

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. April 2007 (05.04.2007)

PCT

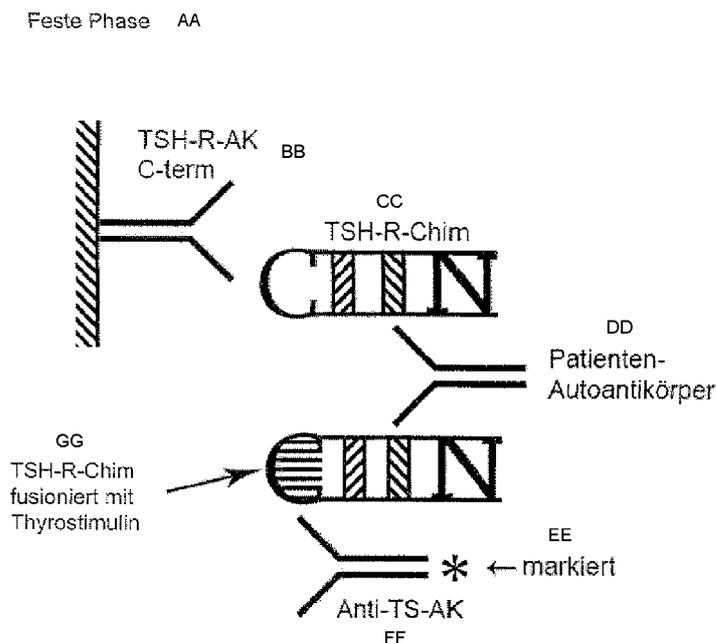
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2007/036511 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation:
G01N 33/76 (2006.01) C07K 14/72 (2006.01)
G01N 33/564 (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2006/066719
- (22) Internationales Anmeldedatum:
25. September 2006 (25.09.2006)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2005 046 022.4
26. September 2005 (26.09.2005) DE
- (71) Anmelder und
(72) Erfinder: LOOS, Ulrich [DE/DE]; Otto Elsässer Weg 9,
89081 Ulm (DE).
- (74) Anwalt: COHAUSZ & FLORACK; Bleichstrasse 14,
40211 Düsseldorf (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR DETECTING AUTOIMMUNE ANTIBODIES AGAINST TSH RECEPTORS AND NOVEL TSH-RECEPTOR CHIMAERAS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON AUTOIMMUNANTIKÖRPERN GEGEN DEN TSH-REZEPTOR UND NEUE TSH- REZEPTORCHIMÄREN



AA ... SOLID PHASE
BB ... TSH-R-ABC-TERM
CC ... TSH-R CHIM
DD ... PATIENT AUTOANTIBODIES
EE ... MARKED
FF ... ANTI-TS-AB
GG ... TSH-R CHIM MERGED WITH THYREOSTIMULINE

(57) Abstract: The invention relates to a method for identifying autoimmune antibodies against TSH receptors with the aid of TSH receptor chimaeras, which, preferably, contain chimaeras which are embodied only in the form of the modified extracellular fraction of a TSH savage-type receptor and are modified by highly immunogenic peptide groups or by detection of suitable enzymes, wherein the inventive determining method makes it possible to easily detecting stimulating, blocking and neutral autoimmune antibodies.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben werden Verfahren zum Nachweis von Autoimmunantikörpern gegen den TSH-Rezeptor unter Einsatz von TSH-Rezeptorchimären, die vorzugsweise nur den als Chimere modifizierten Extrazelluläranteil des TSH-Widtyprezeptors enthalten und durch hoch immunogene Peptidreste oder durch zur Detektion geeignete Enzyme modifiziert sind, wobei die beschriebenen Bestimmungsverfahren einen einfachen Nachweis stimulierender, blockierender und neutraler Autoimmunantikörper ermöglichen.

WO 2007/036511 A1



TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

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

Verfahren zum Nachweis von Autoimmunantikörpern gegen den
TSH-Rezeptor und neue TSH-Rezeptorchimären

TECHNISCHES GEBIET DER ERFINDUNG

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Bestimmung unterschiedlicher Typen von Autoantikörpern gegen den Rezeptor für das Thyroid stimulierende Hormon (TSH-Rezeptor) mit hoher Spezifität und in diesem Verfahren als Bindungsreakgenz verwendbare neue TSH-Rezeptorchimären.

TECHNOLOGISCHER HINTERGRUND DER ERFINDUNG

Der TSH-Rezeptor (TSH-R) spielt eine Schlüsselrolle für die Funktion und das Wachstum von Schilddrüsenzellen. Dieser Rezeptor ist ein Glied einer Unterfamilie der G-Protein gekoppelten Glycoproteinrezeptoren, die außerdem insbesondere noch die Rezeptoren für das luteinisierende Hormon/Choriongonadotropin (LH/CGR) und das Follikel stimulierende Hormon (FSHR) umfasst. Die Rezeptoren dieser Unterfamilie weisen eine große N-terminale extrazelluläre Domäne auf, die für die Ligandenbindung von essentieller Bedeutung ist und für die gezeigt wurde, dass sie an der Signalübermittlung beteiligt ist. Die Übermittlung des TSHR-Signals wird überwiegend durch Aktivierung von Adenylatzyklase vermittelt, was zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Niveaus führt.

Ein Teil des großen Interesses an dem TSH-Rezeptor ist auf seine Rolle als primäres Autoantigen bei Schilddrüsen-Autoimmunkrankheiten zurückzuführen, die vom Auftre-

ten von Autoantikörpern gegen den TSH-Rezeptor begleitet sind. Zu derartigen Schilddrüsen-Autoimmunerkrankungen gehören insbesondere die Basedowsche Krankheit, eine zu Schilddrüsenüberfunktion führende Autoimmunerkrankung, die zu den häufigsten menschlichen Autoimmunerkrankungen überhaupt gehört. Die Basedowsche Krankheit wird durch Aktivierung der Adenylatcyclase und resultierenden cAMP-Anstieg verursacht. Dadurch kommt es zur Schilddrüsen-Überfunktion, Kropfbildung und gegebenenfalls Augenveränderungen. Die Autoantikörper gegen den TSH-Rezeptor können auch blockierenden Charakter haben und somit die Adenylatcyclase und das cAMP hemmen. In diesem Falle kommt es zu einer Unterfunktion der Schilddrüse. Ein gleichzeitiges Auftreten von stimulierenden und blockierenden Autoantikörpern bei den betroffenen Patienten ist ebenfalls möglich, wobei der Anteil der stimulierenden Antikörper in der Regel überwiegt.

Zum Nachweis solcher Autoimmunantikörper gibt es seit einiger Zeit einen Bioassay, in dem die cAMP-Zunahme gemessen wird. Dieses Messverfahren ist sehr zeitaufwendig. Darüber hinaus ist der Bioassay nicht zuverlässig, da er falsch positive Ergebnisse liefern kann. Im Rahmen dieser Beschreibung wird diese Art von Messverfahren als Bioassay zur Abgrenzung von den in-vitro-Verfahren zur Bestimmung von Autoimmunantikörpern gegen den TSH-Rezeptor bezeichnet. Bei einem auf dem Markt befindlichen in-vitro-Nachweisverfahren für Autoimmunantikörper wird ein aus Schweineschilddrüsenmembran extrahierter TSH-Rezeptor eingesetzt (erste Generation der in-vitro-Verfahren). In einem anderen Test zum Nachweis von Autoimmunantikörpern gegen den TSH-Rezeptor wird ein humanes vollständiges rekombinantes TSH-Rezeptorprotein (Wildtyp) in einem Kompe-

titionstest eingesetzt (zweite Generation der in-vitro-Verfahren).

Thyroid Vol.7 (1997) 867-877 beschreibt die Epitope für stimulierende und blockierende Antikörper am TSH-Rezeptor. Die Mehrzahl der funktionellen Epitope für stimulierende Antikörper sind im Bereich der Aminosäuren 8 bis 168, diejenigen für die blockierenden Antikörper im Bereich der Aminosäuren 261 bis 370 des Rezeptorproteins. Für Aktivitätsmessungen wird der zuvor genannte Bioassay eingesetzt.

Durch die WO 01/27634 A1 wird erstmalig ein quantitatives Verfahren zum Nachweis von Autoimmunantikörpern unterschiedlicher Spezifität nebeneinander bereitgestellt, das schnell reproduzierbar und mit hoher Genauigkeit durchführbar ist. Zu diesem Zweck werden TSH-Rezeptorchimären eingesetzt, die sich von dem Wildtyp-Rezeptor dadurch unterscheiden, dass einzelne Sequenzen, an denen Autoimmunantikörper binden, ausgetauscht sind durch entsprechende Sequenzen eines anderen Rezeptors aus der Klasse der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Die TSH-Rezeptorchimären basieren auf dem vollständigen TSH-Rezeptorprotein. Allerdings ist der Messaufwand hoch. Das Trennen durch Zentrifugieren macht das Verfahren zu umständlich für eine routinemäßige Nutzung. Auch muss der Test im Eisbad oder bei 4°C durchgeführt werden, da die TSH-Rezeptorchimären nicht sehr stabil sind. Eine entsprechende technische Lehre findet sich in der WO 01/63296 A1, in der die Verwendung einer Sandwich-Technik zur Detektion vorgeschlagen wird. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass in der Regel mit den dort vorgeschlagenen Testmaterialien, die unspezifische Bindung zu hoch ist. Ein Test zum Nachweis von Autoimmunantikörpern auf der Grundlage der Erkennt-

nisse der beiden zuvor genannten Patentanmeldungen ist auf dem Markt nicht erhältlich.

Ein seit einiger Zeit auf dem Markt befindliches Messverfahren zum Nachweis von Autoimmunantikörpern, das den vollständigen unveränderten TSH-Rezeptor in einem Kompetitionssassay einsetzt, wird für die Zwecke dieser Beschreibung als Nachweisverfahren der zweiten Generation bezeichnet. Dieser Test eignet sich zum Nachweis von Morbus Basedow. Nachteilig hingegen ist, dass stimulierende, blockierende und neutrale Autoimmunantikörper nicht zu unterscheiden sind. Ferner werden nicht alle Subtypen erfasst, da das verdrängte TSH nur zu 30 bis 40 % an das Epitop für stimulierende und blockierende Autoantikörper bindet.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

Ausgehend von diesem Stand der Technik liegt der Erfindung die Aufgabe zu Grunde, das aus der WO 01/27634 A1 bekannte Verfahren zu modifizieren, um die Genauigkeit und Aussagekraft dieses Tests noch weiter zu erhöhen und ein solches Verfahren für Automaten nutzbar zu machen.

Gelöst wird diese Aufgabe durch ein Verfahren zur differentiellen Bestimmung unterschiedlicher gegen den TSH-Rezeptor gerichteter Typen von Autoantikörpern in Patientenproben unter Einsatz von TSH-Rezeptor-chimären als Bindungsreagens, in denen die für die Bindung von stimulierenden und/oder blockierenden Autoantikörpern wesentlichen Sequenzen des Rezeptors durch entsprechende, keine Bindung des jeweiligen Typs von Autoantikörpern bewirkende Sequenzen eines anderen Rezeptors ersetzt sind, in dem

man

- (a) die Patientenprobe in Kontakt bringt mit an eine Festphase gebundenen ersten TSH-Rezeptorchimären, wobei ein Autoimmunantikörper mit einem antigenbindenden Fragment an der ersten TSH-Rezeptorchimäre bindet,
- (b) eine zweite, C-terminal modifizierte Rezeptorchimäre hinzufügt, wobei das andere antigenbindende Fragment des Autoimmunantikörpers an der zweiten C-terminal modifizierten TSH-Rezeptorchimäre bindet und schließlich
- (c) einen gegen das modifizierte C-terminale Epitop der zweiten Rezeptorchimäre gerichteten markierten sekundären Antikörper zusetzt, wobei dieser an das modifizierte C-terminale Epitop der zweiten TSH-Rezeptorchimäre bindet und ein nachweisbares Ereignis auslöst, oder eine zweite Rezeptorchimäre einsetzt, die derart markiert ist, das diese durch bekannte Nachweisverfahren detektiert werden kann.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe auch gelöst werden, indem man

- (a) die Patientenprobe in Kontakt bringt mit an eine Festphase adsorbiertem Bindungsmittel, ausgewählt aus Protein A, Protein G und anti-IgG, um ein Binden eines Autoimmunantikörpers aus der Patientenprobe an das Bindungsmittel zu ermöglichen,

- (b) dem Gemisch aus an eine Festphase adsorbiertem Bindungsmittel und Patientenprobe eine TSH-Rezeptorchimäre zusetzt, um ein Binden eines Autoimmunantikörpers an der TSH-Rezeptorchimäre zu ermöglichen,
- (c) dem erhaltenen Reaktionsgemisch einen markierten modifizierten sekundären Antikörper (F(ab)s) zusetzt, um ein Binden des sekundären Antikörpers an der Rezeptorchimäre an einem von dem Epitop, an dem der Autoimmunantikörper bindet, verschiedenen Epitop der Rezeptorchimäre zu ermöglichen und wobei der sekundäre Antikörper derart modifiziert ist, dass er nicht an dem an eine Festphase adsorbierten Bindungsmittel bindet (nur Fab-Regionen) oder in Stufe (b) eine zur Durchführung eines üblichen Nachweises markierte TSH-Rezeptorchimäre einsetzt.

Gegenstand der Erfindung sind ferner TSH-Rezeptorchimären, in denen die für die Bindung von stimulierenden und/oder blockierenden Autoantikörpern wesentlichen Sequenzen des Rezeptors durch entsprechende, keine Bindung des jeweiligen Typs von Autoantikörpern bewirkende Sequenzen eines anderen Rezeptors ersetzt sind und die TSH-Rezeptorchimären trunkiert sind und daher weder den Membranteil noch den Intrazelluläranteil des TSH-Rezeptorproteins enthalten.

BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

Abb. 1 zeigt schematisch eine erfindungsgemäße Verfahrensweise.

Abb. 2 zeigt schematisch eine weitere erfindungsgemäße Verfahrensweise.

- Abb. 3 zeigt schematisch eine weitere erfindungsgemäße Verfahrensweise.
- Abb. 4 zeigt schematisch eine weitere erfindungsgemäße Verfahrensweise.
- Abb. 5 zeigt schematisch eine weitere erfindungsgemäße Verfahrensweise.
- Abb. 6 zeigt eine nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltene Standardkurve mit NIBSC (WHO)-Standardlösungen von TSH-Autoimmunantikörpern.
- Abb. 7 zeigt ein Interassay-Präzisionsprofil, erstellt mit dem WHO-Standard 90/672 bei n=5 aus Dreifachbestimmungen pro Test.
- Abb. 8 zeigt einen Vergleichs der Messergebnisse, die an Patientenseren mit dem erfindungsgemäßen Verfahren und mit einem Test der so genannten zweiten Generation erzielt wurden.

Sequenz Nr. 1 zeigt die Nukleotidsequenz einer trunkierten TSH-Rezeptorchimäre B (Extrazelluläranteil) fusioniert mit der sekretorischen alkalischen Phosphatase.

Sequenz Nr. 2 zeigt die Aminosäuresequenz einer trunkierten TSH-Rezeptorchimäre B (Extrazelluläranteil) fusioniert der sekretorischen alkalischen Phosphatase.

Sequenz Nr. 3 zeigt die Nukleotidsequenz eines Fusionsproteins aus einer trunkierten TSH-Rezeptorchimäre B (Extrazelluläranteil) fusioniert mit einem immunogenen Epitop.

Sequenz Nr. 4 zeigt die Aminosäuresequenz eines Fusionsproteins aus einer trunkierten TSH-Rezeptorchimäre B (Extrazelluläranteil) fusioniert mit einem immunogenen Epitop.

Sequenz Nr. 5 zeigt die Nukleotidsequenz eines Fusionsproteins aus einer trunkierten TSH-Rezeptorchimäre A (Extrazelluläranteil) fusioniert mit dem sekretorischen Signalpeptid der sekretorischen alkalischen Phosphatase (SEAP) und der SEAP.

Sequenz Nr. 6 zeigt die Aminosäuresequenz eines Fusionsproteins aus einer trunkierten TSH-Rezeptorchimäre A (Extrazelluläranteil) fusioniert mit dem sekretorischen Signalpeptid der SEAP und der SEAP.

Sequenz Nr. 7 zeigt die Nukleotidsequenz eines Fusionsproteins aus einer trunkierten TSH-Rezeptorchimäre A (Extrazelluläranteil) fusioniert mit einem hoch immunogenen Epitop für einen polyklonalen Antikörper.

Sequenz Nr. 8 zeigt die Aminosäuresequenz eines Fusionsproteins aus einer trunkierten TSH-Rezeptorchimäre A (Extrazelluläranteil) fusioniert mit einem hochimmunogenen Epitop für einen polyklonalen Antikörper.

Sequenz Nr. 9 zeigt die Nukleotidsequenz eines Fusionsproteins aus einer trunkierten TSH-Rezeptorchimäre B (Extrazelluläranteil) fusioniert mit einer gLUC-Signalpeptidsequenz und einer Gausia Luciferasesequenz.

Sequenz Nr. 10 zeigt die Aminosäuresequenz eines Fusionsproteins aus einer trunkierten TSH-Rezeptorchimäre B (Extrazelluläranteil) fusioniert mit einer gLUC-Signalpeptidsequenz und einer Gausia Luciferasesequenz.

Die erfindungsgemäß eingesetzten TSH-Rezeptorchimären sind solche, bei denen Teile der Aminosäuresequenz durch

vergleichbare Sequenzen eines anderen Rezeptors mit einem anderen Bindungsverhalten gegenüber TSH-Rezeptorautoimmunantikörpern, insbesondere nicht bindende Sequenzen, ersetzt sind. Solche vergleichbaren Sequenzen können beispielsweise Sequenzen eines Ratten LG-CG-Rezeptors sein. Ausgetauscht wurden bei den erfindungsgemäß eingesetzten Rezeptorchimären folglich die Epitope, an denen stimulierende und/oder blockierende Autoimmunantikörper binden. Bei den TSH-Rezeptorchimären, an denen neutrale Autoimmunantikörper binden, wurden folglich die Epitope für stimulierende und für blockierende Autoimmunantikörper ausgetauscht. Diese Rezeptorchimären können gemäß Biochem. Biophys. Res. Commun. (1991), 179:70-77 oder WO 01/27634 konstruiert werden. Auf beide Dokumente wird für die Zwecke der Offenbarung dieser Erfindung Bezug genommen.

Erfindungsgemäß können also die TSH-Rezeptorchimären A, B und C unterschieden werden. Bei der Chimäre A können vorzugsweise die TSH-Rezeptoraminosäuren 8 bis 165 durch im Wesentlichen die vergleichbaren Aminosäuren 10 bis 166 des LH-CGR ersetzt sein. Bei der Chimäre B können vorzugsweise die TSH-Rezeptoraminosäuren 261 bis 370 durch im Wesentlichen die entsprechenden Aminosäuren 261 bis 329 eines Ratten-LH-CGR ersetzt sein. Bei der Chimäre C können sowohl die Aminosäuren 8 bis 165 als auch die Aminosäuren 261 bis 370 des TSH-Rezeptors durch entsprechende LH-CGR-Aminosäuren ersetzt sein.

Mit der TSH-Rezeptorchimäre A werden blockierende Autoimmunantikörper, mit der Chimäre B stimulierende Autoimmunantikörper und mit der Chimäre C neutrale Autoimmunantikörper aus einer Patientenprobe nachgewiesen.

Der TSH-Rezeptor erstreckt sich vom Cytosol durch die Zellmembran in den Extrazellulärraum. Der extrazelluläre Anteil des Rezeptorproteins weist die Bindungsstellen für TSH und die Autoimmunantikörper auf. Überraschend wurde festgestellt, dass ein trunkiertes TSH-Rezeptorpeptid, welches im Wesentlichen nur den extrazellulären Anteil des TSH-Rezeptorproteins aufweist stabil gelagert werden kann, ohne dass die Fähigkeit zur Bindung von TSH verloren geht. Dasselbe wurde auch für die Fähigkeit zur Bindung von Autoimmunantikörpern erkannt.

Vorzugsweise ist die erfindungsgemäß eingesetzte TSH-Rezeptorchimäre A, B oder C nur der extrazelluläre Teil der jeweiligen TSH-Rezeptorchimäre (trunkierte TSH-Rezeptorchimäre). Das gilt für die so genannte erste im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzte TSH-Rezeptorchimäre als auch für die so genannte zweite zusätzlich eingesetzte TSH-Rezeptorchimäre. Dieser extrazelluläre Anteil der TSH-Rezeptorchimäre kann im Wesentlichen ein Peptid von 1 bis 418 Aminosäuren umfassen. Das entspricht den Aminosäuren 1 bis 418 des extrazellulären Teils des Wildtyp-TSH-Rezeptors. Den bevorzugt eingesetzten trunkierten TSH-Rezeptorchimären A, B und C fehlt es somit im Wesentlichen an dem Cytosol- und dem Membrananteil der bekannten TSH-Rezeptorchimären. Die trunkierten TSH-Rezeptorchimären lassen sich wesentlich einfacher als die bisher bekannten vollständigen TSH-Rezeptorchimären in den erfindungsgemäßen Nachweisverfahren einsetzen.

Vorzugsweise sind die erfindungsgemäßen TSH-Rezeptorchimären A, B und C also solche, denen der Cytosolanteil und im wesentlichen der Membrananteil des TSH-Wildtyprezeptors fehlt. Der Extrazelluläranteil des Wildtyp-TSH-

Rezeptors ist in diesen Fällen als Chimäre A, B oder C, wie zuvor beschrieben, ausgebildet.

Besonders vorteilhaft an diesen trunkierten TSH-Rezeptorchimären ist, dass bei deren Produktion in rekombinierten Zellen, die trunkierten TSH-Rezeptorchimären A, B und C in den Extrazellulärraum sezerniert werden, wenn Signalpeptide bzw. die entsprechende Nukleotidsequenz von beispielsweise der alkalischen Phosphatase oder des Transthyretins vor die TSH-Rezeptorchimär-Nukleotidsequenz insertiert sind. Es ist dann kein Aufschluss der Zellen zur Gewinnung der TSH-Rezeptorchimären A, B oder C erforderlich. Besonders bevorzugt ist das Signalpeptid des Enzyms Transthyretin. Unter Signalpeptid wird in dieser Erfindungsbeschreibung ein Peptidrest verstanden, der wenigstens die für die Sekretion der trunkierten Rezeptorchimären aus der Zelle erforderlichen Aminosäuren aufweist.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Signalpeptid Bestandteil der TSH-Rezeptorchimären und zusätzlich kann ein für Detektionszwecke nutzbares Enzym mit seiner sekretorischen Signalpeptidsequenz in der TSH-Rezeptorchimäre enthalten sein.

In einer Ausführungsform der Erfindung kann die erste, an eine Festphase gebundene TSH-Rezeptorchimäre an ihrem C-terminalen Ende fusioniert sein mit einem Peptid. Ein solches Peptid ist beispielsweise eine hochimmunogene Teilsequenz des Peptids Thyrostimulin oder aus dem C-Terminus des TSH-Rezeptors. In diesem Fall ist der die erste TSH-Rezeptorchimäre an der Festphase immobilisierende Antikörper ein gegen dieses Peptid gerichteter mo-

noklonaler oder polyklonaler Antikörper, beispielsweise ein gegen Thyrostimulin gerichteter Antikörper.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann eine so genannte zweite TSH-Rezeptorchimäre am C-terminalen Ende derart modifiziert sein, dass ein spezifisches Binden der zweiten TSH-Rezeptorchimäre an dem immobilisierten Antikörper, an den bereits eine erste TSH-Rezeptorchimäre C-terminal gebunden hat, vermieden wird. Dadurch werden Probleme wie unspezifische Bindungen, die bei einem Brückenassay auftreten können, unterdrückt. Der Einsatz dieser zweiten derart modifizierten Rezeptorchimäre dient der weiteren Erhöhung der Spezifität und der Sensitivität des Verfahrens.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann die zuvor beschriebene modifizierte zweite TSH-Rezeptorchimäre an ihrem C-terminalen Ende mit einem hochimmunogenem Peptid fusioniert sein. Ein solches kann ausgewählt sein aus einer Teilsequenz von Thyrostimulin oder dem C-terminalen Ende des TSH-Rezeptors. Eine solche Teilsequenz kann dem cytosolischen Teil des TSH-Rezeptors entnommen sein, beispielsweise codiert durch die Nukleotide 743 bis 763 des TSH-Rezeptors. Auch eine derart erhaltene zweite TSH-Rezeptorchimäre weist den Vorteil auf, dass ein Binden der zweiten TSH-Rezeptorchimäre an dem immobilisierten Antikörper, an dem bereits eine erste TSH-Rezeptorchimäre C-terminal gebunden hat, vermieden wird. Durch die Präsentation eines hochimmunogenen Peptidrests kann ein zweiter markierter Antikörper einfach und spezifisch gebunden werden. Durch die Fusion mit einer Teilsequenz des Peptids Thyrostimulin ergibt sich derselbe Vorteil. Antikörper gegen hochimmunogene Peptidsequenzen weisen eine hohe Bindungsaffinität auf. Folglich wird eine hohe Spe-

zifität der Bindung erreicht, wohingegen unspezifische Bindungen weitgehend verringert werden.

Die erfindungsgemäß eingesetzte erste oder zweite TSH-Rezeptorchimäre kann zur Detektion modifiziert sein. Diese Modifizierung kann eine Markierung zur Detektion sein oder eine Markierung durch eine immunogene Peptidsequenz, die durch einen zur Detektion geeigneten sekundären Antikörper erkannt wird.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren können die so genannten ersten TSH-Rezeptorchimären A, B und C an einer festen Phase gebunden sein. Die Bindung der TSH-Rezeptorchimären an der festen Phase kann in diesem Fall über einen immobilisierenden Antikörper erfolgen, der beispielsweise gegen ein C-terminales Epitop der TSH-Rezeptorchimären gerichtet ist. Ein solcher Antikörper kann ein polyklonaler oder monoklonaler Antikörper sein.

Zum Nachweis des Bindens eines Autoimmunantikörpers an einer der TSH-Rezeptorchimären A, B oder C kann ein sekundärer Antikörper eingesetzt werden. Der sekundäre Antikörper kann zusätzlich zu dem immobilisierenden Antikörper vorhanden sein. Er kann ein monoklonaler oder ein polyklonaler Antikörper sein. In solchen Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens, in denen der Autoimmunantikörper an Protein A, G oder an Anti-IgG bindet, wird der Fc-Teil des sekundären Antikörpers zur Erhöhung der Spezifität und der Sensitivität des Tests entfernt sein. Dadurch wird ein Binden dieses sekundären Antikörpers an Protein A, G oder Anti-IgG vermieden. Die Erzeugung solcher Antikörper ist bekannt und beispielsweise beschrieben in Journal of Immunological Methods,

138 (1991), 111-119. Auf dem Markt ist der Kit ImmunoPure[®] F(ab')₂ Preparation Kit von der Pierce Biotechnology Inc., Rockford, Il. 61105/US als Werkzeug zur Abtrennung des Fc-Teils eines Antikörpers erhältlich. Bei diesem Verfahren wird immobilisiertes Pepsin zum Abtrennen des FC-Teils des Antikörpers eingesetzt. Eine anschließende Reaktion mit 5,5-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB), gefolgt von der Fusion mit einem Peptid, das weder an Protein A noch an Protein G bindet. Eine solche Fusion ist beispielsweise beschrieben in Science 241 (1988), 1353. Auf die zuvor genannten Dokumente wird für die Zwecke der Beschreibung der vorliegenden Erfindung Bezug genommen.

Die erfindungsgemäß eingesetzten TSH-Rezeptorchimären, erste oder zweite TSH-Rezeptorchimäre, können je nach gewünschtem Assaydesign markiert sein. Eine direkte Markierung im Sinne der Erfindung ist eine Markierung der TSH-Rezeptorchimären. Eine indirekte Markierung im Sinne der Erfindung ist der Einsatz eines sekundären markierten Antikörpers. Die Markierungen können derart sein, dass sie unmittelbar oder mittelbar ein nachweisbares Signal liefern.

Markierungsmittel können durch Fusion oder chemische Bindung mit den TSH-Rezeptorchimären oder den sekundären Antikörpern verbunden sein. Vorzugsweise sind die Markierungsmittel N-terminal zu der TSH-Rezeptorchimären mit dieser fusioniert.

Geeignete Markierungen erfolgen beispielsweise durch Enzyme wie alkalische Phosphatase (AP), sekretorische alkalische Phosphatase (SEAP), Leuchtkäfer-Luciferase und Peroxidase oder einen Farbstoff wie einen Acridinfarbstoff,

ein fluoreszierendes oder bio-/chemieluminiszierendes Material. Im Falle der zuvor genannten Enzyme ist die dafür codierende Nukleotidsequenz vorzugsweise mit der Nukleotidsequenz der TSH-Rezeptorchimären fusioniert. Geeignete Markierungen erfolgen beispielsweise ferner durch FITC, Biotinylierung und Streptavidin.

Gemäß weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann Protein A, G oder ein Anti-IgG an einer Festphase zur Bindung eines Autoimmunantikörpers immobilisiert sein.

Geeignete feste Phasen umfassen Kunststoffkörper, wie Kunststoffröhrchen, Kunststoffplättchen und magnetische und nichtmagnetische Kunststoffpartikel. Für die erfindungsgemäß eingesetzten festen Phasen geeignete Kunststoffe sind solche, die das Binden von Proteinen durch chemische oder physikalische Reaktion ermöglichen. Diese umfassen Kügelchen, Mikrotiterplatten und Tubes, welche aus Polystyrol, Polyethylen oder anderen bekannten polymeren Materialien bestehen können. Solche feste Phasen sind dem Fachmann bekannt und im Handel erhältlich.

Die erfindungsgemäßen trunkierten TSH-Rezeptorchimären können lyophilisiert gelagert werden. Sie können über einen monoklonalen oder polyklonalen Antikörper an eine Festphase gebunden in lyophilisierter Form gelagert werden. Für die Nachweisreaktion erfolgt eine Rekonstitution der lyophilisierten Komponenten durch Lösen in einem Assaypuffer.

Die erfindungsgemäßen trunkierten TSH-Rezeptorchimären besitzen in gelöster Form eine hohe Stabilität. Sie bleiben bei 4°C 4 bis 7 Tage, bei 24°C 3 bis 6 Tage und bei

37°C 24 Stunden lang stabil. Diese Bedingungen eignen sich für die Durchführung des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens auch auf Automaten, auf denen die Komponenten bei 4°C gelagert werden, während die Versuchsreaktion problemlos bei 37°C ablaufen kann. Demgegenüber bleibt die vollständige TSH-Rezeptorchimäre bei 4°C 3 bis 6 Tage, bei 24°C 24 bis 48 Stunden und bei 37°C nur 3 Stunden lang stabil.

Bei der Bestimmung von TSH-Autoantikörpern im Serum von Patienten mit Morbus Basedow nach dem erfindungsgemäßen Verfahren konnten gute Werte für den Interassay-Variationskoeffizient von 4 bis 12 % ermittelt werden. Die Intraassay-Präzision liegt deutlich unter 10 %. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich ausgezeichnet zum automatisierten Nachweis von Autoimmunantikörpern in Patientenproben. Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird jeweils eine Patientenprobe mit einer der drei TSH-Rezeptorchimären umgesetzt und auf den entsprechenden Autoimmunantikörper untersucht.

Beispielhafte Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Verfahren werden nachfolgend unter Bezugnahme auf die Abbildungen beschrieben.

Abb. 1 zeigt eine Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, in der eine an eine Festphase gebundene trun-kierten TSH-Rezeptorchimäre mit einer Patientenprobe in Kontakt gebracht worden ist. Ein Autoimmunantikörper hat an dem entsprechenden Epitop der TSH-Rezeptorchimäre gebunden. Dem Reaktionsgemisch wird dann eine zweite Rezeptorchimäre zugesetzt, die am C-Terminus durch ein hochimmunogenes Peptid modifiziert ist. Das zweite noch freie Epitop im Fab-Teil des Patienten-Autoimmunantikörpers

bindet dann an der zweiten Rezeptorchimäre. Der Nachweis des Autoimmunantikörpers erfolgt mit einem sekundären markierten Antikörper, der am hoch immunogenen Peptid des C-Terminus der zweiten TSH-Rezeptorchimäre bindet.

In der Ausführungsform der Abb. 2 setzt man als zweite trunkierte TSH-Rezeptorchimäre eine solche ein, die an ihrem C-terminalen Ende mit einem Markierungsmittel modifiziert ist. In diesem Fall kann auf einen sekundären markierten Antikörper verzichtet werden.

In der Abb. 3 ist eine Verfahrensführung gezeigt, in der der immobilisierende Antikörper ein Antikörper ist, der gegen das Peptid Thyrostimulin gerichtet ist. Die erste TSH-Rezeptorchimäre ist eine trunkierte Rezeptorchimäre, die an ihrem C-terminalen Ende mit dem Peptid Thyrostimulin fusioniert ist. Die zweite TSH-Rezeptorchimäre umfasst ebenfalls nur den extrazellulären Teil der Rezeptorchimäre und ist an ihrem C-terminalen Ende markiert. Der Autoimmunantikörper bindet sowohl an der ersten als auch an der zweiten TSH-Rezeptorchimäre.

Abb. 4 zeigt eine erfindungsgemäße Verfahrensweise, in der Protein A, G oder ein Anti-IgG an einer Festphase immobilisiert ist und mit einer Patientenprobe in Kontakt gebracht worden ist. Der Patienten-Autoimmunantikörper bindet mit seinem Fc-Teil an Protein A, G oder Anti-IgG. Nach Zugabe einer TSH-Rezeptorchimäre wird der Patienten-Autoimmunantikörper mit seinem Fab-Stück an dem entsprechenden Epitop der TSH-Rezeptorchimäre binden. Zum Nachweis des Bindens wird ein sekundärer markierter Antikörper eingesetzt, der keine Fc-Region aufweist, damit eine Bindung an Protein A, G oder Anti-IgG unterdrückt wird.

Alternativ kann, wie in der Abb. 5 gezeigt, eine Markierung am C-terminalen Ende der TSH-Rezeptorchimäre erfolgt sein. So kann der Autoimmunantikörper durch eine entsprechende Nachweisreaktion mit der TSH-Rezeptorchimäre nachgewiesen werden.

Es ist auch möglich, aus einer Patientenprobe den Nachweis auf das Vorhandensein von mehreren TSH-Autoimmunantikörpern zu führen. Zu diesen Zweck kann beispielsweise zuerst mit Chimäre A oder C der Nachweis blockierender oder neutraler TSH-Autoimmunantikörper durchgeführt werden. In einem weiteren Testlauf wird derselben Patientenprobe Chimäre B zugesetzt und nach dem erfindungsgemäßen Verfahren vorgegangen.

Beispielhafte erfindungsgemäße TSH-Rezeptorchimären B und A werden anschließend erläutert.

In Sequenz Nr. 1 bzw. 2 (TSH-Rezeptorchimäre B) stehen die

- Nukleotide 1 bis 51 (Aminosäuren 1-17) für die SEAP-Signalpeptidsequenz,
- Nukleotide 52 bis 1557 (Aminosäuren 18-519) für die SEAP-Sequenz,
- Nukleotide 1558 bis 2280 (Aminosäuren 520-760) für die TSHR-Sequenz der Aminosäuren 21 bis 261 der Chimäre),
- Nukleotide 2281 bis 2298 (Aminosäuren 760-766) für die LHR-Sequenz der Aminosäuren 261 bis 266 der Chimäre),
- Nukleotide 2299 bis 2316 (Aminosäuren 767-772) für 6 Histidine und TAA das Stoppkodon.

In Sequenz Nr. 3 bzw. 4 (TSH-Rezeptorchimäre B) stehen die

- Nukleotide 1 bis 60 (Aminosäuren 1-20 für die TSHR-Signalpeptidsequenz,
- Nukleotide 61 bis 783 (Aminosäuren 21-261) für die TSHR-Sequenz der Aminosäuren 21 bis 261 der Chimäre,
- Nukleotide 784 bis 846 (Aminosäuren 262-283) für ein hoch immunogenes Epitop.

In Sequenz Nr. 5 bzw. 6 (TSH-Rezeptorchimäre A) stehen die

- Nukleotide 1 bis 51 (Aminosäuren 1-17) für die SEAP-Signalpeptidsequenz,
- Nukleotide 52 bis 1557 (Aminosäuren 18-519) für die SEAP-Sequenz
- Nukleotide 1561 bis 1998 (Aminosäuren 521-686) für die Aminosäuren 21 bis 166 der LHR-Sequenz der Chimäre,
- Nukleotide 1999 bis 2283 (Aminosäuren 687-781) für die Aminosäuren 166 bis 370 der TSHR-Sequenz (zwischen den Epitopen A und B),
- Nukleotide 2284 bis 2553 (Aminosäuren 782-891) für die Aminosäuren 261 bis 370 des Epitops der Chimäre, wo blockierende TSH-Autoimmunantikörper binden.

In der Sequenz 6 bzw. 7 stehen die

- Nukleotide 1 bis 60 (Aminosäuren 1-20) für die TSHR/LHR-Signalpeptidsequenz,
- Nukleotide 61 bis 498 (Aminosäuren 21-166) für die Aminosäuren 21 bis 166 der LHR-Sequenz,
- Nukleotide 499 bis 783 (Aminosäuren 167-261) der Aminosäuren 166 bis 370 des TSH-Rezeptors,
- Nukleotide 784 bis 1113 (Aminosäuren 262-371) für die Aminosäuren 261 bis 370 des Epitops der Chimäre, wo blockierende TSH-Autoimmunantikörper binden,
- Nukleotide 1114 bis 1176 (Aminosäuren 372-392) für ein hochimmunogenes Epitop aus dem cytosolischen Teil des

TSH-Rezeptors (codiert durch die Nukleotide 743-763 des TSH-Rezeptors).

In der Sequenz 9 bzw. 10 stehen die

- Nukleotide 1 bis 53 (Aminosäuren 1-18) für die gLUC-Signalpeptidsequenz,
- Nukleotide 54 bis 561 (Aminosäuren 19-187) für die Gaussia luciferasesequenz,
- Nukleotide 562 bis 1281 (Aminosäuren 188-427) für die Aminosäuren 21 bis 261 des TSH-Rezeptors,
- Nukleotide 1282 bis 1302 (Aminosäuren 428-434) für die Aminosäuren 261 bis 266 der LHR-Sequenz in der Rezeptorchimäre und die restlichen Nukleotide für 6 Histidine und das Stoppkodon.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter erläutert.

Beispiele

Materialien

Das Plasmid pcDNA3-rLHR (B9) wurde von Dr. D.L. Segaloff (The University of Iowa, USA) zur Verfügung gestellt. Das Plasmid pSP-luc-NF wurde von der Promega GmbH (Heidelberg, Deutschland) erworben. Als ECL Western-Blot-Kit und cAMP-RIA-Kit wurden Kits der Amersham GmbH (Braunschweig, Deutschland) verwendet.

Eingesetzt wurden pIRESneo - Expression Vector, pSEAP2-Basic von CLONTECH Laboratories, Inc, Palo Alto, CA USA, Gaussia Luciferase von P.J.K. GmbH, Kleinbittersdorf, Deutschland, Alkaline Phosphatase E. coli von Laboratory voor Monoklonale antistoffen (LMA), Wageningen, Nieder-

lande, Horseradish Peroxidase von *Armoracia rusticiana*, SYNTHETIC GENE, British Bio-Technology Ltd, UK, h-Thyrostimulin: Nakabayashi et al „Thyrostimulin, a heterodimer of two new human glycoprotein hormone subunits, activates the tyroid-stimulating hormone receptor“, J. Clin. 109 (11), 1445-1452.

Die DNA-Primer

P1 (5'-GTCATGCATCAGCTGCTGGTGCTGGCAGTG-3')
P2 (5'-GTCGACGTCGTTATGTGTAAGTTATCACAG-3')
P3 (5'-GTCCTTAAGAAAACACTGCCCTCCAAAGAAAA-3'9
P4 (5'-ATCGAGCTCTTCATTCTCCTCAAAGATGGC-3')
P5 (5'-TACGATATCGGAATGGGGTGTTCGTCT-3')
P6 (5'-TATGGATCCTTATTTGGAGGGCAGTGT-3')
P7 (5'-TACGATATCATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGGC-3')
P8 (5'-TACAGCGCTTGTCTGCTCGAAGCGGCC-3')

wurden von der Firma Interactiva (Ulm, Deutschland) bezogen.

Zellkultur

HEK293-Zellen wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium, das mit 10 % fötalem Rinderserum ergänzt war, gezüchtet. Die Zellen wurden in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre bei 37 °C kultiviert.

Konstruktion von TSHR/LH-CGR-Chimären

Drei unterschiedliche Chimären des humanen TSHR, bei dem Teilsequenzen durch entsprechende Sequenzen eines Ratten-LH-CGR ersetzt waren, wurden gemäß der Beschreibung in Biochem Biophys Res Commun. (1991), 179: 70-77 konstruiert. Bei einer der Chimären, die nachfolgend als "Chimäre A" bezeichnet wird, waren die TSHR-Aminosäuren 8

bis 165 durch die vergleichbaren Aminosäuren 10 bis 166 des LH-CGR ersetzt; bei "Chimäre B" waren die TSHR-Aminosäuren 261 bis 370 durch die vergleichbaren Aminosäuren 261 bis 329 eines Ratten LH-CGR ersetzt, während im Falle der "Chimäre C" sowohl die Aminosäuren 8-165 als auch die Aminosäuren 261 bis 370 durch vergleichbare LH-CGR-Aminosäuren ersetzt waren.

Im Einzelnen wurde dabei von dem Plasmid pcDNA3-rLHR (B9) ausgegangen, das die Sequenz für den Ratten-LH-CGR-Rezeptor enthält. Die DNA-Sequenzen, die für die Aminosäuren 10 bis 165 sowie 261 bis 329 kodierten, wurden nach der PCR-Technik unter Verwendung der Primpaare P1-P2 bzw. P3-P4, die NsiI, AatII, BfrI bzw. SacI-Restriktionsstellen enthielten, vervielfältigt, wodurch man NsiI/AatII bzw. BfrI/SacI-PCR-Fragmente erhielt. Parallel dazu wurde ein pTM1-TSHR-FLAG-6HIS-Plasmid, das gemäß DE 196 45 729 oder Exp Clin Endocrinol Diabetes 5: 282-290 (1997) erhalten worden war, mit PstI-AatII oder BfrI-SacI-Restriktionsendonukleasen verdaut. Die dabei erzeugten Fragmente wurden entfernt und durch die aus dem Ratten-LH-CGR-Rezeptor erhaltenen PCR-Fragmenten ersetzt, wodurch die cDNA-Sequenzen für die unterschiedlichen TSHR/LH-CGR-Chimären A, B und C erhalten werden.

Der Vektor pTM1-TSHR-FLAG-6HIS oder der daraus erhaltene neue Vektor mit der TSHR/LH-CGR-DNA (pTM1-TSHR/LH-CGR) wurde mit Ava I linearisiert und die „klebrigen“ Enden unter der Verwendung von Klenow-Polymerase aufgefüllt. Der Vektor pIRESneo wurde mit Cla I linearisiert und die „klebrigen“ Enden unter der Verwendung von Klenow-Polymerase aufgefüllt. Das für die Expression bestimmte TSHR bzw. TSHR/LH-CGR Fragment wurde unter Verwendung von Bam HI herausgeschnitten und in die Cla I (aufgefüllte

Stelle) / BamH I Stelle des Expressionsvektor pIRESneo subkloniert. So entstehen Expressionsvektoren pIRESneo-TSHR bzw pIRESneo-TSHR/LH-CGR für die Zellentransfektion und Expression der verschiedenen TSH-Rezeptorchimären und auch für Modifikationen der Chimären.

Herstellung des Extrazellulärteils der TSH-Rezeptorchimären

Die TSH-Rezeptorchimäre B (Wildtyp), die in den Expressionsvektor pIRESneo kloniert ist, wird als Template für die Herstellung und Amplifikation der Nukleotidsequenz mit Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für den extrazellulären Teil der TSH-Rezeptorchimäre B benutzt. Die für die PCR erforderlichen beiden Primer enthalten folgende Nukleotidsequenzen: Primer V enthält eine Sequenz von 6 Nukleotiden für das Restriktionsenzym EcoR V und eine Sequenz von 18 Nukleotiden für die N-terminale Peptidsequenz in Chimäre B ohne Signalpeptid. Primer 6 enthält die Nukleotidsequenz für die Aminosäuren 261 bis 266 zusammen mit der Sequenz von 6 Nukleotiden für Bam H1

Insertion der TSH-Rezeptor-Chimäre B Nukleotidsequenz (nur extrazellulärer Teil) in Expressionsvektor

Das gewonnene PCR-Produkt enthält die Nukleotide, die für die Aminosäuren 21 bis 266 codieren. Diese Sequenz wird über EcoR V und Bam I-Schnittstellen in pIRESneo inseriert.

Fusion der Nukleotidsequenzen der extrazellulären TSH-Rezeptorchimäre B und des Enzyms SEAP

Zunächst wurden als Voraussetzung für die anschließende Fusion mit pSEAP-2 die beiden folgenden Primer hergestellt. Primer 7 enthält die Nukleotide für die N-terminale Aminosäuresequenz von SEAP und die Nukleotide

für EcoR V. Primer 8 enthält die Nukleotide für die c-terminale Aminosäuresequenz von SEAP zusammen mit den Nukleotiden von Eco 47III. Hiermit erfolgt die Amplifizierung dieses Templats durch eine Polymerase-Kettenreaktion.

Insertion

Dann erfolgt die Insertion der fusionierten Nukleotidsequenz in pIRESneo-chim B nach dessen Spaltung an der EcoR V-Schnittstelle. Durch Restriktionsanalyse mit dem Enzym EcoR V und Bam HI werden Klone mit der fusionierten Nukleotidsequenz selektiert (nach der Wahrscheinlichkeit werden 50 % der Klone SEAP in falscher Orientierung enthalten sein, die dann bei der Restriktionsanalyse sich durch eine kürzere Länge von der korrekten Fusionsnukleotidsequenz unterscheiden.

Einbau einer sekretorischen Signalpeptidsequenz

Dieser Vorgang erfolgt mit den gleichen gentechnischen Maßnahmen wie oben unter Fusion und Insertion angegeben. Insbesondere wird hier die Signalpeptidsequenz von Transtyretin verwendet, da es eine hohe Sekretionsleistung für das hochmolekulare Globulin Transthyretin bewirkt.

Expression und Gewinnung von Fusionsproteinen TSHR-SEAP bzw. TSHR/LH-CGR-SEAP als Zellextrakt

Konfluente stabile HEK293-Zellen werden in 10-20 75 cm²-Platten (etwa 20 x 10⁶ Zellen) gezüchtet. Nach Abschaben werden die Zellen in eine phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) überführt und viermal mit PBS unter Zentrifugieren bei 2500 U/min gewaschen. Die erhaltenen Zellen wurden in 0,3 ml eines Puffers A (20 mM Hepes-KOH; pH 7,5; 50mM NaCl; 1% Triton X100; 10 % Glycerol) unter Einfrieren und

Auftauen lysiert. Die erhaltene Suspension wurde bei 30.000 G 1 Stunde lang zentrifugiert, der Überstand (etwa 8 mg/ml Gesamtprotein) wurde gesammelt und bei -70 °C aufbewahrt.

Der so erhaltene Überstand (Extrakt) kann in Bestimmungsverfahren als TSHR-SEAP bzw. TSHR/LH-CGR-SEAP eingesetzt werden.

Herstellung von Zellfraktionen

Die HEK193-Zellen werden durch Zentrifugieren bei 1.200 U/min pelletiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 0,3 ml eines Puffers resuspendiert, der in 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 50 mM NaCl, 10 % Glycerol sowie eine Proteaseinhibitorenmischung enthielt. Die Suspension wurde danach bei 4 °C durch 20 Hubbewegungen in einem Glas/Teflon-Homogenisator homogenisiert und dann 15 min bei 800 G und anschließend 1 Stunde lang bei 30.000 G zentrifugiert. Der Überstand (die Cytoplasmafraktion) wurde gesammelt. Das Membranpellet wurde aufgearbeitet, indem es bei 4°C durch 20 Hubbewegungen in eine Glas/Teflon-Homogenisator in 0,3 ml 1 % Triton X100 im gleichen Puffer homogenisiert und dann bei 30.000 G 1 Stunde lang zentrifugiert wurde. Der Überstand (Triton X100-Membranextrakt) wurde gesammelt und bei -70°C aufbewahrt.

Gewinnung der sekretierten extrazellulären Fusions-TSHR-Chimären

Die trunkierten, extrazellulären Domänen der Fusions-TSHR-Chimären werden von den sie exprimierenden Zellen in den Kulturüberstand sekretiert. Die sekretierten Rezeptor-Proteine werden in Form von bestimmten Verdünnungen im Assaypuffer direkt in den Versuch eingesetzt. Zum Beispiel werden 10 µl extrazelluläre SEAP-TSH-R-Chimäre B

aus 5 ml Kulturüberstand in einer Endverdünnung von 1:10 pro Bestimmung benutzt.

Erstellung einer Standarddeichkurve

Zur Erstellung der Standardkurve wurde eine Standardlösung WHO 90/672 mit einer standardisierten Konzentration von Autoimmunantikörper eingesetzt. Die Ausgangslösung des Standards enthält 100 IU/l, die für die Zwecke der Erstellung der Standardkurve verdünnt wurden. Als Nullwert wurde das Serum einer Probanden ohne Autoimmunantikörper in TXBW-Puffer verwendet.

Die eingesetzten TSH-Rezeptor-Chimären B sind fixiert über Antikörper auf Mikrotiterplatten lyophilisiert gelagert und werden vor Gebrauch in Puffer mit Protein stabilisatoren rekonstituiert. Der Triton X-100-Waschpuffer (TXWP) enthält 0,1% TX-100, 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl. Der Serumverdünnungspuffer enthält 5% Glucose und 5% Milchpulver in TXWP.

50 µl Probenlösung (Verdünnungen des Standards und Nullprobe) pro Vertiefung werden mit Verdünnungspuffer 1:2 verdünnt und 90 Minuten lang bei Raumtemperatur (etwa 22°C) auf Mikrotiterplatten inkubiert. Es wird viermal mit je 300 µl TXWP gewaschen. Dann erfolgt die Zugabe von 10 µl einer 1:100-Verdünnung aus 5 ml Kulturüberstand einer Kulturschale eines Durchmessers von 10 cm von extrazellulärer TSH-Rezeptorchimäre, fusioniert mit einem Enzym SEAP, zu 90 µl TXWP. Anschließend wird unter Schütteln (300-400 UpM) 30 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Dann wird viermal mit 300 µl TXWP gewaschen. Die Bio/Chemolumineszenz wird mit dem Centrol® IA LB 296 Mikrotiterplatten-Meßgerät der Berthold GmbH, Bad Wild-

bad, Schwarzwald, Deutschland unter Einsatz von Tropix[®] (Reagenz für ECL (enhanced Chemolumineszenz) von Applied Biosystems, Foster City, CA, USA gemessen.

Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 0,2 IU/l. Es besteht eine polynomische Funktion zwischen relativen Lichteinheiten (RLU=Relative Light Unit und den Konzentrationen des Standards für stimulierende Autoantikörper über einen Bereich, der bis mindestens 40 IU/l reicht.

In der Abb. 6 ist auf der Y-Achse das Verhältnis der relativen Lichteinheit (RLU) der in den Proben der Verdünnungsreihe des TSH-Rezeptor-Autoantikörperstandards gemessenen RLU (B=bound) im Verhältnis jeweils zu dem Nullwert eines Probanden ohne Autoimmunantikörper (B0), dargestellt als B/B0. Auf der X-Achse ist die Verdünnung der Proben des Standards angegeben. Die Messwerte, Mittelwerte aus Doppelbestimmungen, sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben.

IU / L	Verdünnungsfaktor NIBSC (100 IU / L)	RLU Mittelwert n = 3	B/B0	Intraassay- Variationskoeff izient
0,0	—	6.882,3	1,00	0,0
0,1	1000	28.847,7	4,19	4,6
0,2	500	46.607,0	6,77	3,4
0,3	333,3	65.848,3	9,57	5,7
0,4	250	81.488,0	11,84	3,7
0,5	200	98.427,3	14,30	3,8
0,6	166,7	116.567,7	16,94	3,7
0,7	142,9	135.783,7	19,73	2,6
0,8	125	165.778,3	24,09	4,9
0,9	111,1	192.274,7	27,94	2,0
1,0	100	182.910,3	26,58	0,0
2,0	50	382.131,7	55,52	3,3
5,0	20	938.959,7	136,43	0,8
15,0	6,7	2.483.045,7	360,79	0,9
30,0	3,3	3.772.245,0	548,11	2,6
50,0	2	4.845.780,7	704,09	0,2

Vergleich des erfindungsgemäßen Tests mit dem Kompetitionsassay der „zweiten Generation“

Serum- oder Plasmaproben werden innerhalb von 3 Stunden aus venösem Blut gewonnen. Lagerung bei 4°C über einen Zeitraum von 7 Tage oder bei -20°C 1 bis 2 Jahre möglich. Sekundäre Antikörper (siehe oben) werden bei -20°C aufbewahrt und vor dem Einsatz im Test bei Raumtemperatur aufgetaut. TSH-Rezeptorchimären werden auf Mikrotiterplatten lyophilisiert gelagert und vor Gebrauch in Puffer mit Proteinstabilisatoren rekonstituiert. Triton X-100-Waschpuffer (TXWP) enthält 0,1% TX-100, 50 mM Tris/HCl pH

8,0, 100 mM NaCl. Serumverdünnungspuffer enthält 5% Glukose und 5% Milchpulver in TXWP.

50 µl Serum oder Plasma pro Vertiefung werden mit Puffer TXWP 1:2 verdünnt und 90 Minuten lang bei Raumtemperatur (etwa 22°C) auf Mikrotiterplatten inkubiert. Dann erfolgt die Zugabe von 10 µl einer 1:10-Verdünnung aus 5 ml Kulturüberstand einer Kulturschale eines Durchmessers von 10 cm von extrazellulärer TSH-Rezeptorchimäre, fusioniert mit einem Enzym SEAP, zu 90 µl TXWP. Anschließend wird unter Schütteln (300-400 UpM) 30 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Dann wird viermal mit 300 µl TXWP gewaschen. Die Bio/Chemolumineszenz wird mit dem Centrol® IA LB 296 Mikrotiterplatten-Meßgerät unter Einsatz von Tropic® gemessen.

Abb. 8 zeigt vergleichsweise die Messergebnisse, die an Patientenseren mit dem erfindungsgemäßen Verfahren und mit einem Test der so genannten zweiten Generation erzielt wurden. In dem Test der zweiten Generation wurde mit einem vollständigen TSH-Rezeptor - keine Rezeptorchimäre - in einem Kompetitionstest gearbeitet. Dabei wird der TSH-Rezeptor an einer Festphase immobilisiert und mit Probeserum, markiertem TSH in Kontakt gebracht. Die Konzentration des eingesetzten TSH wurde variiert. Autoantikörper verdrängen TSH vom Rezeptor. Die durch die Verdrängung bewirkte Signaländerung wird als Messwert herangezogen.

Das Assaydesign des erfindungsgemäßen Tests war das von Abb. 2. Die Durchführung des Kompetitionsassays erfolgte entsprechend den Anweisungen des eingesetzten Test-Kits TRAK® der B.R.A.H.M.S AG, 16761 Hennigsdorf, Deutschland.

In der Abb. 8 sind die erfindungsgemäß ermittelten internationalen Einheiten pro Liter auf der Y-Achse und diejenigen nach dem Verfahren der zweiten Generation auf der X-Achse des Diagramms angegeben. Die Auswertung zeigt, dass bei insgesamt 41 Patientenseren die sTRAb-Werte in 14 Fällen niedriger sind und in 19 Fällen höher als die TRAK-Werte liegen.

Obwohl die Erfindung vorstehend unter Bezugnahme auf bestimmte Ausführungen beschrieben wurde, sind Änderungen und Abwandlungen möglich, die für den Fachmann offensichtlich sind und die den durch die Ansprüche vorgegebenen Schutzzumfang nicht verlassen.

P A T E N T A N S P R Ü C H E

1. Verfahren zur differentiellen Bestimmung unterschiedlicher gegen den TSH-Rezeptor (TSH-R) gerichteter Typen von Autoantikörpern in einer Patientenprobe unter Einsatz von TSH-Rezeptorchimären als Bindungsreagens für den Autoantikörper, in denen die für die Bindung von stimulierenden und/oder blockierenden Autoantikörpern wesentlichen Sequenzen des Rezeptors durch entsprechende, keine Bindung des jeweiligen Typs von Autoantikörpern bewirkende Sequenzen eines anderen Rezeptors ersetzt sind, **dadurch gekennzeichnet, dass** man

(a) die Patientenprobe in Kontakt bringt mit an eine Festphase gebundenen ersten TSH-Rezeptorchimären, wobei ein Autoimmunantikörper mit einem antigenbindenden Fragment an der ersten TSH-Rezeptorchimäre bindet,

(b) eine zweite, C-terminal modifizierte Rezeptorchimäre hinzufügt, wobei das andere antigenbindende Fragment des Autoimmunantikörpers an der zweiten C-terminal modifizierten TSH-Rezeptorchimäre bindet und schließlich

(c) einen gegen das modifizierte C-terminale Epitop der zweiten Rezeptorchimäre gerichteten markierten sekundärer Antikörper zusetzt, wobei dieser an das modifizierte C-terminale Epitop der zweiten TSH-

Rezeptorchimäre bindet und ein nachweisbares Ereignis auslöst, oder

eine zweite Rezeptorchimäre einsetzt, die derart ausgestattet ist, das diese durch bekannte Nachweisverfahren detektiert werden kann.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, **dass** man als zweite Rezeptorchimäre eine Rezeptorchimäre einsetzt, die an ihrem C-terminalen Ende derart modifiziert ist, dass ein Binden an dem eine Immobilisierung der ersten TSH-Rezeptorchimäre bewirkenden Antikörper ausgeschlossen ist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, **dass** die Modifizierung durch einen Peptidrest erfolgt.
4. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, **dass** der Peptidrest eine hochimmunogene Teilsequenz aus dem Peptid Thyrostimulin oder dem C-Terminus des TSH-Rezeptors ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, **dass** die zweite Rezeptorchimäre am C-terminalen Ende modifiziert und zum Nachweis durch übliche Nachweisverfahren markiert ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, **dass** die erste, an eine Festphase gebundene TSH-Rezeptorchimäre an ihrem C-terminalen Ende fusioniert ist mit einem Peptid.

7. Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, **dass** die erste TSH-Rezeptorchimäre an ihrem C-terminalen Ende fusioniert ist mit einer hochimmunogenen Peptidsequenz aus dem Peptid Thyrostimulin oder dem C-Terminus des TSH-Rezeptors.

8. Verfahren zur differentiellen Bestimmung unterschiedlicher gegen den TSH-Rezeptor (TSH-R) gerichteter Typen von Autoantikörpern in einer Patientenprobe unter Einsatz von TSH-Rezeptorchimären als Bindungsreagens für den Autoantikörper, in denen die für die Bindung von stimulierenden und/oder blockierenden Autoantikörpern wesentlichen Sequenzen des Rezeptors durch entsprechende, keine Bindung des jeweiligen Typs von Autoantikörpern bewirkende Sequenzen eines anderen Rezeptors ersetzt sind, **dadurch gekennzeichnet**, **dass** man
 - (a) die Patientenprobe in Kontakt bringt mit an eine Festphase adsorbiertem Bindungsmittel, ausgewählt aus Protein A, Protein G und anti-IgG, um ein Binden von Autoimmunantikörpern aus der Patientenprobe an das Bindungsmittel zu ermöglichen,

 - (b) dem Gemisch aus an eine Festphase adsorbiertem Bindungsreagenz und Patientenprobe eine TSH-Rezeptorchimäre zusetzt, um ein Binden eines Autoimmunantikörpers an der Rezeptorchimäre zu ermöglichen,

 - (c) dem erhaltenen Reaktionsgemisch einen markierten modifizierten sekundären Antikörper zusetzt, um ein Binden des sekundären Antikörpers an der Rezeptorchimäre zu ermöglichen,

- märe an einem von dem Epitop, an dem der Autoimmunantikörper bindet, verschiedenen Epitop der Rezeptorchimäre zu ermöglichen und wobei der sekundäre Antikörper derart modifiziert ist, dass er nicht an dem an eine Festphase adsorbierten Bindungsreagenz bindet oder
- in Stufe (b) eine zur Durchführung eines üblichen Nachweis markierte TSH-Rezeptorchimäre einsetzt und den Schritt in Stufe (c) unterlässt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet, dass** man als TSHR-Rezeptorchimäre eine trunkierte Rezeptorchimäre A, B oder C einsetzt, die nur den extrazellulären Teil der Rezeptorchimäre A, B oder C umfasst.
10. TSH-Rezeptorchimären, in der die für die Bindung von stimulierenden und/oder blockierenden Autoantikörpern wesentlichen Sequenzen des Rezeptors durch entsprechende, keine Bindung des jeweiligen Typs von Autoantikörpern bewirkende Sequenzen eines anderen Rezeptors ersetzt sind, **dadurch gekennzeichnet, dass** die TSH-Rezeptorchimären trunkiert sind und im Wesentlichen den Membran- und den Cytosolanteil des nativen TSH-Rezeptorproteins nicht umfassen.
11. TSH-Rezeptorchimäre nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet, dass** die trunkierte TSH-Rezeptorchimäre ein Epitop enthält, an dem ein stimulierender oder ein blockierender TSH-Rezeptor-Autoimmunantikörper bindet oder keines dieser beiden Epitope enthält.

12. TSH-Rezeptorchimäre nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet, dass** die TSH-Rezeptorchimäre N-terminal oder C-terminal ein Enzym oder ein anderes signalgebendes Mittel für eine Nachweisreaktion aufweist.
13. TSH-Rezeptorchimäre nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet, dass** das andere signalgebende Mittel eine Acridin- oder Rutheniumverbindung oder Fluorescinsiothiocyanat ist.
14. TSH-Rezeptorchimäre nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Enzym eine sekretorische alkalische Phosphatase, eine Leuchtkäfer- oder Gausialuciferase oder eine Peroxidase ist.
15. TSH-Rezeptorchimäre nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet, dass** die TSH-Rezeptorchimären an ihrem C-terminalen Ende mit einer immunogenen Peptidsequenz fusioniert ist.
16. TSH-Rezeptorchimäre nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet, dass** die TSH-Rezeptorchimären an ihrem C-terminalen Ende mit einer Peptidsequenz des Peptids Thyrostimulin oder ein Peptidsequenz aus dem Cytosollanteil des TSH-Rezeptors fusioniert ist.
17. TSH-Rezeptorchimäre nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet, dass** die TSH-Rezeptorchimären zur Verbesserung ihrer Sekretion aus der Zelle an ihrem N-terminalen Ende mit dem Signalpeptid des Transthyretins oder mindest dem für die Sekretion aus der Zelle er-

forderlichen Peptidrest dieses Signalpeptids fusioniert sind.

Abb. 1

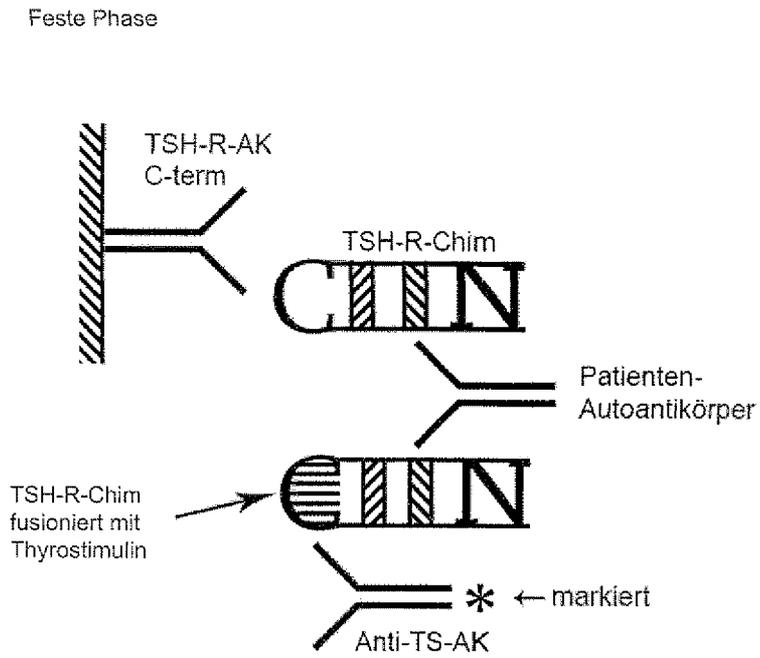


Abb. 2

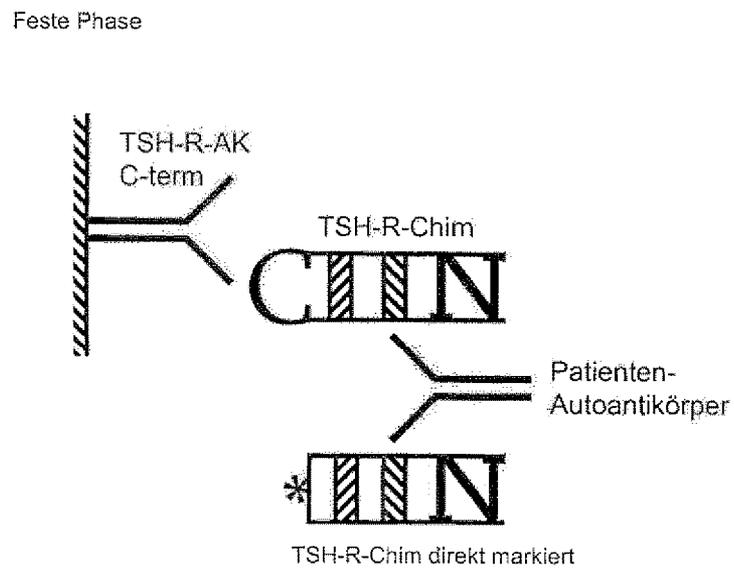


Abb. 3

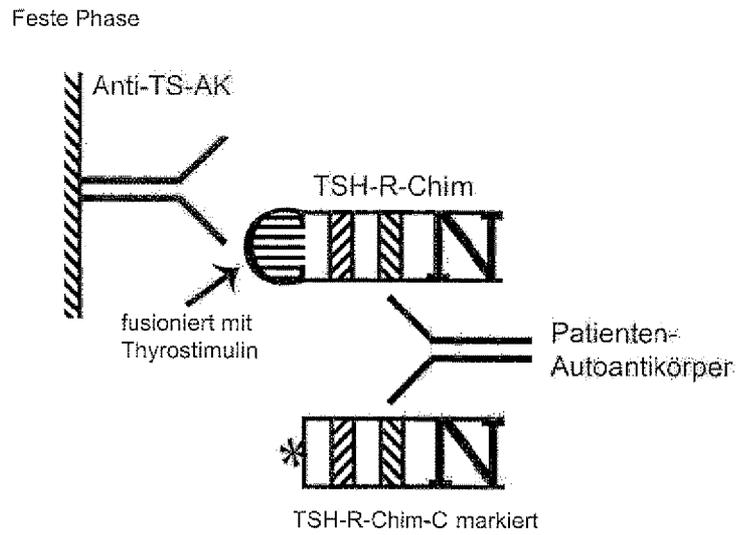


Abb. 4

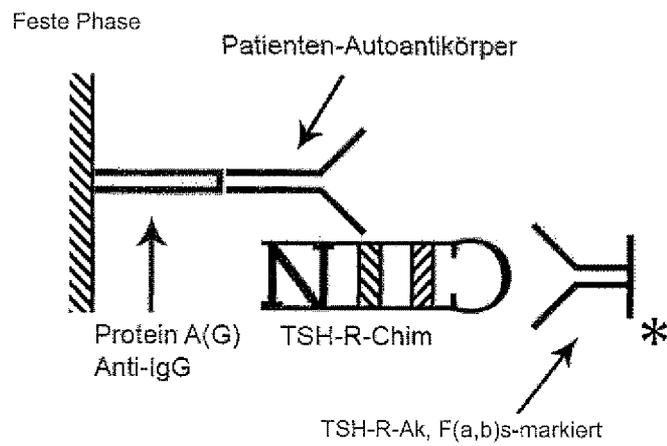


Abb. 5

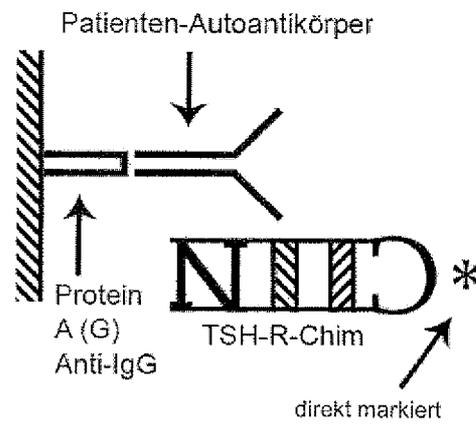
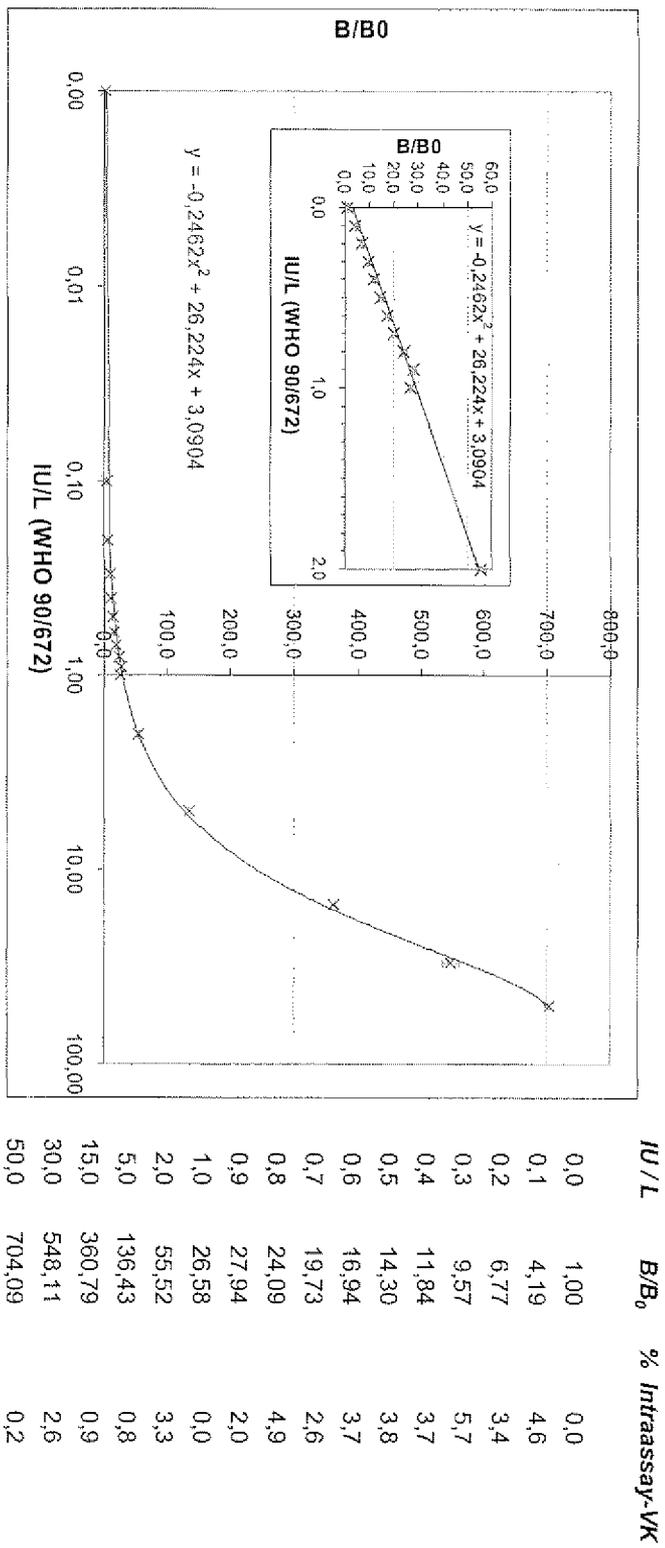


Abb. 6

Standardkurve Brückenassay: Polynomfunktion über weiten Messbereich



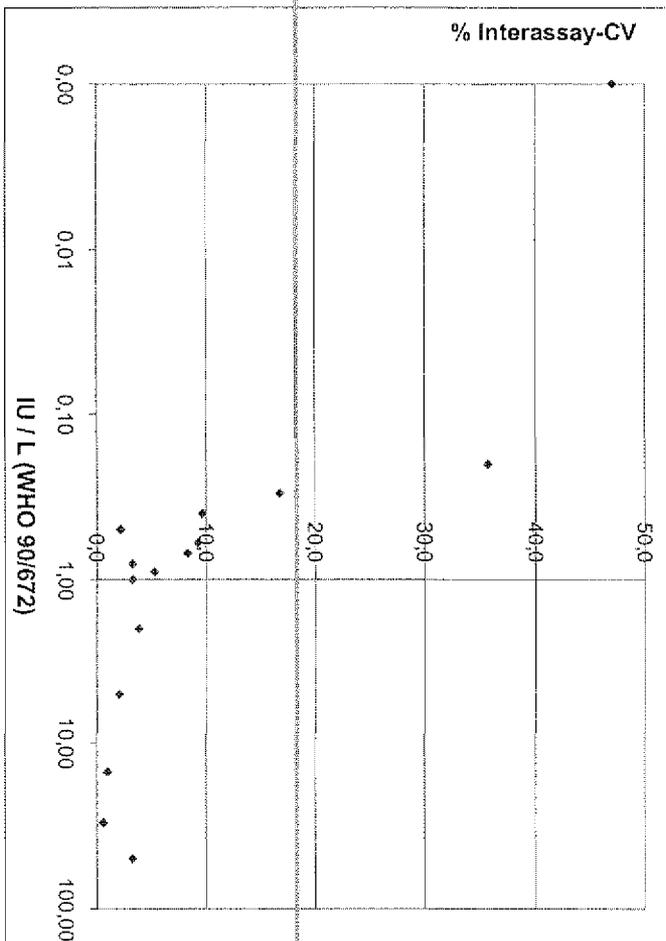
Standardkurve mit WHO-Standard für thyroïdstimulierende Antikörper 90/672

Detektion von sTRAb im Brückenassay

B/B₀: RLU-Mittelwert jedes Standards geteilt durch RLU-Mittelwert des Nullstandards (n = 3).

Abb. 7

Interassay-Präzisionsprofil (Standardkurve) des Brückenassays:
Bestimmung der unteren cut-off-Grenze

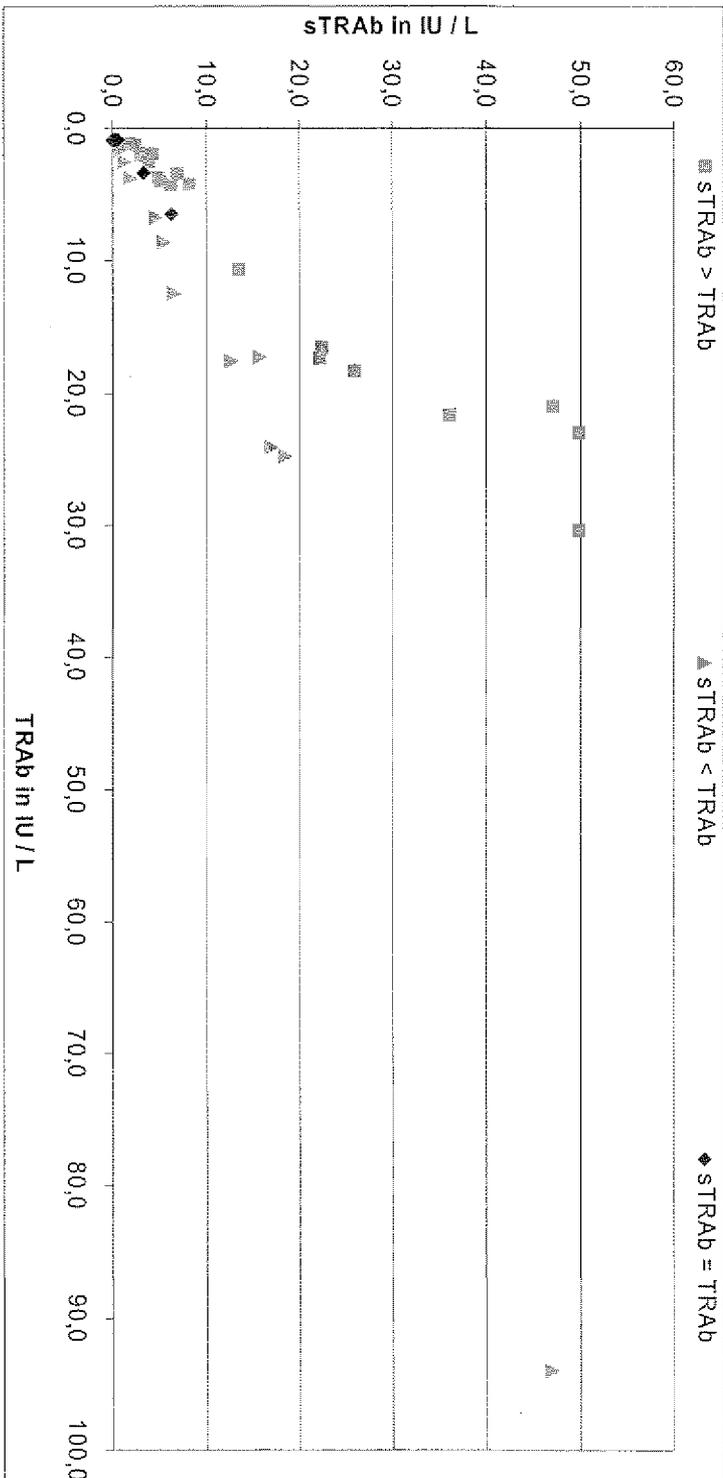


IU / L	% Interassay-VK
0,0	47,0
0,1	182,5
0,2	35,7
cut-off:	
0,3 IU / L	16,8
0,4	9,6
0,5	2,2
0,6	9,4
0,7	8,4
0,8	3,3
0,9	5,3
1,0	3,3
2,0	3,9
5,0	2,1
15,0	0,9
30,0	0,6
50,0	3,3

Interassay-Präzisionsprofil erstellt mit dem **WHO-Standard 90/672** bei **n = 5** aus Dreifachbestimmungen pro Assay.

Abb. 8

Vergleich sTRAb-Werte (Brückenassay) von Patientenseren mit TRAb-Werten (kompetitiver Rezeptorassay)



Patientenseren total n = total 41
STRAb < TRAK: n = 14
STRAb > TRAK: n = 19

eo1f-seq1.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Loos, Ulrich
<120> Innovativer TSH-R-Ab Kit
<130> 051314W0
<150> 102005046022.4
<151> 2005-09-26
<160> 10
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 2319
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1
atgctgctgc tgctgctgct gctgggcctg aggctacagc tctccctggg catcatccca 60
gttgaggagg agaaccgga cttctggaac cgcgaggcag ccgaggccct gggtgccgcc 120
aagaagctgc agcctgcaca gacagccgcc aagaacctca tcatcttctt gggcgatggg 180
atgggggtgt ctacgggtgac agctgccagg atcctaaaag ggcagaagaa ggacaaactg 240
gggcctgaga tacccttggc catggaccgc ttcccatatg tggctctgtc caagacatac 300
aatgtagaca aacatgtgcc agacagtgga gccacagcca cggcctacct gtgcggggtc 360
aagggcaact tccagaccat tggcttgagt gcagccgcc gctttaacca gtgcaacacg 420
acacgcggca acgaggtcat ctccgtgatg aatcgggcca agaaagcagg gaagtcagtg 480
ggagtggtaa ccaccacacg agtgcagcac gcctcgccag ccggcaccta cgcccacacg 540
gtgaaccgca actggtactc ggacgccgac gtgcctgcct cggcccgccca ggaggggtgc 600
caggacatcg ctacgcagct catctccaac atggacattg acgtgatcct aggtggaggc 660
cgaaagtaca tgtttcgcat gggaaaccca gaccctgagt acccagatga ctacagccaa 720
gggtggacca ggctggacgg gaagaatctg gtgcaggaat ggctggcgaa gcgccagggt 780
gcccgggatg tgtggaaccg cactgagctc atgcaggctt ccctggacct gtctgtgacc 840
catctcatgg gtctctttga gcctggagac atgaaatagc agatccaccg agactccaca 900
ctggaccctt ccctgatgga gatgacagag gctgccctgc gcctgctgag caggaacccc 960
cgcggcttct tcctcttcgt ggaggggtgg cgcacgcacc atggtcatca tgaaagcagg 1020
gcttaccggg cactgactga gacgatcatg ttcgacgacg ccattgagag ggcgggcccag 1080
ctcaccagcg aggaggacac gctgagcctc gtcactgccg accactccca cgtcttctcc 1140
ttcggaggct accccttgcg agggagctcc atcttcgggc tggcccctgg caaggcccgg 1200
gacaggaagg cctacacggt cctctatac ggaaacggtc caggctatgt gctcaaggac 1260
ggcggcccgc cggatgttac cgagagcgag agcgggagcc ccgagtatcg gcagcagtca 1320
gcagtgcccc tggacgaaga gaccacgca ggcgaggacg tggcgggtgt cgcgcgcggc 1380
ccgcaggcgc acctggttca cggcgtgcag gagcagacct tcatagcgca cgtcatggcc 1440

ttcgccgcct gcctggagcc ctacaccgcc tgcgacctgg cgccccccgc cggcaccacc 1500
gacgccgcgc acccggtta ctctagagtc gggcgcccg gccgcttcga gcagacagga 1560
atgggggtgtt cgtctccacc ctgagagtc catcaggagg aggacttcag agtcacctgc 1620
aaggatattc aacgcatccc cagcttaccg cccagtagc agactctgaa gcttattgag 1680
actcacctga gaactattcc aagtcagca ttttctaatac tgcccaatat ttccagaatc 1740
tacgtatcta tagatgtgac tctgcagcag ctggaatcac actccttcta caatttgagt 1800
aaagtgactc acatagaaat tcggaatacc aggaacttaa cttacataga ccctgatgcc 1860
ctcaaagagc tccccctcct aaagttcctt ggcattttca aactggact taaaatgttc 1920
cctgacctga ccaaagttta ttccactgat atattcttta tacttgaaat tacagacaac 1980
ccttacatga cgtcaatccc tgtgaatgct tttcaggac tatgcaatga aaccttgaca 2040
ctgaagctgt acaacaatgg ctttacttca gtccaaggat atgctttcaa tgggacaaag 2100
ctggatgctg tttacctaaa caagaataaa tacctgacag ttattgacaa agatgcattt 2160
ggaggagtat acagtggacc aagcttgctg gacgtgtctc aaaccagtgt cactgccctt 2220
ccatcaaag gctggagca cctgaaggaa ctgatagcaa gaaacacctg gactcttaag 2280
aaaacactgc cctccaaaca tcaccatcac catcactaa 2319

<210> 2
<211> 772
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2

Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Arg Leu Gln Leu Ser Leu
1 5 10 15
Gly Ile Ile Pro Val Glu Glu Glu Asn Pro Asp Phe Trp Asn Arg Glu
20 25 30
Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ala Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ala Gln Thr
35 40 45
Ala Ala Lys Asn Leu Ile Ile Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Ser
50 55 60
Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Lys Lys Asp Lys Leu
65 70 75 80
Gly Pro Glu Ile Pro Leu Ala Met Asp Arg Phe Pro Tyr Val Ala Leu
85 90 95
Ser Lys Thr Tyr Asn Val Asp Lys His Val Pro Asp Ser Gly Ala Thr
100 105 110
Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Gly Asn Phe Gln Thr Ile Gly
115 120 125

Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg Gly Asn
 130 135 140
 Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys Ser Val
 145 150 155 160
 Gly Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala Gly Thr
 165 170 175
 Tyr Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp Val Pro
 180 185 190
 Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys Gln Asp Ile Ala Thr Gln Leu Ile
 195 200 205
 Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Lys Tyr Met
 210 215 220
 Phe Arg Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Asp Asp Tyr Ser Gln
 225 230 235 240
 Gly Gly Thr Arg Leu Asp Gly Lys Asn Leu Val Gln Glu Trp Leu Ala
 245 250 255
 Lys Arg Gln Gly Ala Arg Tyr Val Trp Asn Arg Thr Glu Leu Met Gln
 260 265 270
 Ala Ser Leu Asp Pro Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe Glu Pro
 275 280 285
 Gly Asp Met Lys Tyr Glu Ile His Arg Asp Ser Thr Leu Asp Pro Ser
 290 295 300
 Leu Met Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Arg Leu Leu Ser Arg Asn Pro
 305 310 315 320
 Arg Gly Phe Phe Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His
 325 330 335
 His Glu Ser Arg Ala Tyr Arg Ala Leu Thr Glu Thr Ile Met Phe Asp
 340 345 350
 Asp Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln Leu Thr Ser Glu Glu Asp Thr Leu
 355 360 365
 Ser Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr
 370 375 380
 Pro Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Arg
 385 390 395 400

Asp Arg Lys Ala Tyr Thr Val Leu Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr
 405 410 415
 Val Leu Lys Asp Gly Ala Arg Pro Asp Val Thr Glu Ser Glu Ser Gly
 420 425 430
 Ser Pro Glu Tyr Arg Gln Gln Ser Ala Val Pro Leu Asp Glu Glu Thr
 435 440 445
 His Ala Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His
 450 455 460
 Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr Phe Ile Ala His Val Met Ala
 465 470 475 480
 Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr Ala Cys Asp Leu Ala Pro Pro
 485 490 495
 Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro Gly Tyr Ser Arg Val Gly Ala
 500 505 510
 Ala Gly Arg Phe Glu Gln Thr Gly Met Gly Cys Ser Ser Pro Pro Cys
 515 520 525
 Glu Cys His Gln Glu Glu Asp Phe Arg Val Thr Cys Lys Asp Ile Gln
 530 535 540
 Arg Ile Pro Ser Leu Pro Pro Ser Thr Gln Thr Leu Lys Leu Ile Glu
 545 550 555 560
 Thr His Leu Arg Thr Ile Pro Ser His Ala Phe Ser Asn Leu Pro Asn
 565 570 575
 Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu
 580 585 590
 Ser His Ser Phe Tyr Asn Leu Ser Lys Val Thr His Ile Glu Ile Arg
 595 600 605
 Asn Thr Arg Asn Leu Thr Tyr Ile Asp Pro Asp Ala Leu Lys Glu Leu
 610 615 620
 Pro Leu Leu Lys Phe Leu Gly Ile Phe Asn Thr Gly Leu Lys Met Phe
 625 630 635 640
 Pro Asp Leu Thr Lys Val Tyr Ser Thr Asp Ile Phe Phe Ile Leu Glu
 645 650 655
 Ile Thr Asp Asn Pro Tyr Met Thr Ser Ile Pro Val Asn Ala Phe Gln
 660 665 670
 Gly Leu Cys Asn Glu Thr Leu Thr Leu Lys Leu Tyr Asn Asn Gly Phe

<400> 4

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
 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 Glu Lys Ser His Leu Thr Pro Lys Lys Gln Gly
 260 265 270

Gln Ile Ser Glu Glu Tyr Met Gln Thr Val
 275 280

<210> 5
 <211> 2615
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 atgctgctgc tgctgctgct gctgggcctg aggctacagc tctccctggg catcatccca 60
 gttgaggagg agaaccgga cttctggaac cgcgaggcag ccgaggccct gggtgccgcc 120
 aagaagctgc agcctgcaca gacagccgcc aagaacctca tcatcttcct gggcgatggg 180
 atgggggtgt ctacggtgac agctgccagg atcctaaaag ggagaagaa ggacaaactg 240
 gggcctgaga taccctggc catggaccgc ttcccatatg tggctctgtc caagacatac 300
 aatgtagaca aacatgtgcc agacagtgga gccacagcca cggcctacct gtgcggggtc 360
 aagggcaact tccagacat tggcttgagt gcagccgcc gctttaacca gtgcaacacg 420
 acacgcggca acgaggtcat ctccgtgatg aatcgggcca agaaagcagg gaagtcagtg 480
 ggagtggtaa ccaccacacg agtgacgac gcctcgccag ccggcaccta cgcccacacg 540
 gtgaaccgca actggtactc ggacgccgac gtgcctgcct cggcccgcc ggaggggtgc 600
 aggacatcgc tacgcagctc atctccaaca tggacattga cgtgatccta ggtggaggcc 660
 gaaagtacat gtttcgcatg ggaaccccag accctgagta cccagatgac tacagccaag 720
 gtgggaccag gctggacggg aagaatctgg tgcaggaatg gctggcgaag cgccagggtg 780
 cccggtatgt gtggaaccgc actgagctca tgcaggcttc cctggaccgg tctgtgacct 840
 atctcatggg tctctttgag cctggagaca tgaatacga gatccaccga gactccacac 900
 tggaccctc cctgatggag atgacagagg ctgccctgcg cctgctgagc aggaaccccc 960
 gcggcttctt cctcttcgtg gaggggtggtc gcatcgacca tggatcatcat gaaagcaggg 1020
 cttaccgggc actgactgag acgatcatgt tcgacgacgc cattgagagg gcgggcccagc 1080
 tcaccagcga ggaggacacg ctgagcctcg tcaactgccga cactccccac gtcttctcct 1140
 tcggaggcta cccctgcga gggagctcca tcttcgggct ggcccctggc aaggcccggg 1200
 acaggaaggc ctacacggtc ctctatacag gaaacgggtcc aggtatgtg ctcaaggacg 1260
 gcgcccggcc ggatgttacc gagagcgaga gcgggagccc cgagtatcgg cagcagtcag 1320
 cagtgccctt ggacgaagag acccacgcag gcgaggacgt ggcggtgttc gcgcgggcc 1380
 cgcaggcgca cctggttcac ggcgtgcagg agcagacctt catagcgcac gtcatggcct 1440
 tcgccgcctg cctggagccc tacaccgctt gcgacctggc gcccccgcc ggcaccaccg 1500
 acgccgcga cccgggttac tctagatcg gggcgggccg ccgcttcgag cagacaaagc 1560
 cttcacagct gcagtcccga gagctgtcag ggtcgcgctg ccccgagccc tgcgactgcg 1620
 caccggatgg cgccctgcgc tgtcctggcc ctcgagccgg cctcgccaga ctatctctca 1680
 cctatctccc tgtcaaagta attccatcac aagctttcag gggacttaat gaggtcgtaa 1740

aaattgaaat ctctcagagt gattccctgg aaaggataga agctaatagcc tttgacaacc 1800
 tcctcaattt gtctgaacta ctgatccaga acaccaaaaa cctgctatac attgaacctg 1860
 gtgcttttac aaacctcctt cggttaaaat acctgagcat ctgtaacaca ggcattccgaa 1920
 cccttccaga tgttacgaag atctcctcct ctgaatttaa tttcattctg gaaatctgtg 1980
 ataacttaca cataacctca atccctgtga atgcttttca gggactatgc aatgaaacct 2040
 tgacactgaa gctgtacaac aacggcttta cttcagtcca aggatatgct ttcaatggga 2100
 caaagctgga tgctgtttac ctaaacaaga ataaatacct gacagttatt gacaaagatg 2160
 catttgagg agtatacagt ggaccaagct tgctggacgt gtctcaaacc agtgtcactg 2220
 cccttccatc caaaggcctg gagcacctga aggaactgat agcaagaaac acctggactc 2280
 ttaagaaact tccactttcc ttgagtttcc ttcacctcac acgggctgac ctttcttacc 2340
 caagccactg ctgtgccttt aagaatcaga agaaaatcag aggaatcctt gagtccttga 2400
 tgtgtaatga gacagtatg cagagcttgc gccagagaaa atctgtgaat gccttgaata 2460
 gccccctcca ccaggaatat gaagagaatc tgggtgacag cattgttggg tacaaggaaa 2520
 agtccaagtt ccaggatact cataacaacg ctattatta cgtcttcttt gaagaacaag 2580
 aggatgagat cattggtttt ggccaggagc tctaa 2615

<210> 6
 <211> 871
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Arg Leu Gln Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Ile Ile Pro Val Glu Glu Glu Asn Pro Asp Phe Trp Asn Arg Glu
 20 25 30
 Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ala Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ala Gln Thr
 35 40 45
 Ala Ala Lys Asn Leu Ile Ile Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Ser
 50 55 60
 Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Lys Lys Asp Lys Leu
 65 70 75 80
 Gly Pro Glu Ile Pro Leu Ala Met Asp Arg Phe Pro Tyr Val Ala Leu
 85 90 95
 Ser Lys Thr Tyr Asn Val Asp Lys His Val Pro Asp Ser Gly Ala Thr
 100 105 110
 Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Gly Asn Phe Gln Thr Ile Gly
 115 120 125

Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg Gly Asn
 130 135 140

Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys Ser Val
 145 150 155 160

Gly Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala Gly Thr
 165 170 175

Tyr Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp Val Pro
 180 185 190

Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys Gln Asp Ile Ala Thr Gln Leu Ile
 195 200 205

Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Lys Tyr Met
 210 215 220

Phe Arg Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Asp Asp Tyr Ser Gln
 225 230 235 240

Gly Gly Thr Arg Leu Asp Gly Lys Asn Leu Val Gln Glu Trp Leu Ala
 245 250 255

Lys Arg Gln Gly Ala Arg Tyr Val Trp Asn Arg Thr Glu Leu Met Gln
 260 265 270

Ala Ser Leu Asp Pro Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe Glu Pro
 275 280 285

Gly Asp Met Lys Tyr Glu Ile His Arg Asp Ser Thr Leu Asp Pro Ser
 290 295 300

Leu Met Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Arg Leu Leu Ser Arg Asn Pro
 305 310 315 320

Arg Gly Phe Phe Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His
 325 330 335

His Glu Ser Arg Ala Tyr Arg Ala Leu Thr Glu Thr Ile Met Phe Asp
 340 345 350

Asp Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln Leu Thr Ser Glu Glu Asp Thr Leu
 355 360 365

Ser Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr
 370 375 380

Pro Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Arg
 385 390 395 400

Asp Arg Lys Ala Tyr Thr Val Leu Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr
 405 410 415
 Val Leu Lys Asp Gly Ala Arg Pro Asp Val Thr Glu Ser Glu Ser Gly
 420 425 430
 Ser Pro Glu Tyr Arg Gln Gln Ser Ala Val Pro Leu Asp Glu Glu Thr
 435 440 445
 His Ala Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His
 450 455 460
 Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr Phe Ile Ala His Val Met Ala
 465 470 475 480
 Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr Ala Cys Asp Leu Ala Pro Pro
 485 490 495
 Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro Gly Tyr Ser Arg Val Gly Ala
 500 505 510
 Ala Gly Arg Phe Glu Gln Thr Lys Pro Ser Gln Leu Gln Ser Arg Glu
 515 520 525
 Leu Ser Gly Ser Arg Cys Pro Glu Pro Cys Asp Cys Ala Pro Asp Gly
 530 535 540
 Ala Leu Arg Cys Pro Gly Pro Arg Ala Gly Leu Ala Arg Leu Ser Leu
 545 550 555 560
 Thr Tyr Leu Pro Val Lys Val Ile Pro Ser Gln Ala Phe Arg Gly Leu
 565 570 575
 Asn Glu Val Val Lys Ile Glu Ile Ser Gln Ser Asp Ser Leu Glu Arg
 580 585 590
 Ile Glu Ala Asn Ala Phe Asp Asn Leu Leu Asn Leu Ser Glu Leu Leu
 595 600 605
 Ile Gln Asn Thr Lys Asn Leu Leu Tyr Ile Glu Pro Gly Ala Phe Thr
 610 615 620
 Asn Leu Pro Arg Leu Lys Tyr Leu Ser Ile Cys Asn Thr Gly Ile Arg
 625 630 635 640
 Thr Leu Pro Asp Val Thr Lys Ile Ser Ser Ser Glu Phe Asn Phe Ile
 645 650 655
 Leu Glu Ile Cys Asp Asn Leu His Ile Thr Ser Ile Pro Val Asn Ala
 660 665 670
 Phe Gln Gly Leu Cys Asn Glu Thr Leu Thr Leu Lys Leu Tyr Asn Asn

ggtgctttta caaacctccc tcggttaaaa tacctgagca tctgtaacac aggcattccga 420
 acccttccag atgttacgaa gatctcctcc tctgaattta atttcattct ggaaatctgt 480
 gataacttac acataacctc aatccctgtg aatgcttttc agggactatg caatgaaacc 540
 ttgacactga agctgtacaa caacggcttt acttcagtcc aaggatatgc tttcaatggg 600
 acaaagctgg atgctgttta cctaaacaag aataaatacc tgacagttat tgacaaagat 660
 gcatttgag gagtatacag tggaccaagc ttgctggacg tgtctcaaac cagtgtcact 720
 gcccttccat ccaaaggcct ggagcacctg aaggaactga tagcaagaaa cacctggact 780
 cttagaagaa ttccactttc cttgagtttc cttcacctca cacgggctga cttttcttac 840
 ccaagccact gctgtgcctt taagaatcag aagaaaatca gaggaatcct tgagtccttg 900
 atgtgtaatg agagcagtat gcagagcttg cgccagagaa aatctgtgaa tgccttgaat 960
 agccccctcc accaggaata tgaagagaat ctgggtgaca gcattgttgg gtacaaggaa 1020
 aagtccaagt tccaggatac tcataacaac gctcattatt acgtcttctt tgaagaacaa 1080
 gaggatgaga tcattggttt tggccaggag ctcgaaaaat cccatctaac cccaaagaag 1140
 caaggccaaa tctcagaaga gtatatgcaa acgggttaa 1179

<210> 8
 <211> 392
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Met Arg Pro Ala Asp Leu Leu Gln Leu Gln Leu Leu Val Leu Ala Val
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Lys Pro Ser Gln Leu Gln Ser Arg Glu Leu Ser Gly Ser
 20 25 30
 Arg Cys Pro Glu Pro Cys Asp Cys Ala Pro Asp Gly Ala Leu Arg Cys
 35 40 45
 Pro Gly Pro Arg Ala Gly Leu Ala Arg Leu Ser Leu Thr Tyr Leu Pro
 50 55 60
 Val Lys Val Ile Pro Ser Gln Ala Phe Arg Gly Leu Asn Glu Val Val
 65 70 75 80
 Lys Ile Glu Ile Ser Gln Ser Asp Ser Leu Glu Arg Ile Glu Ala Asn
 85 90 95
 Ala Phe Asp Asn Leu Leu Asn Leu Ser Glu Leu Leu Ile Gln Asn Thr
 100 105 110
 Lys Asn Leu Leu Tyr Ile Glu Pro Gly Ala Phe Thr Asn Leu Pro Arg
 115 120 125
 Leu Lys Tyr Leu Ser Ile Cys Asn Thr Gly Ile Arg Thr Leu Pro Asp

130 135 140

Val Thr Lys Ile Ser Ser Ser Glu Phe Asn Phe Ile Leu Glu Ile Cys
 145 150 155 160

Asp Asn Leu His Ile Thr Ser Ile Pro Val Asn Ala Phe Gln Gly Leu
 165 170 175

Cys Asn Glu Thr Leu Thr Leu Lys Leu Tyr Asn Asn Gly Phe Thr Ser
 180 185 190

Val Gln Gly Tyr Ala Phe Asn Gly Thr Lys Leu Asp Ala Val Tyr Leu
 195 200 205

Asn Lys Asn Lys Tyr Leu Thr Val Ile Asp Lys Asp Ala Phe Gly Gly
 210 215 220

Val Tyr Ser Gly Pro Ser Leu Leu Asp Val Ser Gln Thr Ser Val Thr
 225 230 235 240

Ala Leu Pro Ser Lys Gly Leu Glu His Leu Lys Glu Leu Ile Ala Arg
 245 250 255

Asn Thr Trp Thr Leu Lys Lys Leu Pro Leu Ser Leu Ser Phe Leu His
 260 265 270

Leu Thr Arg Ala Asp Leu Ser Tyr Pro Ser His Cys Cys Ala Phe Lys
 275 280 285

Asn Gln Lys Lys Ile Arg Gly Ile Leu Glu Ser Leu Met Cys Asn Glu
 290 295 300

Ser Ser Met Gln Ser Leu Arg Gln Arg Lys Ser Val Asn Ala Leu Asn
 305 310 315 320

Ser Pro Leu His Gln Glu Tyr Glu Glu Asn Leu Gly Asp Ser Ile Val
 325 330 335

Gly Tyr Lys Glu Lys Ser Lys Phe Gln Asp Thr His Asn Asn Ala His
 340 345 350

Tyr Tyr Val Phe Phe Glu Glu Gln Glu Asp Glu Ile Ile Gly Phe Gly
 355 360 365

Gln Glu Leu Glu Lys Ser His Leu Thr Pro Lys Lys Gln Gly Gln Ile
 370 375 380

Ser Glu Glu Tyr Met Gln Thr Val
 385 390

<210> 9
 <211> 1323

<212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 atgggagtca aagttctggt tggcctgatc tgcacgctg tggccgaggc caagcccacc 60
 gagaacaacg aagacttcaa catcgtggcc gtggccagca acttcgcgac cacggatctc 120
 gatgctgacc gcgggaagtt gcccggaag aagctgccgc tggaggtgct caaagagatg 180
 gaagccaatg cccggaaagc tggctgcacc aggggctgtc tgatctgcct gtcccacatc 240
 aagtgcacgc ccaagatgaa gaagttcatc ccaggacgct gccacaccta cgaaggcgac 300
 aaagagtccg cacagggcgg cataggcgag gcgatcgtc acattcctga gattcctggg 360
 ttcaaggact tggagcccat ggagcagttc atcgcacagg tcgatctgtg tgtggactgc 420
 acaactggct gcctcaaagg gcttgccaac gtgcagtggt ctgacctgct caagaagtgg 480
 ctgccgcaac gctgtgcgac ctttgccagc aagatccagg gccaggtgga caagatcaag 540
 ggggccggtg gtgacagcat cggaatgggg tgttcgtctc caccctgcga gtgccatcag 600
 gaggaggact tcagagtcac ctgcaaggat attcaacgca tccccagctt accgcccagt 660
 acgcagactc tgaagcttat tgagactcac ctgagaacta ttccaagtca tgcattttct 720
 aatctgcccc atatttccag aatctacgta tctatagatg tgactctgca gcagctggaa 780
 tcacactcct tctacaattt gagtaaagtg actcacatag aaattcggaa taccaggaac 840
 ttaacttaca tagaccctga tggcctcaa gagctcccc tcctaaagt cttggcatt 900
 ttcaactctg gacttaaaat gttccctgac ctgaccaaag tttattccac tgatatattc 960
 tttatacttg aaattacaga caacccttac atgacgtcaa tccctgtgaa tgcttttcag 1020
 ggactatgca atgaaacctt gacactgaag ctgtacaaca atggctttac ttcagtccaa 1080
 ggatatgctt tcaatgggac aaagctggat gctgtttacc taaacaagaa taaatacctg 1140
 acagttattg acaagatgc atttggagga gtatacagtg gaccaagctt gctggacgtg 1200
 tctcaaacca gtgtcactgc cttccatcc aaaggcctgg agcacctgaa ggaactgata 1260
 gcaagaaca cctggactct taagaaaaca ctgccctcca aacatcacca tcaccatcac 1320
 taa 1323

<210> 10
 <211> 440
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Met Gly Val Lys Val Leu Phe Ala Leu Ile Cys Ile Ala Val Ala Glu
 1 5 10 15
 Ala Lys Pro Thr Glu Asn Asn Glu Asp Phe Asn Ile Val Ala Val Ala
 20 25 30
 Ser Asn Phe Ala Thr Thr Asp Leu Asp Ala Asp Arg Gly Lys Leu Pro
 35 40 45

Gly Lys Lys Leu Pro Leu Glu Val Leu Lys Glu Met Glu Ala Asn Ala
 50 55 60
 Arg Lys Ala Gly Cys Thr Arg Gly Cys Leu Ile Cys Leu Ser His Ile
 65 70 75 80
 Lys Cys Thr Pro Lys Met Lys Lys Phe Ile Pro Gly Arg Cys His Thr
 85 90 95
 Tyr Glu Gly Asp Lys Glu Ser Ala Gln Gly Gly Ile Gly Glu Ala Ile
 100 105 110
 Val Asp Ile Pro Glu Ile Pro Gly Phe Lys Asp Leu Glu Pro Met Glu
 115 120 125
 Gln Phe Ile Ala Gln Val Asp Leu Cys Val Asp Cys Thr Thr Gly Cys
 130 135 140
 Leu Lys Gly Leu Ala Asn Val Gln Cys Ser Asp Leu Leu Lys Lys Trp
 145 150 155 160
 Leu Pro Gln Arg Cys Ala Thr Phe Ala Ser Lys Ile Gln Gly Gln Val
 165 170 175
 Asp Lys Ile Lys Gly Ala Gly Gly Asp Ser Ile Gly Met Gly Cys Ser
 180 185 190
 Ser Pro Pro Cys Glu Cys His Gln Glu Glu Asp Phe Arg Val Thr Cys
 195 200 205
 Lys Asp Ile Gln Arg Ile Pro Ser Leu Pro Pro Ser Thr Gln Thr Leu
 210 215 220
 Lys Leu Ile Glu Thr His Leu Arg Thr Ile Pro Ser His Ala Phe Ser
 225 230 235 240
 Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr Leu
 245 250 255
 Gln Gln Leu Glu Ser His Ser Phe Tyr Asn Leu Ser Lys Val Thr His
 260 265 270
 Ile Glu Ile Arg Asn Thr Arg Asn Leu Thr Tyr Ile Asp Pro Asp Ala
 275 280 285
 Leu Lys Glu Leu Pro Leu Leu Lys Phe Leu Gly Ile Phe Asn Thr Gly
 290 295 300
 Leu Lys Met Phe Pro Asp Leu Thr Lys Val Tyr Ser Thr Asp Ile Phe
 305 310 315 320

Phe Ile Leu Glu Ile Thr Asp Asn Pro Tyr Met Thr Ser Ile Pro Val
 325 330 335
 Asn Ala Phe Gln Gly Leu Cys Asn Glu Thr Leu Thr Leu Lys Leu Tyr
 340 345 350
 Asn Asn Gly Phe Thr Ser Val Gln Gly Tyr Ala Phe Asn Gly Thr Lys
 355 360 365
 Leu Asp Ala Val Tyr Leu Asn Lys Asn Lys Tyr Leu Thr Val Ile Asp
 370 375 380
 Lys Asp Ala Phe Gly Gly Val Tyr Ser Gly Pro Ser Leu Leu Asp Val
 385 390 395 400
 Ser Gln Thr Ser Val Thr Ala Leu Pro Ser Lys Gly Leu Glu His Leu
 405 410 415
 Lys Glu Leu Ile Ala Arg Asn Thr Trp Thr Leu Lys Lys Thr Leu Pro
 420 425 430
 Ser Lys His His His His His His
 435 440

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/066719

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/76 G01N33/564 C07K14/72		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/63296 A2 (MILO GMBH [DE]; BERGMANN ANDREAS [DE]; LOOS ULRICH [DE]; MINICH WALDEM) 30 August 2001 (2001-08-30) page 4, paragraph 2 page 12 - page 15 page 30	1-17
X	DE 196 45 729 C1 (BRAHMS DIAGNOSTICA GMBH [DE]) 4 June 1998 (1998-06-04) cited in the application page 3 - page 6	1-17
X	WO 00/00590 A (RAPOPORT BASIL [US]; MCLACHLAN SANDRA M [US]) 6 January 2000 (2000-01-06) page 31 - page 35 page 40, line 1 - line 6 page 89 - page 95	1-17
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
2 February 2007	15/02/2007	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Behrens, Ralf	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/066719

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>TAHARA K ET AL: "EPITOPES FOR THYROID STIMULATING AND BLOCKING AUTOANTIBODIES ON THE EXTRACELLULAR DOMAIN OF THE HUMAN THYROTROPIN RECEPTOR" THYROID, MARY ANN LIEBERT, NEW YORK, NY, US, vol. 7, no. 6, December 1997 (1997-12), pages 867-877, XP000993366 ISSN: 1050-7256</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2006/066719

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0163296	A2	30-08-2001 EP 1259825 A2	27-11-2002
DE 19645729	C1	04-06-1998 NONE	
WO 0000590	A	06-01-2000 AU 4725599 A	17-01-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2006/066719

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. G01N33/76 G01N33/564 C07K14/72

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
G01N

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 01/63296 A2 (MILO GMBH [DE]; BERGMANN ANDREAS [DE]; LOOS ULRICH [DE]; MINICH WALDEM) 30. August 2001 (2001-08-30) Seite 4, Absatz 2 Seite 12 - Seite 15 Seite 30	1-17
X	DE 196 45 729 C1 (BRAHMS DIAGNOSTICA GMBH [DE]) 4. Juni 1998 (1998-06-04) in der Anmeldung erwähnt Seite 3 - Seite 6	1-17
X	WO 00/00590 A (RAPOPORT BASIL [US]; MCLACHLAN SANDRA M [US]) 6. Januar 2000 (2000-01-06) Seite 31 - Seite 35 Seite 40, Zeile 1 - Zeile 6 Seite 89 - Seite 95	1-17

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
 - *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 - *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
 - *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
 - *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
 - *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
 - *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
2. Februar 2007	15/02/2007

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Behrens, Ralf
---	--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2006/066719

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	TAHARA K ET AL: "EPITOPES FOR THYROID STIMULATING AND BLOCKING AUTOANTIBODIES ON THE EXTRACELLULAR DOMAIN OF THE HUMAN THYROTROPIN RECEPTOR" THYROID, MARY ANN LIEBERT, NEW YORK, NY, US, Bd. 7, Nr. 6, Dezember 1997 (1997-12), Seiten 867-877, XP000993366 ISSN: 1050-7256 -----	1-17

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2006/066719

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0163296	A2	30-08-2001	EP 1259825 A2	27-11-2002
DE 19645729	C1	04-06-1998	KEINE	
WO 0000590	A	06-01-2000	AU 4725599 A	17-01-2000