptor de TSH, que son fáciles de manipular y son seguros. De ese modo, se pueden diagnosticar enfermedades de la tiroides.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.  
 <120> Un método de análisis biológico y un kit para la medición de un anticuerpo contra el receptor de TSH y una célula recombinante novedosa para ello  
 <130> 669763  
 <150> JP 2009-155183  
 <151> 2009-06-30  
 10 <160> 7  
 <170> PatentIn versión 3. 2  
 <210> 1  
 <211> 764  
 <212> PRT  
 15 <213> Humana  
 <400> 1

```

Met Arg Pro Ala Asp Leu Leu Gln Leu Val Leu Leu Leu Asp Leu Pro
1                               5                               10                               15

Arg Asp Leu Gly Gly Met Gly Cys Ser Ser Pro Pro Cys Glu Cys His
                               20                               25                               30

Gln Glu Glu Asp Phe Arg Val Thr Cys Lys Asp Ile Gln Arg Ile Pro
                               35                               40                               45

Ser Leu Pro Pro Ser Thr Gln Thr Leu Lys Leu Ile Glu Thr His Leu
                               50                               55                               60

Arg Thr Ile Pro Ser His Ala Phe Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg
65                               70                               75                               80

Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu Ser His Ser
                               85                               90                               95

Phe Tyr Asn Leu Ser Lys Val Thr His Ile Glu Ile Arg Asn Thr Arg
                               100                              105                              110

Asn Leu Thr Tyr Ile Asp Pro Asp Ala Leu Lys Glu Leu Pro Leu Leu
                               115                              120                              125

Lys Phe Leu Gly Ile Phe Asn Thr Gly Leu Lys Met Phe Pro Asp Leu
130                               135                               140

Thr Lys Val Tyr Ser Thr Asp Ile Phe Phe Ile Leu Glu Ile Thr Asp
145                               150                               155                               160

Asn Pro Tyr Met Thr Ser Ile Pro Val Asn Ala Phe Gln Gly Leu Cys

```



ES 2 534 330 T3

165						170						175											
Asn	Glu	Thr	Leu	Thr	Leu	Lys	Leu	Tyr	Asn	Asn	Gly	Phe	Thr	Ser	Val								
180						185						190											
Gln	Gly	Tyr	Ala	Phe	Asn	Gly	Thr	Lys	Leu	Asp	Ala	Val	Tyr	Leu	Asn								
195						200						205											
Lys	Asn	Lys	Tyr	Leu	Thr	Val	Ile	Asp	Lys	Asp	Ala	Phe	Gly	Gly	Val								
210						215						220											
Tyr	Ser	Gly	Pro	Ser	Leu	Leu	Asp	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Val	Thr	Ala								
225						230						235						240					
Leu	Pro	Ser	Lys	Gly	Leu	Glu	His	Leu	Lys	Glu	Leu	Ile	Ala	Arg	Asn								
245						250						255											
Thr	Trp	Thr	Leu	Lys	Lys	Leu	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Phe	Leu	His	Leu								
260						265						270											
Thr	Arg	Ala	Asp	Leu	Ser	Tyr	Pro	Ser	His	Cys	Cys	Ala	Phe	Lys	Asn								
275						280						285											
Gln	Lys	Lys	Ile	Arg	Gly	Ile	Leu	Glu	Ser	Leu	Met	Cys	Asn	Glu	Ser								
290						295						300											
Ser	Met	Gln	Ser	Leu	Arg	Gln	Arg	Lys	Ser	Val	Asn	Ala	Leu	Asn	Ser								
305						310						315						320					
Pro	Leu	His	Gln	Glu	Tyr	Glu	Glu	Asn	Leu	Gly	Asp	Ser	Ile	Val	Gly								
325						330						335											
Tyr	Lys	Glu	Lys	Ser	Lys	Phe	Gln	Asp	Thr	His	Asn	Asn	Ala	His	Tyr								
340						345						350											
Tyr	Val	Phe	Phe	Glu	Glu	Gln	Glu	Asp	Glu	Ile	Ile	Gly	Phe	Gly	Gln								
355						360						365											
Glu	Leu	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Glu	Thr	Leu	Gln	Ala	Phe	Asp	Ser	His								
370						375						380											
Tyr	Asp	Tyr	Thr	Ile	Cys	Gly	Asp	Ser	Glu	Asp	Met	Val	Cys	Thr	Pro								
385						390						395						400					
Lys	Ser	Asp	Glu	Phe	Asn	Pro	Cys	Glu	Asp	Ile	Met	Gly	Tyr	Lys	Phe								
405						410						415											
Leu	Arg	Ile	Val	Val	Trp	Phe	Val	Ser	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Gly	Asn								
420						425						430											

ES 2 534 330 T3

Val Phe Val Leu Leu Ile Leu Leu Thr Ser His Tyr Lys Leu Asn Val  
 435 440 445

Pro Arg Phe Leu Met Cys Asn Leu Ala Phe Ala Asp Phe Cys Met Gly  
 450 455 460

Met Tyr Leu Leu Leu Ile Ala Ser Val Asp Leu Tyr Thr His Ser Glu  
 465 470 475 480

Tyr Tyr Asn His Ala Ile Asp Trp Gln Thr Gly Pro Gly Cys Asn Thr  
 485 490 495

Ala Gly Phe Phe Thr Val Phe Ala Ser Glu Leu Ser Val Tyr Thr Leu  
 500 505 510

Thr Val Ile Thr Leu Glu Arg Trp Tyr Ala Ile Thr Phe Ala Met Arg  
 515 520 525

Leu Asp Arg Lys Ile Arg Leu Arg His Ala Cys Ala Ile Met Val Gly  
 530 535 540

Gly Trp Val Cys Cys Phe Leu Leu Ala Leu Leu Pro Leu Val Gly Ile  
 545 550 555 560

Ser Ser Tyr Ala Lys Val Ser Ile Cys Leu Pro Met Asp Thr Glu Thr  
 565 570 575

Pro Leu Ala Leu Ala Tyr Ile Val Phe Val Leu Thr Leu Asn Ile Val  
 580 585 590

Ala Phe Val Ile Val Cys Cys Cys Tyr Val Lys Ile Tyr Ile Thr Val  
 595 600 605

Arg Asn Pro Gln Tyr Asn Pro Gly Asp Lys Asp Thr Lys Ile Ala Lys  
 610 615 620

Arg Met Ala Val Leu Ile Phe Thr Asp Phe Ile Cys Met Ala Pro Ile  
 625 630 635 640

Ser Phe Tyr Ala Leu Ser Ala Ile Leu Asn Lys Pro Leu Ile Thr Val  
 645 650 655

Ser Asn Ser Lys Ile Leu Leu Val Leu Phe Tyr Pro Leu Asn Ser Cys  
 660 665 670

Ala Asn Pro Phe Leu Tyr Ala Ile Phe Thr Lys Ala Phe Gln Arg Asp  
 675 680 685

ES 2 534 330 T3

Val Phe Ile Leu Leu Ser Lys Phe Gly Ile Cys Lys Arg Gln Ala Gln  
690 695 700

Ala Tyr Arg Gly Gln Arg Val Pro Pro Lys Asn Ser Thr Asp Ile Gln  
705 710 715 720

Val Gln Lys Val Thr His Glu Met Arg Gln Gly Leu His Asn Met Glu  
725 730 735

Asp Val Tyr Glu Leu Ile Glu Asn Ser His Leu Thr Pro Lys Lys Gln  
740 745 750

Gly Gln Ile Ser Glu Glu Tyr Met Gln Thr Val Leu  
755 760

<210> 2

<211> 664

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> CNG alfa2 modificado

<400> 2

Met Met Thr Glu Lys Ser Asn Gly Val Lys Ser Ser Pro Ala Asn Asn  
1 5 10 15

His Asn His His Pro Pro Pro Ser Ile Lys Ala Asn Gly Lys Asp Asp  
20 25 30

His Arg Ala Gly Ser Arg Pro Gln Ser Val Ala Ala Asp Asp Asp Thr  
35 40 45

Ser Ser Glu Leu Gln Arg Leu Ala Glu Met Asp Thr Pro Arg Arg Gly  
50 55 60

Arg Gly Gly Phe Arg Arg Ile Val Arg Leu Val Gly Ile Ile Arg Asp  
65 70 75 80

Trp Ala Asn Lys Asn Phe Arg Glu Glu Glu Pro Arg Pro Asp Ser Phe  
85 90 95

Leu Glu Arg Phe Arg Gly Pro Glu Leu Gln Thr Val Thr Thr His Gln  
100 105 110

Gly Asp Gly Lys Gly Asp Lys Asp Gly Glu Gly Lys Gly Thr Lys Lys  
115 120 125

Lys Phe Glu Leu Phe Val Leu Asp Pro Ala Gly Asp Trp Tyr Tyr Arg  
130 135 140

10

ES 2 534 330 T3

Trp Leu Phe Val Ile Ala Met Pro Val Leu Tyr Asn Trp Cys Leu Leu  
 145 150 155 160

Val Ala Arg Ala Cys Phe Ser Asp Leu Gln Arg Asn Tyr Phe Val Val  
 165 170 175

Trp Leu Val Leu Asp Tyr Phe Ser Asp Thr Val Tyr Ile Ala Asp Leu  
 180 185 190

Ile Ile Arg Leu Arg Thr Gly Phe Leu Glu Gln Gly Leu Leu Val Lys  
 195 200 205

Asp Pro Lys Lys Leu Arg Asp Asn Tyr Ile His Thr Leu Gln Phe Lys  
 210 215 220

Leu Asp Val Ala Ser Ile Ile Pro Thr Asp Leu Ile Tyr Phe Ala Val  
 225 230 235 240

Gly Ile His Ser Pro Glu Val Arg Phe Asn Arg Leu Leu His Phe Ala  
 245 250 255

Arg Met Phe Glu Phe Phe Asp Arg Thr Glu Thr Arg Thr Ser Tyr Pro  
 260 265 270

Asn Ile Phe Arg Ile Ser Asn Leu Val Leu Tyr Ile Leu Val Ile Ile  
 275 280 285

His Trp Asn Ala Cys Ile Tyr Tyr Ala Ile Ser Lys Ser Ile Gly Phe  
 290 295 300

Gly Val Asp Thr Trp Val Tyr Pro Asn Ile Thr Asp Pro Glu Tyr Gly  
 305 310 315 320

Tyr Leu Ala Arg Glu Tyr Ile Tyr Cys Leu Tyr Trp Ser Thr Leu Thr  
 325 330 335

Leu Thr Thr Ile Gly Glu Thr Pro Pro Pro Val Lys Asp Glu Glu Tyr  
 340 345 350

Leu Phe Val Ile Phe Asp Phe Leu Ile Gly Val Leu Ile Phe Ala Thr  
 355 360 365

Ile Val Gly Asn Val Gly Ser Met Ile Ser Asn Met Asn Ala Thr Arg  
 370 375 380

Ala Glu Phe Gln Ala Lys Ile Asp Ala Val Lys His Tyr Met Gln Phe  
 385 390 395 400

ES 2 534 330 T3

Arg Lys Val Ser Lys Asp Met Glu Ala Lys Val Ile Lys Trp Phe Asp  
 405 410 415

Tyr Leu Trp Thr Asn Lys Lys Thr Val Asp Glu Arg Glu Val Leu Lys  
 420 425 430

Asn Leu Pro Ala Lys Leu Arg Ala Glu Ile Ala Ile Asn Val His Leu  
 435 440 445

Ser Thr Leu Lys Lys Val Arg Ile Phe Gln Asp Trp Glu Ala Gly Leu  
 450 455 460

Leu Val Glu Leu Val Leu Lys Leu Arg Pro Gln Val Phe Ser Pro Gly  
 465 470 475 480

Asp Tyr Ile Cys Arg Lys Gly Asp Ile Gly Lys Glu Met Tyr Ile Ile  
 485 490 495

Lys Glu Gly Lys Leu Ala Val Val Ala Asp Asp Gly Val Thr Gln Tyr  
 500 505 510

Ala Leu Leu Ser Ala Gly Ser Cys Phe Gly Glu Ile Ser Ile Leu Asn  
 515 520 525

Ile Lys Gly Ser Lys Met Gly Asn Arg Arg Thr Ala Asn Ile Arg Ser  
 530 535 540

Leu Gly Tyr Ser Asp Leu Phe Cys Leu Ser Lys Asp Asp Leu Met Glu  
 545 550 555 560

Ala Val Thr Glu Tyr Pro Asp Ala Lys Lys Val Leu Glu Glu Arg Gly  
 565 570 575

Arg Glu Ile Leu Met Lys Met Gly Leu Leu Asp Glu Asn Glu Val Ala  
 580 585 590

Ala Ser Met Glu Val Asp Val Gln Glu Lys Leu Glu Gln Leu Glu Thr  
 595 600 605

Asn Met Glu Thr Leu Tyr Thr Arg Phe Ala Arg Leu Leu Ala Glu Tyr  
 610 615 620

Thr Gly Ala Gln Gln Lys Leu Lys Gln Arg Ile Thr Val Leu Glu Thr  
 625 630 635 640

Lys Met Lys Gln Asn His Glu Asp Asp Tyr Leu Ser Asp Gly Ile Asn  
 645 650 655

Thr Pro Glu Pro Ala Val Ala Glu  
 660

<210> 3

5 <211> 228

<212> PRT <213> Artificial

<220>

<223> aequorina modificada

ES 2 534 330 T3

<400> 3

Met Ser Val Leu Thr Pro Leu Leu Leu Arg Gly Leu Thr Gly Ser Ala  
1 5 10 15

Arg Arg Leu Pro Val Pro Arg Ala Lys Ile His Ser Leu Pro Pro Glu  
20 25 30

Gly Lys Leu Gly Ile Met Lys Val Lys Leu Thr Ser Asp Phe Asp Asn  
35 40 45

Pro Lys Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val  
50 55 60

Asn His Asn Gly Arg Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser  
65 70 75 80

Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg  
85 90 95

His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly Met Lys Tyr  
100 105 110

Gly Val Glu Thr Glu Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg Leu  
115 120 125

Ala Thr Glu Glu Leu Glu Arg Tyr Ser Lys Asn Gln Ile Thr Leu Ile  
130 135 140

Arg Leu Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Gln Asn  
145 150 155 160

Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ser Ala Gly  
165 170 175

Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp  
180 185 190

Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His  
195 200 205

Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly  
210 215 220

Gly Ala Val Pro  
225

- 5  
<210> 4  
<211> 1995  
<212> ADN  
<213> Mus musculus  
<400> 4

ES 2 534 330 T3

atgatgaccg aaaaatccaa cgggtggaag agctctccag ctaataacca taaccatcat 60  
cctcctcctt ctatcaaggc caatggcaaa gatgaccaca gggcaggtag cagaccacag 120  
tctgtggcag ctgatgatga cacttctca gaactgcaaa ggttggcaga gatggatact 180  
ccacgcaggg gaaggggtgg cttccgaagg attgtccgcc tgggtgggat catcagagac 240  
tgggccaaaca aaaatctccg tgaggaggaa ccaagacctg actccttctt agagcgtttc 300  
cgtgggcctg agctccagac tgtgacaacc catcaggggg atggcaaagg cgacaaggac 360  
ggcgagggaa agggcaccaa aaagaaattt gaactgtttg ttttgaccc agctggagac 420  
tggattacc gttggttgtt tgtcattgcc atgcctgttc tttacaactg gtgtctgttg 480  
gtagccagag cctgcttcag tgatctacag agaaactatt ttgtggtatg gctggtgctg 540  
gattacttct cagacactgt ttatattgca gacctcatca ttcggctgcg cacaggcttc 600  
ctagaacaag ggctcctggt caaagacccc aagaaattgc gagacaacta tatccacact 660  
ttgcagttca aattggatgt ggcttctatc atccccactg acctcattta ttttgctgtg 720  
ggtatccaca gccctgaggt acgctttaat cgtctgttac actttgcccg tatgtttgag 780  
ttctttgacc gcactgagac acgtacaagc taccccaaca tcttccgaat cagcaacctg 840  
gtcctctaca tcttggtcat catccactgg aatgcttcta tttactatgc tatctctaag 900  
tccattggct ttggggttga cacctgggtt taccccaaca ttactgacce tgaatatggc 960  
tacctggcta gggagtacat ttactgcctt tactggcca cactgaccct caccaccatt 1020  
ggagagacac caccctctgt aaaggatgag gagtacctat ttgtcatctt tgacttctctg 1080  
attggtgtcc tcatctttgc cactattgtg ggaaatgtgg gctccatgat ctccaacatg 1140  
aatgccacac gagcagagtt ccaggccaag attgatgctg tcaaacta catgcagttc 1200  
cgaaaggta gtaaagacat ggaagccaag gtcatcaaat ggtttgacta cttgtggacc 1260  
aataagaaga cagtagatga acgagaagtc ctaaagaacc tgctgcaaa gcttagggca 1320  
gagatagcca ttaatgttca tttgtccact ctgaagaaag tgcgcatatt ccaggattgt 1380  
gaagctggcc tgctggtgga actggtactg aagcttcgtc ctcaggctct tagtcctgga 1440  
gattatattt gccgtaaggg ggacattggc aaggaaatgt acatcatcaa ggagggcaaa 1500  
ttggcagtgg tagctgatga tgggtgact cagtatgcct tgctgtcagc tgggagctgc 1560  
tttggtgaga ttagtctcct taacattaag ggtagcaaaa tgggcaatcg gcgcactgcc 1620  
aatatccgta gtctgggcta ctcagatctc ttctgcttgt ccaaggatga tcttatggaa 1680  
gctgtgactg agtatcctga tgccaagaaa gtcctggaag aacgggtag ggagatcctg 1740  
atgaaggaag gtctactgga tgagaatgaa gtggcagcta gtatggaggt agatgttcag 1800  
gagaagctgg agcagctgga gacaaacatg gagacctgt acactcgttt tgcccgcctg 1860  
ctggctgagt aactggagc ccagcagaag ctcaaacagc gcatcacagt gctggagacc 1920  
aagatgaaac agaaccatga ggatgattac ctatcagatg ggataaacac ccctgagcca 1980  
gctgttgctg aatag 1995

ES 2 534 330 T3

<211> 2301  
 <212> ADN  
 <213> Humana  
 <400> 5

5

tggaaaatga	ggccggcgga	cttgctgcag	ctggtgctgc	tgctcgacct	gcccagggac	60
ctgggcgga	tggggtggtc	gtctccaccc	tgcgagtgcc	atcaggagga	ggacttcaga	120
gtcacctgca	aggatattca	acgcatcccc	agcttaccgc	ccagtacgca	gactctgaag	180
cttattgaga	ctcacctgag	aactattcca	agtcatgcat	tttctaactc	gcccaatatt	240
tccagaatct	acgtatctat	agatgtgact	ctgcagcagc	tggaatcaca	ctccttctac	300
aatttgagta	aagtgactca	catagaaatt	cggaatacca	ggaacttaac	ttacatagac	360
cctgatgccc	tcaaagagct	ccccctccta	aagttccttg	gcattttcaa	cactggactt	420
aaaatgttcc	ctgacctgac	caaagtttat	tccactgata	tattctttat	acttgaaatt	480
acagacaacc	cttacatgac	gtcaatccct	gtgaatgctt	ttcagggact	atgcaatgaa	540
accttgacac	tgaagctgta	caacaatggc	tttacttcag	tccaaggata	tgctttcaat	600
gggacaaagc	tggatgctgt	ttacctaaac	aagaataaat	acctgacagt	tattgacaaa	660
gatgcatttg	gaggagtata	cagtggacca	agcttgctgg	acgtgtctca	aaccagtgtc	720
actgcccttc	catccaaagg	cctggagcac	ctgaaggaac	tgatagcaag	aacacactgg	780
actcttaaga	aacttccact	ttccttgagt	ttccttcacc	tcacacgggc	tgacctttct	840
taccaagcc	actgetgtgc	ttttaagaat	cagaagaaaa	tcagaggaat	ccttgagtcc	900
ttgatgtgta	atgagagcag	tatgcagagc	ttgcgccaga	gaaaatctgt	gaatgccttg	960
aatagccccc	tccaccagga	atatgaagag	aatctgggtg	acagcattgt	tgggtacaag	1020
gaaaagtcca	agttccagga	tactcataac	aacgctcatt	attacgtctt	ctttgaagaa	1080
caagaggatg	agatcattgg	ttttggccag	gagctcaaaa	acccccagga	agagactcta	1140
caagcttttg	acagccatta	tgactacacc	atatgtgggg	acagtgaaga	catggtgtgt	1200



ES 2 534 330 T3

accccaagt cccgatgagtt caaccocgtgt gaagacataa tgggctacaa gttcctgaga 1260  
 attgtggtgt ggttcgtag tctgctggct ctccctggga atgtctttgt cctgcttatt 1320  
 ctctcacca gccactacaa actgaacgtc ccccgctttc tcatgtgcaa cctggccttt 1380  
 ggggatttct gcatggggat gtacctgctc ctcatcgcct ctgtagacct ctacactcac 1440  
 tctgagtact acaaccatgc catcgactgg cagacaggcc ctgggtgcaa cacggctggt 1500  
 ttcttactg tctttgcaag cgagttatcg gtgtatacgc tgacggcat caccctggag 1560  
 cgctggtatg ccatcacctt cgccatgcgc ctggaccgga agatccgcct caggcacgca 1620  
 tgtgccatca tgggtggggg ctggggttgc tgettccttc tggccctgct tcctttggtg 1680  
 ggaataagta gctatgccaa agtcagtatc tgccctgccc tggacaccga gaccctctt 1740  
 gctctggcat atattgtttt tgttctgacg ctcaacatag ttgccttcgt catcgtctgc 1800  
 tgctgttatg tgaagatcta catcacagtc cgaaatccgc agtacaacc aggggacaaa 1860  
 gataccaaaa ttgccaagag gatggctgtg ttgatcttca ccgacttcat atgcatggcc 1920  
 ccaatctcat tctatgctct gtcagcaatt ctgaacaagc ctctcatcac tgttagcaac 1980  
 tccaaaatct tgctggtagt cttctatcca cttaactcct gtgccaatcc attcctctat 2040  
 gctattttca ccaaggcctt ccagagggat gtgttcatcc tactcagcaa gtttggcatc 2100  
 tgtaaacgcc aggctcagge ataccggggg cagaggggtc ctccaaagaa cagcactgat 2160  
 attcaggttc aaaaggttac ccacgagatg aggcagggtc tccacaacat ggaagatgtc 2220  
 tatgaactga ttgaaaactc ccatctaacc ccaaagaagc aaggccaaat ctcagaagag 2280  
 tatatgcaaa cggttttgta a 2301

<210> 6  
 <211> 1995  
 5 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> CNG alfa2 modificado  
 <400> 6

10 atgatgaccg aaaaatccaa cgggtgtgaag agctctccag ctaataacca taacctcat 60  
 cctcctcctt ctatcaaggc caatggcaaa gatgaccaca gggcaggtag cagaccacag 120  
 tctgtggcag ctgatgatga cacttctca gaactgcaa ggttggcaga gatggatact 180  
 ccacgcaggg gaaggggtgg cttccgaagg attgtccgcc tgggtggggat catcagagac 240  
 tgggccaaca aaaatctccg tgaggaggaa ccaagacctg actccttct agagcgttct 300  
 cgtgggcctg agctccagac tgtgacaacc catcaggggg atggcaaagg cgacaaggac 360  
 ggcgagggaa agggcaccaa aaagaaattt gaactgtttg ttttggacc agctggagac 420  
 tggattacc gttggttgtt tgtcattgcc atgcctgttc tttacaactg gtgtctgttg 480  
 gtagccagag cctgcttcag tgatctacag agaaactatt ttgtggtatg gctggtgctg 540

ES 2 534 330 T3

gattacttct cagacactgt ttatattgca gacctcatca ttoggctgcg cacaggcttc 600  
ctagaacaag ggctcctggg caaagacccc aagaaattgc gagacaacta tatccacact 660  
ttgcagttca aattggatgt ggcttctatc atccccactg acctcattta ttttgctgtg 720  
ggtatccaca gccctgaggt acgctttaat cgtctgttac actttgcccg tatgtttgag 780  
ttctttgacc gcactgagac acgtacaagc taccccaaca tcttccgaat cagcaacctg 840  
gtcctctaca tcttggatcat catccactgg aatgcttga tttactatgc tatctetaag 900  
tccattggct ttggggttga cacctggggt taccccaaca ttactgacct tgaatatggc 960  
tacctggcta gggagtacat ttactgcctt tactgggtcca cactgaccct caccaccatt 1020  
ggagagacac caccctctgt aaaggatgag gagtacctat ttgtcatctt tgacttctctg 1080  
attggtgtcc tcacttttgc cactattgtg ggaaatgtgg gctccatgat ctccaacatg 1140  
aatgccacac gagcagagtt ccaggccaag attgatgctg tcaaacta catgcagttc 1200  
cgaaaggcca gtaaagacat ggaagccaag gtcacaaat ggtttgacta cttgtggacc 1260  
aataagaaga cagtagatga acgagaagtc ctaaagaacc tgcctgcaa gcttagggca 1320  
gagatagcca ttaatgttca tttgtccact ctgaagaaag tgcgcatatt ccaggattgg 1380  
gaagctggcc tgctgggtga actggtactg aagcttcgtc ctcaggtctt tagtcctgga 1440  
gattatattt gccgtaaggg ggacattggc aaggaaatgt acatcatcaa ggagggcaa 1500  
ttggcagtgg tagctgatga tgggtgtgact cagtatgcct tgctgtcagc tgggagctgc 1560  
tttgggtgaga ttagtacct taacattaag ggtagcaaaa tgggcaatcg gcgcactgcc 1620  
aatatccgta gtctgggcta ctcagatctc ttctgcttgt ccaaggatga tcttatggaa 1680  
gctgtgactg agtatcctga tgccaagaaa gtcctggaag aacggggtag ggagatcctg 1740  
atgaagatgg gtctactgga tgagaatgaa gtggcagcta gtatggaggt agatgttcag 1800  
gagaagctgg agcagctgga gacaaacatg gagaccttgt aactcgttt tgcccgcctg 1860  
ctggctgagt aactggagc ccagcagaag ctcaaacagc gcatcacagt gctggagacc 1920  
aagatgaaac agaaccatga ggatgattac ctatcagatg ggataaacac ccctgagcca 1980  
gctgttgctg aatag 1995

<210> 7  
<211> 687  
5 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> aequorina modificada  
10 <400> 7

atgagcgtgc tgacccccct gctgctgctg ggcctgaccg gcagcgcccg ccgcctgccc 60  
gtgccccgcg ccaagatcca cagcctgccc cccgagggca agctgggcat catgaaggtg 120

# ES 2 534 330 T3

aagctgacca gcgacttoga caaccccaag tggatcggcc gccacaagca catggtcaac	180
ttcctggacg tgaaccacaa cgcccgcatc agcctggacg agatggtgta caaggccagc	240
gacatcgtga tcaacaacct gggcgccacc cccgagcagg ccaagcgcca caaggacgcc	300
gtggaggcct tcttcggcgg cgccggcatg aagtacggcg tggagaccga gtggcccag	360
tacatcgagg gctggaagcg cctggccacc gaggagctgg agcgctacag caagaaccag	420
atcacctga tccgcctgtg gggcgacgcc ctgttcgaca tcatcgaaa ggaccagaac	480
ggcgccatca ccctggacga gtggaaggcc tacaccaaga gcgccggcat catccagagc	540
agcgaggact gcgaggagac cttccgcgtg tgcgacatcg acgagagcgg ccagctggac	600
gtggacgaga tgacccgcca gcacctgggc ttctggtaca ccatggaccc cgctgcgag	660
aagctgtacg gcggcgccgt gcctaa	687

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un kit para el diagnóstico de enfermedades de la tiroides, que comprende una célula que expresa un receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSHR), un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, en donde la proteína sensible al calcio es una proteína que emite luminiscencia en respuesta al calcio.
2. El kit de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un anticuerpo anti-TSH.
- 10 3. El kit de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende adicionalmente ViviRen (R) como sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio.
4. El kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende adicionalmente TSH o un anticuerpo monoclonal TSAb estimulador.
- 15 5. El kit según la reivindicación 4, que comprende adicionalmente forskolina.
6. El kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el TSHR es TSHR que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1, el canal de calcio dependiente de AMPc es un canal de calcio CNG modificado que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 y la proteína sensible al calcio es apoaquorina modificada que tiene la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 3.
- 20 7. El kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la célula se selecciona del grupo que consiste en una célula CHO, una célula HEK293 y una célula 3T3.
- 25 8. Un kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en el diagnóstico de enfermedades de la tiroides.
9. El kit de la reivindicación 8, en donde se determina la cantidad de un anticuerpo estimulador de la tiroides y/o la cantidad de un anticuerpo de bloqueo de la estimulación de la tiroides en una muestra biológica.
- 30 10. El kit según la reivindicación 8 o 9, para el diagnóstico de la enfermedad de Graves y/o la enfermedad de Hashimoto.
- 35 11. Un método para el diagnóstico de enfermedades de la tiroides, para determinar que un ser humano tiene un alto riesgo de desarrollar una enfermedad de la tiroides, o para determinar la eficacia del tratamiento de la enfermedad de la tiroides, que comprende las siguientes etapas (1), (2) y (3) o (1'), (2) y (3):  
 (1) preparar una mezcla que contiene la célula comprendida en el kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio, un medio exento de  $\text{Ca}^{2+}$  o un medio exento de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , TSH y una muestra derivada de la sangre de un sujeto de ensayo; o  
 40 (1') preparar una mezcla que contiene la célula comprendida en el kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio, un medio exento de  $\text{Ca}^{2+}$  o un medio exento de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  y una muestra derivada de la sangre de un sujeto de ensayo;  
 (2) añadir una disolución que contiene  $\text{Ca}^{2+}$  a la mezcla preparada en (1) o (1'); y  
 45 (3) medir la luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida desde la célula.
12. El método según la reivindicación 11, en donde la mezcla preparada en (1') contiene adicionalmente un anticuerpo anti-TSH.
- 50 13. Un método para el diagnóstico del hipotiroidismo, que comprende las siguientes etapas (1) a (3):  
 (1) preparar una mezcla que contiene la célula comprendida en el kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio, un medio que contiene  $\text{Ca}^{2+}$ , TSH o un anticuerpo monoclonal TSAb estimulador y una muestra derivada de la sangre de un sujeto de ensayo;  
 55 (2) añadir forskolina a la mezcla preparada en (1); y  
 (3) cuantificar la luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida desde la célula.
14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en donde la célula no se cultiva en un ambiente estéril.
- 60 15. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en donde el TSHR es TSHR que tiene la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 1, el canal de calcio dependiente de AMPc es un canal de calcio CNG modificado que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, la proteína sensible al calcio es apoaquorina modificada que tiene la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 3 y el sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio es ViviRen (R).

Figura 1

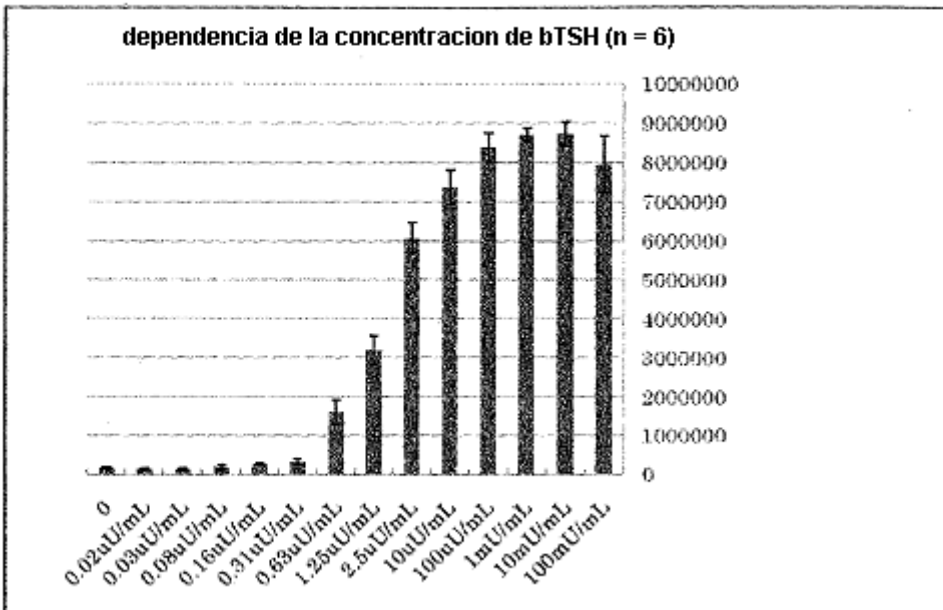


Figura 2

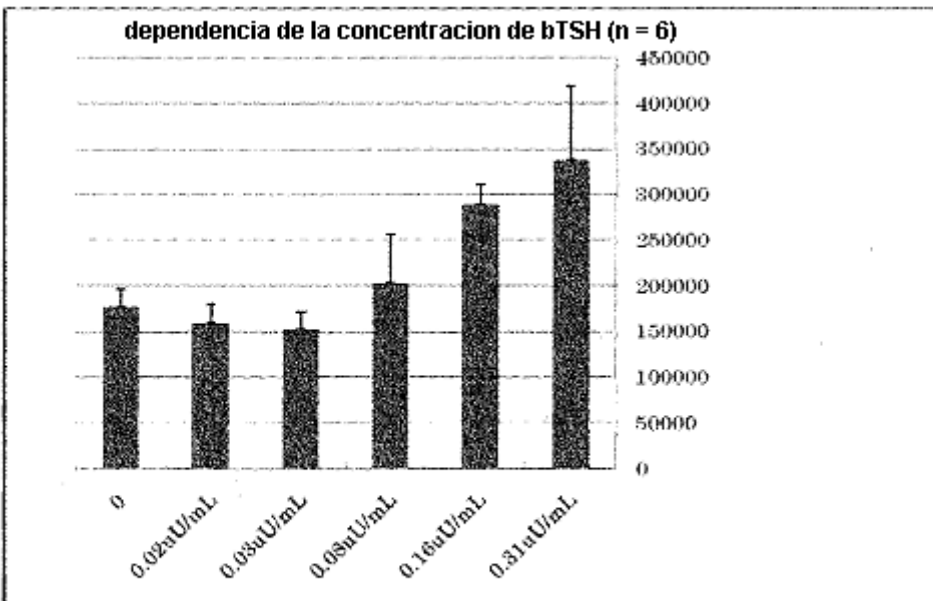


Figura 3

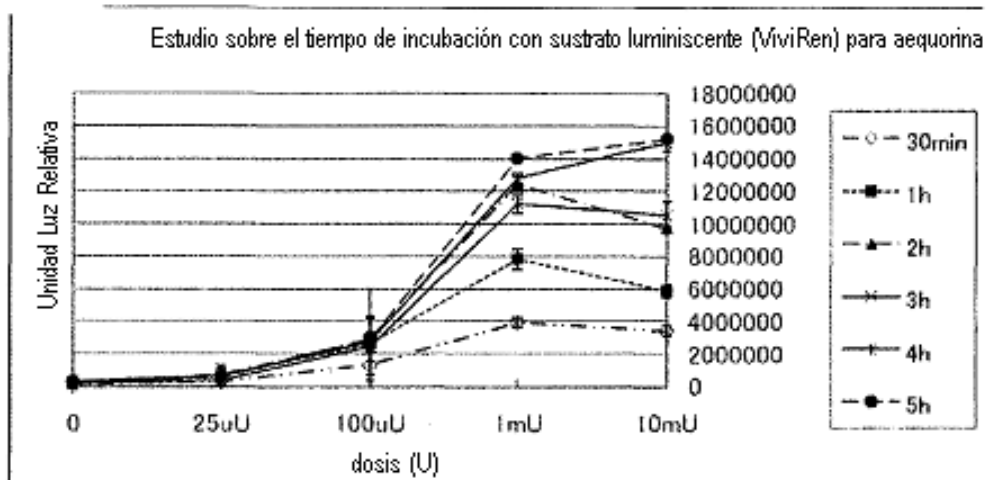


Figura 4

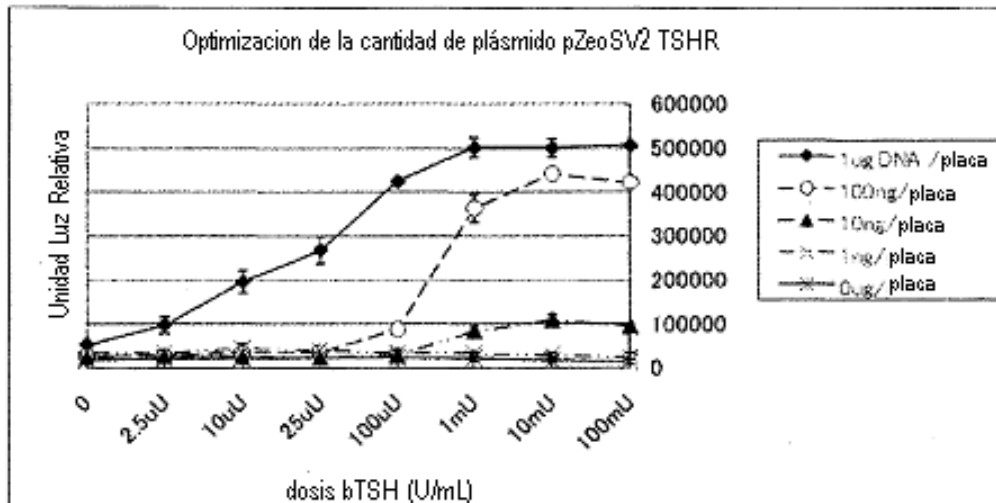


Figura 5

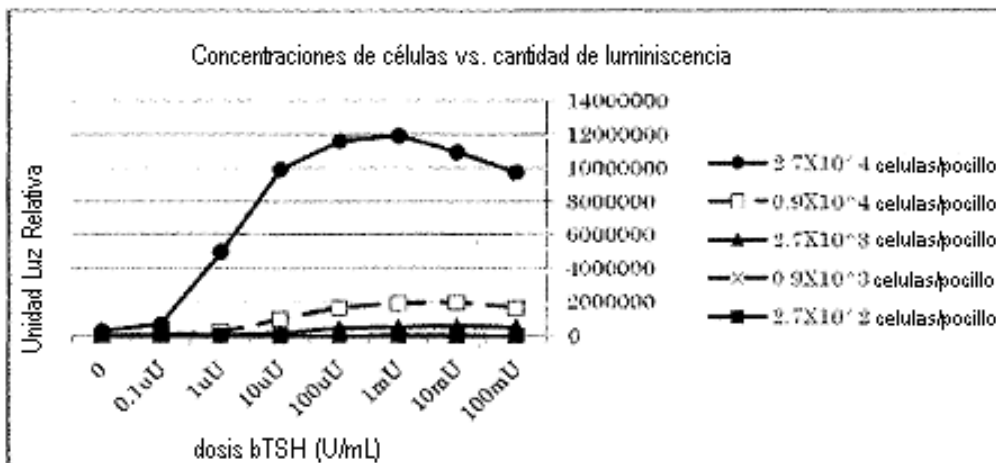


Figura 6

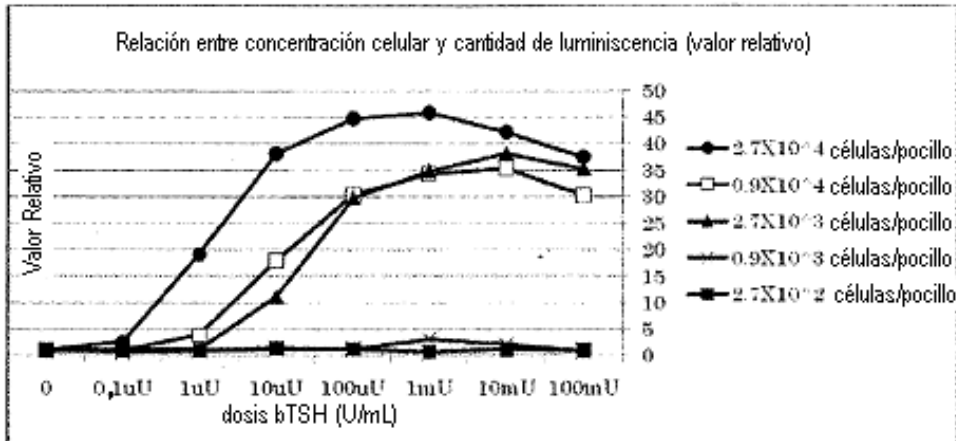


Figura 7

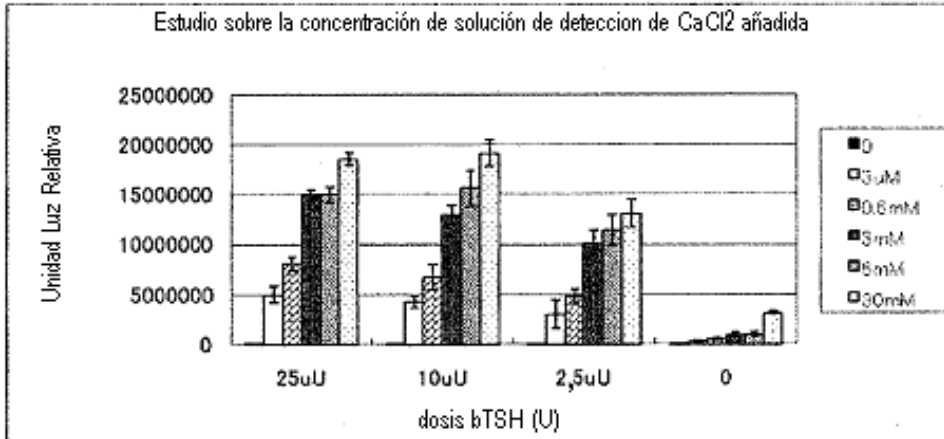


Figura 8

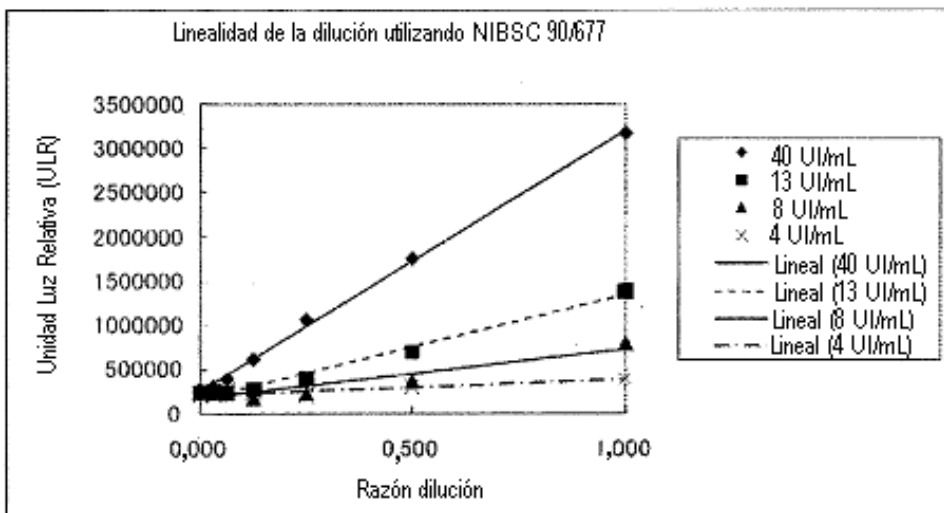


Figura 9

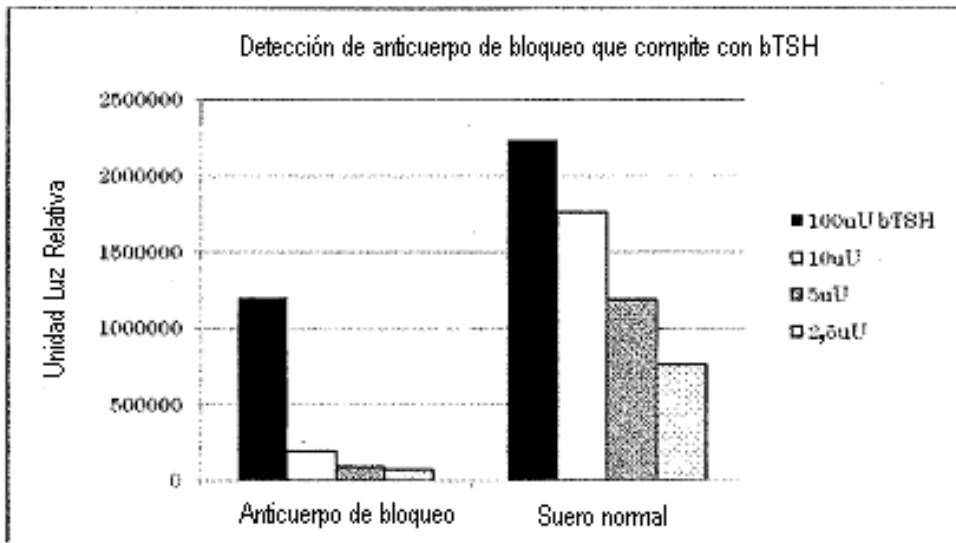


Figura 10

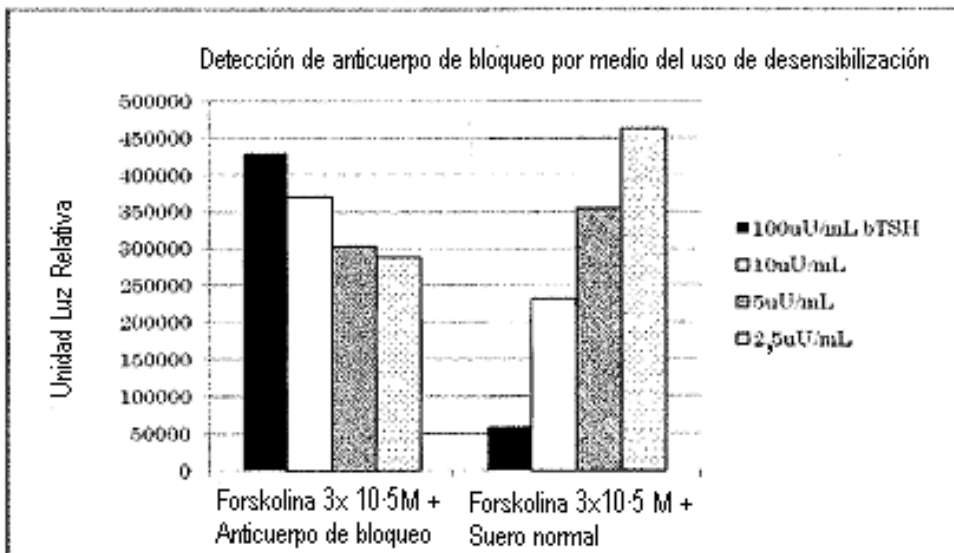


Figura 11

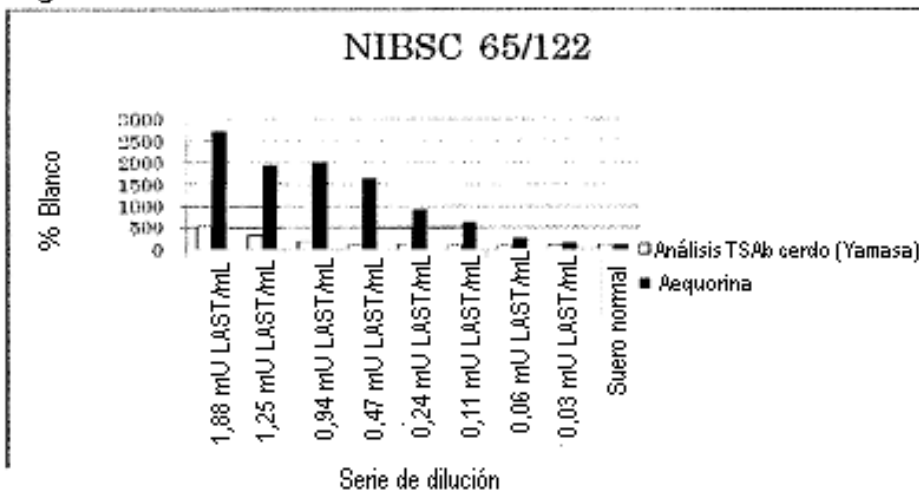




Figura 12

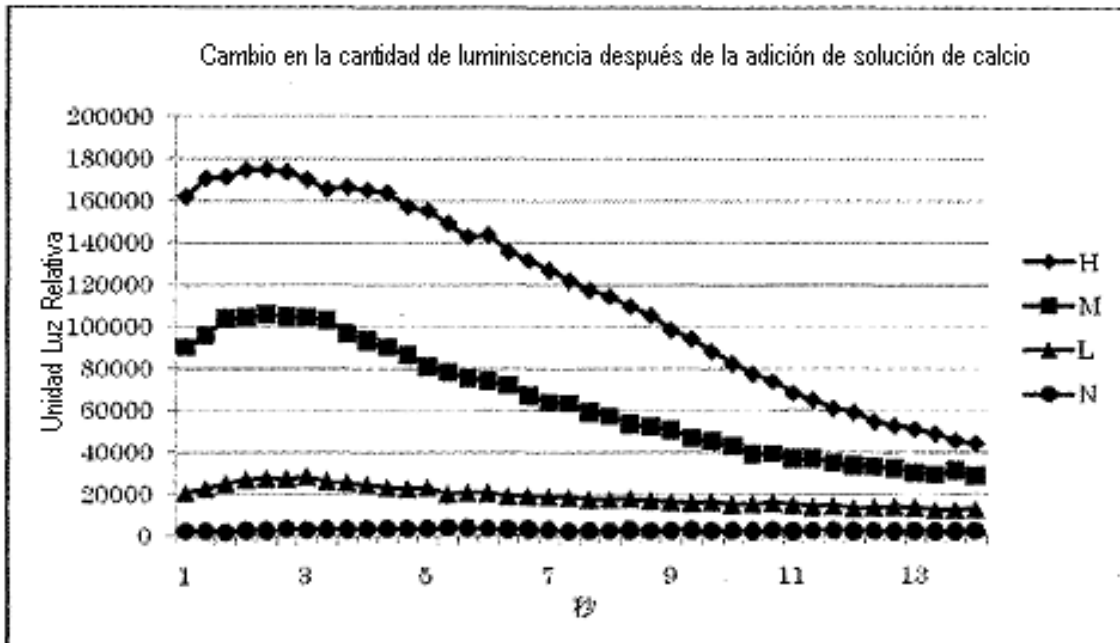


Figura 13

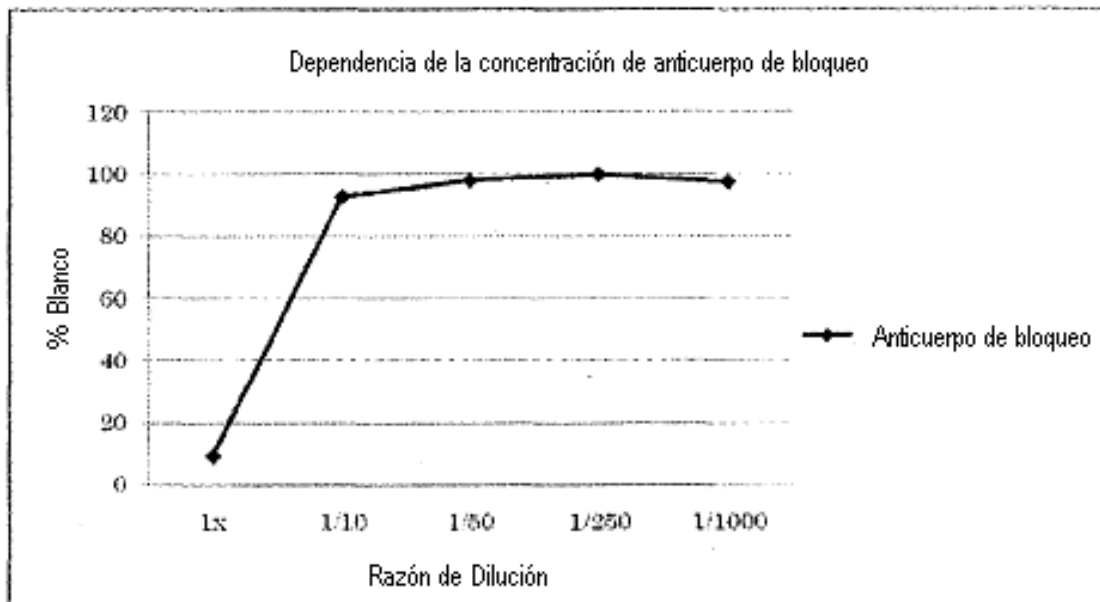


Figura 14

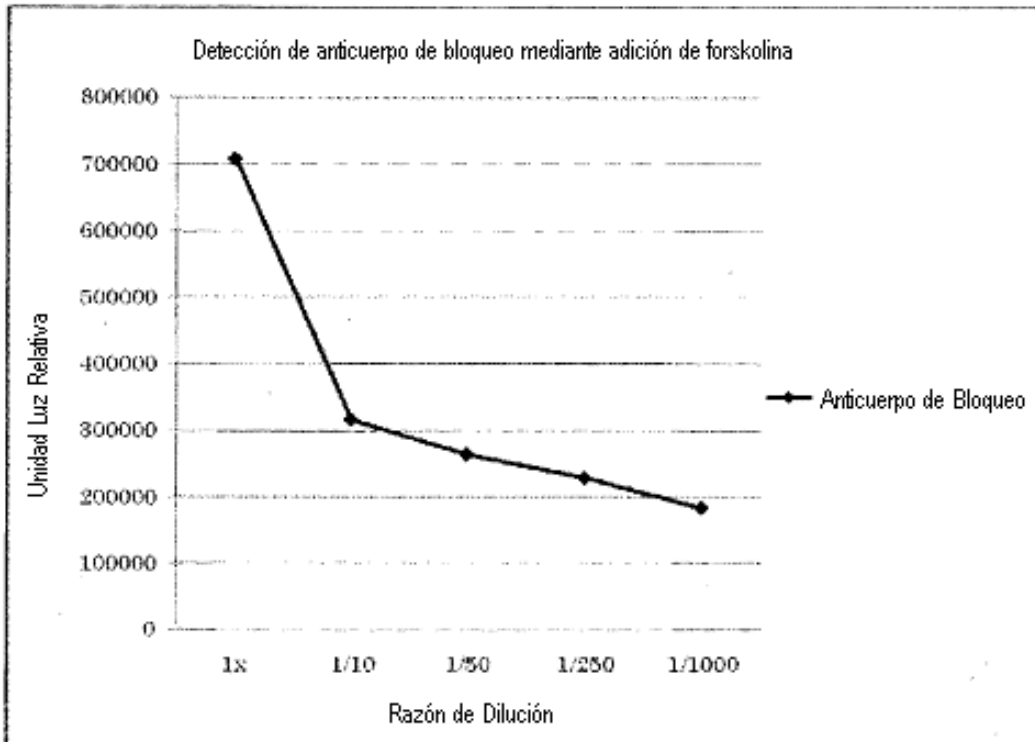


Figura 15

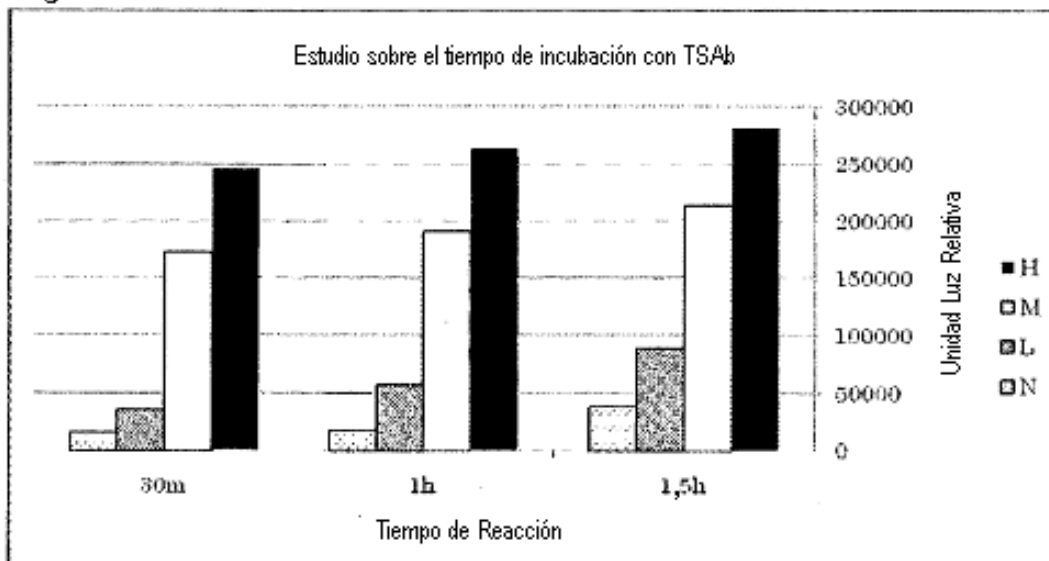


Figura 16

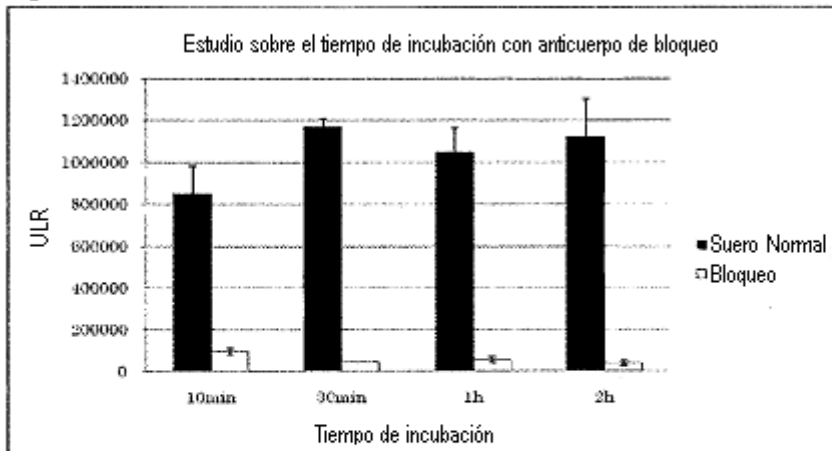


Figura 17

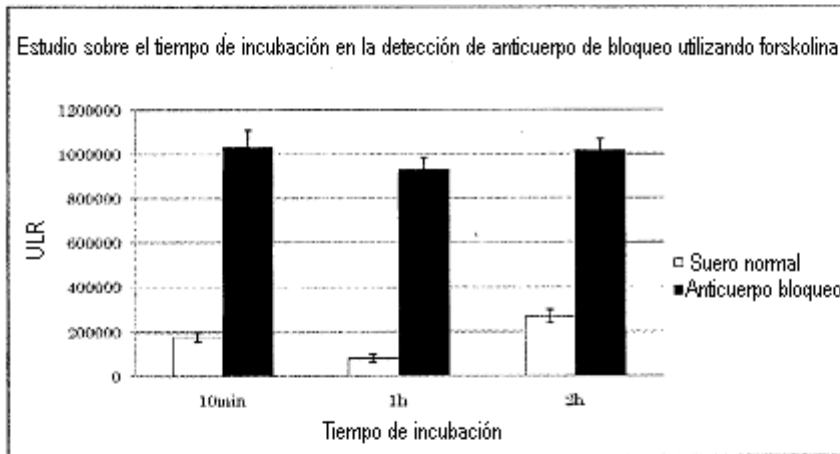


Figura 18

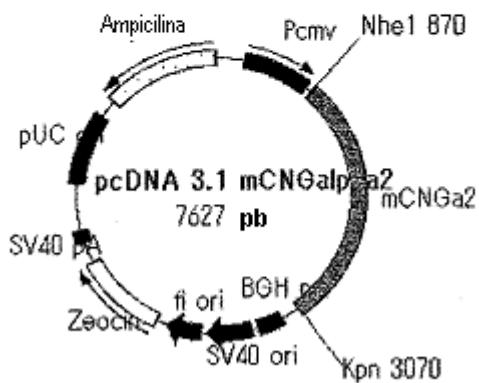


Figura 19

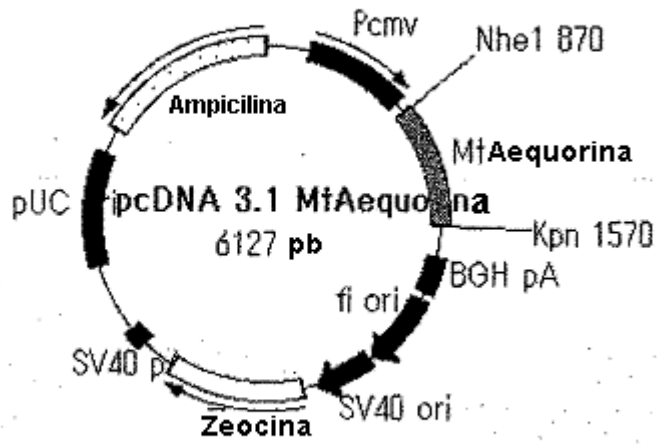


Figura 20

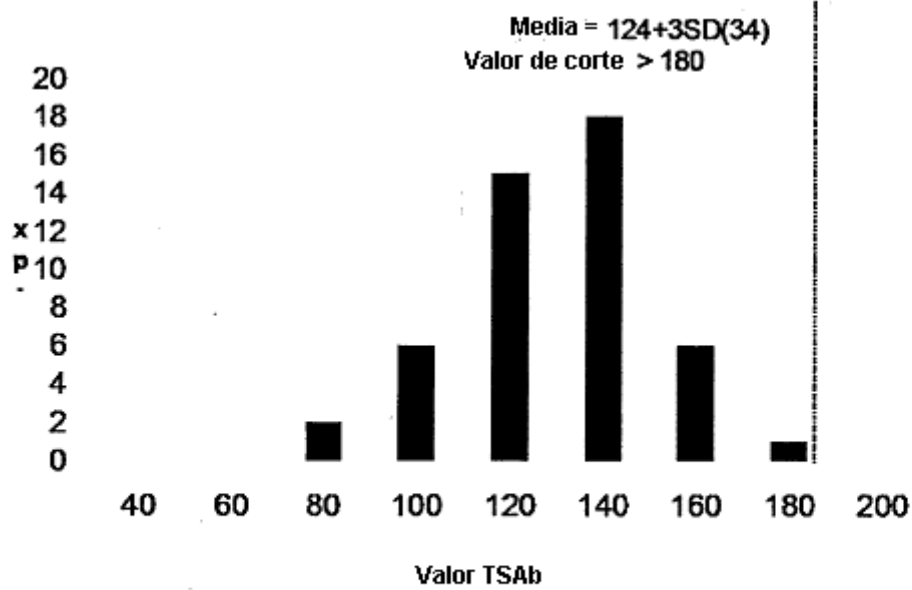


Figura 21

