

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 262**

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)
G01N 33/76 (2006.01)
G01N 33/554 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2010** **E 14195873 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017** **EP 2857497**

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:

16.11.2017

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 2 642 262 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 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.

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;

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; y

un análisis para autoanticuerpos del receptor de TSH basado en células transfectadas con TSHR (es decir células CHO) que utiliza niveles de luciferasa inducida por AMPc como criterio de valoración.

Bibliografía no relacionada con patentes 1: Methods in Enzymology, 74, 405-420 (1981)

Bibliografía no relacionada con patentes 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 célula que se puede utilizar en un análisis para la medición de TSAb y/o TSBAb y para el diagnóstico de una enfermedad de la tiroides etc., que puede ser manipulada más convenientemente que los métodos convencionales sin necesidad de uso de un radioisótopo que requiere técnicas o equipos especiales.

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 una célula que expresa un receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSHR), un canal de calcio dependiente de AMPc, en donde el canal de calcio dependiente de AMPc es un canal de calcio CNG (activado por nucleótidos cíclicos) modificado que exhibe una mayor sensibilidad al AMPc

que al GMPc y una proteína sensible al calcio, en donde la proteína sensible al calcio es una proteína que emite luminiscencia en la respuesta al calcio.

Efectos ventajosos de la invención

La presente invención proporciona un célula útil en un análisis para detectar anticuerpos contra TSHR. El uso de la célula anterior 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 utilizando la célula anterior.

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 aecurina 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 aecurina 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 aecurina y el tiempo de incubación en una cantidad de luminiscencia emitida desde las células CHO que expresan TSHR humano, el canal CNG modificado y aecurina 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 aecurina modificada.

[Figura 5] La Figura 5 muestra una relación entre una concentración de células CHO que expresan TSHR humano, el canal CNG modificado y aecurina 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 aecurina 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 CaCl_2 añadido sobre la cantidad de luminiscencia emitida desde las células CHO que expresan TSHR humano, el canal CNG modificado y aecurina 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 aecurina 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 pmCNG α 2.

[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, en donde el canal de calcio dependiente de AMPc es un canal de calcio CNG (activado

por nucleótidos cíclicos) modificado que exhibe una mayor sensibilidad al AMPc que al GMPc y una proteína sensible al calcio, en donde la proteína sensible al calcio es una proteína que emite luminiscencia en respuesta al calcio.

5 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
10 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
20 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
30 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 activado 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%
40 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^a en un canal de calcio CNG de ratón por triptófano, la sustitución del ácido glutámico 583^a en un canal de calcio CNG de ratón por metionina, la sustitución de la treonina 537^a 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 537^a 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
50 ejemplo, se lleva a cabo la sustitución de la cisteína 460^a en el canal de calcio CNG de ratón por triptófano, y también se puede realizar la sustitución del ácido glutámico 583^a por metionina. El canal de calcio CNG puede consistir en una subunidad α y/o una subunidad β . 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 aecurina, Cameleon (Invitrogen Corp.), Case12 (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 A1-2 descrita en la Patente Japonesa Abierta a la Inspección Pública Núm. 2002-153279, y sus apoproteínas, si las hubiera, (p. ej., apoaecurina).

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 de acuerdo con la presente invención 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 de acuerdo con la presente invención 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 apoaecurina 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 de acuerdo con la presente invención 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 de acuerdo con la presente invención también se puede preparar forzando a la célula para que exprese transitoriamente o establemente la proteína o 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.

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 de acuerdo con la presente invención 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 de acuerdo con la presente invención 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.

Se describe una composición 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 de acuerdo con la presente invención (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 de acuerdo con la presente invención) se puede utilizar para analizar la cantidad de un anticuerpo estimulador de la tiroides y/o la cantidad de un anticuerpo de bloqueo 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 TSBAb y el mixedema.

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.

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.

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 de acuerdo con la presente invención. 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

(a) 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.

(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 TSBA_b está ausente en la muestra, no se produce la entrada de calcio en la célula. Esto significa que la ausencia de TSBA_b está representada por la supresión de la luminiscencia de la proteína sensible al calcio como un resultado. Por otro lado, si TSBA_b 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 descrita, 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 descrita 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 descrita, 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 de acuerdo con la presente invención. 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, 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, 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 puede utilizar 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 puede calcular 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.

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 de acuerdo con la presente invención. 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 (TSBAAb) 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 (TSBAAb) 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 puede utilizar un patrón de anticuerpo (TSBAAb) 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 (TSBAAb) se puede calcular 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 (TSBAAb) 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 (TSBAAb) 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 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 de acuerdo con la presente invención. 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 (TSBA_b) 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 (TSBA_b) 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 puede utilizar un patrón de anticuerpo (TSBA_b) 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 (TSBA_b) se puede calcular 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 (TSBA_b) 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 (TSBA_b) 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 de acuerdo con la presente invención.

Por ejemplo, cuando la concentración en suero de un anticuerpo estimulador de la tiroides medida utilizando la composición de acuerdo con la presente invención 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 de acuerdo con la presente invención 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 de acuerdo con la presente invención.

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 de acuerdo con la presente invención 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 de acuerdo con la presente invención 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 de acuerdo con la presente invención es menor antes del tratamiento que después del tratamiento, se puede determinar que el tratamiento del hipotiroidismo es eficaz.

La presente invención proporciona una composición 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. Se describe adicionalmente un kit que comprende la composición de acuerdo con la presente invención 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 y la composición 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 de acuerdo con la presente invención se puede preparar de manera adecuada y se prepara, por ejemplo, a una concentración de 3×10^4 células/ml a 3×10^6 células/ml. La célula de acuerdo con la presente invención puede ser preparada, por ejemplo, suspendiéndola a una concentración de 3×10^6 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, 3×10^3 células a 3×10^5 células por pocillo de la placa de 96 pocillos.

El medio para el cultivo celular no está limitado siempre que pueda mantener la célula de acuerdo con la presente invención. El medio de cultivo celular puede estar exento de Ca^{2+} o exento de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$.

La disolución de detección puede contener CaCl_2 , azul de tripano, un catión que es capaz de causar la luminiscencia de aecurina y 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 CaCl_2 y azul de tripano pueden ser ajustadas apropiadamente por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la concentración de CaCl_2 puede ser de 9 a 18 mM, y la concentración de azul de tripano puede ser de 0,001 a 0,010%. La disolución de detección es, por ejemplo, una disolución acuosa que contiene CaCl_2 9 mM y azul de tripano al 0,002%. La concentración final de 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 ion magnesio, el ion 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 aecurina. El derivado de coelenterazina incluye ViviRen (R), (Promega Corp.). La concentración de ViviRen se puede ajustar apropiadamente y puede ser, por ejemplo, de 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 puede ser, por ejemplo, de 100 mU/ml. Por otra parte, se puede utilizar TSAb en lugar de o además de la TSH. El TSAb 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 descrito 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 de acuerdo con la presente invención 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 descrito 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 descrito 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).

La composición descrita o el kit 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 (TSAb) en una muestra de sangre de un paciente que exhibe hipertiroidismo utilizando la composición 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).

Se describe adicionalmente un método para diagnosticar la enfermedad de Graves, que comprende las siguientes etapas (A) a (C):

(A) preparar una mezcla que contiene una célula de acuerdo con la presente invención, un sustrato

luminiscente para la proteína sensible al calcio, un medio exento de Ca^{2+} y una muestra derivada de la sangre de un sujeto de ensayo;
 (B) añadir una disolución que contiene 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 de 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 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 CaCl_2 . La disolución que contiene Ca^{2+} 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.

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.

Se describe adicionalmente un método para el diagnóstico de la enfermedad de Graves, que comprende las siguientes etapas:

- (1) cultivar una célula de acuerdo con la presente invención, en un medio exento de 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 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 Ca^{2+} no está limitado, siempre y cuando la célula se pueda mantener. Por ejemplo, se utilizan NaCl 130 mM, KCl 5 mM, HEPES 20 mM, MgCl_2 1 mM, NaHCO_3 4,8 mM, PEG6000 al 5%, pH 7,4. Además, el medio exento de 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 $3 \text{ a } 30 \times 10^4$ células/ml y 90 μl /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 h. El tiempo de incubación se puede establecer en 2-8 h y es, por ejemplo, de 3 h. 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 aecurina, las células son cultivadas generalmente durante aproximadamente 12-24 h después de la siembra de las células. Se ha confirmado que incluso si las células se cultivan durante aproximadamente 2 h, 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 h después de la siembra de las células, se puede detectar una fuerte luminiscencia de la proteína sensible a calcio, por ejemplo, empleando aecurina 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 PEG a la sangre de un sujeto de ensayo y recolectando una fracción precipitada. Por ejemplo, se utiliza PEG6000 al 30% como disolución acuosa de 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 CaCl_2 .

Con tal que los tiempos de incubación en las etapas (2) y (3) se encuentran dentro del plazo de aproximadamente 4 h 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 descrito incluyen un anticuerpo policlonal de cabra anti-TSH humana.

La disolución que contiene 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 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 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 aecurina emita apropiadamente luminiscencia.

En la etapa (3), la luminiscencia es emitida por la proteína sensible al calcio tal como la aecurina inmediatamente después de la adición de la disolución de 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, aecurina) 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 pueden medir 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 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 puede utilizar 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 puede calcular 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, aecurina) 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, aecurina) 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 aecurina 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.

Se describe adicionalmente 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 la presente invención, un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio, un medio exento de Ca^{2+} , TSH o un anticuerpo monoclonal TSAbs estimulador y una muestra derivada de la sangre de un sujeto de ensayo;
- (B) añadir una disolución que contiene 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 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 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 CaCl_2 . Además, la disolución que contiene Ca^{2+} 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.

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

Se describe adicionalmente un método para el diagnóstico de hipotiroidismo (p. ej., enfermedad de Hashimoto), que comprende las siguientes etapas:

- (1) cultivar una célula de acuerdo con la presente invención, en un medio exento de 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 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, aecuatorina) 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 aecuatorina 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.

Adicionalmente se describe 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 la presente invención, un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio, un medio que contiene 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 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 CaCl_2 . Además, el medio que contiene 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 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 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 aecuatorina 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.

Se describe adicionalmente un método para el diagnóstico de hipotiroidismo (por ejemplo, enfermedad de Hashimoto), que comprende las siguientes etapas:

- (1) cultivar una célula de acuerdo con la presente invención, en un medio que contiene 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, aecuatorina) 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 (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 (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, $n = 1, 2, 3, 4, \text{ o } 5$) 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_b) 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 $\times 100$ (%) (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 puede utilizar un patrón de anticuerpo (TSBA_b) 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_b) se puede calcular 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_b) 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, $n = 1, 2, 3, 4, \text{ o } 5$) de las concentraciones en suero de (TSBA_b) 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, aecuorina) 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, aecuorina) 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 aecuorina 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

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.

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 pmCNG α 2 (Figura 18). Además, para mejorar la selectividad de AMPc y la sensibilidad al mismo, se preparó un constructo pmCNG α 2MW que expresaba un canal de calcio dependiente de nucleótidos cíclicos modificados (SEQ ID NO: 6) en el que la cisteína 460^a (C) estaba sustituida por triptófano (W) y el ácido glutámico 583^a (E) estaba sustituido por metionina (M) mediante el método de mutación puntual por PCR. Por otra parte, se trató una secuencia de ADNc de apoaecuatorina 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 apoaecuatorina 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-cm². Al día siguiente, las células fueron transfectadas con 1 μ g de pZeoSV2 hTSHR, 2 μ g de pmCNG α 2MW, y 2 μ 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 μ l de una disolución de Versene (EDTA) a la placa de Petri y se suspendieron en un medio DMEM/F12 que contenía 10 ml de cFCS al 5%. La suspensión obtenida se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min. A continuación, el sedimento se disolvió a una concentración de $2-5 \times 10^6$ células/ml en 1 ml de CELLBANKER y se almacenó a -80°C.

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

Se descongeló 1 ml (3×10^6 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, MgCl₂ 1 mM, NaHCO₃ 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 7,5 μ l de ViviRen 4 mM (Promega Corp.) a la misma. La mezcla se sembró a una concentración de 90 μ l/pocillo en una placa de 96 pocillos. Después del cultivo a 37°C durante 3 h en una atmósfera de CO₂, se añadió a esto (n = 6) bTSH diluido seriadamente con PBS a una concentración de 10 μ l/pocillo, y las células se cultivaron durante 30 min. A continuación, se añadió una disolución de CaCl₂ 3 mM a esto a una concentración de 50 μ 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.

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

Como se muestra en la Figura 2 (vista aumentada del intervalo de baja concentración), la cantidad mínima detectable para bTSH fue de 0,16 μ U/ml de manera que el valor detectado fue susceptible de ser discriminado significativamente del valor que se calcula por valor del blanco + 3SD. 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 μ U/mL (Atsuo Nagata, et al.: Clinical Endocrinology, 41: 1023, 1993).

Por otra parte, dado que la aecuatorina realiza una reacción luminiscente, la elevada relación de señal con respecto a blanco (S/N), (es decir, unos 100 μ 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 μ U/ml de bTSH, SN = 7).

3. Estudio de reproducibilidad

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 mU LAST/ml), M (1,25 mU LAST/ml) y L (0,94 mU LAST/ml). Se añadieron 150 μ l de PEG600 al 30% a 50 μ l de cada suero de control preparado, y las mezclas se agitaron y después se dejaron en reposo a 4°C durante 5 min. Después de centrifugación a 3000 rpm a 4°C durante 20 min, los precipitados obtenidos se disolvieron por separado en 400 μ l de un tampón de muestra para preparar soluciones de muestras. Se descongeló 1 ml (3×10^6 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 μ l de ViviRen 4 mM. La mezcla se sembró a una concentración de 80 μ l/pocillo en una placa de 96 pocillos. Después del cultivo a 37°C durante 3 h en una atmósfera de CO₂, se añadieron a esto por separado las muestras preparadas (n = 2) a una concentración de 20 μ l/pocillo, y las células se cultivaron durante 30 min. A

continuación, se añadió a esto una disolución de CaCl_2 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) ($\text{YAMASA TSAb\%} = \text{Valor de la muestra/Valor del suero de un individuo normal} \times 100 (\%)$).

[Tabla 1]

	Reproducibilidad entre series			Reproducibilidad entre series			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 tiroides 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 aecurina

Se descongeló 1 ml (3×10^6 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_2 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 h 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 1×10^5 células/ml en una placa de Petri de 10 cm^2 y se cultivaron durante 1 día. A continuación, se mezclaron 3 μg de pcDNA mt sAEQ, 1 μg de pmCNG α 2MW, 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_2 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 (3×10^6 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 3×10^5 células/ml a 3×10^5 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_2 , 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_2 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 3×10^5 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_2 añadida

Se descongeló 1 ml (3×10^6 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_2 , 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_2 (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_2 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 de control con anticuerpo estimulador

Se descongeló 1 ml (3×10^6 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_2 . 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_2 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 (TSBAbs)

Se descongeló 1 ml (3×10^6 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_2 , se añadieron al mismo por separado una fracción de anticuerpo de bloqueo de la estimulación tiroidea derivada de un paciente con hipotiroidismo (TSBAbs) 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 2,5 μU /ml) a una concentración de 10 μl /pocillo. Después del cultivo durante 30 minutos, se añadió a esto una disolución de CaCl_2 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 μU /mL de bTSH, lo que demuestra la inhibición competitiva de acuerdo con la

concentración de bTSH competidor (véase la Figura 9).

Quando 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 descripción 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 (3×10^6 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 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 CO₂, 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 µl/pocillo. Al mismo tiempo, se añadió adicionalmente bTSH (concentraciones finales: 100 µU a 2,5 µU/ml) a una concentración de 10 µl/pocillo. Después del cultivo durante 30 min, 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.

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 µU o inferiores. Sin embargo, en la presencia de 100 µU 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 descripción]

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 descripción, 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 (3×10^6 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 µl de ViviRen 4 mM. La mezcla se sembró a una concentración de 90 µl/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 µl de PEG6000 30% a 50 µl 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 µl de un tampón de muestra para preparar soluciones de

muestra. Después del cultivo a 37°C durante 3 h en una atmósfera de CO₂, las soluciones de muestra se añadieron a esto por separado a una concentración de 10 µl/pocillo, y las células se cultivaron durante 30 min. A esto se le añadió disolución de detección de CaCl₂ 9 mM a una concentración de 50 µl/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 (3×10^6 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, MgCl₂ 1mM, NaHCO₃ 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 µl de ViviRen 4 mM (Promega Corp.). 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 CO₂, 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 µl/pocillo. Después de cultivar durante 30 minutos, se añadió a esto una disolución de CaCl₂ 9 mM a una concentración de 50 µl/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 CaCl₂.

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 (3×10^6 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, MgCl₂ 1 mM, NaHCO₃ 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.). Después del cultivo a 37°C durante 3 h en una atmósfera de CO₂, se mezclaron 90 µl de la disolución de células con 10 µl 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 CaCl₂ 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 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 (3×10^6 células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 en un baño caliente y se suspendió en 10 ml de un tampón de muestra (CaCl₂ 3 mM, NaCl 130 mM, KCl 5 mM, HEPES 20 mM, MgCl₂ 1 mM, NaHCO₃ 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 µl de ViviRen 4 mM (Promega Corp.). La mezcla se sembró a una concentración de 90 µl/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 µl/pocillo, y, adicionalmente, se añadió a esto una disolución de bTSH (concentración final: 100 µl/ml) a una concentración de 10 µl/pocillo. Después del cultivo a 37°C durante 30 min en una atmósfera de CO₂, 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 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 tiroides (TSAb) o del anticuerpo de bloqueo de la estimulación tiroidea (TSBAb)

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

Se descongeló 1 ml (3×10^6 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, $MgCl_2$ 1 mM, $NaHCO_3$ 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 $CaCl_2$ 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 minutos a 1 hora 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 (3×10^6 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, $MgCl_2$ 1 mM, $NaHCO_3$ 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, 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 $CaCl_2$ 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 minutos 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 (3×10^6 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_2 (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_2 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 como se ha descrito anteriormente que contiene 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_2 (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 (3×10^6 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_2). 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 ± 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 descripción. La razón de verdaderos positivos del kit existente fue 68%, y la del kit proporcionado por la presente descripción fue 98%, demostrando que el kit de la presente descripción 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 proporciona una célula que es adecuada para 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> 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
 <130> 669763
 10 <150> EP 10794054.6
 <151> 2010-06-24
 <150> JP 2009-155183
 <151> 2009-06-30
 <160> 7
 15 <170> PatentIn versión 3.2
 <210> 1
 <211> 764
 <212> PRT
 <213> Humana
 20 <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 2 642 262 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 2 642 262 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
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
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
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 2 642 262 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

<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

5

10

ES 2 642 262 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

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>

ES 2 642 262 T3

<223> aecuorina modificada

<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

<210> 4

<211> 1995

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 4

atgatgaccg aaaaatccaa cgggtgtgaag 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 aaaatttccg tgaggaggaa ccaagacctg actccttcct agagcgtttc 300
cgtgggcctg agctccagac tgtgacaacc catcaggggg atggcaaagg cgacaaggac 360
ggcgagggaa agggcaccaa aaagaaattt gaactgtttg ttttggacct agctggagac 420
tgggtattacc 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 ttttgcgtg 720
ggatccaca gccctgaggt acgctttaat cgtctgttac actttgccg tatgtttgag 780
ttctttgacc gcaactgagac acgtacaagc taccccaaca tcttccgaat cagcaacctg 840
gtcctctaca tcttggtcat catccactgg aatgcttgta tttactatgc tatctctaag 900
tccattgget ttgggggtga cacctgggtt taccccaaca ttactgacct tgaatatggc 960
tacctggcta gggagtacat ttactgcctt tactggcca cactgacct caccaccatt 1020
ggagagacac caccctctgt aaaggatgag gagtacctat ttgtcatctt tgacttctg 1080
attggtgtcc tcatctttgc cactattgtg ggaaatgtgg gctccatgat ctccaacatg 1140
aatgccacac gagcagagtt ccaggccaag attgatgctg tcaaacta catgcagttc 1200
cgaaaggta gtaaagacat ggaagccaag gtcacaaat 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 tgggtgtgact cagtatgcct tgctgtcagc tgggagctgc 1560
tttggtgaga ttagtatcct taacattaag ggtagcaaaa tgggcaatcg gcgcaactgcc 1620
aatatccgta gtctgggcta ctcagatctc ttctgcttgt ccaaggatga tcttatggaa 1680
gctgtgactg agtatcctga tgccaagaaa gtccctggaag 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

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

5

tggaaaatga ggccggcgga cttgctgcag ctggtgctgc tgctcgacct gcccagggac	60
ctgggcgga tgggggtgttc gtctccaccc tgcgagtgcc atcaggagga ggacttcaga	120
gtcacctgca aggatattca acgcatcccc agcttaccgc ccagtacgca gactctgaag	180
cttattgaga ctcacctgag aactattcca agtcatgcat tttctaattct gcccaatatt	240
tccagaatct acgtatctat agatgtgact ctgcagcagc tggaatcaca ctccttctac	300
aatttgagta aagtgactca catagaaatt cggaatacca ggaacttaac ttacatagac	360
cctgatgccc tcaaagagct cccctccta 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 aaacacctgg	780
actcttaaga aacttccact ttccttgagt ttccttcacc tcacacgggc tgacctttct	840
taccaagcc actgctgtgc 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

acccccaagt cccgatgagtt caaccocgtgt gaagacataa tgggctacaa gttccctgaga 1260
 attgtggtgt ggttcgtagt tctgctggct ctccctggga atgtctttgt cctgcttatt 1320
 ctctcacca gccactacaa actgaacgtc ccccgctttc tcatgtgcaa cctggccttt 1380
 ggggatttct gcatggggat gtacctgctc ctcatcgctt ctgtagacct ctacactcac 1440
 tctgagtact acaaccatgc catcgactgg cagacaggcc ctgggtgcaa cacggctggt 1500
 ttcttcactg tctttgcaag cgagttatcg gtgtatacgc tgacgggtcat caccctggag 1560
 cgctggtatg ccatcacctt cgccatgcgc ctggaccgga agatccgcct caggcacgca 1620
 tgtgccatca tgggtggggg ctgggtttgc tgcctccttc tcgccctgct tcctttggtg 1680
 ggaataagta gctatgccaa agtcagtatc tgccctgcca tggacaccga gaccctctt 1740
 gctctggcat atattgtttt tgtctgacg ctcaacatag ttgccttcgt catcgtctgc 1800
 tgctgttatg tgaagatcta catcacagtc cgaaatccgc agtacaaccc aggggacaaa 1860
 gataccaaaa ttgccaagag gatggctgtg ttgatcttca ccgacttcat atgcatggcc 1920
 ccaatctcat tctatgctct gtcagcaatt ctgaacaagc ctctcatcac tgtagcaac 1980
 tccaaaatct tgctggtagt cttctatcca cttaactcct gtgccaatcc attcctctat 2040
 gctattttca ccaaggcctt ccagagggat gtgttcatcc tactcagcaa gtttggcatc 2100
 tgtaaacgcc aggtcagggc ataccggggg cagagggttc ctccaaagaa cagcactgat 2160
 attcagggttc aaaagggttac ccacgagatg aggcagggtc tccacaacat ggaagatgtc 2220
 tatgaactga ttgaaaactc ccatctaacc ccaaagaagc aaggccaaat ctgagaagag 2280
 tatatgcaaa cggttttgta a 2301

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

atgatgaccg aaaaatccaa cgggtgtgaag agctctccag ctaataacca taaccatcat 60
 cctcctcctt ctatcaaggc caatggcaaa gatgaccaca gggcaggtag cagaccacag 120
 tctgtggcag ctgatgatga cacttcctca gaactgcaa ggttggcaga gatggatact 180
 ccacgcaggg gaaggggtgg cttccgaagg attgtccgcc tgggtggggat catcagagac 240
 tgggccaaca aaaatttccg tgaggaggaa ccaagacctg actccttctt agagcgtttc 300
 cgtgggcctg agctccagac tgtgacaacc catcaggggg atggcaaagg cgacaaggac 360
 ggcgagggaa agggcaccaa aaagaaattt gaactgtttt ttttggaccc agctggagac 420
 tggattacc gttggttgtt tgtcattgcc atgcctgttc tttacaactg gtgtctgttg 480
 gtagccagag cctgcttcag tgatctacag agaaactatt ttgtggtatg gctgggtgctg 540

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 tcttgggtcat catccactgg aatgcttgta tttactatgc tatctctaag 900
tccattggct ttgggggtga cacctggggt taccccaaca ttactgacct tgaatatggc 960
tacctggcta gggagtacat ttactgcctt tactgggtcca cactgaccct caccaccatt 1020
ggagagacac caccctctgt aaaggatgag gagtacctat ttgtcatctt tgacttcctg 1080
attggtgtcc tcatctttgc 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 ctgaggtctt tagtcctgga 1440
gattatattt gccgtaaggg ggacattggc aaggaaatgt acatcatcaa ggagggcaa 1500
ttggcagtgg tagctgatga tgggtgtgact cagtatgcct tgctgtcagc tgggagctgc 1560
tttgggtgaga ttagtatact taacattaag ggtagcaaaa tgggcaatcg gcgcactgcc 1620
aatatccgta gtctgggcta ctgagatctc ttctgcttgt ccaaggatga tcttatggaa 1680
gctgtgactg agtatcctga tgccaagaaa gtccctggaag 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

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> aecuorina modificada

<400> 7

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

ES 2 642 262 T3

aagctgacca gcgacttcga caaccccaag tggatcggcc gccacaagca catgttcaac	180
ttcctggacg tgaaccacaa cggccgcacg 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
atcacccctga tccgcctgtg gggcgacgcc ctgttcgaca tcatcgacaa ggaccagaac	480
ggcgccatca ccctggacga gtggaaggcc tacaccaaga gcgccggcat catccagagc	540
agcgaggact gcgaggagac cttccgcgtg tgcgacatcg acgagagcgg ccagctggac	600
gtggacgaga tgacccgcca gcacctgggc ttctggtaca ccatggaccc cgcctgcgag	660
aagctgtacg gcggcgccgt gccctaa	687

REIVINDICACIONES

1. Una célula que expresa un receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSHR), un canal de calcio dependiente de AMPc, en donde el canal de calcio dependiente de AMPc es un canal de calcio CNG (activado por nucleótidos cíclicos) modificado, y una proteína sensible al calcio, en donde la proteína sensible al calcio es una proteína que emite luminiscencia en respuesta al calcio.
2. La célula de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el canal de calcio CNG modificado es un canal de calcio CNG modificado derivado de una célula epitelial olfativa de ratón y comprende las siguientes sustituciones: la cisteína 460^a es sustituida por triptófano; y el ácido glutámico 583^a es sustituido por metionina.
3. La célula de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la proteína sensible al calcio es la apoaeuorina.
4. La célula de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la apoaeuorina es apoaeuorina modificada que está optimizada para su uso en un codón humano y que tiene una señal de direccionamiento mitocondrial.
5. La célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la célula expresa transitoriamente o establemente cada uno del receptor de la hormona estimuladora tiroidea (TSHR), el canal de calcio dependiente de AMPc y la proteína sensible al calcio.
6. La célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 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 apoaeuorina modificada que tiene la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 3.
7. La célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la célula se selecciona del grupo que consiste en una célula CHO, una célula HEK293 y una célula 3T3.
8. La célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la célula es una célula derivada de la glándula tiroidea que expresa endógenamente el TSHR, seleccionándose la célula derivada de la glándula tiroidea ente FRTL-5 y Nthy-ori, y forzada a expresar transitoriamente o establemente cada uno del canal de calcio dependiente de AMPc y de la proteína sensible al calcio.
9. La célula de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la célula es una célula derivada de tejido olfativo que expresa endógenamente el canal de calcio CNG, siendo forzada la célula derivada de tejido olfativo a expresar transitoriamente o establemente cada uno del TSHR y de la proteína sensible al calcio..

Figura 1

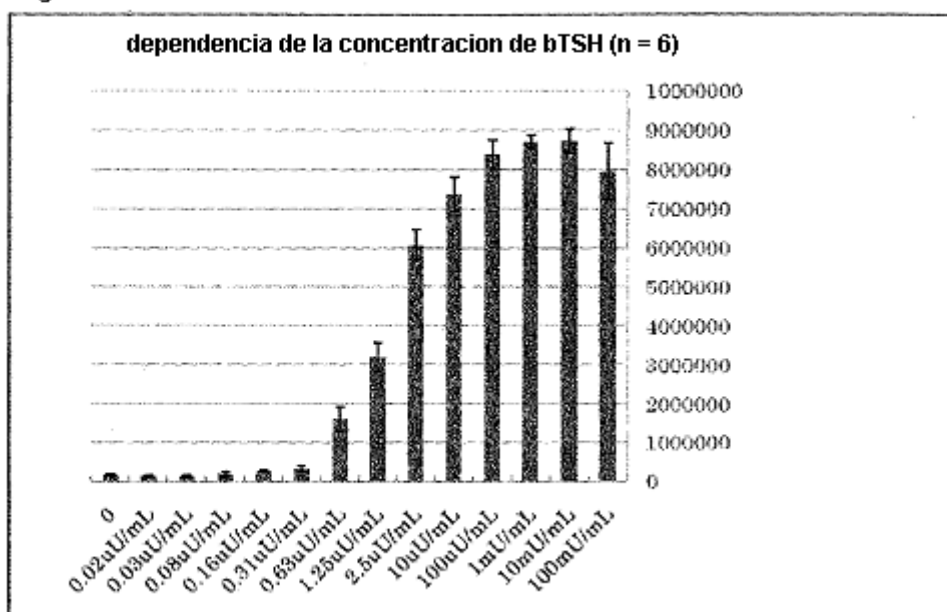


Figura 2

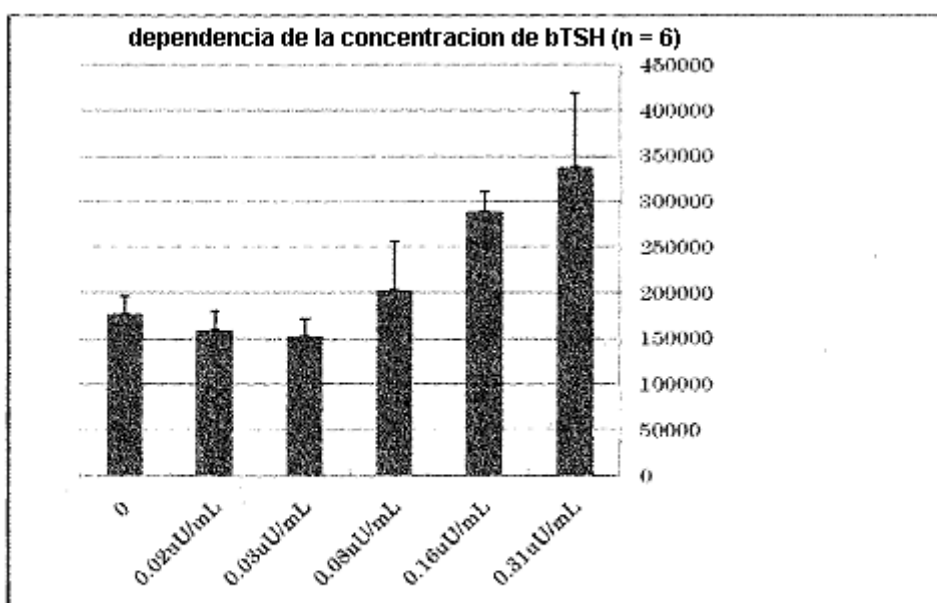


Figura 3

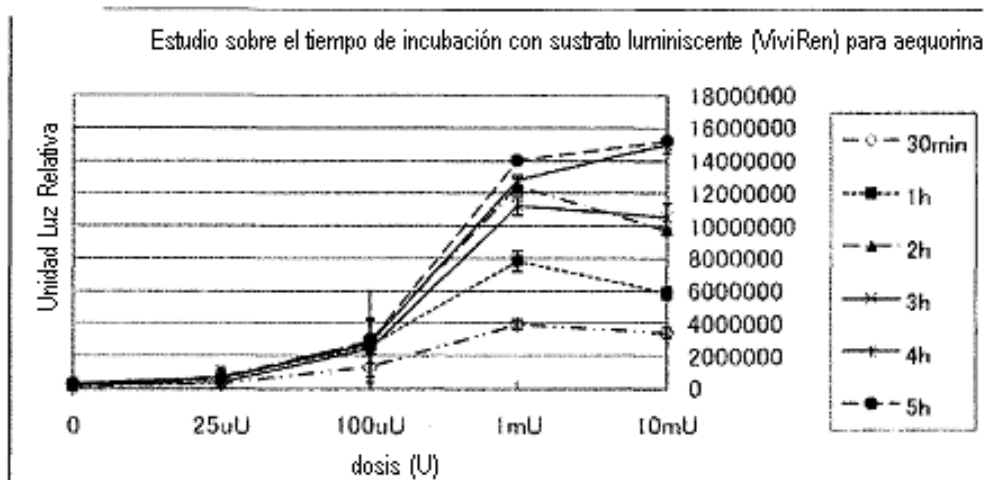


Figura 4

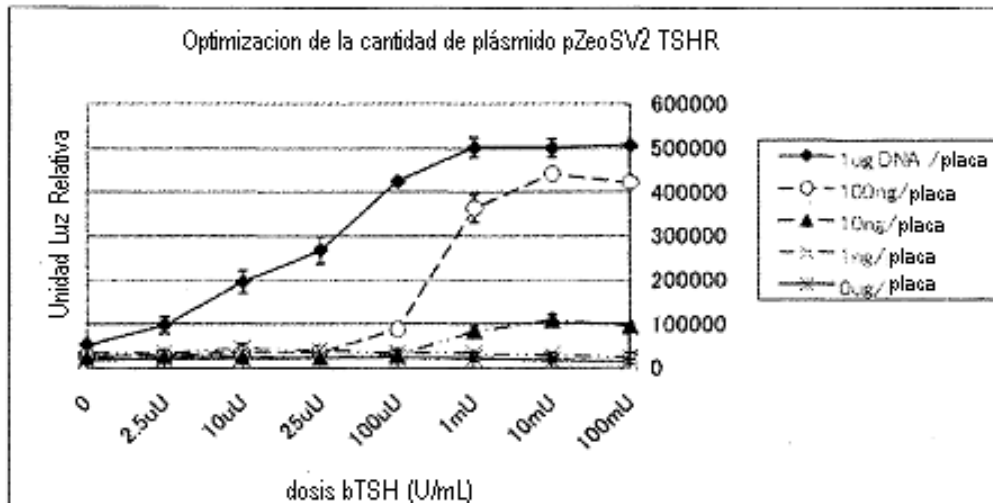


Figura 5

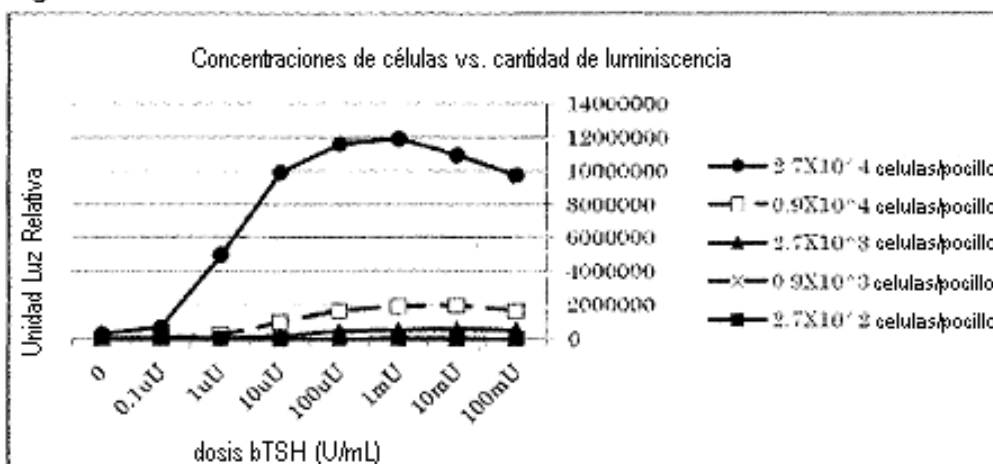


Figura 6

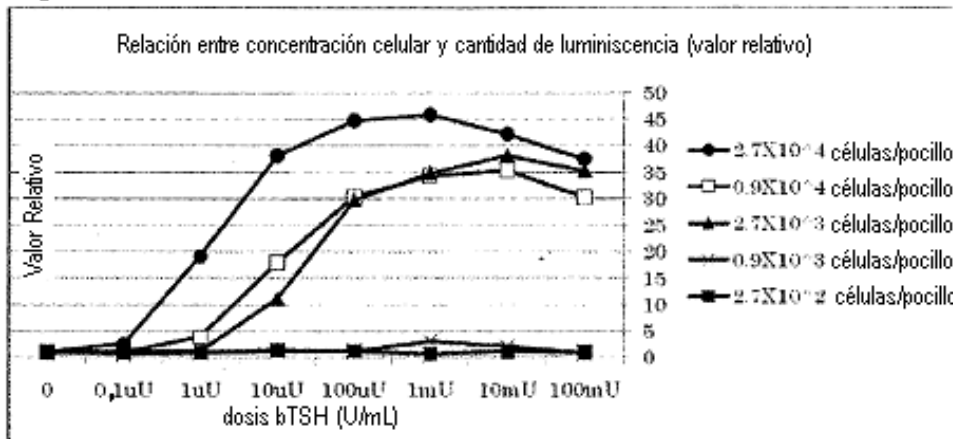


Figura 7

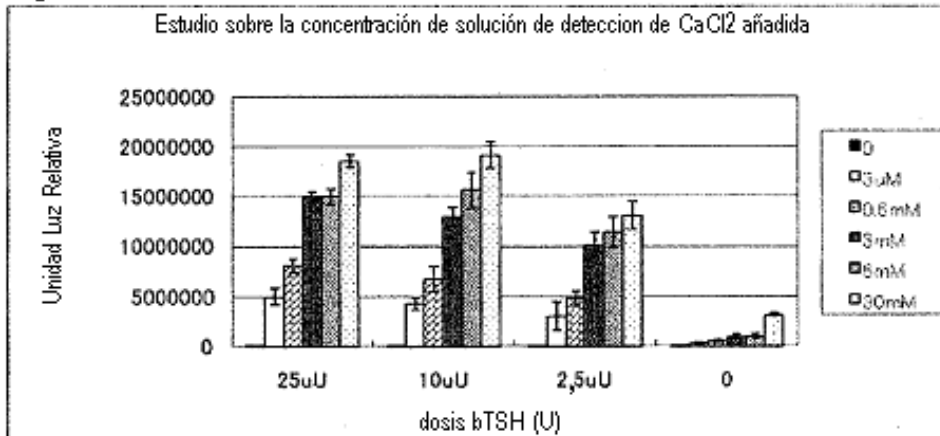


Figura 8

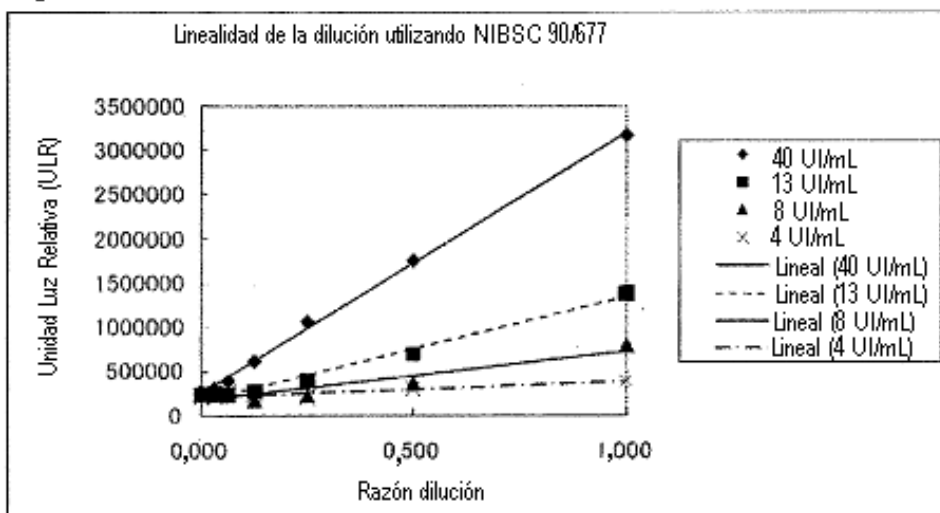


Figura 9

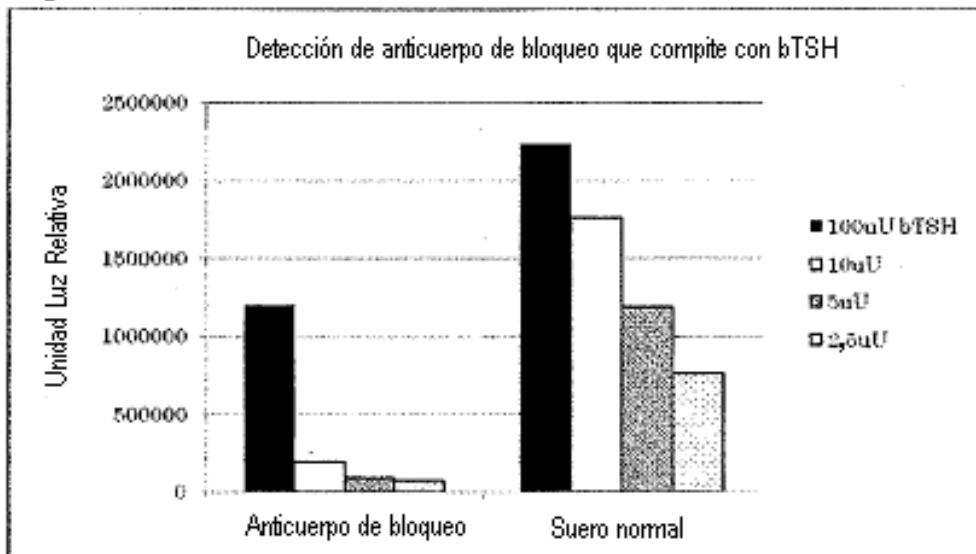


Figura 10

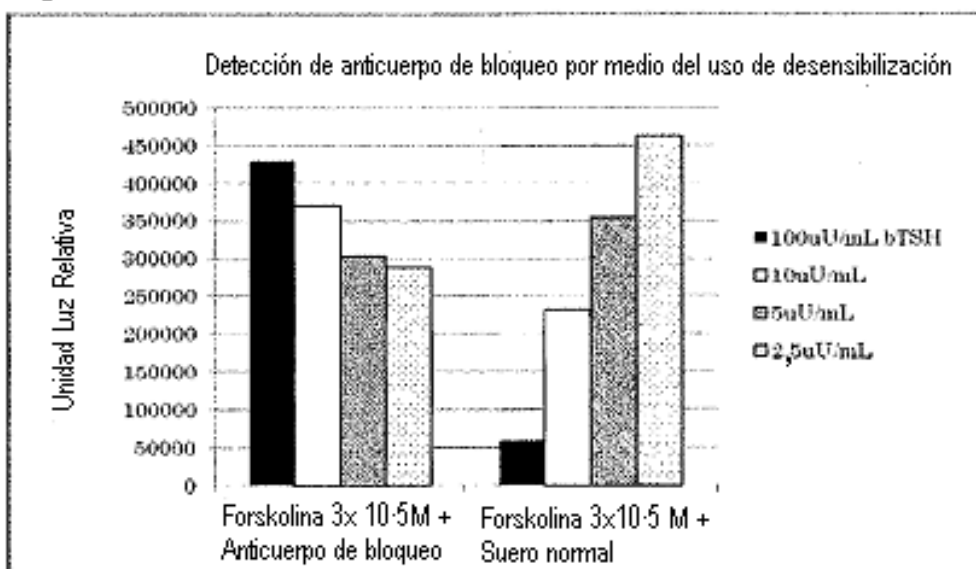


Figura 11

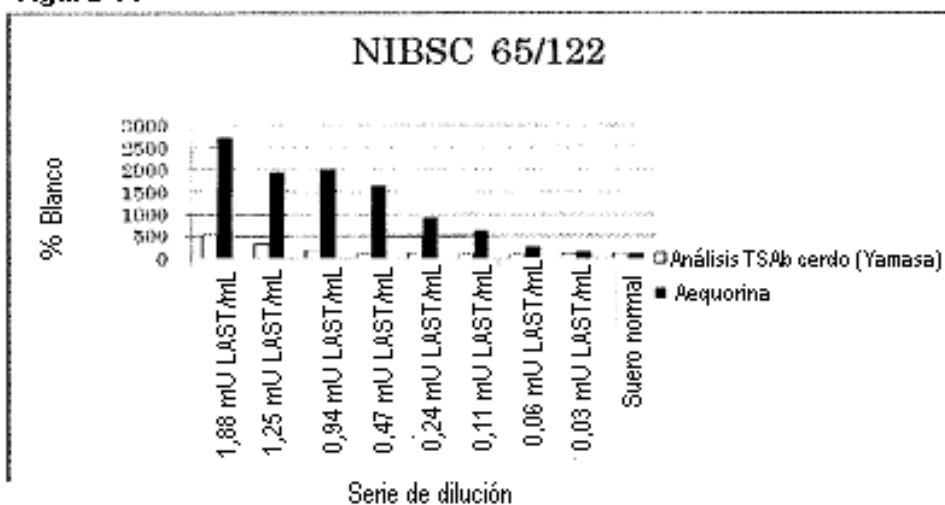


Figura 12

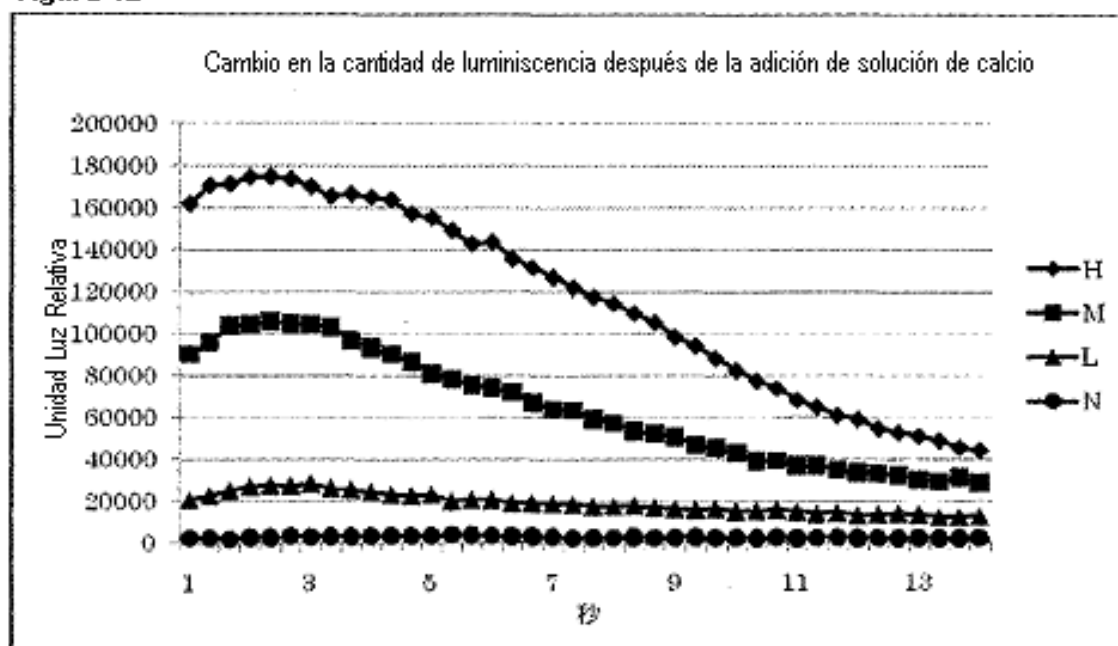


Figura 13

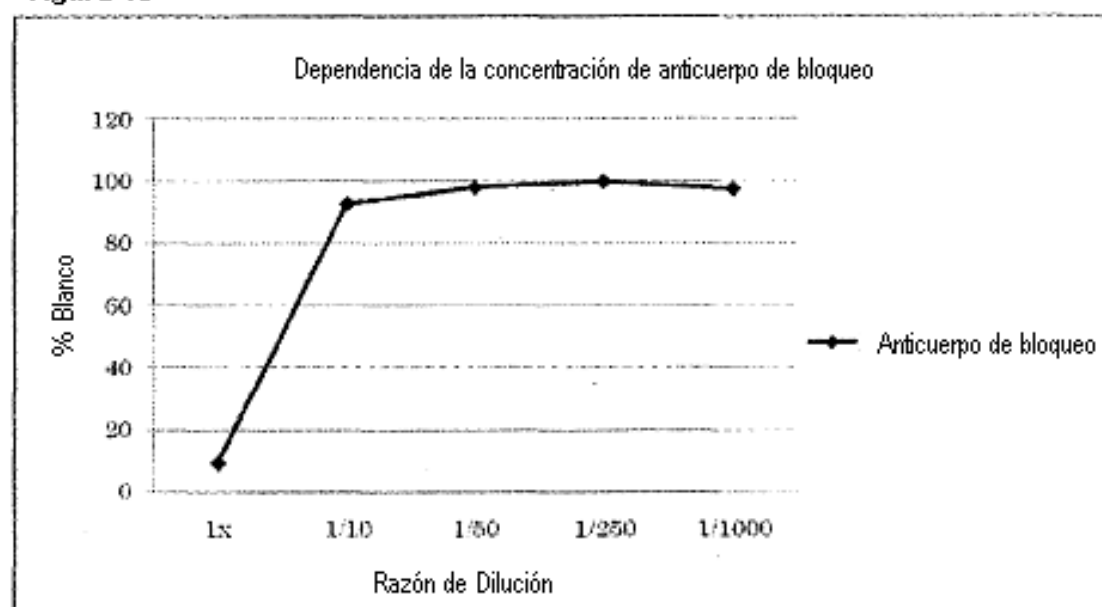


Figura 14

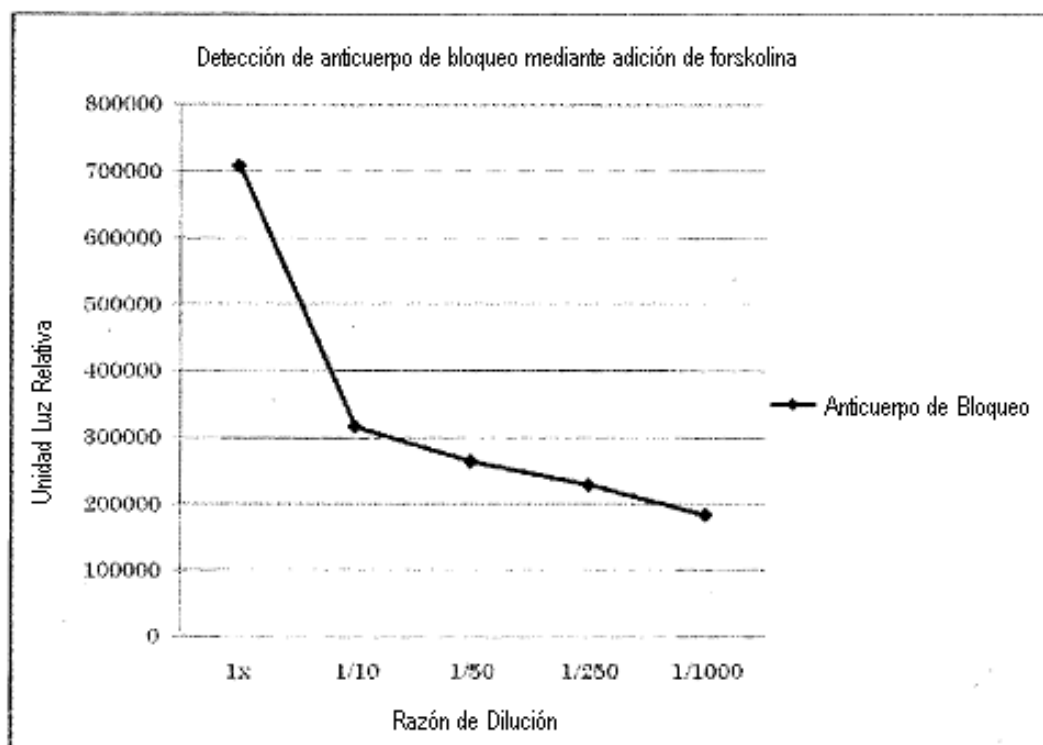


Figura 15

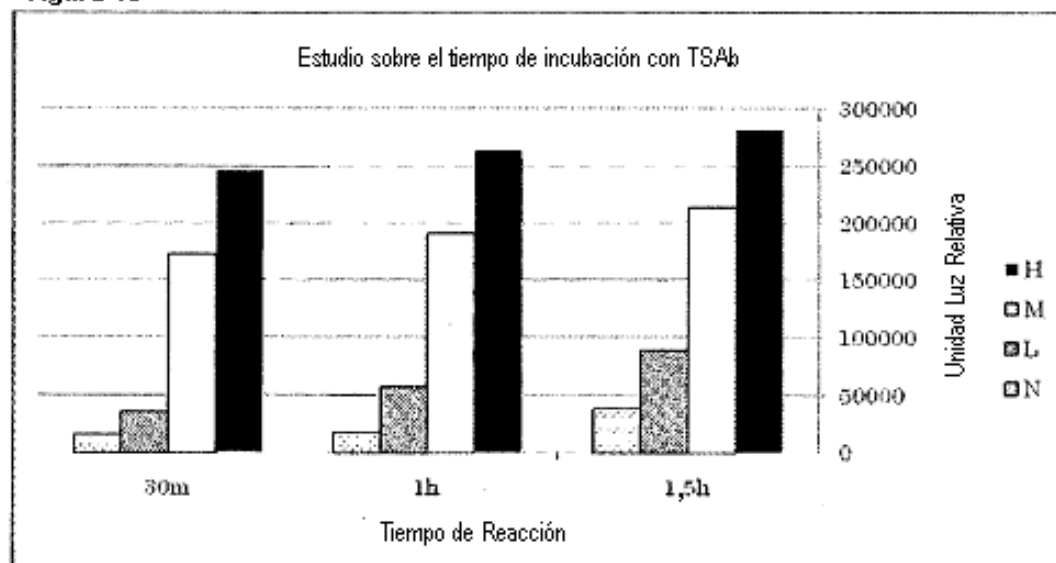


Figura 16

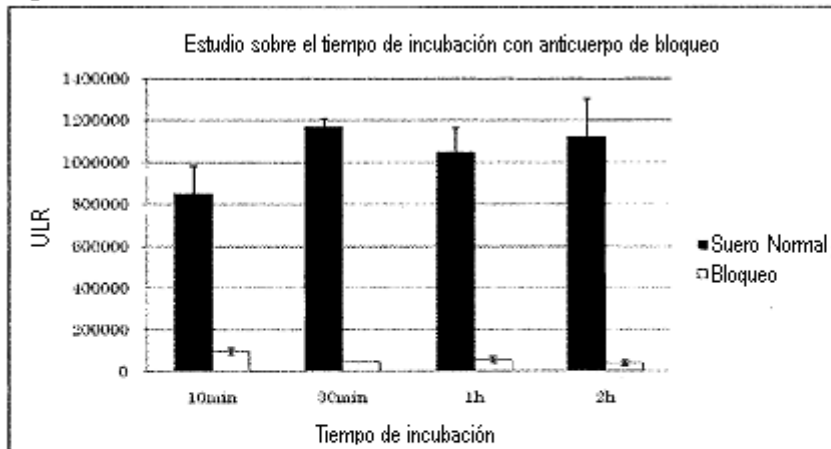


Figura 17

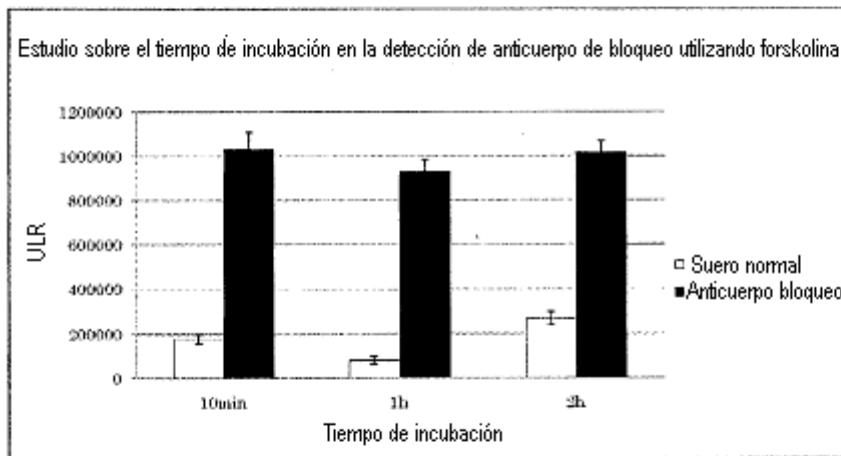


Figura 18

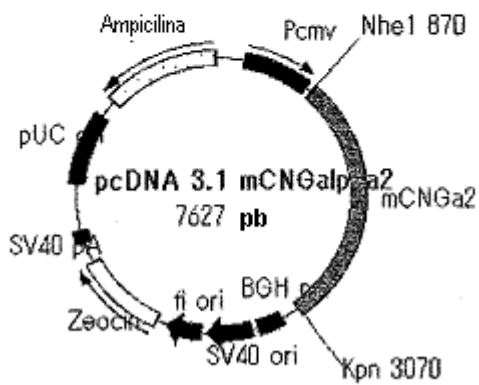


Figura 19

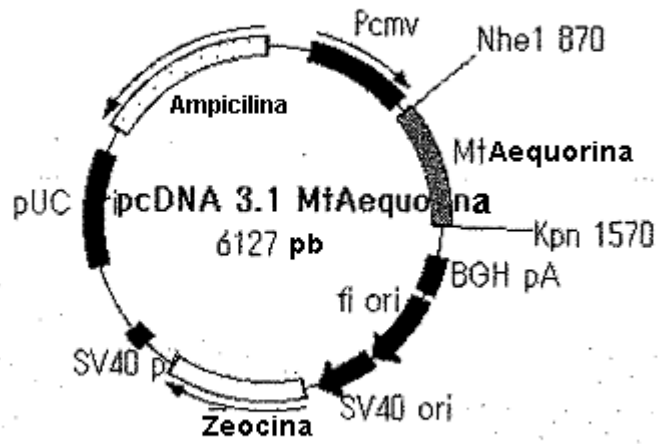


Figura 20

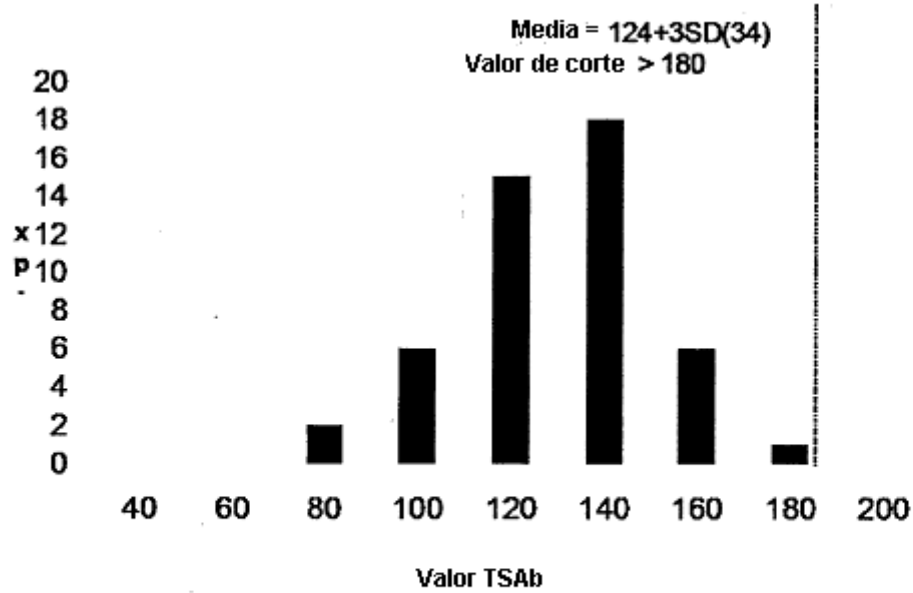


Figura 21

