



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101657468 B

(45) 授权公告日 2014. 09. 03

(21) 申请号 200880011577. 5

A61P 5/08 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 02. 14

G01N 33/564 (2006. 01)

C12N 15/13 (2006. 01)

(30) 优先权数据

60/901, 332 2007. 02. 15 US

0702990. 3 2007. 02. 15 GB

0714036. 1 2007. 07. 18 GB

(56) 对比文件

WO 00/49050 A, 2000. 08. 24, 全文.

WO 02/08723 A, 2002. 01. 31, 全文.

KOHN L D. ET AL. characterization of monoclonal thyrotropin binding-inhibition autoantibodies from a hashimoto's patient whose children have intrauterine and neonatal thyroid disease.. 《THE JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM》. 1997, 第 82 卷 (第 2 期), 3998-4009.

(85) PCT 国际申请进入国家阶段日

2009. 10. 10

(86) PCT 国际申请的申请数据

PCT/GB2008/000518 2008. 02. 14

(87) PCT 国际申请的公布数据

WO2008/099185 EN 2008. 08. 21

审查员 张彬

(73) 专利权人 RSR 有限公司

地址 英国加的夫

(72) 发明人 B·瑞斯史密斯 J·福尔曼克

J·桑德斯

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司

公司 11285

代理人 张广育 刘文君

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006. 01)

C12N 5/24 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

C12N 5/28 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书115页

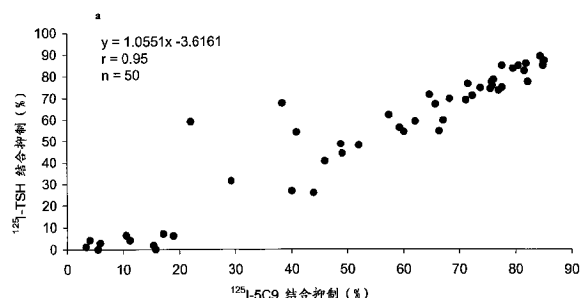
序列表8页 附图8页

(54) 发明名称

用作拮抗剂的抗促甲状腺激素受体的人单克隆抗体

(57) 摘要

本发明提供了一种分离的 TSHR 抗体, 所述抗体是一种 TSH 的拮抗剂。本发明还涉及应用本发明的抗体的方法。



1. 一种分离的抗促甲状腺激素受体 (TSHR) 的人单克隆或重组抗体, 所述抗体是一种促甲状腺激素 (TSH) 的拮抗剂, 具有 10^9L/mol 的对人全长 TSHR 的结合亲和力, 其中所述抗体包含 V_H 区, 所述 V_H 区包含以下的互补决定区 (CDR) :

- a) SNYMS (CDR1) ;
 - b) VTYSGGSTSYADSVKG (CDR2) ; 和
 - c) GGRYCSSISCYARSGCDY (CDR3) ,
- 以及 V_L 区, 所述 V_L 区包含以下的 CDR :
- a) RASQSISNYLN (CDR1) ;
 - b) AASSLQS (CDR2) ; 和
 - c) QQSYSSPSTT (CDR3) 。

2. 根据权利要求 1 的抗体, 所述抗体包括 SEQ ID No. 9 表示的或 SEQ ID No. 7 的核苷酸序列编码的氨基酸序列, 以及 SEQ ID No. 10 表示的或 SEQ ID No. 8 的核苷酸序列编码的氨基酸序列。

3. 根据权利要求 1 的抗体, 所述抗体具有 10^{10}L/mol 的对人全长 TSHR 的结合亲和力。

4. 一种分离的抗根据权利要求 1、2 或 3 的 TSHR 的抗体, 所述抗体可抑制 TSHR 的组成型活性。

5. 根据权利要求 1、2、3 或 4 的抗体, 所述抗体是一种甲状腺刺激性抗体的拮抗剂。

6. 根据权利要求 1、2、3 或 4 的抗体, 所述抗体具有患者血清 TSHR 自身抗体的 TSH 拮抗剂特性, 所述患者血清 TSHR 自身抗体是 TSH 拮抗剂。

7. 根据权利要求 5 的抗体, 所述抗体是一种 TSH 的拮抗剂, 并且是一种甲状腺刺激性抗体的拮抗剂。

8. 根据权利要求 6 的抗体, 所述抗体是一种 TSH 的拮抗剂, 并且是一种甲状腺刺激性抗体的拮抗剂。

9. 根据权利要求 1-4、7 和 8 任一项的抗体, 所述抗体具有患者血清 TSHR 自身抗体的拮抗剂特征, 所述患者血清 TSHR 自身抗体是甲状腺刺激性抗体的拮抗剂。

10. 根据权利要求 1-4、7 和 8 任一项的抗体, 所述抗体是一种 TSH、hMAb TSHR1 (M22) 或者对 TSHR 有刺激活性的抗体或有阻断活性的抗体与 TSHR 或其一部分结合的抑制剂。

11. 根据权利要求 10 的抗体, 其中所述 TSHR 部分包括 TSHR 的富含亮氨酸的结构域 (LRD) 或其相当大的部分。

12. 一种核苷酸, 包括
一种编码根据权利要求 1-11 任一项的抗体的核苷酸序列。

13. 一种包含根据权利要求 12 的核苷酸的载体。

14. 一种包含根据权利要求 1-11 任一项的抗体的分离的细胞。

15. 一种组合物, 所述组合物包含确定浓度的 TSHR 自身抗体, 并包含一种根据权利要求 1-11 任一项的抗体。

16. 一种组合物, 所述组合物包含确定浓度的具有 TSH 拮抗剂活性的 TSHR 自身抗体, 包括一种根据权利要求 1-11 任一项的抗体。

17. 一种组合物, 所述组合物包含确定浓度的 TSHR 自身抗体, 包括一种根据权利要求 1-11 任一项的抗体, 所述 TSHR 自身抗体为甲状腺刺激性抗体的拮抗剂。

18. 一种组合物,所述组合物包含确定浓度的具有TSH拮抗剂活性的TSHR自身抗体,包括一种根据权利要求1-11任一项的抗体,所述TSHR自身抗体为甲状腺刺激性抗体的拮抗剂。

19. 一种药物组合物,包含根据权利要求1-11任一项的抗体和可药用载体。

20. 包含根据权利要求1-11任一项的抗体和可药用载体的药物组合物在制备用于治疗甲状腺相关病症的药物中的用途,其中所述甲状腺相关病症选自:甲状腺活动过度、格雷夫斯眼病、新生儿甲状腺功能亢进症、人绒毛膜促性腺激素诱导的甲状腺功能亢进症、胫骨前粘液水肿、甲状腺癌和甲状腺炎。

21. 根据权利要求19或20的药物组合物,所述组合物包括一种或多种另外的促甲状腺激素受体拮抗剂。

22. 一种产生根据权利要求1-11任一项的抗体的方法,所述方法包括培养一种根据权利要求14的细胞,从而所述抗体通过所述细胞表达。

23. 根据权利要求22的方法,其中所述抗体通过所述细胞分泌。

24. 根据权利要求1-11任一项的抗体在制备用于治疗一种甲状腺相关病症的药物中的用途,所述甲状腺相关病症选自:甲状腺活动过度、格雷夫斯眼病、新生儿甲状腺功能亢进症、人绒毛膜促性腺激素诱导的甲状腺功能亢进症、胫骨前粘液水肿、甲状腺癌和甲状腺炎。

25. 一种确定一种待测验TSHR抗体与一种具有TSHR-相关氨基酸序列的多肽的结合情况的方法,其中所述方法涉及一步使用根据权利要求1-11任一项的抗体的方法步骤。

26. 根据权利要求25的方法,所述方法包括确定根据权利要求1-11任一项的抗体对于TSHR抗体与所述多肽的结合的效应。

27. 根据权利要求26的方法,其中所述TSHR-相关多肽包含全长的人TSHR。

28. 一种确定待测验的TSH或一个相关分子与一种具有TSHR-相关氨基酸序列的多肽的结合情况的方法,其中所述方法涉及一步使用根据权利要求1-11任一项的抗体的方法步骤。

29. 根据权利要求28的方法,其中所述方法是ELISA。

30. 一种确定参与结合作为拮抗剂的TSHR自身抗体的TSHR氨基酸的方法,所述方法包括提供一条具有根据权利要求1-11任一项的抗体可结合的TSHR-相关第一氨基酸序列的多肽、在所述TSHR-相关的氨基酸序列中修饰至少一个氨基酸,以及确定这样的改变对所述抗体结合的效应。

31. 一种改变一种根据权利要求1-11任一项的抗体的方法,所述方法包括修饰所述抗体的至少一个氨基酸,以及确定这样的修饰对结合于一条TSHR-相关序列的效应。

32. 一种鉴定可抑制甲状腺刺激性抗体与TSHR结合的分子的方法,所述方法包括提供至少一种根据权利要求1-11任一项的抗体作为参照物。

33. 一种鉴定可抑制甲状腺阻断性抗体与TSHR结合的分子的方法,所述方法包括提供至少一种根据权利要求1-11任一项的抗体,作为参照物。

34. 根据权利要求33的方法,其中选择阻止甲状腺阻断性抗体与TSHR结合的分子。

用作拮抗剂的抗促甲状腺激素受体的人单克隆抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及与促甲状腺激素 (TSH) 受体 (TSHR) 反应的抗体,并且具体而言,但非排他性地涉及这样的抗体,即这种抗体可与 TSHR 结合并且可通过 TSH- 刺激性抗体或 TSHR- 刺激性抗体阻断 TSHR 的激活。

背景技术

[0002] 促甲状腺激素 (Thyrotropin) 或促甲状腺激素 (thyroid stimulating hormone) (TSH) 是一种通过 TSHR 调节甲状腺功能的垂体激素 (Szkudlinski MW, Fremont V, Ronin C, Weintraub BD 2002 Thyroid-stimulating hormone and TSHR structure-function relationships. *Physiological Reviews* 82:473-502)。TSHR 是一种 G 蛋白偶联受体,由 3 个结构域组成:富含亮氨酸的结构域 (LRD)、切割结构域 (CD) 和跨膜结构域 (TMD) (Nunez Miguel R, Sanders J, Jeffreys J, Depraetere H, Evans M, Richards T, Blundell TL, Rees Smith B, Furmaniak J 2004 Analysis of the thyrotropin receptor-thyrotropin interaction by comparative modelling. *Thyroid* 14:991-1011)。TSH 结合到 TSHR 上引发受体信号传导,其促进甲状腺激素:甲状腺素 (T4) 和三碘甲状腺原氨酸 (T3) 的形成与释放。有一种反馈机制涉及循环中 T4 和 T3 的水平,这种机制控制从脑下垂体释放 TSH (和下丘脑分泌的促甲状腺激素释放激素),TSH 又控制甲状腺激活和血清中甲状腺激素的水平。

[0003] 本领域的很多资料说明,某些自身免疫性甲状腺病 (AITD) 的患者具有与 TSHR 反应的自身抗体 (Rees Smith B, McLachlan SM, Furmaniak J 1988 Autoantibodies to the thyrotropin receptor. *Endocrine Reviews* 9:106-121)。在大多数情况下,这些自身抗体与 TSHR 结合并模仿 TSH 的作用,从而刺激甲状腺产生高水平的 T4 和 T3。这些自身抗体被称为甲状腺刺激性自身抗体或 TSHR 自身抗体 (TRAb),具有刺激性活性或 TSH 激动剂活性。上文提及的甲状腺功能控制的生理反馈机制在这种甲状腺刺激性自身抗体存在的情况下和出现甲状腺活动过度或甲状腺毒症 (血清中甲状腺激素过量) 的患者中是无效应的。这种病症被称为格雷夫斯病 (Graves' disease)。人们认为,在一些患者中,具有刺激活性的 TRAb 在眶后组织中与 TSHR 相互作用,并且导致了格雷夫斯病的眼部征状。作为强大的甲状腺刺激因子的人单克隆抗体 (hMAb TSHR1) 被详细记载于专利申请 WO2004/050708A2 中。

[0004] 与在一些患 AITD 的患者中不同,自身抗体可结合 TSHR、阻止 TSH 结合于所述受体,但没有刺激 TSHR 的能力。这些类型的自身抗体被称为具有阻断活性或 TSH 拮抗活性的 TRAb,并且在其血清中有阻断性 TRAb 的患者可能会出现甲状腺活性不足的症状 (甲状腺功能减退症) (Rees Smith B, McLachlan SM, Furmaniak J 1988 Autoantibodies to the thyrotropin receptor. *Endocrine Reviews* 9:106-121)。具体地,如果存在于怀孕女性的血清中,具有阻断活性的 TRAb 可穿过胎盘并且可以阻断胎儿的甲状腺 TSHR,引起新生儿甲状腺功能减退症和严重的发育后果。再者,具有阻断活性的 TRAb 可出现于受感染母亲的

母乳中,这可能在婴儿中进一步导致临床的甲状腺功能减退症。迄今为止,还尚未获得具有 TSH 拮抗剂活性的抗 TSHR 的人单克隆自身抗体。因此,针对这种类型的自身抗体怎样和 TSHR 相互作用的详尽研究,以及针对它们和 TSHR 的相互作用与刺激类型的自身抗体(例如 M22)以及与 TSH 相比如何的详细研究均受到了限制。

[0005] 人绒毛膜促性腺激素是一种在妊娠过程中产生的具有温和甲状腺刺激效应的激素。

[0006] 对具有刺激活性或阻断活性的 TRAb 的性质的表征在下述研究中是绝对重要的,所述研究即其目标是改善对与 TSHR 的自身免疫反应相关的疾病的诊断和治疗。在专利申请 W02004/050708A2 中描述的发明提供了关于具有强大刺激活性的人单克隆自身抗体的性质及其与 TSHR 的相互作用的详情。再者,专利申请 W02006/016121A 公开了一种包括至少一个点突变的突变的 TSHR 制品,它可用于在来自待筛查的患者的体液样品中,对患者血清刺激性 TSHR 自身抗体、患者血清阻断性 TSHR 自身抗体和 TSH 进行差异筛查和鉴定。专利申请 W02004/050708A2 还描述了具有 TSHR 阻断活性的小鼠单克隆抗体(9D33)。9D33 以高亲和力(2×10^{10} L/mol)与 TSHR 结合,并且是一种 TSH、hMAb TSHR1(M22)和具有刺激活性或阻断活性的患者血清 TRAb 的有效拮抗剂(专利申请 W02004/050708A2 和 Sanders J, Allen F, Jeffreys J, Bolton J, Richards T, Depraetere H, Nakatake N, Evans M, Kiddie A, Premawardhana LD, Chirgadze DY, Miguel RN, Blundell TL, Furmaniak J, Rees Smith B 2005 Characteristics of a monoclonal antibody to the thyrotropin receptor that acts as a powerful thyroid-stimulating autoantibody antagonist. *Thyroid* 15: 672-682)。虽然小鼠单克隆抗体 9D33 至少可显示具有阻断活性的患者血清 TRAb 的一些特征,但它是一种通过以 TSHR 免疫实验动物产生的小鼠抗体,并因此不能真正代表人体内对 TSHR 自身免疫应答过程中产生的 TSHR 的自身抗体。作为一种小鼠单克隆抗体,为了应用于人体内,需要将 9D33 人源化。考虑到人源化过程中涉及的成本和复杂操作来看,这可能是不利的。

[0007] 本发明起因于抗 TSHR 的人单克隆自身抗体(5C9)的产生和性质,该抗体在患者血清中是一种 TSH 和刺激性 TRAb 的有效拮抗剂。已经从具有甲状腺功能减退症和高水平 TSHR 自身抗体的患者的外周淋巴细胞分离到了 5C9。通过以下方式将该淋巴细胞永生化:以爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)感染并将阳性克隆与小鼠/人细胞系融合,以形成稳定的克隆。从克隆培养物的上清液纯化 IgG,评估 5C9 IgG 结合于 TSHR 并影响 TSHR 活性的能力。具体地,研究了 5C9 抑制 TSH 与 TSHR 结合的能力,及抑制 TSH 的环 AMP 刺激活性的能力。再者,还评估了 5C9 抑制刺激性或阻断性的患者血清 TRAb 与 TSHR 的结合的能力,及抑制它们的生物活性的能力。另外,研究了 5C9 在对 TSHR 抗体、TSH 和相关化合物的测定中的用途。对 5C9 的重链(HC)和轻链(LC)的可变区(V 区)基因进行测序,并指定互补决定区(CDR)。

发明内容

[0008] 根据本发明的第一方面,提供了一种分离的 TSHR 的人抗体,该抗体是一种 TSH 的拮抗剂。

[0009] 根据本发明的第二方面,提供了一种分离的 TSHR 的人源化抗体,该抗体是一种 TSH 的拮抗剂。

[0010] 根据本发明第一方面或第二方面的抗体为“一种根据本发明的抗体”。

[0011] 根据本发明的抗体可为一种甲状腺刺激性抗体的拮抗剂。

[0012] 根据本发明的抗体可具有患者血清 TSHR 自身抗体——一种 TSH 拮抗剂——的 TSH 拮抗剂特征。

[0013] 根据本发明的抗体可为 TSH 的拮抗剂和甲状腺刺激性抗体的拮抗剂。

[0014] 根据本发明的抗体可具有患者血清 TSHR 自身抗体——甲状腺刺激性抗体的拮抗剂——的拮抗剂特征。

[0015] 根据本发明的抗体可以是一种 TSH、M22 或者对 TSHR 有刺激活性的抗体或有阻断活性的抗体与 TSHR 或其一部分结合的抑制剂。TSHR 部分可包括 LRD 或其相当大的部分。优选地，一种可阻断这种结合的抗体。

[0016] 根据本发明的抗体可为单克隆抗体或重组体抗体，或者包含其片段或由其片段组成，是一种 TSH 的拮抗剂。根据本发明的抗体可包含这样的 V_H 区，即该 V_H 区包含一种或多种选自图 2 中显示的 CDR 1、CDR 2 或 CDR 3 的 CDR，或者一种或多种基本与这些 CDR 同源的氨基酸序列。此外或另外，根据本发明的抗体可包含这样的 V_L 区，即该 V_L 区包含一种或多种选自图 3 中显示的 CDR 1、CDR 2 和 CDR 3 的 CDR，或者一种或多种基本与这些 CDR 同源的氨基酸序列。

[0017] 根据本发明的抗体与人全长 TSHR 可具有约 10^{10} L/mol 的结合亲和力。优选地，根据本发明的抗体与人全长 TSHR 可具有约 10^9 L/mol 的结合亲和力。

[0018] 本发明可帮助本领域技术人员理解驱使刺激性和阻断性 TSHR 自身抗体发展和产生的免疫学机制。另外，本发明可帮助本领域技术人员理解具有甲状腺刺激活性的 TSHR 自身抗体与具有阻断活性的 TSHR 自身抗体之间的分子差异。另外，本发明的治疗处理方法和药物组合物提供了新的甲状腺相关病症疗法。

[0019] 一种优选的本发明抗体为 5C9。已意外地发现 5C9 可抑制促甲状腺激素受体的组成型活性，也就是说在不存在促甲状腺激素或 M22 的情况下，在测验系统中产生环 AMP。这可能特别有利于对甲状腺中剩余的或转移的甲状腺癌细胞的治疗，尤其是在阻止或延迟再生长方面，这是因为促甲状腺激素受体的组成型活性可造成这些细胞更快速地生长。

[0020] 本文使用的术语“抗体”及同系术语例如“多种抗体”根据上下文包括基于免疫球蛋白的结合部分，例如单克隆和多克隆抗体、单链抗体和多特异性抗体，并且还包括本领域技术人员可用于代替这种基于免疫球蛋白的结合部分的结合部分，例如结构域抗体、双链抗体、IgG ΔC_H2 、F(ab')₂、Fab、scFv、 V_L 、 V_H 、dsFv、微型抗体、三链抗体、四链抗体、(scFv)₂、scFv-Fc 和 F(ab')₃ (Holliger P, Prospero T, Winter G 1993 "Diabodies: small bivalent and bispecific antibody fragments" Proc Natl Acad Sci USA 90: 6444-6448.), (Carter PJ 2006 "Potent antibody therapeutics by design" Nat Rev Immunol 6: 343-357)。

[0021] 术语“TSHR”是指具有显示于图 4 中的氨基酸序列的全长人促甲状腺激素受体，或者它的与促甲状腺激素受体高度同源的变体或片段。优选地，这种变体和片段与显示于图 4 中的氨基酸序列有 70-99.9% 的同源性。

[0022] 根据本发明的另一方面，提供了一种核苷酸，所述核苷酸包括：

[0023] a) 编码根据本发明第一方面的抗体的核苷酸序列；

[0024] b) 编码如图 2 或 3 中所示的抗体 V_H 结构域、抗体 V_L 结构域或 CDR 的氨基酸序列的如图 2 或 3 中所示的核苷酸序列;或者

[0025] c) 与 a) 或 b) 的核苷酸序列高度同源并编码以至少约 10^9 L/mol 的亲合力与 TSHR 结合的抗体的核苷酸序列。

[0026] 根据本发明的另一方面,提供了一种包含根据本发明的以上方面的核苷酸的载体。

[0027] 所述载体可以为一种质粒、病毒或它们的片段。本领域技术人员已知多种不同类型的载体。

[0028] 根据本发明的另一方面,提供了一种包含根据本发明的抗体、核苷酸和 / 或载体的分离的细胞;所述分离的细胞可表达一种根据本发明的抗体。优选地,所述分离的细胞分泌一种根据本发明的抗体。优选地,根据本发明的分离的细胞来自一个稳定的异源杂交瘤细胞系。

[0029] 根据本发明的又一方面,提供了一种包含确定浓度的 TSHR 自身抗体并包含根据本发明的抗体的组合物。这种组合物可包含一种确定浓度的具有 TSH 拮抗剂活性的 TSHR 自身抗体,并包括一种根据本发明的抗体。

[0030] 或者,根据本发明的该方面的组合物可包含一种确定浓度的 TSHR 自身抗体——甲状腺刺激性抗体拮抗剂,并包括一种根据本发明的抗体。一种组合物可包含一种确定浓度的具有 TSH 拮抗剂活性的 TSHR 自身抗体——甲状腺刺激性抗体拮抗剂,并包括一种根据本发明的抗体。

[0031] 根据本发明的另一方面,提供了一种用于给予哺乳动物受试者进行甲状腺相关病症治疗的药物组合物,包含一种根据本发明的抗体和一种可药用的载体。所述甲状腺相关病症可选自甲状腺活动过度、格雷夫斯眼病、新生儿甲状腺功能亢进症、人绒毛膜促性腺激素诱导的甲状腺功能亢进症、胫骨前粘液水肿、甲状腺癌和甲状腺炎。

[0032] 根据本发明的药物组合物可用于对人给药。优选地,根据本发明的药物组合物对受试者的免疫系统无显著的不利效应。

[0033] 根据本发明的药物组合物可包含另外的促甲状腺激素受体拮抗剂。一种合适的另外的促甲状腺激素受体拮抗剂为 W02004/050708 中公开的 9D33。

[0034] 已考虑到本发明的药物组合物可具有多种形式。用于治疗甲状腺相关病症的根据本发明的药物组合物可以为一种可注射的形式。用于治疗胫骨前粘液水肿的根据本发明的药物组合物优选地为一种局部给药形式。用于治疗格雷夫斯眼病的根据本发明的药物组合物优选地为滴眼剂的形式。

[0035] 本发明的药物组合物包括根据本发明的任意抗体和可药用的任意载体、佐剂或运载体。可用于本发明药物组合物的药用载体、佐剂和运载体包括但不限于离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白(如人血清白蛋白)、缓冲物质(如磷酸盐)、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物、水、盐或电解质(如硫酸鱼精蛋白)、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、硅溶胶、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素基物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡,聚乙烯聚氧丙烯嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂。

[0036] 本发明的药物组合物可通过口服给药、非经肠给药、通过喷雾吸入给药、局部给

药、通过滴眼液给药或眼膏给药、直肠给药、鼻腔给药、口腔给药、阴道给药或经由植入储存器给药。我们优选口服给药或注射给药。本文所用的术语“非经肠”包括皮下、皮内、静脉内、肌内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、病灶内和颅内注射或输液技术。

[0037] 所述药物组合物可为无菌可注射制剂的形式，如无菌可注射的水悬浮液或油悬浮液。这种悬浮液可依照本领域中已知技术使用合适的分散剂或润湿剂（如 Tween 80）和助悬剂制成。无菌可注射试剂也可由无毒肠外可接受的稀释剂或溶剂制成的无菌可注射溶液或悬浮液，如溶于 1,3-丁二醇的溶液形式。可使用的可接受的运载体和溶剂是甘露醇、水、林格氏液和等渗氯化钠溶液。另外，无菌的不挥发性油通常被用作溶剂或助悬介质。为此目的，可使用任何温和的不挥发性油，包括合成的单甘油酯或双甘油酯。脂肪酸（如油酸及其甘油酯衍生物）可用于制备可注射剂，正如天然的药学可接受的油类（如橄榄油或蓖麻油）尤其是其聚氧乙基化形式一样。这些油溶液或悬浮液也可含有长链醇稀释剂或分散剂如 Ph. Helv 或类似的醇。

[0038] 本发明的药物组合物可以任何口服可接受的药剂形式口服给药，包括但不限于胶囊、片剂、水悬浮液和溶液。对于口服用片剂，常用的载体包括乳糖和玉米淀粉。通常还加入润滑剂如硬脂酸镁。对于口服用胶囊形式，有用的稀释剂包括乳糖和干的玉米淀粉。当水悬浮液为口服给药时，其活性成分与乳化剂和悬浮剂结合。如果需要，还可加入某些甜味剂和 / 或调味剂和 / 或着色剂。

[0039] 本发明的药物组合物也可以直肠给药用栓剂形式给药。可通过将本发明的化合物与合适的非刺激性赋形剂混合来制备这些组合物，所述赋形剂在室温下为固态但在直肠温度下为液体，因而会在直肠中溶解从而释放出活性组分。这种材料包括但不限于可可脂、蜂蜡和聚乙二醇。

[0040] 当所需治疗包括局部施药容易到达的区域或器官时，本发明药物组合物的局部给药尤其有用。对于局部皮肤给药，所述药物组合物应该用含有悬浮或溶解于载体中的活性组分的合适软膏来配制。用于本发明化合物局部用药的载体包括但不限于矿物油、液体石油、白石油、丙二醇、聚氧乙烯聚氧丙烯化合物、乳化蜡和水。或者，所述药物组合物可以用含有悬浮或溶解于载体中的活性化合物的合适洗剂或霜剂来配制。合适的载体包括但不限于矿物油、脱水山梨醇单硬脂酸酯、聚山梨醇酯 60、十六烷基酯蜡、棕榈醇、2-辛基十二烷醇、苯甲醇和水。本发明的药物组合物也可通过直肠栓剂制剂或以合适的灌肠剂形式用于下肠道。本发明还包括局部经皮膏药。

[0041] 本发明的药物组合物可以鼻用喷雾剂或吸入剂的形式给药。这些组合物是按照药物制剂领域熟知的技术制备的，并可使用苯甲醇或其他合适防腐剂、增强生物利用度的吸收促进剂、碳氟化合物和 / 或其他本领域中已知的助溶剂或分散剂来制备为盐水溶液。

[0042] 根据本发明的又一方面，提供了一种产生根据本发明的抗体的方法，所述方法包括培养一种或多种根据本发明的分离的细胞，从而由所述细胞表达所述抗体。优选地，所述抗体由所述细胞分泌。

[0043] 根据本发明的又一方面，提供了一种在哺乳动物受试者中或者来源于该受试者的细胞中治疗甲状腺相关病症的方法，所述方法包括将所述受试者或所述细胞与本发明的抗体相接触。

[0044] 根据本发明的另一方面，提供了一种在哺乳动物受试者的甲状腺中抑制甲状腺刺

激性抗体刺激 TSHR 的方法,所述方法包括将所述受试者与本发明的抗体相接触。优选地,阻止甲状腺刺激性抗体与 TSHR 的结合。

[0045] 根据本发明的另一方面,提供了一种在哺乳动物受试者中抑制甲状腺刺激性抗体与甲状腺外 TSHR 结合的方法,所述方法包括将所述受试者与本发明的抗体相接触。所述甲状腺外 TSHR 可存在于所述受试者的眶后组织和 / 或胫骨前组织中。当被应用于该方法中时,本发明的抗体优选地阻断 TSHR 自身抗体与甲状腺外 TSHR 的结合。

[0046] 根据本发明的另一方面,提供了一种在受试者中或在源自受试者的甲状腺细胞中治疗甲状腺中的或转移的甲状腺癌的方法,所述方法包括将所述癌细胞与本发明的抗体相接触,目的是在所述细胞中抑制组成型促甲状腺激素受体活性。优选地,阻止或延迟甲状腺癌细胞的再生长。

[0047] 还提供了一种在受试者中或在源自受试者的甲状腺细胞中治疗由组成型甲状腺活性造成的甲状腺活动过度的方法,所述方法包括将所述受试者或甲状腺细胞与本发明的抗体相接触,目的是抑制由组成型甲状腺活性造成的甲状腺活动过度。

[0048] 在上述本发明的各方法中治疗的受试者优选地为人。

[0049] 根据本发明的另一方面,提供了根据本发明的抗体在治疗甲状腺相关病症中的用途。或者,提供了根据本发明的抗体在制备用于治疗甲状腺相关病症的药剂中的用途。

[0050] 还提供了一种在医学疗法中使用的根据本发明的抗体。具体而言,提供了根据本发明的抗体用于治疗甲状腺相关病症的用途。所述甲状腺相关病症可选自甲状腺活动过度、格雷夫斯眼病、新生儿甲状腺功能亢进症、人绒毛膜促性腺激素诱导的甲状腺功能亢进症、胫骨前粘液水肿、甲状腺癌和甲状腺炎。

[0051] 根据本发明的另一方面,提供了一种表征 TSHR 抗体的方法,包括确定待测验的 TSHR 抗体与具有 TSHR 相关氨基酸序列的多肽的结合情况,其中所述方法涉及一个方法步骤,该步骤包括使用本发明的抗体。优选地,所述方法包括确定本发明的抗体对 TSHR 抗体与该多肽结合的效应。具有 TSHR 相关的氨基酸序列的多肽优选地包括全长人 TSHR。

[0052] 根据本发明的另一方面,提供了一种用于表征 TSH 及相关分子的方法,包括确定待测验的 TSH 或相关分子与具有 TSHR 相关氨基酸序列的多肽的结合情况,其中所述方法涉及一步包括使用本发明抗体的方法步骤。

[0053] 用于表征 TSHR 抗体或 TSH 的方法以及上文描述的相关方法可以为 ELISA 形式。

[0054] 根据本发明的另一方面,提供了一种确定在结合作为拮抗剂的 TSHR 自身抗体过程中涉及的 TSHR 氨基酸的方法,所述方法包括:提供一条具有本发明抗体可结合的第一 TSHR 相关氨基酸序列的多肽,在所述 TSHR 相关的氨基酸序列中修饰至少一个氨基酸以及确定这样的修饰对所述抗体结合的效应。

[0055] 一种修饰本发明抗体的方法,所述方法包括修饰所述抗体的至少一个氨基酸以及确定这样的修饰对于与 TSHR 相关序列的结合的效应。优选地,选择对 TSHR 的亲和力增强的经修饰的 TSHR 抗体。

[0056] 根据本发明的另一方面,提供了一种鉴定可抑制甲状腺刺激性抗体与 TSHR 结合的分子的方法,所述方法包括提供至少一种根据本发明的抗体作为参照物。优选地,选择可阻止甲状腺刺激性抗体与 TSHR 结合的待测验的分子。

[0057] 还提供了一种鉴定可抑制甲状腺阻断性抗体与 TSHR 结合的分子的方法,所述方

法包括提供至少一种根据本发明的抗体作为参照物。优选地,选择可阻止甲状腺阻断性抗体与 TSHR 结合的分子。

附图说明

[0058] 现在通过参考附图 1-4、仅以例证的方式对根据本发明的抗体和方法进行描述,其中:

[0059] 图 1 的 3 幅系列图示出了来自患格雷夫斯病的患者 ($n = 40$) 和健康的捐血者 ($n = 10$) 的血清对 ^{125}I -5C9IgG、 ^{125}I -TSH 或 ^{125}I -M22 与经 TSHR 涂覆的管结合的效应的比较。

[0060] a ^{125}I -5C9IgG 结合与 ^{125}I -TSH 结合

[0061] b ^{125}I -5C9IgG 结合与 ^{125}I -M22IgG 结合

[0062] c ^{125}I -TSH 结合与 ^{125}I -M22IgG 结合;

[0063] 图 2 给出的序列为 5C9 重链 (HC) 的可变区序列

[0064] a 以未注释和注释的形式显示的 5C9HC 的寡核苷酸序列。在注释的形式中,用于 PCR 引物的序列为框示的各个互补决定区 (CDR);及黑体所示的恒定区。

[0065] b 源自以未注释和注释形式显示的寡核苷酸序列的 5C9HC 的氨基酸序列;

[0066] 图 3 给出的序列为 5C9 轻链 (LC) 的可变区序列;

[0067] a 以未注释和注释 (按照图 2) 的形式显示的 5C9LC 的寡核苷酸序列。

[0068] b 源自以未注释和注释形式显示的寡核苷酸序列的 5C9LC 的氨基酸序列;

[0069] 图 4 显示了人 TSHR 的共有氨基酸序列 (登记号 P16473, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=62298994>)。

具体实施方式

[0070] 方法

[0071] 人单克隆 TSHR 自身抗体 5C9 的淋巴细胞分离及克隆化

[0072] 使用记载于 W02004/050708A2 中的方法,常规地分离单克隆自身抗体 5C9。最初从收集自患产后甲状腺功能减退症并具有高水平 TRAb 的患者的血样中分离到淋巴细胞 (得到地方伦理委员会的批准)。如 W02004/050708A2 中所述,以爱泼斯坦巴尔病毒 (EBV) (European Collection of Cell Cultures-ECACC;Porton Down, SP40JG, UK) 感染所述淋巴细胞,并培养于小鼠巨噬细胞饲养层上。将分泌 TSHR 自身抗体的永生化淋巴细胞与小鼠/人杂交细胞系 K6H6/B5 (ECACC) 融合,通过有限稀释克隆 4 次,以得到单集落。通过抑制 ^{125}I - 标记的 TSH 与 TSHR 的结合,检测了处在不同克隆化阶段的细胞培养上清液中 TSHR 自身抗体 (W02004/050708A2) 的存在情况。将产生 TSHR 自身抗体的单克隆扩大,并从培养物收集上清液用于进行自身抗体纯化。

[0073] 5C9IgG 制品的纯化和标记

[0074] 使用蛋白质 A 亲和色谱法在 MabSelect (GE Healthcare, UK) 上,根据 (Sanders J, Jeffreys J, Depraetere H, Evans M, Richards T, Kiddie A, Brereton K, Premwardhana LD, Chirgadze DY, Nunez Miguel R, Blundell TL, Furmaniak J, Rees Smith B 2004 Characteristics of a human monoclonal autoantibody to the thyrotropin receptor: sequence structure and function. *Thyroid* 2004;14:560-570) 记载从培养物上清液中纯

化 5C9IgG, 并通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 评估纯度。

[0075] 使用径向扩散测定 (The Binding Site; Birmingham, B296AT, UK) 确定 5C9 的重链同种型, 通过蛋白质印迹法以抗人 κ 链和抗人 λ 链的特异性小鼠单克隆抗体 (Sigma-Aldrich Company Ltd, Poole, UK) 确定轻链同种型。

[0076] 在室温下, 将溶于 20mmol/L 乙酸钠溶液 (pH 4.5) 的 10mg/mL 的 5C9IgG 与依照制造商说明书 (Perbio Science UK Ltd, Cramlington, UK) 制备的固定化胃蛋白酶振荡孵育 4.5 小时。此后, 通过离心 (在室温下, 1000×g, 5 分钟) 除去固定化胃蛋白酶, 并在 4℃ 下将上清液用 300mmol/L NaCl, 10mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 透析过夜。使用 Sephacryl S-300 High Resolution Matrix (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK), 分离包含 5C9F(ab')₂ 和少量完整 IgG 的透析后混合物。以这种方式纯化的 5C9F(ab')₂ 制品不包含完整的 IgG, 这是通过 SDS-PAGE 和 HPLC 凝胶过滤分析来判断的。

[0077] 再者, 在 37℃ 下, 使用终浓度 100mmol/L 的 L-半胱氨酸对 F(ab')₂ 消减 1 小时。在室温下以终浓度 50mmol/L 的碘代乙酰胺终止该反应 30 分钟。如上文所述, 使用 Sephacryl S-300 柱纯化 F(ab')。以这种方式纯化的 F(ab') 制品不包含 F(ab')₂, 这是通过 SDS-PAGE 和 HPLC 凝胶过滤分析来判断的。

[0078] 另外, 用汞木瓜酶 (mercuripapain) (Sigma, UK) 以 1 : 100 的酶 / 蛋白质比处理 5C9IgG、将其透析入 50mmol/L NaCl, Tris-HCl (pH 9.0) 中, 并通过阴离子交换 Sepharose (购自 GE Healthcare 的 Q-Sepharose Fast flow) 柱, 以从 Fab 制品分离完整的 IgG 或 Fc。通过 SDS-PAGE 和凝胶过滤 (Sephacryl S-300 柱; 如上述) 的分析表明, 在所述 Fab 制品中没有检测到完整的 IgG。

[0079] 如 Sanders J, Oda Y, Roberts S, Kiddie A, Richards T, Bolton J, McGrath V, Walters S, Jaskolski D, Furmaniak J, Rees Smith B 1999. The interaction of TSH receptor autoantibodies with ¹²⁵I-labelled TSH receptor. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 1999;84:3797-3802 中所述, 以 ¹²⁵I 标记 5C9IgG, 或者以生物素酰肼 (Perbio Science, Cramlington, UK) 标记 5C9IgG。

[0080] 对 ¹²⁵I-TSH、¹²⁵I-M22 或 ¹²⁵I-5C9 与 TSHR 结合的抑制

[0081] 如 W02004/050708A2 中的描述, 使用经 TSHR 涂覆的管进行了结合抑制测定。在该测定中, 在室温下将 100 μL 试验样品 (Mab 制品、患者血清或未标记的 TSH) 和 50 μL 起始缓冲液 (RSR Ltd) 在经 TSHR 涂覆的管中轻轻振荡孵育 2 小时。在吸出后, 将所述管洗涤, 并且加入 100 μL 的 ¹²⁵I-标记的蛋白质 (5×10⁴cpm) 并在室温下振荡孵育 1 小时。然后, 将所述管吸出、洗涤并在 γ 计数器中计数。

[0082] 按照下式计算对经标记蛋白质的结合的抑制:-

[0083]

$$100 \times \left[1 - \frac{\text{在存在测验材料的情况下结合的cpm}}{\text{在存在对照材料的情况下结合的cpm}} \right]$$

[0084] 对照材料为混合的健康捐血者血清、个体的健康捐血者血清或在各个实验结果中指示的其他材料。

[0085] 对 5C9IgG 与 TSHR 结合的 Scatchard 分析

[0086] 在室温下, 将溶于 50 μL 测定缓冲液 (50mmol/L NaCl, 10mmol/L Tris (pH 7.8) 和

1% Triton X-100) 中未标记的 5C9IgG 和 50 μ L 的 125 I- 标记的 5C9IgG (溶于测定缓冲液中 30,000cpm) 在经 TSHR 涂覆的管中振荡孵育 2 小时 (在这些条件下出现最大结合)、吸出、以 1mL 测定缓冲液洗涤两次并在 γ 计数器中计数。对结合的 IgG 的浓度与结合的 / 游离的 IgG 的浓度进行作图 (Scatchard G 1949 The attraction of proteins for small molecules and ions. Annals of the New York Academy of Sciences 51:660-672), 以推导缔合常数。

[0087] 对环 AMP 产生的刺激的分析

[0088] 如 W02004/050708A2 中所述, 测验了 5C9IgG 和其他制品在以人 TSHR 转染的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中刺激环 AMP 产生的能力。将每个细胞表达大约 5×10^4 个或大约 5×10^5 个 TSHR 的 CHO 细胞以每个孔 3×10^4 个细胞接种于 96- 孔板中, 在无胎牛血清的 DMEM (Invitrogen Ltd, Paisley, UK) 中进行适应, 然后添加试验样品 (TSH、IgG 或患者血清) (100 μ L 稀释于环 AMP 测定缓冲液, 即无 NaCl 的 Hank's 缓冲盐溶液, 包含 1g/L 葡萄糖、20mmol/L HEPES、222mmol/L 蔗糖、15g/L 牛血清白蛋白和 0.5mmol/L 的 3- 异丁基-1- 甲基黄嘌呤 (pH 7.4)), 并在 37°C 下孵育 1 小时。在除去试验溶液后, 将细胞裂解并通过以下两方法的一种测定所述裂解产物中的环 AMP 浓度: 1) 使用来自 GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK 的 Biotrak 酶免疫测定系统; 和 2) 使用来自 Assay Designs; Cambridge Bioscience, UK 的 Direct Cyclic AMP Correlate EIA 试剂盒。结果表示为细胞裂解产物 (200 μ L) 中 pmol/mL 的环 AMP, 或者表示为 fmol/ 细胞孔。

[0089] 对拮抗剂 (阻断) 活性的测量

[0090] 评估了 5C9IgG 和其他制品抑制猪 (p)TSH、天然人 (h)TSH 和重组体人 (rh)TSH、MAb M22 和患者血清 TRAb 在表达 TSHR 的 CHO 细胞中的刺激活性的能力。这一点的实现是通过在存在及不存在 5C9IgG (或其他试验制品) 的情况下, 比较 TSH、M22 或 TRAb 的刺激效应。按上文所述进行该测定, 除了将 50 μ L 稀释于环 AMP 测定缓冲液中的 5C9 (或其他试验制品) 添加至所述细胞孔, 然后添加 50 μ L 的 TSH、M22 或患者血清 (在环 AMP 测定缓冲液中适当稀释), 并如上文所述刺激测定进行孵育和试验。

[0091] 除了 5C9 之外, 在该测定中测验了其他 MAb 和来自具有阻断类型 TRAb 的患者的血清。

[0092] 可变区基因的分析

[0093] 如 W02004/050708A2 中所述, 使用从 1×10^7 个分泌 5C9IgG 的异源杂交瘤细胞制备的总 RNA 以产生用于 RT-PCR (逆转录 PCR) 反应的 mRNA, 确定了 5C9 重链和轻链的可变区基因。使用 Medical Research Council 的 V-base (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) 设计特异性 IgG1HC 和 κ LC 正义和反义链寡核苷酸引物, 并由 Invitrogen (Paisley, PA49RF, UK) 合成这些引物。在以下条件下进行 RT 反应: 50°C 下 15 分钟; 然后进行 40 个 PCR 循环, 每个循环为: 94°C 下 15 秒、50°C 下 30 秒及 72°C 下 30 秒。将 DNA 产物克隆至 pUC18 中, 并用 Sanger-Coulson 法进行测序 (Sanger F, Nicklen S, Coulson AR 1977 DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 74:5463-5467)。使用 Ig blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) 将 V 区序列与已有人 Ig 基因序列比较。

[0094] 对人 TSHR 序列中的氨基酸突变对 5C9 活性的效应的分析

[0095] 用于将具体突变引入 TSHR 序列的方法已经被记载于专利申请 WO2006/016121A 中。而且,使用 Flp-In 系统将突变的 TSHR 构建体转染至 CHO 细胞中也被记载于 WO2006/016121A 中。

[0096] 将表达野生型或突变 TSHR 的 Flp-In-CHO 细胞接种于 96 孔板中,并如上文所述用于测验 5C9 制品阻断 TSH、M22 或患者血清 TRAb 的刺激活性的能力。

[0097] 对于 TSHR 抗体、TSH 和相关分子的基于 5C9 的测定

[0098] 将 2.55mg/mL 的 5C9IgG 透析至 100mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 8.5) 中,并与 EZ-Link NHS-LC-Biotin(Perbio) 进行反应,IgG 与生物素的摩尔比为 1/10。在室温下,将试验血清样品 (75 μ L) 在经 TSHR-涂覆的 ELISA 板孔 (RSRLtd) 中振荡 (每分钟振荡 500 次) 孵育 2 小时。在除去所述试验样品并洗涤后,添加生物素标记的 5C9IgG (100 μ L 中 2ng),并在室温下不振荡继续孵育 25 分钟。将孔清空、洗涤并添加 100 μ L 链亲合素-过氧化物酶 (100 μ L 中 10ng;RSR Ltd),并在室温下不振荡继续孵育 20 分钟。然后,将孔洗涤 3 次,添加过氧化物酶的底物四甲基联苯胺 (tetramethyl benzidine) (TMB;100 μ L;RSR Ltd),并在避光且不振荡的条件下,在室温下孵育 30 分钟。然后,添加 50 μ L 的 0.5mol/L H_2SO_4 以终止该反应,使用 ELISA 板读数仪在 450nm 下读取每个板孔的吸光度。按照下式计算对 5C9IgG-生物素结合的抑制:-

[0099]

$$100 \times \left[1 - \frac{\text{试验样品在 450 nm 下的吸光度}}{\text{阴性对照血清样品在 450 nm 下的吸光度}} \right]$$

[0100] 结果

[0101] 5C9 分泌细胞系的分离及克隆化

[0102] 将从 20mL 患者血液中的淋巴细胞 (27×10^6) 以 EBV 感染,并在 48 孔板中以每孔 1×10^6 个细胞铺展于小鼠巨噬细胞饲养层之上。在 EBV 感染后第 13 天,在板孔上清液中监测对 ^{125}I -TSH 结合的抑制。将来自阳性孔的细胞扩大,与 K6H6/B5 杂交瘤细胞系融合,并在 96 孔板中铺展。获得了一个稳定产生具有 ^{125}I -TSH 结合抑制活性的抗体的克隆,并进行 4 次再克隆。从异源杂交瘤培养物上清液中纯化的被命名为 5C9 的单克隆抗体是具有 κ 轻链的亚类 IgG1。

[0103] 5C9IgG 的 TSHR 结合活性和阻断活性

[0104] 表 1 中显示了,不同浓度的 5C9IgG 抑制标记的 TSH、标记的 M22 或标记的 5C9 自身与 TSHR 结合的能力。如表 1 中所示,在使用少至 0.005 μ g/mL 的 5C9IgG 的情况下, ^{125}I -TSH 的结合出现了 12% 的抑制,并且该抑制以剂量依赖的方式增大,在 100 μ g/mL 的 5C9 时抑制最高升至 84%。这可与捐献者的血清 IgG 对 ^{125}I -TSH 结合的抑制相似;在 0.05mg/mL 时抑制 13%,并且在 1mg/mL 时以剂量依赖的方式增大至抑制 94%。在捐献者的血浆的情形下,在以 1 : 160 稀释健康捐血者的混合血清时, ^{125}I -TSH 结合出现了 16% 的抑制,在以 1 : 10 稀释时抑制为 95%。

[0105] 5C9IgG 还对 ^{125}I -M22IgG 与涂覆在管上的 TSHR 的结合有效应 (表 1)。在 0.01 μ g/mL 的 5C9IgG 时, ^{125}I -M22IgG 的结合出现了 9% 的抑制,并且在增加浓度时引起该抑制以剂量依赖的方式增大,在 100 μ g/mL 时最高达 85%。捐献者血清 IgG 在 0.01mg/mL 下是有效的,引起 9% 的抑制,并且在 1mg/mL 时以剂量依赖的方式增大至 89% 的抑制。在以 1 : 320

稀释时,捐献者的血清血浆显示出对 ^{125}I -M22IgG 结合的 13%的抑制,在以 1 : 10 稀释时抑制 91%。

[0106] 未标记的 5C9IgG 能够以剂量依赖的方式抑制 ^{125}I -5C9 与经 TSHR 涂覆的管的结合(在 $0.005\mu\text{g/mL}$ 时抑制 11%,在 $100\mu\text{g/mL}$ 时最多升至抑制 88%)(表 1)。 ^{125}I -5C9 的结合还被捐献者的血清 IgG 抑制(在 $0.05\mu\text{g/mL}$ 时抑制 15%,在 1mg/mL 时抑制 91%),以及被捐献者血浆的稀释物抑制(在 1 : 320 的稀释度时抑制 10%,在 1 : 10 的稀释度时 92%)。

[0107] 表 2a-c 中显示了,5C9IgG 在表达 TSHR 的 CHO 细胞中阻断 TSH 和 M22- 介导的对环 AMP 的刺激的能力。猪 TSH(3ng/mL) 强烈地刺激环 AMP 的产生($19,020\pm 2154\text{fmol/细胞孔}$; 平均值 $\pm\text{SD}$; $n = 3$)(表 2a)。在存在 $0.1\mu\text{g/mL}$ 的 5C9IgG 的情况下,猪 TSH 的刺激活性降低至 $11874\pm 4214\text{fmol/细胞孔}$ (平均值 $\pm\text{SD}$; $n = 3$),并且该抑制效应依赖于 5C9 浓度,在存在 $1\mu\text{g/mL}$ 的 5C9 时仅产生 $2,208\pm 329\text{fmol/细胞孔}$ 的环 AMP(表 2a)。淋巴细胞捐献者的血清还在 CHO-TSHR 细胞中对 TSH 介导的环 AMP 刺激有强效应。如表 2a 中所示,在存在 1 : 10 稀释度的捐献者血清的情况下(该稀释度下的总血清 IgG 浓度为 1.43mg/mL),对环 AMP 产生的抑制将其降低至大约 6000fmol/细胞孔 ,这类似于不存在血清下的 19000fmol/细胞孔 。该效应对应于大约 $0.37\mu\text{g/mL}$ 的纯化 5C9IgG 的效应(利用表 2a 中所示不同浓度 5C9IgG 的效应的稀释度曲线计算而得)。这表明,在阻断 TSH 刺激环 AMP 产生的能力这方面,纯化 5C9IgG 的活性比捐献者血清 IgG 高出大约 3900 倍。

[0108] 5C9 的片段,例如 5C9F(ab')₂ 和 5C9Fab 也是有效的 TSH 刺激的抑制物。具体而言,5C9IgG、5C9F(ab')₂ 和 5C9Fab 在 $100\mu\text{g/mL}$ 时的 TSH 刺激抑制活性是相同的(表 2b)。在 $10\mu\text{g/mL}$ 时,所有三种制品:5C9IgG、5C9F(ab')₂ 和 5C9Fab 也是 TSH 刺激活性的强效抑制剂,然而,5C9IgG 似乎比 5C9F(ab')₂ 或 5C9Fab 更有效(表 2b)。

[0109] M22Fab(3ng/mL) 是一种环 AMP 的强效刺激物($9,432\pm 822\text{fmol/细胞孔}$)(表 2c),并且在存在 5C9 的情况下,M22Fab 的刺激效应被以剂量依赖的方式抑制,环 AMP 的水平在存在 $0.1\mu\text{g/mL}$ 的 5C9IgG 的情况下降低至 $1,298\pm 134\text{fmol/细胞孔}$ 。M22 刺激的完全抑制出现于 $100\mu\text{g/mL}$ 的 5C9 时(表 2c)。

[0110] Scatchard 分析表明了, ^{125}I - 标记的 5C9 以 $4\times 10^{10}\text{L/mol}$ 的缔合常数结合于 TSHR。

[0111] 血清 TRA b 对 ^{125}I -5C9IgG 与 TSHR 结合的抑制

[0112] 表 3 和图 1 中显示了,血清 TRAb 抑制 ^{125}I -5C9IgG 与经 TSHR 涂覆的管结合的能力。还为了比较之目的示出了相同血清 TRAb 对 ^{125}I -TSH 结合及 ^{125}I -M22IgG 结合的效应。

[0113] ^{125}I -5C9IgG 与 TSHR 的结合没有被来自 10 个不同健康捐血者的血清(N1-N10,表 3) 明显抑制(抑制范围 3.4-18.9%)。在 ^{125}I -TSH 和 ^{125}I -M22 抑制测定中(表 3),来自 40 名均为 TSHR 自身抗体阳性的格雷夫斯病患者的血清(G1-G40,表 3) 对 ^{125}I -5C9 与经 TSHR 涂覆的管结合(抑制范围 22.0-85.2%)的抑制,达到了比来自健康捐血者的血清更大的程度(表 3)。患者血清 TRAb 抑制 ^{125}I -5C9IgG、 ^{125}I -TSH 或 ^{125}I -M22IgG 与 TSHR 结合的能力是相当的,Pearson 相关系数 $r = 0.95$ (^{125}I -5C9IgG 与 ^{125}I -TSH;图 1a) 和 $r = 0.95$ (^{125}I -5C9IgG 与 ^{125}I -M22IgG;图 1b)。图 1c 显示相同血清对 ^{125}I -TSH 和 ^{125}I -M22 IgG 抑制的比较(Pearson 系数 $r = 0.99$)。

[0114] 这些实验表明,5C9IgG 与 TSHR 的结合可被血清 TRAb 有效地抑制,并且血清 TRAb

对 5C9IgG 结合的抑制效应类似于它们对 TSH 或 M22 结合的抑制效应。

[0115] 表 4 显示了不同稀释度的具有 TSH 阻断活性的患者血清 TRAb (B1-B5) 及具有强甲状腺刺激活性的患者血清 TRAb (S1、S2 和 S4) 对 ^{125}I -5C9IgG 结合的抑制。 ^{125}I -5C9IgG 的结合被血清 B1-B5, 以及血清 S1、S2 和 S4 以剂量依赖的方式抑制。同样这些阻断和刺激血清还以剂量依赖的方式抑制 ^{125}I -TSH 和 ^{125}I -M22IgG 结合, 而且在同样的血清稀释度下所有三种经标记配体的抑制百分数是相当的 (表 4a & b)。

[0116] 这些结果表明, 具有刺激活性和阻断活性的 TSHR 自身抗体可抑制 5C9 与 TSHR 的结合。

[0117] 具有 TSH 结合抑制活性的小鼠 MAbs 对 ^{124}I -5C9IgG 与 TSHR 结合的抑制

[0118] 测验具有 ^{125}I -TSH 结合抑制活性的不同小鼠 TSHR MAbs 抑制 ^{125}I -5C9 与 TSHR 结合的能力, 并与对 ^{125}I -M22IgG 结合的效应进行比较 (表 5)。如表 5 中所示, 具有抑制 ^{125}I -TSH 结合和 ^{125}I -M22IgG 结合的能力的所有 MAbs 还抑制了 ^{125}I -5C9 结合, 但在某些 MAbs 的情况下对 ^{125}I -5C9 结合和 ^{125}I -M22 结合的抑制效应弱于对 ^{125}I -TSH 结合的效应。

[0119] 这些实验表明, 5C9 在 TSHR 上的结合位点和小鼠 TSHR MAbs 在 TSHR 上的结合位点之间有大量的重叠, 所述小鼠 TSHR MAbs 具有抑制 TSH 结合的能力。

[0120] 5C9IgG 在表达 TSHR 的 CHO 细胞中对患者血清对环 AMP 产生的刺激的效应

[0121] 如表 2 中所示, 5C9IgG 能够在表达 TSHR 的 CHO 细胞中阻断 TSH 或 M22 对环 AMP 水平的刺激。在不同系列的实验中, 测验了 5C9IgG 对患者血清 TRAb 的刺激活性的效应, 结果显示于表 6a 中。血清 T1-T9 和 T11-T18 在 CHO-TSHR 细胞中刺激了环 AMP 的产生, 并且与对照 MAbs IgG (对人甲状腺过氧化物酶特异性的 2G4) 的孵育对它们的刺激活性没有效应。然而, 在存在 5C9IgG (50 μL 的 200 $\mu\text{g/mL}$) 的情况下, 所有测验血清的刺激活性都显著降低 (表 6a)。

[0122] 6 种不同血清 (T1、T6、T3、T19、T20 和 T21) 的剂量响应效应显示于表 6b-g 中。在这些实验中, 浓度范围 0.1 $\mu\text{g/mL}$ -100 $\mu\text{g/mL}$ 的 5C9IgG 导致了血清刺激活性的剂量依赖的降低, 并且在除血清 T3 之外的所有测验血清中, 5C9IgG 的效应都与 9D33 的效应相当, 后者是具有阻断活性的抗 TSHR 的小鼠单克隆抗体 (记载于 WO2004/050708A2 中)。对于 T3 血清的情况 (表 6a&6d), 在存在 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 5C9IgG 的情况下观察到对环 AMP 产生的约 50% 的抑制, 而 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 9D33IgG 导致了几乎完全抑制。这表明, 在 5C9 和 9D33 所识别的表位之间可能有一些微小差异。

[0123] 5C9IgG 在表达 TSHR 的 CHO 细胞中对基础 (即未受激的) 环 AMP 产生的效应

[0124] 除了抑制 TSH 和 TSHR 抗体的刺激活性之外, 5C9 在不存在这些甲状腺刺激物的情况下抑制了环 AMP 的产生量。具体地, 表 6b 显示了, 在存在 100 $\mu\text{g/mL}$ 对照单克隆的 IgG (2G4) 的情况下所产生的 $1207 \pm 123\text{fmol/细胞孔}$ 的环 AMP, 在存在 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 5C9IgG 的情况下降低至 $301 \pm 38\text{fmol/细胞孔}$ 。9D33IgG 的效应较小, 存在 100 $\mu\text{g/mL}$ 9D33IgG 的情况下产生 $721 \pm 183\text{fmol/细胞孔}$ 。在显示于表 6d、6e、6f 和 6g 的独立实验中得到了类似的结果。这表明, 5C9IgG 对 TSHR 的基础活性或组成型活性具有显著的效应。

[0125] 5C9IgG 在表达包含氨基酸突变的 TSHR 的 CHO 细胞中对环 AMP 产生的刺激的效应

[0126] 图 7 中显示了, 在 CHO-TSHR 细胞中, TSHR 的单氨基酸突变对 5C9 阻断猪 TSH 的环 AMP 刺激活性的能力的效应。具体而言, 在这样的 CHO 细胞中研究了 5C9 对环 AMP 产生

的刺激效应,即这种 CHO 细胞表达以下残基突变成丙氨酸的 TSHR:Lys 58、Ile 60、Arg 80、Tyr 82、Thr 104、Arg 109、Lys129、Phe 134、Asp 151、Lys 183、Gln 235、Arg 255、Trp 258 和 Ser 281。另外,在以下 TSHR 残基的情况下研究了对荷电突变进行改变的效应:Arg80Asp、Asp151Arg、Lys183Asp 和 Arg255Asp,其中依照常规的表示法,被替换的氨基酸残基及其在原始序列的多肽中的位置被标明于替换氨基酸残基之前。以前的研究已表明,对 TSHR Asp160Lys 的荷电突变进行改变导致 TSHR 失去了对 TSH 的响应性,而对 M22 的响应未受影响(专利申请 W02006/016121A)。因此,使用 M22 作为环 AMP 的刺激物,在 CHO-TSHR 细胞中研究了 TSHR Asp160Lys 突变对 5C9 生物活性的效应(表 71)。

[0127] 在所研究的所有 TSHR 突变中,仅发现 3 个突变对 5C9 作为拮抗剂的能力有影响。Lys129 突变成 Ala(表 7h) 导致 5C9IgG 完全丧失了阻断 TSH 对环 AMP 产生的刺激的能力。

[0128] 而且, TSHR 突变 Lys183Ala 引起了 5C9IgG 阻断活性的部分降低;在用 TSHR Lys183Ala 突变进行测验时,1 μ g/mL 时观察到对 TSH 刺激的 28%抑制,不同于使用野生型 TSHR 时的 84%抑制(表 7m)。甚至在 100 μ g/mL 的 5C9IgG 时,在用 TSHR Lys183Ala 突变的实验中仅检测对 TSH 刺激的部分抑制(43%),而在该浓度时,在用野生型受体的实验中观察到对 TSH 刺激活性的完全阻断(93%)(表 7m)。如果正电荷的 Lys183 突变成负电荷的天冬氨酸,那么对 5C9 生物活性的效应类似于使用 Lys183Ala 突变时观察到的效应(表 7m)。这说明了,Lys183 对 5C9 的生物活性是重要的。在 Asp151Ala 的情形下,观察到 5C9IgG 阻断活性出现了轻微的降低:在 1 μ g/mL 时 49%抑制,不同于野生型的 88%的抑制(表 7j)。然而,在存在 100 μ g/mL 的 5C9IgG 的情况下,该活性与野生型 TSHR 相同。当负电荷的 Asp151 突变成正电荷的精氨酸时,不会观察到 5C9IgG 阻断活性的显著降低(表 7k)。

[0129] 可以将 TSHR 突变对 5C9 活性的效应与 TSHR 突变对 9D33 活性的效应相比较。如专利申请 W02006/016121A 中所述, TSHR 突变 Lys 58、Arg 80、Tyr 82、Arg 109、Lys 129 和 Phe 134 均对 9D33 活性有效应。然而,除了 Lys 129 之外,这些突变中没有一种还对 5C9 活性有效应。再者,如专利申请 W02006/016121A 中所述,在影响 M22 活性的突变(Arg 80、Tyr 82、Glu 107、Arg 109、Lys 129、Phe 130、Lys 183、Tyr 185、Arg 255 和 Trp 258)中,除 Lys 129 之外没有一种影响了 5C9 活性。另外, Lys 183 突变对 5C9 活性和 M22 活性有部分的效应,但对 9D33 活性无效应。

[0130] 这些结果表明以下的 TSHR 残基中存在不同,所述残基即对于与甲状腺刺激性人抗体 M22、与小鼠阻断抗体 9D33 及与人阻断抗体 5C9 相互作用来说重要的 TSHR 残基。因此,5C9 与其他具有拮抗剂活性的 TSHR 抗体(如 9D33)的结合可能是一种特别有效的方式,用于抑制患者血清 TRAb 的刺激活性、其他刺激物和/或 TSHR 的组成型活性。

[0131] 5C9 的可变区序列

[0132] 对编码 5C9 的基因的序列分析表明,HC V 区基因来自 VH3-53 家族,D 基因来自 D2-2 家族,并且 J 基因来自 JH4 家族。在 LC 的情形下,V 区基因来自 012 家族且 J 区基因来自 JK2 种系。HC 的核苷酸和氨基酸序列分别显示于图 2a 和 2b 中,并且 LC 的核苷酸和氨基酸序列分别显示于图 3a 和 3b 中。

[0133] 与种系序列相比,HC 基因序列中有体细胞突变;具体是 FWR1 中 1 个沉默突变、CDR2 中 2 个替换突变、CDR3 中 1 个沉默突变和 1 个替换突变以及 FWR4 中 1 个沉默突变。然而,HC V 区序列的特征在于两个插入片段;一个在 V 基因和 D 基因之间长 6 个碱基对,另

一个在 D 基因和 J 基因之间长 15 个碱基对。因此,HC CDR1 长 5 个氨基酸、CDR2 长 16 个氨基酸且 CDR3 长 18 个氨基酸(图 2b)。

[0134] 在 LC 序列中有:FWR1 中 1 个沉默突变、CDR1 中 1 个替换突变、CDR3 中 1 个替换突变及在 V 基因和 J 基因之间 6 个碱基对长的插入片段。LC CDR1 由 11 个氨基酸组成、CDR2 由 7 个氨基酸组成且 CDR3 由 10 个氨基酸组成(图 3b)。

[0135] 用于检测 TSH 或 TRAb 的基于 5C9 的测定

[0136] 表 8 中显示了用于检测 TSHR 自身抗体的 ELISA 实例,该 ELISA 基于 5C9IgG- 生物素与经 TSHR 涂覆的板孔的结合。在该测定中,对于 TSH- 生物素结合的抑制呈阳性的所有样品均也对 5C9IgG- 生物素结合呈阳性。再者,TSH- 生物素测定和 5C9- 生物素测定中的吸光度信号、抑制百分数和派生的单位 /L 值是相当的(表 8)。

[0137] 5C9IgG 在表达 TSHR 的 CHO 细胞中对小鼠甲状腺刺激性单克隆抗体(小鼠 TSHR MAb ;TSMAB) 的刺激活性的效应

[0138] 如表 9 中所示,5C9IgG 能够阻断所有 5 种测验 TSMAB(1、2、4、5 和 7) 对环 AMP 产生的刺激。例如,TSMAB1(表 9) 刺激环 AMP 水平至 $18.94 \pm 7.4 \text{ pmol/mL}$,而在存在 $100 \mu\text{g/mL}$ 的 5C9IgG 情况下仅产生 $1.24 \pm 0.07 \text{ pmol/mL}$ 的环 AMP。这可以与存在 $100 \mu\text{g/mL}$ 的对照 MAb 2G4 的情况下 $16.5 \pm 1.1 \text{ pmol/mL}$ 的环 AMP 水平相比较(表 9)。

[0139] 表 9 中以及下文表 10-15 中显示的环 AMP 水平以 pmol/mL 表示,即每个细胞孔的环 AMP 水平为: $\text{pmol/mL} \div 5$ (代表 $200 \mu\text{L}$ 的来自每个测定孔的样品)。

[0140] 5C9IgG 在表达 TSHR 的 CHO 细胞中对天然人 TSH 和重组人 TSH 的刺激活性的效应

[0141] 表 2 和表 10 中显示了 5C9IgG 阻断猪 TSH 对环 AMP 刺激的能力。另外,5C9IgG 显示了抑制天然人 TSH(来自 National Institute for Biological Standards and Control, South Mimms, Potters Bar EN6 3QG UK 的 NIBSC 参照制品 81/565) 和重组 TSH(NIBSC 参照制品 94/674) 两者对环 AMP 刺激的能力(表 10)。具体而言, 100 ng/mL 的重组或天然人 TSH 对环 AMP 产生的刺激需要 $0.1\text{--}1.0 \mu\text{g/mL}$ 的 5C9IgG,以获得对环 AMP 产生的完全抑制。在采集用于分离 5C9 的血液时,捐献者血清中的循环系统 TSH 的水平为 160 mU/L (大约 32 ng/mL),所得的结果(表 2a 和表 10)表明,在血清中存在 $32\text{--}320 \text{ ng/mL}$ 的 5C9IgG 的情况下将完全阻断该水平的循环系统 TSH。使用对 ^{125}I -M22 与 TSHR 结合的抑制,评估了所述捐献者血清中 TSHR 自身抗体的水平(如 Nakatake N, Sanders J, Richards T, Burne P, Barrett C, Dal Pra C, Presotto F, Betterle C, Furmaniak J, Rees Smith B 2006 Estimation of serum TSH receptor autoantibody concentration and affinity. Thyroid 16:1077-1084 中所述),为 1700 ng/mL (120 ng/mg),即比用于阻断 TSH 的甲状腺刺激所需的 5C9 浓度高出数倍。

[0142] 5C9IgG 在表达具有活化突变 S281I、I568T 和 A623I 的 TSHR 的 CHO 细胞中对基础(即未受激的)环 AMP 活性的效应

[0143] 在不存在甲状腺刺激物(即 TSH 或 TSHR 抗体)时,5C9IgG 在表达具有活化突变的 TSHR 的 CHO 细胞中能够降低环 AMP 的产生量。如表 11a 中所示,在不存在 5C9 的情况下,基础环 AMP 在表达具有活化突变 S281I 的 TSHR 的 CHO 细胞中的浓度为 $9.90 \pm 1.51 \text{ pmol/mL}$,并且在存在 $0.01 \mu\text{g/mL}$ 的 5C9IgG 的情况下它降低至 $4.17 \pm 0.60 \text{ pmol/mL}$,且在存在 $1 \mu\text{g/mL}$ 的 5C9IgG 的情况下降低至 $3.44 \pm 0.63 \text{ pmol/mL}$ 。阻断性小鼠 TSHR MAb 9D33 和对照 MAb 2G4 都几乎没有效果(表 11a)。

[0144] 使用 TSHR 活化突变 I568T 获得了类似的结果(表 11b),该结果显示了 $21.39 \pm 5.31 \text{ pmol/mL}$ 的基础环 AMP 浓度。在添加 $1 \mu\text{g/mL}$ 的 5C9IgG 时它降低至 $5.29 \pm 0.75 \text{ pmol/mL}$,不同于添加 2G4IgG 和 5C9IgG 的情形下分别至 $20.52 \pm 0.95 \text{ pmol/mL}$ 和 $21.65 \pm 1.99 \text{ pmol/mL}$ 。在基础环 AMP 浓度为 36.89 pmol/mL 的第三种 TSHR 活化突变研究(即 A623I)的情形下,添加 $1 \mu\text{g/mL}$ 的 5C9IgG 将环 AMP 水平降低至 $16.43 \pm 1.27 \text{ pmol/mL}$,这不同于基本无效应的 $1 \mu\text{g/mL}$ 的对照 IgG 2G4($28.96 \pm 2.29 \text{ pmol/mL}$)或 $1 \mu\text{g/mL}$ 的 9D33IgG($40.09 \pm 7.73 \text{ pmol/mL}$)(表 11c)。

[0145] 这些结果表明,与小鼠阻断性 MAb 9D33 不同,5C9 对与 TSHR 活化突变相关的环 AMP 产生具有显著的效应,即便是当所述突变在 TSHR 的不同部分时(即细胞外结构域中的 S281I、跨膜结构域的第二细胞外环中的 I568T 及跨膜结构域的第三细胞内环中的 A623I)。

[0146] 在表达野生型 TSHR 的 CHO 细胞中对以下效应的比较:5C9、小鼠 TSHR 阻断性单克隆抗体 9D33 及这两种抗体的混合物对于由 TSH 介导的对环 AMP 产生的刺激的效应

[0147] 如前文的实验中和表 12 中所示,低至 $1 \mu\text{g/mL}$ 的浓度的人 TSHR 阻断性 MAb 5C9 和小鼠 TSHR 阻断性 MAb 9D33 在 CHO-TSHR 细胞中具有阻断 TSH 的 TSHR 环 AMP 刺激活性的能力。如表 12 的实验 1-5 中所示,9D33IgG 和 5C9IgG 对于由 TSH 介导的对环 AMP 的刺激效应是可相加的。当两个不同浓度的 TSH(3 ng/mL 和 0.3 ng/mL)用于刺激时(分别在表 12 的实验 1-3 及实验 4 和 5 中),出现了同样的相加效应。

[0148] 在表达野生型 TSHR 的 CHO 细胞中对以下效应的比较:5C9、小鼠 TSHR 阻断性单克隆抗体 9D33 及这两种抗体的混合物对于由 M22 介导的对环 AMP 产生的刺激的效应

[0149] 如前文所示,5C9 和 9D33 还能在 CHO-TSHR 细胞中抑制由 M22Fab 介导的对环 AMP 的刺激。9D33IgG 和 5C9IgG 对于由 M22 介导的对环 AMP 的刺激效应是可相加的(表 13,实验 1-4)。当两个不同浓度的 M22Fab(3 ng/mL 和 0.3 ng/mL)用于刺激时(分别在表 13 的实验 1 和 2 及实验 3 和 4 中),出现了同样的相加效应。

[0150] 5C9IgG 和 9D33IgG 对于由 TSH 和 M22 两者介导的对环 AMP 产生的刺激的相加效应都是类似的(表 12 和 13)。

[0151] 在每个细胞均表达大量野生型 TSHR 的 CHO 细胞中,5C9 对基础(即未受激的)环 AMP 活性的效应

[0152] 每个细胞均表达大约 5×10^5 个受体的 CHO 细胞系与前文实验中(例如表 9-13)使用的标准 CHO 细胞系(每个细胞表达大约 5×10^4 个 TSHR)相比,显示了较高水平的基础(即未受激的)环 AMP,即分别是 $47.1 \pm 11.7 \text{ pmol/mL}$ 和大约 1.0 pmol/mL 。使用每个细胞均表达大量受体的细胞系评估了 5C9IgG 和 9D33IgG 对野生型 TSHR 基础活性的效应。与 9D33IgG 和抗 GAD(5B3)的阴性对照抗体的孵育导致了对基础环 AMP 活性的 0-5.3%抑制(表 14;实验 1),表明该阻断性小鼠 MAb 9D33 或对照 MAb 在表达野生型 TSHR 的 CHO 细胞中对基础环 AMP 产生没有效应。然而,在 5C9IgG 的情形下观察到对基础环 AMP 活性的明显抑制(表 14;实验 2), $0.1 \mu\text{g/mL}$ 和 $10 \mu\text{g/mL}$ 分别导致 45.7%和 74.6%的抑制。另外,在每个细胞均表达大量野生型 TSHR 的 CHO 细胞中,5C9Fab 和 5C9F(ab')也是基础环 AMP 活性的有效抑制剂(表 14 实验 3)。例如, $1 \mu\text{g/mL}$ 和 $100 \mu\text{g/mL}$ 的 5C9Fab 分别显示了对基础环 AMP 产生的 39%和 61%的抑制,均不同于 $100 \mu\text{g/mL}$ 的 5C9F(ab')的 48%的抑制(表 14 实验 3)。

[0153] 具有拮抗剂(即阻断)活性的患者血清 TSHR 自身抗体在表达具有活化突变 I568T

的 TSHR 的 CHO 细胞中对基础（即未受激的）环 AMP 活性的效应

[0154] 在存在 $20.5 \pm 8.7 \text{ pmol/mL}$ 的环 AMP 测定缓冲液的情况下, TSHR I568T 细胞的基础环 AMP 产生基本上不会受到添加来自健康捐血者的正常混合血清 (NPS) 或 3 种不同个体的健康捐血者血清 (N1-N3) 的影响, 所述血清是以 1/10 和 1/50 的稀释度测验的。与在存在环 AMP 测定缓冲液的情况下的基础环 AMP 产生相比, 在存在 NPS 和 N1-N3 血清的情况下的基础环 AMP 产生显示了 0-14% 的抑制 (表 15)。然而, 在存在具有高水平阻断型 TRAb 的 4 种不同血清 (B2-B5) 的情况下则观察到对基础环 AMP 产生的 23-89% 的抑制 (表 15)。在存在 5C9IgG ($1 \mu\text{g/mL}$) 的情况下, 观察到对 TSHR I568T 基础环 AMP 活性的 83% 的抑制。表 15 中还显示了, 2 种阻断性血清 (B3 和 B4) 在表达具有 I 568T 突变的 TSHR 的 CHO 细胞中对基础环 AMP 产生的剂量响应效应。

[0155] 这些结果表明, 5C9 具有患者阻断性 TSHR 自身抗体的 TSHR 阻断活性特征, 具体地有关 TSHR 活化突变体 I 568T 中对基础环 AMP 产生的抑制。

[0156] 具有拮抗剂活性的患者血清 TSHR 自身抗体在表达具有活化突变 S281I 的 TSHR 的 CHO 细胞中对基础（即未受激的）环 AMP 活性的效应

[0157] 在存在环 AMP 测定缓冲液的情况下, TSHR S281I 细胞的基础环 AMP 产生为 $11.2 \pm 2.0 \text{ pmol/mL}$, 并且与健康捐血者混合血清或个体的健康捐血者血清 (1/10 或 1/50 稀释) 的孵育没有效应 (表 16)。相反, 在存在具有高水平阻断类型 TRAb 的 4 种不同血清 (B2-B5) 的情况下, 观察到对基础环 AMP 产生的 31-56% 的抑制 (表 16)。在使用 TSHR S281I 的实验中, $1 \mu\text{g/mL}$ 的 5C9IgG 引起了对基础环 AMP 活性的 71% 的抑制。

[0158] 具有拮抗剂活性的患者血清 TSHR 自身抗体在表达具有活化突变 A623I 的 TSHR 的 CHO 细胞中对基础（即未受激的）环 AMP 活性的效应

[0159] 在存在环 AMP 测定缓冲液的情况下, TSHR A623I 细胞的基础环 AMP 产生为 $43.5 \pm 11.2 \text{ pmol/mL}$, 并且基本不受与健康捐血者混合血清或个体的血清的孵育的影响 (表 17)。在这些实验中, 与具有高水平阻断型 TRAb 的 4 种不同血清 (B2-B5) 进行孵育引起了对环 AMP 的 -1% -56% 的抑制 (表 17)。这可以与在相同实验中由 $1 \mu\text{g/mL}$ 的 5C9IgG 引起的 49% 的抑制相比较。

[0160] 在每个细胞均表达 5×10^5 个野生型 TSHR 的 CHO 细胞中, 具有拮抗剂活性的患者血清 TSHR 自身抗体对基础（即未受激的）环 AMP 活性的效应

[0161] 在该系列实验中, 在每个细胞均表达较高数目野生型 TSHR 的 CHO 细胞中的基础环 AMP 产生为 $28.1 \pm 0.7 \text{ pmol/mL}$ 。当所述细胞与 1/10 稀释度的健康捐血者混合血清或个体血清 (N1-N3) 进行孵育时, 基础环 AMP 水平的范围是在存在环 AMP 测定缓冲液的情况下的环 AMP 水平的 99% -146%, 而该范围在 1/50 的稀释度时为 93% -137%。在具有阻断型 TSHR 自身抗体的 4 种测验血清中, 一种血清 (B2) 对基础环 AMP 产生无效应 (表 18)。在两种血清 (B3 和 B5) 的情形下, 环 AMP 的水平高于在存在环 AMP 测定缓冲液的情况下观察到的水平 (表 18)。有充分理由的是, 血清 B3 和 B5 包含一种具有刺激活性和阻断活性的 TSHR 自身抗体的混合物。相反, 以 1/10 和 1/50 稀释度的血清 B4 对基础环 AMP 产生有明显的抑制效应, 即相与在存在环 AMP 测定缓冲液的情况下的水平相比分别为基础环 AMP 水平的 31% 和 61% (表 18)。与在存在环 AMP 测定缓冲液的情况下的水平相比, 这可以与在存在 $1 \mu\text{g/mL}$ 的 5C9IgG 的情况下 33% 的水平相比较 (表 18)。

[0162] 总 5C9IgG 在以野生型 TSHR 或以具有活化突变的 TSHR 转染的 CHO 细胞中对基础环 AMP 产生的效应,与使用来自对阻断型 TSHR 自身抗体阳性的患者的血清时观察到的效应类似。然而,在不同突变的情形下个体患者血清的效应是不同的(表 19)。在野生型 TSHR 的情形下,一些血清显示了刺激效应,所述刺激效应被推测是由 TSHR 刺激性抗体以及阻断性抗体的存在引起(表 19)。

[0163] 5C9 在表达包含氨基酸突变的 TSHR 的 CHO 细胞中对环 AMP 产生的刺激的效应

[0164] 在表达具有氨基酸突变的 TSHR 的 CHO 细胞中,将 5C9 对环 AMP 产生的刺激的效应扩展至包括以下至丙氨酸的突变:Asp43、Glu61、His105、Glu107、Phe130、Glu178、Tyr185、Asp203、Tyr206、Lys209、Asp232、Lys250、Glu251、Thr257、Arg274 和 Asp276(表 20a-p 并总结于表 21 中)。

[0165] 将 TSHR 的氨基酸 Asp43、Glu61、His105、Glu107、Tyr185、Asp232 和 Thr275 突变成丙氨酸,对 5C9IgG 抑制 TSH 刺激环 AMP 产生的能力没有效应。通过将 TSHR Phe130、Glu178、Asp203、Tyr206、Lys250、Glu251 和 Asp276 突变成丙氨酸,降低了 5C9 抑制 TSH 刺激环 AMP 产生的能力。在 Lys209Ala 和 Asp274Ala 这两个突变的情形下,5C9IgG 抑制 TSH 刺激环 AMP 产生的能力升高。

[0166] 总之(表 7、20 和 21),与野生型 TSHR 比较,10 个 TSHR 残基 Lys 129、Phe130、Asp151、Glu178、Lys183、Asp203、Tyr206、Lys250、Glu251 和 Asp276 都降低了 5C9 抑制 TSH 的环 AMP 刺激的能力。TSHR 的 Lys129 和 Asp203 突变显示了最大的效应并引起对 5C9 活性的完全抑制。

[0167] 在表达野生型 TSHR 的 CHO 细胞中与在表达突变的 TSHR Asp203Ala 的 CHO 细胞中比较阻断性血清 B2-B5 对于由 TSH 介导的对环 AMP 产生的刺激的效应

[0168] 1 μ g/mL 的 5C9 对野生型 TSHR 的阻断效应(对 TSH 诱导的环 AMP 刺激的 92% 的抑制)在 TSHR Asp203Ala 突变的情形下降低至 4%(表 22)。

[0169] 阻断性血清 B4 活性不受 TSHR Asp203Ala 突变的影响,而与野生型 TSHR 相比,在 TSHR Asp203Ala 的情形下,使用阻断性血清 B2 和 B3 时观察到对 TSH 诱导的环 AMP 刺激的抑制百分数稍低。

[0170] 在一种血清 B5 的情形下,观察到对 TSH 诱导的环 AMP 刺激的抑制百分数出现了显著降低;即在野生型和突变的 TSHR 中不同,分别抑制 69% 和 30%。

[0171] TSHR Asp203Ala 突变对 5C9 活性的效应大于对阻断性血清活性的效应,然而 3/4 的测验血清的阻断活性被影响至不同的程度。这可能表明了,用于阻断 TSHR 自身抗体的结合位点和 5C9 有重叠,但是与不同血清接触的实际 TSHR 氨基酸中存在一些差异。

[0172] 总结和结论

[0173] 上文描述的实验提供了这样的证据,即根据本发明的抗体(例如 5C9)能阻断不同甲状腺刺激物的刺激活性,所述甲状腺刺激物包括人和小鼠 TSHR 刺激性抗体、天然的人和动物 TSH 以及重组人 TSH。再者,提供了这样的证据,即两种不同的阻断类型的抗体——人 MAbs 5C9 和小鼠 MAbs 9D33,在被单独测验时在表达 TSHR 的 CHO 细胞中具有阻断由 TSH 或 M22 介导的对环 AMP 的刺激的能力,并且在被混合在一块时显示出对 TSH 或 M22 刺激的可相加阻断效应。

[0174] 根据本发明的抗体(例如 5C9)对 TSHR 基础(即未受激的)环 AMP 活性的新效应。

已通过使用具有更高基础环 AMP 水平的 TSHR 转染 CHO 细胞的实验研究了这些效应,即已确证了根据本发明的抗体(例如 5C9)对基础环 AMP 活性的阻断效应。再者,已表明,一些含有具有阻断(拮抗剂)活性的 TSHR 自身抗体的血清在这些 TSHR 转染的细胞中具有阻断基础环 AMP 活性的能力。这些实验还提供了这样的证据,即根据本发明的抗体(例如 5C9 和血清 TSHR 阻断性抗体)对与活化 TSHR 突变相关的基础环 AMP 活性有阻断效应。

[0175] 这些结果强调,5C9 是一种显示阻断类型的 TSHR 自身抗体的特征的人 Mab,即它是与自身免疫甲状腺疾病相关的患者血清 TSHR 自身抗体的代表。

[0176] 所述的实验还使得可鉴定这样的一些 TSHR 氨基酸,即这些 TSHR 氨基酸对于根据本发明的抗体的阻断活性是重要的。

[0177] 总的来说,这些结果表明,根据本发明的抗体(例如 5C9)与在来自患自身免疫甲状腺疾病患者的不同血清中出现的 TSHR 阻断性抗体相比,显示出类似的 TSHR 结合活性及类似的对 TSHR 功能的生物效应。因此,由于具有血清阻断性 TSHR 自身抗体的特征和生物活性,根据本发明的抗体(例如 5C9)可在多种临床病症中用于将 TSHR 失活。这些病症包括 TSH 介导的 TSHR 活化、由甲状腺刺激性 TSHR 自身抗体介导的 TSHR 活化、基础(即未受激的、组成型)TSHR 活性以及与活化性 TSHR 突变相关的 TSHR 活化。因此,根据本发明的抗体(例如 5C9)可应用于对与上文提及的 TSHR 活化相关的病症进行治疗和控制;例如格雷夫斯病、格雷夫斯眼病、由 TSHR 活化突变引起的甲状腺功能亢进症、由 TSH 水平异常(病理学的或药理学的)引起的甲状腺功能亢进症、甲状腺癌和甲状腺癌转移。

[0178] 表 1

[0179] 5C9IgG、捐淋巴细胞者 IgG、捐淋巴细胞者血浆对于 ^{125}I -TSH、 ^{125}I -M22IgG 或 ^{125}I -5C9IgG 与经 TSHR 涂覆的管结合的抑制

[0180]

样品	^{125}I -TSH (抑制%)	^{125}I -M22IgG (抑制%)	^{125}I -5C9 (抑制%)
捐献者血浆(稀释于 HBD 混合物中)			
1/5	97	92	93
1/10	95	91	92
1/20	82	85	82
1/40	57	75	56
1/80	30	53	29
1/160	16	29	13
1/320	8	13	10

捐献者 IgG (稀释于 1mg/mL HBD 混合 IgG 中)			
1mg/mL	94	89	91
0. 5mg/mL	90	86	89
0. 25mg/mL	63	79	64
0. 1mg/mL	29	51	26
0. 05mg/mL	13	29	15
0. 025mg/mL	2	17	5
0. 01mg/mL	5	9	1

[0181]

5C9IgG (稀释于 100 μ g/mL 2G4 中)			
100 μ g/mL	84	85	88
50 μ g/mL	76	81	80
25 μ g/mL	67	69	71
10 μ g/mL	54	60	59
5 μ g/mL	47	53	54
2. 5 μ g/mL	42	43	49
1 μ g/mL	37	31	42
0. 5 μ g/mL	33	32	41
0. 1 μ g/mL	29	22	34
0. 05 μ g/mL	25	19	30
0. 01 μ g/mL	13	9	15
0. 005 μ g/mL	12	5	11
0. 001 μ g/mL	3	2	3

- [0182] 标记的示踪物与经 TSHR 涂覆的管的平均结合%为；
- [0183] 在用 ^{125}I -TSH 的实验中 14%；
- [0184] 在用 ^{125}I -M22IgG 的实验中 21%；
- [0185] 并且在用 ^{125}I -5C9 的实验中 20%；
- [0186] HBD 混合物=健康捐血者血清的混合物；
- [0187] 2G4 =对照 IgG(抗甲状腺过氧化物酶的人 MAbs)。
- [0188] 表 2a
- [0189] 5C9IgG 或捐淋巴细胞者血清 IgG 在表达人 TSHR 的 CHO 细胞中对于环 AMP 产生的 TSH 刺激的效应
- [0190]

样品	IgG 浓度	环 AMP(fmol/ 细胞孔； 平均值 $\pm$ SD, n = 3)
仅 pTSH(3ng/mL)		19020 $\pm$ 2154
仅 5C9IgG	1 μ g/mL	141 $\pm$ 5
5C9IgG+pTSH(3ng/mL)	1 μ g/mL	2208 $\pm$ 329
5C9IgG+pTSH(3ng/mL)	0.5 μ g/mL	4754 $\pm$ 876
5C9IgG+pTSH(3ng/mL)	0.1 μ g/mL	11874 $\pm$ 4214
5C9IgG+pTSH(3ng/mL)	0.08 μ g/mL	14525 $\pm$ 3690
5C9IgG+pTSH(3ng/mL)	0.06 μ g/mL	13290 ¹
5C9IgG+pTSH(3ng/mL)	0.04 μ g/mL	13928 $\pm$ 1572
5C9IgG+pTSH(3ng/mL)	0.02 μ g/mL	16432 $\pm$ 9286
5C9IgG+pTSH(3ng/mL)	0.01 μ g/mL	18969 $\pm$ 5308
仅环 AMP 测定缓冲液		207 $\pm$ 51
捐献者血清 ^a 1/10	1.43mg/mL ^b	1102 $\pm$ 46
捐献者血清 1/10+pTSH(3ng/mL)	1.43mg/mL	5931 $\pm$ 350
捐献者血清 1/20+pTSH(3ng/mL)	0.715mg/mL	16886 $\pm$ 728
捐献者血清 1/30+pTSH(3ng/mL)	0.477mg/mL	16453 $\pm$ 3455
捐献者血清 1/40+pTSH(3ng/mL)	0.358mg/mL	17716 $\pm$ 1753

捐献者血清 1/50+pTSH(3ng/mL)	0.286mg/mL	17928±4772
-------------------------	------------	------------

[0191]

捐献者血清 1/100+pTSH(3ng/mL)	0.143mg/mL	18226±2268
--------------------------	------------	------------

[0192] ¹ 单次测定[0193] ^a 按所示将捐献者血清稀释于环 AMP 测定缓冲液[0194] ^b 通过浊度法测定的未稀释血清 IgG 浓度为 14.3mg/mL

[0195] 5C9IgG 和 TSH 稀释于环 AMP 测定缓冲液中。

[0196] 表 2b

[0197] 5C9IgG、F(ab')₂ 和 Fab 片段在表达人 TSHR 的 CHO 细胞中对 TSH 诱导的环 AMP 产生的抑制

[0198] 实施例 1

[0199]

样品	环 AMP(fmol/细胞孔;平均值±SD, n = 3)
仅环 AMP 测定缓冲液	586±148
仅 TSH 3ng/mL	18557±363
仅 5C9Fab 100 μg/mL	235±35
5C9Fab 100 μg/mL+TSH	938±93
5C9Fab 10 μg/mL+TSH	1283±239
仅 5C9F(ab') ₂ 100 μg/mL	204±12
5C9F(ab') ₂ 100 μg/mL+TSH	877±195
5C9F(ab') ₂ 10 μg/mL+TSH	916±188
仅 5C9IgG 100 μg/mL	237±54
5C9IgG 100 μg/mL+TSH	754±177
5C9IgG 10 μg/mL+TSH	247±115
2G4IgG 100 μg/mL+TSH	6082 ¹

[0200] 实施例 2

[0201]

样品	环 AMP (fmol/ 细胞孔 ; 平均值 $\pm$ SD, n = 3)
仅环 AMP 测定缓冲液	584 $\pm$ 111
仅 TSH 3ng/mL	19363 $\pm$ 5198
仅 2G4IgG 100 μ g/mL	608 $\pm$ 169

[0202]

2G4IgG 100 μ g/mL+TSH	18147 $\pm$ 972
2G4IgG 10 μ g/mL+TSH	18114 $\pm$ 6544
仅 5C9F(ab') ₂ 100 μ g/mL	414 $\pm$ 22
5C9F(ab') ₂ 100 μ g/mL+TSH	1058 $\pm$ 223
5C9F(ab') ₂ 10 μ g/mL+TSH	1333 $\pm$ 443
仅 5C9IgG 100 μ g/mL	338 $\pm$ 108
5C9IgG 100 μ g/mL+TSH	1109 $\pm$ 375
5C9IgG 10 μ g/mL+TSH	723 $\pm$ 71
5C9Fab 100 μ g/mL only	212 $\pm$ 37
5C9Fab 100 μ g/mL+TSH	867 $\pm$ 127
5C9Fab 10 μ g/mL+TSH	4131 $\pm$ 776

[0203] ¹ 双份样品的平均值

[0204] 2G4 = 对照 IgG (抗甲状腺过氧化物酶的人 MAbs)。

[0205] 抗体和 TSH 制品稀释于环 AMP 测定缓冲液中。

[0206] 表 2c

[0207] 5C9IgG 和 9D33IgG 在表达人 TSHR 的 CHO 细胞中对于由 TSH 或 M22Fab 对环 AMP 产生的刺激的效应

[0208]

测验样品	环 AMP 产生 (fmol/ 细胞孔 ; 平均值 $\pm$ SD n = 3)
仅环 AMP 测定缓冲液	473 $\pm$ 21
仅 pTSH 3ng/mL	12, 270 $\pm$ 980

仅 5C9IgG 100 μ g/mL	426 $\pm$ 27
仅 5C9IgG 10 μ g/mL	360 $\pm$ 53
仅 5C9IgG 1 μ g/mL	376 $\pm$ 18
仅 5C9IgG 0.1 μ g/mL	404 $\pm$ 42
仅 5C9IgG 0.01 μ g/mL	578 $\pm$ 65
仅 5C9IgG 0.001 μ g/mL	554 $\pm$ 47
5C9IgG 100 μ g/mL+pTSH 3ng/mL	1094 $\pm$ 70
5C9IgG 10 μ g/mL+pTSH 3ng/mL	1028 $\pm$ 47
5C9IgG 1 μ g/mL+pTSH 3ng/mL	1872 $\pm$ 168
5C9IgG 0.1 μ g/mL+pTSH 3ng/mL	3920 $\pm$ 464
5C9IgG 0.01 μ g/mL+pTSH 3ng/mL	15,050 $\pm$ 386
5C9IgG 0.001 μ g/mL+pTSH 3ng/mL	14,147 $\pm$ 1,310
仅 9D33IgG 100 μ g/mL	626 $\pm$ 127
9D33IgG 100 μ g/mL+pTSH 3ng/mL	2,218 $\pm$ 5
仅 M22Fab 3ng/mL	9,432 $\pm$ 822
5C9IgG 100 μ g/mL+M22Fab 3ng/mL	354 $\pm$ 56

[0209]

5C9IgG 10 μ g/mL+M22Fab 3ng/mL	638 ¹ $\pm$ 190
5C9IgG 1 μ g/mL+M22Fab 3ng/mL	956 $\pm$ 169
5C9IgG 0.1 μ g/mL+M22Fab 3ng/mL	1,298 $\pm$ 134
5C9IgG 0.01 μ g/mL+M22Fab 3ng/mL	9,978 $\pm$ 919
5C9IgG 0.001 μ g/mL+M22Fab 3ng/mL	11,614 $\pm$ 393
9D33IgG 100 μ g/mL+M22Fab 3ng/mL	1,048 $\pm$ 10

[0210] ¹ 双份样品的平均值

[0211] 9D33 是一种可在表达 TSHR 的 CHO 细胞中阻断由 TSH 和 TRAb 介导的对环 AMP 产生

的刺激的小鼠抗体。

[0212] 抗体和 TSH 制品稀释于环 AMP 测定缓冲液中。

[0213] 表 3

[0214] ^{125}I -5C9IgG、 ^{125}I -TSH 和 ^{125}I -M22IgG 与经 TSHR 涂覆的管的结合及患者血清样品对其的抑制

[0215]

血清样品	^{125}I -5C9 结合抑制 (%)	^{125}I -TSH 结合抑制 (%)	^{125}I -M22 结合抑制 (%)
N1	15.7	0	9.3
N2	3.3	1.2	7.2
N3	15.3	1.9	0.7
N4	4.0	4.2	0
N5	18.9	6.3	11.4
N6	5.9	2.9	1.4
N7	17.1	7.2	9.4
N8	5.5	0	0
N9	11.2	4.2	2.9
N10	10.5	6.5	5.8
G1	79.6	83.6	80.5
G2	75.8	77.5	73.5
G3	82.2	77.5	78.1
G4	77.7	74.9	74.8
G5	77.0	73.6	71.5
G6	64.7	71.6	69.1
G7	75.6	74.3	66.0
G8	73.7	74.7	77

[0216]

G9	76.1	78.5	79.2
G10	75.9	75.8	69.9
G11	81.6	82.5	79.7
G12	71.6	76.6	73.9
G13	72.3	71.1	70.2
G14	81.9	85.8	80.9
G15	84.9	85.3	84.4
G16	80.5	84.9	81.7
G17	85.0	86.9	85.3
G18	84.9	85	84.2
G19	85.1	87.3	85.4
G20	84.4	89.3	87.7
G21	77.6	84.9	77.0
G22	67.1	59.7	61.5
G23	57.5	62.2	59.5
G24	65.7	67.1	64.4
G25	59.3	56.3	62.3
G26	38.4	67.7	69.4
G27	22.0	59.1	58.9
G28	68.3	69.7	72.8
G29	40.9	54.2	50.4
G30	71.2	69.1	72
G31	62.2	59.2	62.0

[0217]

G32	46.0	40.6	49.2
G33	44.0	25.9	37.2
G34	52.0	48	55.0
G35	60.1	54.4	60.7
G36	29.3	31.4	43.2
G37	49.0	44.1	45.5
G38	40.1	26.7	29.8
G39	66.4	54.7	58.9
G40	48.8	48.5	48.5

[0218] N1-10 = 来自健康捐血者的血清

[0219] G1-G40 = 来自有格雷夫斯病史的患者的血清

[0220] 结果为十分一致的两次测定的平均值

[0221]

$$\text{抑制}\% = 100 - \left[\frac{A}{B} \times 100 \right]$$

[0222] 其中 A = 存在测验血清的情况下的结合 ; B = 存在健康捐血者血清混合物 (HBD 混合物) 的情况下的结合。

[0223] ^{125}I -5C9 在存在 HBD 混合物的情况下显示 20% 的结合、 ^{125}I -TSH 在存在 HBD 混合物的情况下显示 12% 的结合并且 ^{125}I -M22 在存在 HBD 混合物的情况下显示 17% 的结合。

[0224] 表 4a

[0225] 比较具有阻断或刺激活性的患者血清对于 ^{125}I -5C9IgG、 ^{125}I -TSH 和 ^{125}I -M22IgG 与经 TSHR 涂覆的管的结合的抑制

[0226]

测定样品	^{125}I -5C9 结合抑制 (%)	^{125}I -TSH 结合抑制 (%)	^{125}I -M22 结合抑制 (%)
测定校验物			
40U/L	87	90	84.4
8U/L	62	67	63.0
2U/L	15	27	25.6

1U/L	4.3	15	14.8
阳性对照血清	34	35	38.7
阻断性血清			
B1			
1/5	93	95	91.7
1/10	92	94	89.2
1/20	91	91	85.9
1/40	85	80	78.8
1/80	67	55	67.4
1/160	33	33	45.9
1/320	20	17	26.4

[0227]

B2			
1/5	92	91	86.6
1/10	85	85	79.5
1/20	NT	73	66.2
1/40	68	51	50.0
1/80	42	34	29.7
1/160	19	22	20.3
1/320	NT	13	7.8
B3			
1/5	89	93	85.5

1/10	82	84	76.3
1/20	62	64	61.7
1/40	37	44	42.5
1/80	14	26	26.2
1/160	NT	12	16.6
1/320	NT	7	8.9
B4			
1/5	93	94	90.3
1/10	93	95	88.5
1/20	92	93	85.1
1/40	89	89	81.1

[0228]

1/80	78	76	72.1
1/160	56	54	56.9
1/320	34	37	39.9
B5			
1/5	94	93	90.3
1/10	91	92	87.0
1/20	87	87	82.2
1/40	74	72	71.7
1/80	56	47	54.6
1/160	31	29	36.4
1/320	19	17	21.4

刺激性血清			
S1			
1/5	89	91	84.9
1/10	80	84	75.4
1/20	63	67	62.9
1/40	42	50	46.2
1/80	26	34	31.9
1/160	9	21	16.3
1/320	16	4	10.6

[0229] 表 4b

[0230]

测验样品	¹²⁵ I-5C9 结合抑制 (%)	¹²⁵ I-TSH 结合抑制 (%)	¹²⁵ I-M22 结合抑制 (%)
测定校验物			
40U/L	87.2	90.4	82.2
8U/L	62.0	67.2	63.3
2U/L	21.3	22.0	27.9
1U/L	15.0	13.0	21.8
阳性对照血清	34.2	31.4	38.6
HBD 混合物	6.2	-0.6	12.5
S2			
纯品	91.8	95.1	88.6
1/5	76.7	84.5	72.7

1/10	62.3	71.4	66.4
1/20	48.2	57.0	51.9
1/40	31.8	39.3	41.4
1/80	21.3	19.4	32.9
1/160	16.8	9.7	25.1
S4			

[0231]

纯品	91.0	92.9	86.2
1/5	71.0	72.4	68.7
1/10	55.5	55.6	57.4
1/20	39.9	34.0	46.3
1/40	27.3	16.4	35.4
1/80	17.0	8.6	25.4
1/160	16.1	2.1	19.5

[0232] B1-B5 为含有高水平的具有拮抗剂（阻断）活性的 TRAb 的患者血清。

[0233] B3 是来自捐淋巴细胞者的 5C9 血清

[0234] S1、S2 和 S4 为含有高水平的具有激动剂（刺激）活性的 TRAb 的患者血清。

[0235] 测定校验物 40U/L、8U/L、2U/L 和 1U/L 为 M22IgG 在健康捐血者血清混合物（HBD 混合物）中的稀释物，以 U/L 的 NIBSC 90/672 表示的活性是通过对经标记的 TSH 与经 TSHR 涂覆的管的结合的抑制来进行评估。

[0236]

$$\text{抑制}\% = 100 - \left[\frac{A}{B} \times 100 \right]$$

[0237] 其中 A = 试验样品 ; B = HBD 混合物

[0238] NT = 未试验

[0239] 1/5、1/10 等表示试验血清在 HBD 混合物中的稀释因子，纯品 = 未稀释的血清

[0240] 在存在 HBD 混合物的情况下，大约 20%、17% 和 12% 的经 ¹²⁵I- 标记的 M22IgG、5C9IgG 和 TSH 分别结合于经 TSHR 涂覆的管。

[0241] 表 5

[0242] 不同浓度的抗 TSHR 的小鼠 MAbs 对于经 ^{125}I -标记的 TSH、 ^{125}I -M22IgG 和 ^{125}I -5C9IgG 与经 TSHR 涂覆的管的结合的抑制

[0243]

测验样品		^{125}I -TSH (抑制%)	^{125}I -M22 IgG (抑制%)	^{125}I -5C9 IgG (抑制%)
5C9 IgG	100 $\mu\text{g/mL}$	50	53	65.5
5C9 IgG	10 $\mu\text{g/mL}$	30	22	42
5C9 IgG	1 $\mu\text{g/mL}$	21	14	27
5C9 IgG	0.1 $\mu\text{g/mL}$	8	6	10
5C9 IgG	0.01 $\mu\text{g/mL}$	2	5	0
7C71 IgG ¹	100 $\mu\text{g/mL}$	65	68	82
7C71 IgG	10 $\mu\text{g/mL}$	55	64	65
7C71 IgG	1 $\mu\text{g/mL}$	47	58	53
7C71 IgG	0.1 $\mu\text{g/mL}$	28	37	17
7C71 IgG	0.01 $\mu\text{g/mL}$	8	14	5
10C31 IgG ¹	100 $\mu\text{g/mL}$	68	69	76
10C31 IgG	10 $\mu\text{g/mL}$	56	71	62
10C31 IgG	1 $\mu\text{g/mL}$	52	62	54
10C31 IgG	0.1 $\mu\text{g/mL}$	39	48	36
10C31 IgG	0.01 $\mu\text{g/mL}$	15	24	8
2E71 IgG ¹	100 $\mu\text{g/mL}$	51	63	60
2E71 IgG	10 $\mu\text{g/mL}$	41	62	52

[0244]

2E71 IgG	1 $\mu\text{g/mL}$	35.5	59	48
2E71 IgG	0.1 $\mu\text{g/mL}$	30	43	32
2E71 IgG	0.01 $\mu\text{g/mL}$	14.5	15	17.5
3E71 IgG ¹	100 $\mu\text{g/mL}$	49	51	65
3E71 IgG	10 $\mu\text{g/mL}$	37	51	50
3E71 IgG	1 $\mu\text{g/mL}$	37	45	40
3E71 IgG	0.1 $\mu\text{g/mL}$	21.5	28	21
3E71 IgG	0.01 $\mu\text{g/mL}$	12	15	3
14D3 IgG ¹	100 $\mu\text{g/mL}$	57	62	63
14D3 IgG	10 $\mu\text{g/mL}$	52	60	50.5
14D3 IgG	1 $\mu\text{g/mL}$	37	37	35
14D3 IgG	0.1 $\mu\text{g/mL}$	12.5	15	10
14D3 IgG	0.01 $\mu\text{g/mL}$	4	3	1
16E5 IgG ¹	100 $\mu\text{g/mL}$	48	53	59
16E5 IgG	10 $\mu\text{g/mL}$	44	51	53
16E5 IgG	1 $\mu\text{g/mL}$	39	40	47
16E5 IgG	0.1 $\mu\text{g/mL}$	26	22	34
16E5 IgG	0.01 $\mu\text{g/mL}$	9	12	20
17D2 IgG ¹	100 $\mu\text{g/mL}$	56	49	55
17D2 IgG	10 $\mu\text{g/mL}$	43	39	43
17D2 IgG	1 $\mu\text{g/mL}$	24	24	26
17D2 IgG	0.1 $\mu\text{g/mL}$	7	13	11

[0245]

17D2 IgG	0.01 $\mu\text{g/mL}$	3	1	3
M22 IgG	100 $\mu\text{g/mL}$	95	95	88
M22 IgG	10 $\mu\text{g/mL}$	95	94	89
M22 IgG	1 $\mu\text{g/mL}$	94	93	87
M22 IgG	0.1 $\mu\text{g/mL}$	77	79	72
M22 IgG	0.01 $\mu\text{g/mL}$	22	32	24
9D33 IgG ²	100 $\mu\text{g/mL}$	69	61	70
9D33 IgG	10 $\mu\text{g/mL}$	65	60	60
9D33 IgG	1 $\mu\text{g/mL}$	55	48	48
9D33 IgG	0.1 $\mu\text{g/mL}$	31	27	29
9D33 IgG	0.01 $\mu\text{g/mL}$	8	13	13
2G4 IgG ³	100 $\mu\text{g/mL}$	3	3	6
2G4 IgG	10 $\mu\text{g/mL}$	3	4	10
2G4 IgG	1 $\mu\text{g/mL}$	0	0	8
2G4 IgG	0.1 $\mu\text{g/mL}$	4	6	4
2G4 IgG	0.01 $\mu\text{g/mL}$	0	0	0
2B4 IgG ⁴	100 $\mu\text{g/mL}$	88.5	30	72
2B4 IgG	10 $\mu\text{g/mL}$	85	19	48
2B4 IgG	1 $\mu\text{g/mL}$	82	9	42
2B4 IgG	0.1 $\mu\text{g/mL}$	56	12	23
2B4 IgG	0.01 $\mu\text{g/mL}$	13.5	1	8
8E3 IgG ⁴	100 $\mu\text{g/mL}$	82.5	27	65

[0246]

8E3 IgG	10 $\mu\text{g/mL}$	72	18	42
8E3 IgG	1 $\mu\text{g/mL}$	53	8	23
8E3 IgG	0.1 $\mu\text{g/mL}$	17	0.5	9
8E3 IgG	0.01 $\mu\text{g/mL}$	5	0	0
4E2 IgG ⁴	100 $\mu\text{g/mL}$	76	24	32
4E2 IgG	10 $\mu\text{g/mL}$	74	21	32
4E2 IgG	1 $\mu\text{g/mL}$	57	15	20
4E2 IgG	0.1 $\mu\text{g/mL}$	25	2	11
4E2 IgG	0.01 $\mu\text{g/mL}$	4	1	5
1D5 IgG ⁴	100 $\mu\text{g/mL}$	77	26	26
1D5 IgG	10 $\mu\text{g/mL}$	72	20	20
1D5 IgG	1 $\mu\text{g/mL}$	55	8	13
1D5 IgG	0.1 $\mu\text{g/mL}$	23	0	3
1D5 IgG	0.01 $\mu\text{g/mL}$	4	0	0
7C4 IgG ⁴	100 $\mu\text{g/mL}$	78	24	51
7C4 IgG	10 $\mu\text{g/mL}$	76	22	35
7C4 IgG	1 $\mu\text{g/mL}$	72	22	36
7C4 IgG	0.1 $\mu\text{g/mL}$	38	7	19
7C4 IgG	0.01 $\mu\text{g/mL}$	9	6	6
3E6 IgG ⁴	100 $\mu\text{g/mL}$	84	46	55
3E6 IgG	10 $\mu\text{g/mL}$	79	31	40
3E6 IgG	1 $\mu\text{g/mL}$	71	16	29

[0247]

3E6 IgG	0.1 $\mu\text{g/mL}$	28	5	9
3E6 IgG	0.01 $\mu\text{g/mL}$	3	0	6
1C52 IgG ⁴	100 $\mu\text{g/mL}$	64	22	30
1C52 IgG	10 $\mu\text{g/mL}$	39	9	15
1C52 IgG	1 $\mu\text{g/mL}$	22	5	15
1C52 IgG	0.1 $\mu\text{g/mL}$	5	4	11
1C52 IgG	0.01 $\mu\text{g/mL}$	0	2	10
7B72 IgG ⁴	100 $\mu\text{g/mL}$	88	32	39
7B72 IgG	10 $\mu\text{g/mL}$	77	21	27
7B72 IgG	1 $\mu\text{g/mL}$	50	14	22
7B72 IgG	0.1 $\mu\text{g/mL}$	16	2	13
7B72 IgG	0.01 $\mu\text{g/mL}$	8	1	4
8E2 IgG ⁵	100 $\mu\text{g/mL}$	52	52	32
8E2 IgG	10 $\mu\text{g/mL}$	24.5	24	12
8E2 IgG	1 $\mu\text{g/mL}$	8	3	1
8E2 IgG	0.1 $\mu\text{g/mL}$	13	1	8
8E2 IgG	0.01 $\mu\text{g/mL}$	0	0	13
18C5 IgG ⁶	100 $\mu\text{g/mL}$	57	50	51
18C5 IgG	10 $\mu\text{g/mL}$	17	14	24
18C5 IgG	1 $\mu\text{g/mL}$	3.5	2	17
18C5 IgG	0.1 $\mu\text{g/mL}$	3	0	13
18C5 IgG	0.01 $\mu\text{g/mL}$	0.7	0	14

[0248]

2G2 IgG ⁷	100 µg/mL	0.1	0	11
2G2 IgG	10 µg/mL	3	0.6	10
2G2 IgG	1 µg/mL	6	1.5	12
2G2 IgG	0.1 µg/mL	2	0.2	9
2G2 IgG	0.01 µg/mL	2	1.4	11

[0249] 抗体稀释于健康捐血者血清混合物 (HBD 混合物) 中。

[0250]

$$\text{抑制}\% = 100 - \left[\frac{A}{B} \times 100 \right]$$

[0251] 其中 A = 存在测验样品的情况下的结合% ; B = 存在 HBD 混合物的情况下的结合%。

[0252] ¹ 具有甲状腺刺激活性的小鼠 TSHR MAb

[0253] ² 可阻断由 TSH 和 TRAb 介导的对环 AMP 产生的刺激的小鼠 TSHR MAb (见表 2)

[0254] ³ 抗甲状腺过氧化物酶 MAb 的人 MAb (阴性对照)

[0255] ⁴ 具有 TSH 阻断活性的小鼠 TSHR MAb (可识别由 TSHR 氨基酸 381-385 形成的表位)

[0256] ⁵ 具有 TSH 阻断活性的小鼠 TSHR MAb (可识别由 TSHR 氨基酸 36-42 形成的表位)

[0257] ⁶ 具有 TSH 阻断活性的小鼠 TSHR MAb (可识别由 TSHR 氨基酸 246-260 形成的表位)

[0258] ³ 小鼠 Tg MAb (阴性对照)

[0259] 在存在 HBD 混合物的情况下, 大约 13%、24% 和 15% 的经 ¹²⁵I- 标记的 5C9IgG、M22IgG 和 TSH 分别结合于经 TSHR 涂覆的管。

[0260] 表 6a

[0261] 5C9IgG 在表达人 TSHR 的 CHO 细胞中对于由患者血清中 TRAb 对环 AMP 产生的刺激的效应

[0262] 实验 1a

[0263]

试验样品	环 AMP (fmol/ 细胞孔平均值 ±SD ; n = 3)
仅环 AMP 测定缓冲液	378 ± 21
仅 HBD 混合物	352 ± 38
HBD 混合物 + 2G4IgG	316 ± 54
HBD 混合物 + 5C9IgG	136 ± 46

仅 T1	13734 ± 580
T1+2G4IgG	10928 ± 740
T1+5C9IgG	142 ± 4
仅 T2	1716 ± 185
T2+2G4IgG	1362 ± 190
T2+5C9IgG	146 ± 4
仅 T3	11722 ± 1280
T3+2G4IgG	11948 ± 3200
T3+5C9IgG	5660 ± 790
仅 T4	6388 ± 820
T4+2G4IgG	6022 ± 710
T4+5C9IgG	188 ± 65

[0264]

仅 T5	3084 ± 990
T5+2G4IgG	2152 ± 240
T5+5C9IgG	152 ± 15
仅 T6	14802 ± 1475
T6+2G4IgG	10878 ± 675
T6+5C9IgG	232 ± 25

[0265] 实验 1b

[0266]

试验样品	环 AMP (fmol/ 细胞孔平均值 ± SD ; n = 3)
仅环 AMP 测定缓冲液	434 ± 52

仅 HBD 混合物	518±216
HBD 混合物 +2G4IgG	378±34
HBD 混合物 +5C9IgG	178±47
仅 T7	7388±1250
T7+2G4IgG	5696±715
T7+5C9IgG	ud
仅 T8	1736 ¹
T8+2G4IgG	1392 ¹
T8+5C9IgG	ud
仅 T9	5052 ¹
T9+2G4IgG	5000 ¹
T9+5C9IgG	ud

[0267] 实验 1c

[0268]

样品	环 AMP (fmol/ 细胞孔平均值 ±SD ;n = 3)
仅环 AMP 测定缓冲液	366±316
仅 HBD 混合物	646±62
HBD 混合物 +2G4IgG	496±42
HBD 混合物 +5C9IgG	294±92
仅 T13	4030±1146
T13+2G4IgG	3330±63
T13+5C9IgG	540±36

仅 T14	5490 ± 197
T14+2G4IgG	4470 ± 1867
T14+5C9IgG	510 ± 146
仅 T15	2130 ± 387
T15+2G4IgG	2380 ± 320
T15+5C9IgG	ud
仅 T16	4990 ± 155
T16+2G4IgG	5270 ± 941
T16+5C9IgG	ud
仅 T17	4410 ± 470
T17+2G4IgG	4460 ± 288

[0269]

T17+5C9IgG	ud
仅 T18	910 ± 126
T18+2G4IgG	830 ± 21
T18+5C9IgG	ud

[0270] 实验 1d

[0271]

样品	环 AMP (fmol/ 细胞孔平均值 ± SD ; n = 3)
仅环 AMP 测定缓冲液	487 ± 75
仅 HBD 混合物	285 ± 71
HBD 混合物 + 2G4IgG	311 ± 68
HBD 混合物 + 5C9IgG	108 ± 33

仅 T11	4052 ± 233
T11+2G4IgG	4659 ± 1260
T11+5C9IgG	154 ± 33
仅 T12	4058 ± 721
T12+2G4IgG	5556 ± 593
T12+5C9IgG	145 ± 24

[0272] ud = 未检测

[0273] ¹ = 两次测定

[0274] HBD 混合物为健康捐血者血清的混合物 ; 这些实验中所用的是在环 AMP 测定缓冲液中以 1 : 10 的稀释度稀释。

[0275] T1-T9 和 T11-T18 为在表达 TSHR 的 CHO 细胞中刺激环 AMP 产生的血清。T1-T9 和 T11-T18 以 1 : 10 稀释于环 AMP 测定缓冲液中进行试验。

[0276] 2G4 是一种抗甲状腺过氧化物酶的人单克隆抗体 (阴性对照)。

[0277] 2G4IgG 和 5C9IgG 在 100 μ g/mL 下进行试验。

[0278] 表 6b

[0279] 5C9IgG 和 9D33IgG 在表达人 TSHR 的 CHO 细胞中对于由患者血清中 TRAb 对环 AMP 产生的刺激的剂量响应效应

[0280] 实验 2

[0281]

试验样品	环 AMP (fmol/ 细胞孔平均值 ± SD ; n = 3)
仅环 AMP 测定缓冲液	707 ± 147
仅 HBD 混合物	503 ± 80
仅 T1	20336 ± 1539
仅 100 μ g/mL 2G4IgG (阴性对照 IgG)	1207 ± 123
T1+100 μ g/mL 2G4IgG	22078 ± 2546
T1+10 μ g/mL 2G4IgG	18868 ± 1806

T1+1 μ g/mL 2G4IgG	19025 $\pm$ 1450
T1+0.1 μ g/mL 2G4IgG	16659 $\pm$ 1031
T1+0.01 μ g/mL 2G4IgG	20876 $\pm$ 1887
T1+0.001 μ g/mL 2G4IgG	18134 $\pm$ 2126
仅 100 μ g/mL 9D33IgG	721 $\pm$ 183
T1+100 μ g/mL 9D33IgG	1061 $\pm$ 104
T1+10 μ g/mL 9D33IgG	1464 $\pm$ 191
T1+1 μ g/mL 9D33IgG	4990 $\pm$ 1670

[0282]

T1+0.1 μ g/mL 9D33IgG	17867 $\pm$ 2220
T1+0.01 μ g/mL 9D33IgG	19943 $\pm$ 1834
T1+0.001 μ g/mL 9D33IgG	21648 $\pm$ 502
仅 100 μ g/mL 5C9IgG	301 $\pm$ 38
T1+100 μ g/mL 5C9IgG	724 $\pm$ 28
T1+10 μ g/mL 5C9IgG	1119 $\pm$ 348
T1+1 μ g/mL 5C9IgG	2428 $\pm$ 594
T1+0.1 μ g/mL 5C9IgG	16152 $\pm$ 3577
T1+0.01 μ g/mL 5C9IgG	20314 $\pm$ 279
T1+0.001 μ g/mL 5C9IgG	16868 $\pm$ 912

[0283] T1 为在表达 TSHR 的 CHO 细胞中刺激环 AMP 产生的患者血清样品 ;以 1 : 10 稀释于环 AMP 测定缓冲液中进行试验。

[0284] 2G4 是一种抗甲状腺过氧化物酶的人单克隆抗体 (阴性对照)。

[0285] 9D33 为一种抗阻断由 TSH 和 TRAb 刺激的环 AMP 产生的 TSHR 的小鼠单克隆抗体 (见表 2)

[0286] 表 6c

[0287] 5C9IgG 在表达人 TSHR 的 CHO 细胞中对于由患者血清 TRAb 对环 AMP 产生的刺激的

剂量响应效应

[0288] 实验 3

[0289]

试验样品	环 AMP (fmol/ 细胞孔平均值 $\pm$ SD ;n = 3)
仅环 AMP 测定缓冲液	757 $\pm$ 138
仅 HBD 混合物	512 $\pm$ 76
仅 T6	14216 $\pm$ 3985
仅 100 μ g/mL 9D33IgG	729 $\pm$ 31
T6+100 μ g/mL 9D33IgG	1052 $\pm$ 702
T6+10 μ g/mL 9D33IgG	2256 $\pm$ 1088
T6+1 μ g/mL 9D33IgG	5447 $\pm$ 313
T6+0.1 μ g/mL 9D33IgG	8700 $\pm$ 665
T6+0.01 μ g/mL 9D33IgG	10290 $\pm$ 495
T6+0.001 μ g/mL 9D33IgG	10296 ¹
仅 100 μ g/mL 5C9IgG	360 $\pm$ 38
T6+100 μ g/mL 5C9IgG	295 $\pm$ 30
T6+10 μ g/mL 5C9IgG	1027 $\pm$ 368
T6+1 μ g/mL 5C9IgG	2368 $\pm$ 528
T6+0.1 μ g/mL 5C9IgG	9533 $\pm$ 1679

[0290]

T6+0.01 μ g/mL 5C9IgG	13883 $\pm$ 1718
T6+0.001 μ g/mL 5C9IgG	11843 $\pm$ 1241

[0291] ¹ 单次测定

[0292] 见表 6a 和 6b 的说明性脚注。

[0293] 表 6d

[0294] 5C9IgG 在表达人 TSHR 的 CHO 细胞中对于由患者血清中 TRAb 对环 AMP 产生的刺激

的剂量响应效应

[0295]

样品	环 AMP (fmol/ 细胞孔平均值 $\pm$ SD ; n = 3)
仅环 AMP 测定缓冲液	622 $\pm$ 79
仅 HBD 混合物	479 $\pm$ 53
仅 T3	14023 $\pm$ 2487
仅 100 μ g/mL 2G4IgG	745 $\pm$ 136
T3+100 μ g/mL 2G4IgG	12086 $\pm$ 2613
T3+10 μ g/mL 2G4IgG	12862 $\pm$ 250
T3+1 μ g/mL 2G4IgG	12931 $\pm$ 891
T3+0.1 μ g/mL 2G4IgG	13853 $\pm$ 1589
T3+0.01 μ g/mL 2G4IgG	11939 $\pm$ 131
T3+0.001 μ g/mL 2G4IgG	13650 $\pm$ 1679
仅 100 μ g/mL 9D33IgG	616 $\pm$ 111
T3+100 μ g/mL 9D33IgG	1597 $\pm$ 323
T3+10 μ g/mL 9D33IgG	4262 $\pm$ 367
T3+1 μ g/mL 9D33IgG	7385 $\pm$ 554
T3+0.1 μ g/mL 9D33IgG	11960 $\pm$ 1390
T3+0.01 μ g/mL 9D33IgG	12178 $\pm$ 1676

[0296]

T3+0.001 μ g/mL 9D33IgG	12159 $\pm$ 2970
仅 100 μ g/mL 5C9IgG	212 $\pm$ 40
T3+100 μ g/mL 5C9IgG	6136 $\pm$ 558

T3+10 μ g/mL 5C9IgG	7806 $\pm$ 793
T3+1 μ g/mL 5C9IgG	8075 $\pm$ 610
T3+0.1 μ g/mL 5C9IgG	10414 $\pm$ 1094
T3+0.01 μ g/mL 5C9IgG	13743 $\pm$ 1687
T3+0.001 μ g/mL 5C9IgG	11641 $\pm$ 2168

[0297] 参见表 6a 和 6b 的说明性脚注。

[0298] 表 6e

[0299] 5C9IgG 在表达人 TSHR 的 CHO 细胞中对于由 TRAb 患者血清对环 AMP 产生的刺激的剂量响应效应

[0300]

样品	环 AMP (fmol/ 细胞孔平均值 $\pm$ SD ; n = 3)
仅环 AMP 测定缓冲液	616 $\pm$ 161
仅 HBD 混合物	312 $\pm$ 56
仅 T19	6014 $\pm$ 280
仅 100 μ g/mL 2G4IgG	1058 $\pm$ 75
T19+100 μ g/mL 2G4IgG	7142 $\pm$ 215
T19+10 μ g/mL 2G4IgG	6182 $\pm$ 46
T19+1 μ g/mL 2G4IgG	7280 $\pm$ 1052
T19+0.1 μ g/mL 2G4IgG	7275 $\pm$ 145
T19+0.01 μ g/mL 2G4IgG	6820 $\pm$ 729
T19+0.001 μ g/mL 2G4IgG	7620 $\pm$ 870
仅 100 μ g/mL 9D33IgG	592 $\pm$ 168
T19+100 μ g/mL 9D33IgG	550 $\pm$ 65
T19+10 μ g/mL 9D33IgG	448 $\pm$ 76
T19+1 μ g/mL 9D33IgG	404 $\pm$ 36

T19+0.1 μ g/mL 9D33IgG	2394 ¹
T19+0.01 μ g/mL 9D33IgG	5765 ¹

[0301]

T19+0.001 μ g/mL 9D33IgG	7088 $\pm$ 668
仅 100 μ g/mL 5C9IgG	186 ²
T19+100 μ g/mL 5C9IgG	220 $\pm$ 90
T19+10 μ g/mL 5C9IgG	275 $\pm$ 150
T19+1 μ g/mL 5C9IgG	187 $\pm$ 34
T19+0.1 μ g/mL 5C9IgG	375 $\pm$ 129
T19+0.01 μ g/mL 5C9IgG	5747 $\pm$ 411
T19+0.001 μ g/mL 5C9IgG	6467 ¹

[0302] ¹ 双份样品的平均值[0303] ² 单次测定

[0304] 参见表 6a 和 6b 的说明性脚注。

[0305] 表 6f

[0306] 5C9IgG 在表达人 TSHR 的 CHO 细胞中对于由患者血清中 TRAb 对环 AMP 产生的刺激的剂量响应效应

[0307]

样品	环 AMP (fmol/ 细胞孔平均值 $\pm$ SD ;n = 3)
仅环 AMP 测定缓冲液	255 $\pm$ 40
仅 HBD 混合物	200 $\pm$ 82
仅 T21	4764 $\pm$ 732
仅 100 μ g/mL 2G4IgG	835 $\pm$ 94
T20+100 μ g/mL 2G4IgG	6684 $\pm$ 931
T20+10 μ g/mL 2G4IgG	4571 $\pm$ 776

T20+1 μ g/mL 2G4IgG	5744 $\pm$ 727
T20+0.1 μ g/mL 2G4IgG	4323 $\pm$ 849
T20+0.01 μ g/mL 2G4IgG	6396 $\pm$ 1314
T20+0.001 μ g/mL 2G4IgG	6789 $\pm$ 893
仅 100 μ g/mL 9D33IgG	382 $\pm$ 142
T20+100 μ g/mL 9D33IgG	287 $\pm$ 164
T20+10 μ g/mL 9D33IgG	204 $\pm$ 49
T20+1 μ g/mL 9D33IgG	980 ¹
T20+0.1 μ g/mL 9D33IgG	5362 $\pm$ 574
T20+0.01 μ g/mL 9D33IgG	5389 $\pm$ 1139

[0308]

T20+0.001 μ g/mL 9D33IgG	7514 $\pm$ 785
仅 100 μ g/mL 5C9IgG	224 $\pm$ 109
T20+100 μ g/mL 5C9IgG	NT
T20+10 μ g/mL 5C9IgG	NT
T20+1 μ g/mL 5C9IgG	181 ¹
T20+0.1 μ g/mL 5C9IgG	2184 $\pm$ 1078
T20+0.01 μ g/mL 5C9IgG	6486 $\pm$ 436
T20+0.001 μ g/mL 5C9IgG	4856 ¹

[0309] ¹ 双份样品的平均值

[0310] NT = 未试验

[0311] 参见表 6a 和 6b 的说明性脚注。

[0312] 表 6g

[0313] 5C9IgG 在表达人 TSHR 的 CHO 细胞中对于由患者血清中 TRAb 对环 AMP 产生的刺激的剂量响应效应

[0314]

样品	环 AMP (fmol/ 细胞孔平均值 $\pm$ SD ;n = 3)
仅环 AMP 测定缓冲液	466 $\pm$ 65
仅 HBD 混合物	390 $\pm$ 118
仅 T21	9781 $\pm$ 1672
仅 100 μ g/mL 2G4IgG	999 $\pm$ 55
T21+100 μ g/mL 2G4IgG	10848 $\pm$ 373
T21+10 μ g/mL 2G4IgG	10355 $\pm$ 469
T21+1 μ g/mL 2G4IgG	10831 $\pm$ 140
T21+0.1 μ g/mL 2G4IgG	12215 $\pm$ 793
T21+0.01 μ g/mL 2G4IgG	13014 $\pm$ 855
T21+0.001 μ g/mL 2G4IgG	10500 $\pm$ 162
仅 100 μ g/mL 9D33IgG	534 $\pm$ 89
T21+100 μ g/mL 9D33IgG	442 $\pm$ 32
T21+10 μ g/mL 9D33IgG	605 $\pm$ 254
T21+1 μ g/mL 9D33IgG	1383 $\pm$ 66
T21+0.1 μ g/mL 9D33IgG	8719 $\pm$ 389
T21+0.01 μ g/mL 9D33IgG	10772 $\pm$ 799

[0315]

T21+0.001 μ g/mL 9D33IgG	10229 $\pm$ 714
仅 100 μ g/mL 5C9IgG	253 $\pm$ 25
T21+100 μ g/mL 5C9IgG	210 $\pm$ 60
T21+10 μ g/mL 5C9IgG	303 $\pm$ 107

T21+1 μ g/mL 5C9IgG	418 $\pm$ 65
T21+0.1 μ g/mL 5C9IgG	7483 $\pm$ 415
T21+0.01 μ g/mL 5C9IgG	10441 $\pm$ 122
T21+0.001 μ g/mL 5C9IgG	11281 $\pm$ 911

[0316] 参见表 6a 和 6b 的说明性脚注。

[0317] 表 7a

[0318] 在表达野生型 TSHR 和 Lys58 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中 TSH 诱导的环 AMP 产生。不同稀释度的 5C9IgG 的效应。

[0319]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值 $\pm$ SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	315 $\pm$ 39	822 $\pm$ 52	260
仅TSH	10730 $\pm$ 1737	13228 $\pm$ 1428	123
2G4 10 μ g/mL + TSH	11707 $\pm$ 2291	12883 $\pm$ 2107	110
2G4 100 μ g/mL + TSH	9640 $\pm$ 1664	10148 $\pm$ 3680	105
5C9 0.01 μ g/mL + TSH	7341 $\pm$ 343	7913 $\pm$ 880	108
5C9 0.1 μ g/mL + TSH	4635 $\pm$ 257	4815 ¹	104
5C9 1.0 μ g/mL + TSH	918 $\pm$ 159	1794 $\pm$ 308	195
5C9 10 μ g/mL + TSH	351 $\pm$ 187	955 $\pm$ 405	272
5C9 100 μ g/mL + TSH	528 $\pm$ 363	1001 $\pm$ 306	190
仅 5C9 100 μ g	47 $\pm$ 15	<25	—

[0320] ¹ 双份样品的平均值

[0321] pTSH 浓度 = 3ng/mL

[0322] 所有稀释都于环 AMP 测定缓冲液中

[0323] 2G4 是一种抗甲状腺过氧化物酶的人单克隆抗体 (5C9 的阴性对照)。

[0324] 表 7b

[0325] 在表达野生型 TSHR 和 Ile60 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中 TSH 诱导的环 AMP 产生。不同稀释度的 5C9IgG 的效应。

[0326]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	470 ±92	837 ±78	114
仅TSH	18654 ¹	22935 ±2542	123
2G4 10 µg/mL + TSH	17555 ¹	22960 ±4312	131
2G4 100 µg/mL + TSH	18654 ±3979	24488 ±4501	131
5C9 0.01 µg/mL + TSH	8018 ±276	18952 ±1811	236
5C9 0.1 µg/mL + TSH	7097 ±613	11609 ±1415	164
5C9 1.0 µg/mL + TSH	1568 ±133	3290 ±64	210
5C9 10 µg/mL + TSH	1772 ±632	1211 ±343	68
5C9 100 µg/mL + TSH	1733 ±132	3134 ±794	181
仅 5C9 100 µg	61 ±8	260 ±43	426

[0327] 参见表 7a 的说明性脚注。

[0328] 表 7c

[0329] 在表达野生型 TSHR 和 Arg80 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中 TSH 诱导的环 AMP 产生。不同稀释度的 5C9IgG 的效应。

[0330]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	775 ±66	1165 ±32	150
仅TSH	12467 ±510	12930 ±179	104
2G4 10 µg/mL + TSH	13600 ±1555	14849 ±462	109
2G4 100 µg/mL + TSH	11726 ±177	13539 ±314	115
5C9 0.01 µg/mL + TSH	14410 ±1331	14273 ±1845	99
5C9 0.1 µg/mL + TSH	11256 ±1627	9278 ±837	82
5C9 1.0 µg/mL + TSH	6704 ±791	1358 ±500	20
5C9 10 µg/mL + TSH	2107 ±264	1163 ±415	55
5C9 100 µg/mL + TSH	2234 ±540	518 ±133	23
仅 5C9 100 µg	244 ±92	494 ±163	202

[0331] 参见表 7a 的说明性脚注。

[0332] 表 7d

[0333] 在表达野生型 TSHR 和 Arg80 突变成天冬氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中 TSH 诱导的环 AMP 产生。不同稀释度的 5C9IgG 的效应。

[0334]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	548 ±67	637 ±96	116
仅TSH	13598 ±3445	19400 ±1684	143
2G4 10 µg/mL + TSH	14795 ±2776	19430 ±1779	131
2G4 100 µg/mL + TSH	15500 ±897	16003 ±237	103
5C9 0.01 µg/mL + TSH	13082 ¹	21021 ±2838	161
5C9 0.1 µg/mL + TSH	6326 ±358	4420 ±182	70
5C9 1.0 µg/mL + TSH	2635 ±326	1912 ±101	73
5C9 10 µg/mL + TSH	1906 ±146	1249 ±329	66
5C9 100 µg/mL + TSH	1613 ±176	1274 ±15	79
仅 5C9 100 µg	300 ±45	523 ±3	174

[0335] 参见表 7a 的说明性脚注。

[0336] 表 7e

[0337] 在表达野生型 TSHR 和 Tyr82 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中 TSH 诱导的环 AMP 产生。不同稀释度的 5C9IgG 的效应。

[0338]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	557 ±27	1219 ±49	219
仅TSH	12674 ±234	15327 ±2041	121
2G4 10 µg/mL + TSH	13587 ±967	17585 ¹	129
2G4 100 µg/mL + TSH	13518 ±894	15395 ±1777	113
5C9 0.01 µg/mL + TSH	13902 ±1970	15737 ±1442	113
5C9 0.1 µg/mL + TSH	6250 ±1143	12692 ±3138	203
5C9 1.0 µg/mL + TSH	1600 ±467	2955 ±732	185
5C9 10 µg/mL + TSH	822 ±99	1646 ±308	200
5C9 100 µg/mL + TSH	978 ±102	1028 ±216	105
仅 5C9 100 µg	289 ±30	1427 ±419	494

[0339] 参见表 7a 的说明性脚注。

[0340] 表 7f

[0341] 在表达野生型 TSHR 和 Thr104 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中 TSH 诱导的环 AMP 产生。不同稀释度的 5C9IgG 的效应。

[0342]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值 $\pm$ SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	590 $\pm$ 59	640 $\pm$ 95	108
仅TSH	11294 $\pm$ 1307	14247 $\pm$ 3093	126
2G4 10 μ g/mL + TSH	14255 $\pm$ 1410	13227 $\pm$ 1782	93
2G4 100 μ g/mL + TSH	13422 $\pm$ 2337	15499 $\pm$ 2042	115
5C9 0.01 μ g/mL + TSH	12307 $\pm$ 1080	11733 $\pm$ 422	95
5C9 0.1 μ g/mL + TSH	7097 $\pm$ 79	9506 $\pm$ 738	134
5C9 1.0 μ g/mL + TSH	3699 $\pm$ 391	6196 $\pm$ 1075	168
5C9 10 μ g/mL + TSH	1796 $\pm$ 417	3094 $\pm$ 740	172
5C9 100 μ g/mL + TSH	2218 $\pm$ 395	3110 $\pm$ 412	140
仅 5C9 100 μ g	195 $\pm$ 23	264 $\pm$ 102	135

[0343] 参见表 7a 的说明性脚注。

[0344] 表 7g

[0345] 在表达野生型 TSHR 和 Arg109 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中 TSH 诱导的环 AMP 产生。不同稀释度的 5C9IgG 的效应。

[0346]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值 $\pm$ SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	381 $\pm$ 28	675 $\pm$ 50	177
仅TSH	13823 $\pm$ 5141	9769 $\pm$ 372	71
2G4 10 μ g/mL + TSH	14428 $\pm$ 8959	9524 $\pm$ 1014	66
2G4 100 μ g/mL + TSH	19307 $\pm$ 3130	8800 $\pm$ 631	46
5C9 0.01 μ g/mL + TSH	10820 $\pm$ 1644	9651 $\pm$ 1066	89
5C9 0.1 μ g/mL + TSH	4011 $\pm$ 1290	1719 $\pm$ 40	43
5C9 1.0 μ g/mL + TSH	1206 $\pm$ 88	827 $\pm$ 157	69
5C9 10 μ g/mL + TSH	706 $\pm$ 282	827 $\pm$ 147	117
5C9 100 μ g/mL + TSH	1230 $\pm$ 120	561 $\pm$ 164	46
仅 5C9 100 μ g	228 $\pm$ 45	335 $\pm$ 14	147

[0347] 参见表 7a 的说明性脚注。

[0348] 表 7h

[0349] 在表达野生型 TSHR 和 Lys129 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中 TSH 诱导的环 AMP 产生。不同稀释度的 5C9IgG 的效应。

[0350]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	370 ±97	590 ±17	159
仅TSH	15632 ±2362	15502 ±547	99
2G4 10 µg/mL + TSH	11344 ±3278	14787 ±986	130
2G4 100 µg/mL + TSH	12580 ±2397	14148 ±1033	112
5C9 0.01 µg/mL + TSH	10545 ±161	12161 ±1797	115
5C9 0.1 µg/mL + TSH	2714 ±154	13257 ±2414	488
5C9 1.0 µg/mL + TSH	1008 ±229	12837 ±1148	1274
5C9 10 µg/mL + TSH	548 ±26	11175 ¹	2039
5C9 100 µg/mL + TSH	491 ±73	15929 ±1228	3244
仅 5C9 100 µg	107 ±18	217 ±36	203

[0351] 参见表 7a 的说明性脚注。

[0352] 表 7i

[0353] 在表达野生型 TSHR 和 Phe134 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中 TSH 诱导的环 AMP 产生。不同稀释度的 5C9IgG 的效应。

[0354]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值 $\pm$ SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	347 $\pm$ 88	867 $\pm$ 129	250
仅TSH	17641 $\pm$ 2133	15497 $\pm$ 1691	88
2G4 10 μ g/mL + TSH	13759 $\pm$ 116	17235 $\pm$ 1602	125
2G4 100 μ g/mL + TSH	11224 $\pm$ 4039	16213 $\pm$ 1948	144
5C9 0.01 μ g/mL + TSH	13584 $\pm$ 1268	15872 $\pm$ 1140	117
5C9 0.1 μ g/mL + TSH	8702 $\pm$ 1542	6368 $\pm$ 778	73
5C9 1.0 μ g/mL + TSH	4542 $\pm$ 104	1944 $\pm$ 838	43
5C9 10 μ g/mL + TSH	2394 $\pm$ 44	1058 $\pm$ 189	44
5C9 100 μ g/mL + TSH	1393 $\pm$ 128	1069 $\pm$ 65	77
仅 5C9 100 μ g	212 $\pm$ 6	337 $\pm$ 60	159

[0355] 参见表 7a 的说明性脚注。

[0356] 表 7j

[0357] 在表达野生型 TSHR 和 Asp151 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中 TSH 诱导的环 AMP 产生。不同稀释度的 5C9IgG 的效应。

[0358]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	508 ±341	1236 ±88	243
仅TSH	11266 ±76	10455 ±771	93
2G4 10 µg/mL + TSH	15208 ±1686	10713 ±1859	70
2G4 100 µg/mL + TSH	11915 ±1366	10416 ±3434	114
5C9 0.01 µg/mL + TSH	11245 ±1583	12616 ±1295	112
5C9 0.1 µg/mL + TSH	6949 ±99	9956 ±983	143
5C9 1.0 µg/mL + TSH	1388 ±238	6450 ±2088	465
5C9 10 µg/mL + TSH	380 ±108	2276 ±1238	599
5C9 100 µg/mL + TSH	945 ±180	1535 ±378	162
仅 5C9 100 µg	176 ±49	395 ±42	224

[0359] 参见表 7a 的说明性脚注。

[0360] 表 7k

[0361] 在表达野生型 TSHR 和 Asp151 突变成精氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中 TSH 诱导的环 AMP 产生。不同稀释度的 5C9IgG 的效应。

[0362]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值 $\pm$ SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	703 $\pm$ 107	768 $\pm$ 82	109
仅TSH	11131 $\pm$ 3208	19990 $\pm$ 458	180
2G4 10 μ g/mL + TSH	15927 $\pm$ 2244	18846 $\pm$ 3293	118
2G4 100 μ g/mL + TSH	13643 $\pm$ 3195	21275 $\pm$ 1580	156
5C9 0.01 μ g/mL + TSH	12351 $\pm$ 5559	18254 $\pm$ 1877	148
5C9 0.1 μ g/mL + TSH	6694 $\pm$ 3111	10561 $\pm$ 1025	158
5C9 1.0 μ g/mL + TSH	2754 $\pm$ 166	2591 $\pm$ 472	94
5C9 10 μ g/mL + TSH	1217 ¹	1609 $\pm$ 69	132
5C9 100 μ g/mL + TSH	1572 $\pm$ 515	2330 $\pm$ 273	148
仅 5C9 100 μ g	260 $\pm$ 156	409 $\pm$ 88	157

[0363] 参见表 7a 的说明性脚注。

[0364] 表 71

[0365] 在表达野生型 TSHR 和 Asp160 突变成赖氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中 TSH 诱导的环 AMP 产生。不同稀释度的 5C9IgG 的效应。

[0366]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值 $\pm$ SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	787 $\pm$ 119	1252 $\pm$ 274	159
仅M22	16750 $\pm$ 1515	14288 $\pm$ 1260	85
2G4 10 μ g/mL + M22	16188 $\pm$ 1463	15476 $\pm$ 468	96
2G4 100 μ g/mL + M22	15505 $\pm$ 2665	12638 $\pm$ 819	82
5C9 0.01 μ g/mL + M22	16719 $\pm$ 541	15239 $\pm$ 445	91
5C9 0.1 μ g/mL + M22	9385 $\pm$ 4006	7704 $\pm$ 703	82
5C9 1.0 μ g/mL + M22	821 $\pm$ 268	963 $\pm$ 204	117
5C9 10 μ g/mL + M22	208 $\pm$ 89	642 $\pm$ 386	309
5C9 100 μ g/mL + M22	301 $\pm$ 182	657 $\pm$ 87	218
仅 5C9 100 μ g	429 $\pm$ 49	458 $\pm$ 8	107
仅M22 (重复测定)	16702 $\pm$ 2170	18892 $\pm$ 2113	113

[0367] M22 浓度 = 3mg/mL

[0368] 参见表 7a 的其他说明性脚注。

[0369] 表 7m

[0370] 在表达野生型 TSHR 和 Lys183 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中 TSH 诱导的环 AMP 产生。不同稀释度的 5C9IgG 的效应。

[0371]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	642 ±34	1153 ±236	180
仅TSH	22385 ±532	20210 ±1366	90
2G4 10 µg/mL + TSH	20148 ±2625	23254 ±3027	115
2G4 100 µg/mL + TSH	19926 ¹	22442 ±2489	113
5C9 0.01 µg/mL + TSH	17974 ¹	23284 ±2243	130
5C9 0.1 µg/mL + TSH	11499 ±892	24289 ±720	211
5C9 1.0 µg/mL + TSH	3489 ±606	14586 ±155	418
5C9 10 µg/mL + TSH	1234 ±357	7568 ±605	618
5C9 100 µg/mL + TSH	1456 ±838	11448 ±933	786
仅 5C9 100 µg	384 ±19	747 ±230	195

[0372] 参见表 7a 的说明性脚注。

[0373] 表 7n

[0374] 在表达野生型 TSHR 和 Lys183 突变成天冬氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中 TSH 诱导的环 AMP 产生。不同稀释度的 5C9IgG 的效应。

[0375]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值 $\pm$ SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	486 $\pm$ 151	737 $\pm$ 54	152
仅TSH	14730 $\pm$ 1647	17668 $\pm$ 597	120
2G4 10 μ g/mL + TSH	14234 $\pm$ 1097	17133 $\pm$ 2281	120
2G4 100 μ g/mL + TSH	14737 $\pm$ 1905	16071 $\pm$ 1188	109
5C9 0.01 μ g/mL + TSH	12911 $\pm$ 2357	20614 $\pm$ 2552	160
5C9 0.1 μ g/mL + TSH	8577 $\pm$ 615	17344 $\pm$ 2898	202
5C9 1.0 μ g/mL + TSH	3424 $\pm$ 135	12655 $\pm$ 835	370
5C9 10 μ g/mL + TSH	1114 $\pm$ 112	6587 $\pm$ 1480	591
5C9 100 μ g/mL + TSH	1720 $\pm$ 119	9007 $\pm$ 1295	524
仅 5C9 100 μ g	<12.5	54 $\pm$ 8	—

[0376] 参见表 7a 的说明性脚注。

[0377] 表 7o

[0378] 在表达野生型 TSHR 和 Gln235 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中 TSH 诱导的环 AMP 产生。不同稀释度的 5C9IgG 的效应。

[0379]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	478 ±94	713 ±52	149
仅TSH	14882 ±944	15844 ±922	106
2G4 10 µg/mL + TSH	17754 ±3150	18900 ±3098	106
2G4 100 µg/mL + TSH	12991 ¹	18598 ±2708	143
5C9 0.01 µg/mL + TSH	7181 ±618	17535 ±3692	244
5C9 0.1 µg/mL + TSH	7784 ±1111	7437 ±1183	96
5C9 1.0 µg/mL + TSH	2545 ±471	2416 ±423	95
5C9 10 µg/mL + TSH	532 ±65	1023 ±400	192
5C9 100 µg/mL + TSH	747 ±114	727 ±168	97
仅 5C9 100 µg	119 ±28	256 ±86	215

[0380] 参见表 7a 的说明性脚注。

[0381] 表 7p

[0382] 在表达野生型 TSHR 和 Arg255 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中 TSH 诱导的环 AMP 产生。不同稀释度的 5C9IgG 的效应。

[0383]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	538 ±12	797 ±113	148
仅TSH	14362 ±3305	15243 ±2093	106
2G4 10 µg/mL + TSH	14444 ±3161	19042 ±1085	132
2G4 100 µg/mL + TSH	16810 ±3461	17710 ±4886	105
5C9 0.01 µg/mL + TSH	6624 ±1236	8124 ±395	123
5C9 0.1 µg/mL + TSH	3788 ±838	4137 ±537	109
5C9 1.0 µg/mL + TSH	966 ±150	1941 ±113	201
5C9 10 µg/mL + TSH	867 ±100	692 ±152	80
5C9 100 µg/mL + TSH	1013 ±247	809 ±248	80
仅 5C9 100 µg	32 ¹	248 ±94	775

[0384] 参见表 7a 的说明性脚注。

[0385] 表 7q

[0386] 在表达野生型 TSHR 和 Arg255 突变成天冬氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中 TSH 诱导的环 AMP 产生。不同稀释度的 5C9IgG 的效应。

[0387]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	620 ±33	616 ¹	99
仅TSH	17531 ±1730	18081 ±2439	103
2G4 10 µg/mL + TSH	19870 ±2766	15519 ±702	78
2G4 100 µg/mL + TSH	18265 ±1999	19638 ±1505	108
5C9 0.01 µg/mL + TSH	17518 ±2407	15654 ±148	89
5C9 0.1 µg/mL + TSH	6604 ±1552	5583 ±655	85
5C9 1.0 µg/mL + TSH	3375 ±227	1932 ±677	57
5C9 10 µg/mL + TSH	1244 ±565	735 ±9	59
5C9 100 µg/mL + TSH	1506 ±151	1414 ±568	94
仅 5C9 100 µg	278 ±125	559 ±97	201

[0388] 参见表 7a 的说明性脚注。

[0389] 表 7r

[0390] 在表达野生型 TSHR 和 Trp258 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中 TSH 诱导的环 AMP 产生。不同稀释度的 5C9IgG 的效应。

[0391]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	354 ±28	382 ±55	108
仅TSH	21023 ±2104	7095 ±1086	33
2G4 10 µg/mL + TSH	19564 ±1076	7070 ±148	36
2G4 100 µg/mL + TSH	21591 ±2652	6066 ±336	28
5C9 0.01 µg/mL + TSH	19471 ±1456	6619 ±511	34
5C9 0.1 µg/mL + TSH	10455 ±1968	1944 ±168	19
5C9 1.0 µg/mL + TSH	2616 ±118	1127 ±24	43
5C9 10 µg/mL + TSH	1192 ±253	357 ±11	30
5C9 100 µg/mL + TSH	1316 ±283	484 ±247	37
仅 5C9 100 µg	211 ±35	423 ±109	200

[0392] 参见表 7a 的说明性脚注。

[0393] 表 7s

[0394] 在表达野生型 TSHR 和 Ser281 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中 TSH 诱导的环 AMP 产生。不同稀释度的 5C9IgG 的效应。

[0395]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值 $\pm$ SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	496 $\pm$ 72	1094 $\pm$ 132	221
仅TSH	13562 $\pm$ 3416	26450 ¹	195
2G4 10 μ g/mL + TSH	16805 $\pm$ 1139	25086 $\pm$ 1730	149
2G4 100 μ g/mL + TSH	14334 $\pm$ 860	27672 $\pm$ 3549	193
5C9 0.01 μ g/mL + TSH	13791 $\pm$ 3221	28966 $\pm$ 3443	210
5C9 0.1 μ g/mL + TSH	9071 $\pm$ 1696	15560 $\pm$ 5836	172
5C9 1.0 μ g/mL + TSH	3732 $\pm$ 514	3550 $\pm$ 725	95
5C9 10 μ g/mL + TSH	802 $\pm$ 215	1551 $\pm$ 545	193
5C9 100 μ g/mL + TSH	1078 $\pm$ 158	1601 $\pm$ 720	149
5C9 100 μ g only	201 $\pm$ 41	785 $\pm$ 188	391

[0396] 参见表 7a 的说明性脚注。

[0397] 表 8

[0398] 比较使用基于对 TSH- 生物素结合或 5C9IgG- 生物素结合的抑制的 ELISA 获得的血清 TRAb 测定结果

[0399]

	TSH-生物素参照测定			5C9 IgG-生物素测定		
试验样品	Abs 450nm	抑制 %	浓度 (U/L)	Abs 450nm	抑制 %	浓度 (U/L)
测定阴性对照	2.143	0	0	2.421	0	0
测定校验物						
1 U/L	1.821	15	1	2.027	16	1
2 U/L	1.564	27	2	1.747	28	2
8 U/L	0.66	69	8	0.532	78	8
40 U/L	0.132	94	40	0.092	96	40
测定阳性对照	1.273	41	3.22	1.344	44	3.28
患者血清						
A	2.122	1	0.14	2.209	9	0.44
B	1.081	50	4.24	1.029	58	4.54
C	0.225	90	26.03	0.173	93	18.4

[0400]

D	2.069	3	0.24	2.27	6	0.31
E	1.789	16	1.12	2.189	10	0.49
F	1.454	32	2.43	1.791	26	1.85
G	1.053	51	4.41	1.123	54	4.12
H	1.242	42	3.37	1.309	46	3.4
I	0.208	90	28.01	0.174	93	18.32
健康捐血者 血清						
4276	2.182	-2	0	2.451	-1	0
4280	2.292	-7	0	2.621	-8	0
4281	2.138	0	0	2.529	-4	0
4282	2.204	-3	0	2.6	-7	0
4284	2.306	-8	0	2.613	-8	0
4285	2.328	-9	0	2.756	-14	0
4286	2.34	-9	0	2.691	-11	0
4289	2.381	-11	0	2.628	-9	0

[0401] 测定校验物 40U/L、8U/L、2U/L 和 1U/L 为 M22IgG 在健康捐血者血清混合物 (HBD

混合物) 中的稀释物, 以 U/L 的 NIBSC 90/672 表示的活性是通过对经标记的 TSH 与经 TSHR 涂覆的管的结合的抑制来进行评估。测定阴性对照为 HBD 混合物。

[0402] 表 9

[0403] 5C9IgG 对于甲状腺刺激性小鼠 MAbs(mTSMAB) 的 TSHR 刺激的效应

[0404]

	在添加TSMAB和以下物质后, 表达野生型TSHR的 CHO细胞中的环AMP浓度(平均 pmol/mL $\pm$ SD; n = 3)		
试验样品 ^a	仅缓冲液	5C9 IgG 100 μ g/mL	2G4 IgG ^b 100 μ g/mL
TSMAB 1 1 μ g/mL	18.94 $\pm$ 7.4	1.24 $\pm$ 0.07	16.5 $\pm$ 1.1
TSMAB 2 1 μ g/mL	9.71 $\pm$ 0.96	2.26 $\pm$ 0.05	8.96 $\pm$ 1.28
TSMAB 4 10 ng/mL	34.5 $\pm$ 2.04	2.20 $\pm$ 0.20	33.1 $\pm$ 1.25
TSMAB 5 100 ng/mL	27.26 $\pm$ 2.14	0.85 $\pm$ 0.01	22.5 $\pm$ 2.4
TSMAB 7 100 ng/mL	9.90 $\pm$ 1.52	1.26 $\pm$ 0.59	9.07 $\pm$ 0.65

[0405]

仅缓冲液	3.39 $\pm$ 1.35	1.56 $\pm$ 1.84	4.32 $\pm$ 0.95
------	-----------------	-----------------	-----------------

[0406] ^a 稀释于环 AMP 测定缓冲液中

[0407] ^b2G4 是一种对照的抗甲状腺过氧化物酶的人单克隆抗体。

[0408] 表 10

[0409] 5C9IgG 对于不同 TSH 制品的 TSHR 刺激的效应

[0410] 实验 1

[0411]

稀释于环 AMP 测定缓冲液中的试验样品	表达野生型 TSHR 的 CHO 细胞中的 环 AMP 浓度 (pmol/mL 平均值 $\pm$ SD ;n = 3)
仅缓冲液	0.37 $\pm$ 0.15

仅天然的人 TSH 100ng/mL	36.14±1.83
天然的人 TSH 100ng/mL 和 0.001 μg/mL 5C9IgG.	36.0±6.1
天然的人 TSH 100ng/mL 和 0.01 μg/mL 5C9IgG	18.0±5.4
天然的人 TSH 100ng/mL 和 0.1 μg/mL 5C9IgG	0.20±0.06
天然的人 TSH 100ng/mL 和 1.0 μg/mL 5C9IgG	0.14±0.02
天然的人 TSH 100ng/mL 和 10 μg/mL 5C9IgG	0.11±0.04
天然的人 TSH 100ng/mL 和	0.16±0.03

[0412]

100 μg/mL 5C9IgG	
仅重组体人 TSH 100ng/mL	12.73±4.0
重组体人 TSH 100ng/mL 和 0.001 μg/mL 5C9IgG.	13.63±1.7
重组体人 TSH 100ng/mL 和 0.01 μg/mL 5C9IgG	8.13±2.13
重组体人 TSH 100ng/mL 和 0.1 μg/mL 5C9IgG	0.12±0.06
重组体人 TSH 100ng/mL 和 1.0 μg/mL 5C9IgG	0.10±0.03
重组体人 TSH 100ng/mL 和 10 μg/mL 5C9IgG	0.12±0.05
重组体人 TSH 100ng/mL 和 100 μg/mL 5C9IgG	0.19±0.08

[0413] 实验 2

[0414]

稀释于环 AMP 测定缓冲液中的试验样品	表达野生型 TSHR 的 CHO 细胞中的 环 AMP 浓度 (pmol/mL 平均值 $\pm$ SD ; n = 3)
仅缓冲液	0.18 $\pm$ 0.08
仅天然的人 TSH 100ng/mL	40.8 $\pm$ 6.92
天然的人 TSH 100ng/mL 和 0.001 μ g/mL 5C9IgG.	37.6 $\pm$ 6.35
天然的人 TSH 100ng/mL 和 0.01 μ g/mL 5C9IgG	34.4 $\pm$ 2.28
天然的人 TSH 100ng/mL 和 0.1 μ g/mL 5C9IgG	15.8 $\pm$ 1.39
天然的人 TSH 100ng/mL 和 1.0 μ g/mL 5C9IgG	0.13 $\pm$ 0.03
天然的人 TSH 100ng/mL 和 10 μ g/mL 5C9IgG	0.18 $\pm$ 0.05
天然的人 TSH 100ng/mL 和 100 μ g/mL 5C9IgG	0.21 $\pm$ 0.10
仅重组体人 TSH 100ng/mL	16.72 $\pm$ 2.90
重组体人 TSH 100ng/mL 和 0.001 μ g/mL 5C9IgG.	20.0 $\pm$ 1.73
重组体人 TSH 100ng/mL 和 0.01 μ g/mL 5C9IgG	20.6 $\pm$ 1.57

[0415]

重组体人 TSH 100ng/mL 和 0.1 μ g/mL 5C9IgG	7.39 $\pm$ 1.74
重组体人 TSH 100ng/mL 和 1.0 μ g/mL 5C9IgG	0.07 $\pm$ 0.01
重组体人 TSH 100ng/mL 和 10 μ g/mL 5C9IgG	0.07 $\pm$ 0.01
重组体人 TSH 100ng/mL 和 100 μ g/mL 5C9IgG	0.11 $\pm$ 0.03

仅天然的猪 TSH 0.3ng/mL	40.2±4.0
天然的猪 TSH 0.3ng/mL 和 0.001 μg/mL 5C9IgG.	32.7±4.0
天然的猪 TSH 0.3ng/mL 和 0.01 μg/mL 5C9IgG	28.2±2.04
天然的猪 TSH 0.3ng/mL 和 0.1 μg/mL 5C9IgG	18.0±1.36
天然的猪 TSH 0.3ng/mL 和 1.0 μg/mL 5C9IgG	2.14±0.85
天然的猪 TSH 0.3ng/mL 和 10 μg/mL 5C9IgG	0.20±0.14
天然的猪 TSH 0.3ng/mL 和	0.18±0.13
100 μg/mL 5C9IgG	

[0416] 实验 3

[0417]

稀释于环 AMP 测定缓冲液中的试验样品	表达野生型 TSHR 的 CHO 细胞中的 环 AMP 浓度 (pmol/mL 平均值 ±SD ;n = 3)
仅缓冲液	2.0±0.8
仅天然的人 TSH 100ng/mL	31.1±2.55
天然的人 TSH 100ng/mL 和 0.001 μg/mL 5C9IgG.	36.0±3.27
天然的人 TSH 100ng/mL 和 0.01 μg/mL 5C9IgG	28.4±3.55
天然的人 TSH 100ng/mL 和 0.1 μg/mL 5C9IgG	7.22±3.20
天然的人 TSH 100ng/mL 和 1.0 μg/mL 5C9IgG	0.67±0.46
天然的人 TSH 100ng/mL 和 10 μg/mL 5C9IgG	0.8±0.45

天然的人 TSH 100ng/mL 和 100 μ g/mL 5C9IgG	1.35 $\pm$ 1.0
--	----------------

[0418]

仅重组体人 TSH 100ng/mL	26.4 $\pm$ 3.53
重组体人 TSH 100ng/mL 和 0.001 μ g/mL 5C9IgG.	25.6 $\pm$ 2.45
重组体人 TSH 100ng/mL 和 0.01 μ g/mL 5C9IgG	22.9 $\pm$ 7.4
重组体人 TSH 100ng/mL 和 0.1 μ g/mL 5C9IgG	1.18 $\pm$ 0.49
重组体人 TSH 100ng/mL 和 1.0 μ g/mL 5C9IgG	0.81 $\pm$ 0.05
重组体人 TSH 100ng/mL 和 10 μ g/mL 5C9IgG	0.74 $\pm$ 0.42
重组体人 TSH 100ng/mL 和 100 μ g/mL 5C9IgG	0.88 $\pm$ 0.55
仅天然的猪 TSH 0.3ng/mL	35.7 $\pm$ 4.82
天然的猪 TSH 0.3ng/L 和 0.001 μ g/mL 5C9IgG.	38.2 $\pm$ 2.54
天然的猪 TSH 0.3ng/mL 和 0.01 μ g/mL 5C9IgG	26.6 $\pm$ 3.22
天然的猪 TSH 0.3ng/mL 和	10.1 $\pm$ 1.79

[0419]

0.1 μ g/mL 5C9IgG	
天然的猪 TSH 0.3ng/mL 和 1.0 μ g/mL 5C9IgG	2.28 $\pm$ 0.71
天然的猪 TSH 0.3ng/mL 和 10 μ g/mL 5C9IgG	0.68 $\pm$ 0.21
天然的猪 TSH 0.3ng/mL 和 100 μ g/mL 5C9IgG	1.03 $\pm$ 0.63

[0420] 表 11a

[0421] 5C9IgG 和 9D33IgG 对具有活化突变 S281I 的 TSHR 的组成型活性的效应

[0422]

稀释于环 AMP 测定缓冲液中的试验样品	表达 TSHR S281I 的 CHO 细胞中的 环 AMP 浓度 (pmol/mL 平均值 $\pm$ SD ; n = 3)
仅缓冲液	9.90 $\pm$ 1.51
0.001 μ g/mL 2G4IgG ^a	6.83 $\pm$ 0.37
0.01 μ g/mL 2G4IgG	7.74 $\pm$ 0.78
0.1 μ g/mL 2G4IgG	8.58 $\pm$ 1.12
1 μ g/mL 2G4IgG	8.37 $\pm$ 1.10
0.001 μ g/mL 5C9IgG	4.31 $\pm$ 0.16
0.01 μ g/mL 5C9IgG	4.17 $\pm$ 0.60
0.1 μ g/mL 5C9IgG	3.20 $\pm$ 0.63
1 μ g/mL 5C9IgG	3.44 $\pm$ 0.63
0.001 μ g/mL 9D33IgG	5.97 $\pm$ 0.94
0.01 μ g/mL 9D33IgG	9.27 $\pm$ 1.4
0.1 μ g/mL 9D33IgG	8.13 $\pm$ 0.72
1 μ g/mL 9D33IgG	7.33 $\pm$ 1.17

[0423] ^a2G4 是一种对照的抗甲状腺过氧化物酶的人单克隆抗体。

[0424] 表 11b

[0425] 5C9IgG 和 9D33IgG 对具有活化突变 I568T 的 TSHR 的组成型活性的效应

[0426]

稀释于环 AMP 测定缓冲液中的试验样品	表达 TSHR I568T 的 CHO 细胞中的 环 AMP 浓度 (pmol/mL 平均值 $\pm$ SD ; n = 3)
仅缓冲液	21.39 $\pm$ 5.31
0.001 μ g/mL 2G4IgG	19.13 $\pm$ 2.77

0.01 $\mu\text{g/mL}$ 2G4IgG	16.67 $\pm$ 1.87
0.1 $\mu\text{g/mL}$ 2G4IgG	19.92 $\pm$ 0.91
1 $\mu\text{g/mL}$ 2G4IgG	20.52 $\pm$ 0.95
0.001 $\mu\text{g/mL}$ 5C9IgG	18.81 $\pm$ 1.39
0.01 $\mu\text{g/mL}$ 5C9IgG	9.24 $\pm$ 0.83
0.1 $\mu\text{g/mL}$ 5C9IgG	6.02 $\pm$ 1.93
1 $\mu\text{g/mL}$ 5C9IgG	5.29 $\pm$ 0.75
0.001 $\mu\text{g/mL}$ 9D33IgG	16.58 $\pm$ 0.00
0.01 $\mu\text{g/mL}$ RSR-B2IgG	17.03 $\pm$ 2.36
0.1 $\mu\text{g/mL}$ RSR-B2IgG	19.96 $\pm$ 1.66
1 $\mu\text{g/mL}$ RSR-B2IgG	21.65 $\pm$ 1.99

[0427] 表 11c

[0428] 5C9IgG 和 9D33IgG 对具有活化突变 A623I 的 TSHR 的组成型活性的效应

[0429]

稀释于环 AMP 测定缓冲液中的试验样品	表达 TSHR A621I 的 CHO 细胞中的 环 AMP 浓度 (pmol/mL 平均值 $\pm$ SD ; n = 3)
仅缓冲液	36.89 ^a
0.001 $\mu\text{g/mL}$ 2G4IgG	28.46 $\pm$ 2.31
0.01 $\mu\text{g/mL}$ 2G4IgG	33.44 $\pm$ 1.12
0.1 $\mu\text{g/mL}$ 2G4IgG	30.40 $\pm$ 7.93
1 $\mu\text{g/mL}$ 2G4IgG	28.96 $\pm$ 2.29
0.001 $\mu\text{g/mL}$ 5C9IgG	26.52 $\pm$ 1.33
0.01 $\mu\text{g/mL}$ 5C9IgG	27.03 $\pm$ 2.13
0.1 $\mu\text{g/mL}$ 5C9IgG	19.79 $\pm$ 0.48

1 μ g/mL 5C9IgG	16.43 $\pm$ 1.27
0.001 μ g/mL 9D33IgG	29.55 $\pm$ 3.15
0.01 μ g/mL 9D33IgG	27.64 $\pm$ 3.49
0.1 μ g/mL 9D33IgG	31.78 $\pm$ 9.18
1 μ g/mL 9D33IgG	40.09 $\pm$ 7.73

[0430] ^a 两次测定

[0431] 表 12

[0432] 5C9 加 9D33 在表达野生型 TSHR 的 CHO 细胞中对于阻断环 AMP 产生的 pTSH 刺激的效应

[0433] 实验 1

[0434]

环 AMP 测定缓冲液中的试验样品	环 AMP 浓度 (pmol/mL 平均值 $\pm$ SD ; n = 3)
仅缓冲液	1.9 $\pm$ 1.0
TSH 3ng/mL	48.5 $\pm$ 14
10 μ g/mL 9D33	2.9 $\pm$ 1.0
10 μ g/mL 5C9	0.45 $\pm$ 0.31
10 μ g/mL 9D33+10 μ g/mL 5C9	1.12 $\pm$ 0.4
10 μ g/mL 9D33+TSH	23.8 $\pm$ 8.7
10 μ g/mL 5C9+TSH	3.7 $\pm$ 2.7
10 μ g/mL 9D33+10 μ g/mL 5C9+TSH	4.9 (n = 2)
1 μ g/mL 9D33+TSH	28.7 $\pm$ 1.8
1 μ g/mL 5C9+TSH	13.9 $\pm$ 3.1
1 μ g/mL 9D33+1 μ g/mL 5C9+TSH	12.6 $\pm$ 2.5

[0435] 实验 2

[0436]

环 AMP 测定缓冲液中的试验样品	环 AMP 浓度 (pmol/mL 平均值 $\pm$ SD ;n = 3)
仅缓冲液	0.72 $\pm$ 0.63
TSH 3ng/mL	34.3 $\pm$ 3.1

[0437]

10 μ g/mL 9D33	1.6 $\pm$ 1.3
10 μ g/mL 5C9	0.4 $\pm$ 0.4
10 μ g/mL 9D33+10 μ g/mL 5C9	0.03 (n = 1)
10 μ g/mL 9D33+TSH	9.5 $\pm$ 1.7
10 μ g/mL 5C9+TSH	3.1 $\pm$ 1.0
10 μ g/mL 9D33+10 μ g/mL 5C9+TSH	3.3 $\pm$ 2.0
1 μ g/mL 9D33+TSH	19.0 $\pm$ 3.2
1 μ g/mL 5C9+TSH	6.1 $\pm$ 0.6
1 μ g/mL 9D33+1 μ g/mL 5C9+TSH	5.9 $\pm$ 0.6

[0438] 实验 3

[0439]

环 AMP 测定缓冲液中的试验样品	环 AMP 浓度 (pmol/mL 均值 $\pm$ SD ;n = 3)
仅缓冲液	0.99 $\pm$ 0.03
TSH 3ng/mL	51.3 $\pm$ 5.0
100 μ g/mL 9D33	1.14 $\pm$ 0.13
100 μ g/mL 5C9	0.50 $\pm$ 0.04

100 μ g/mL 9D33+100 μ g/mL 5C9	0.66 $\pm$ 0.9
100 μ g/mL 9D33+TSH	10.53 $\pm$ 0.84
100 μ g/mL 5C9+TSH	1.4 $\pm$ 0.18
100 μ g/mL 9D33+100 μ g/mL 5C9+TSH	1.3 $\pm$ 0.36
10 μ g/mL 9D33+TSH	13.5 $\pm$ 2.9
10 μ g/mL 5C9+TSH	1.9 $\pm$ 1.1

[0440]

10 μ g/mL 9D33+10 μ g/mL 5C9+TSH	1.2 $\pm$ 0.1
1 μ g/mL 9D33+TSH	27.8 $\pm$ 2.2
1 μ g/mL 5C9+TSH	5.4 $\pm$ 1.8
1 μ g/mL 9D33+1 μ g/mL 5C9+TSH	5.2 $\pm$ 0.3
0.1 μ g/mL 9D33+TSH	35.1 $\pm$ 2.3
0.1 μ g/mL 5C9+TSH	18.7 $\pm$ 3.4
0.1 μ g/mL 9D33+0.1 μ g/mL 5C9+TSH	14.4 $\pm$ 1.0
0.01 μ g/mL 9D33+TSH	47.1 $\pm$ 1.9
0.01 μ g/mL 5C9+TSH	33.9 $\pm$ 7.8
0.01 μ g/mL 9D33+0.01 μ g/mL 5C9+TSH	27.8 $\pm$ 1.3

[0441] 实验 4

[0442]

环 AMP 测定缓冲液中的试验样品	环 AMP 浓度 (pmol/mL 平均值 $\pm$ SD ;n = 3)
仅缓冲液	1.4 $\pm$ 0.5
TSH 0.3ng/mL	46.6 $\pm$ 12.9

100 μ g/mL 9D33	0.99 ± 0.62
100 μ g/mL 5C9	0.15 ± 0.12
100 μ g/mL 9D33+100 μ g/mL 5C9	0.41 ± 0.40
100 μ g/mL 9D33+TSH	3.53 ± 1.1
100 μ g/mL 5C9+TSH	0.29 ± 0.15
100 μ g/mL 9D33+100 μ g/mL 5C9+TSH	0.63 ± 0.38

[0443]

10 μ g/mL 9D33+TSH	4.23 ± 0.81
10 μ g/mL 5C9+TSH	0.23 ± 0.08
10 μ g/mL 9D33+10 μ g/mL 5C9+TSH	0.52 ± 0.15
1 μ g/mL 9D33+TSH	9.01 ± 0.67
1 μ g/mL 5C9+TSH	1.65 ± 0.47
1 μ g/mL 9D33+1 μ g/mL 5C9+TSH	1.21 ± 0.67
0.1 μ g/mL 9D33+TSH	20.2 ± 2.2
0.1 μ g/mL 5C9+TSH	6.2 ± 1.8
0.1 μ g/mL 9D33+0.1 μ g/mL 5C9+TSH	7.6 ± 1.3

[0444] 实验 5

[0445]

环 AMP 测定缓冲液中的试验样品	环 AMP 浓度 (pmol/mL 平均值 $\pm$ SD ; n = 3)
仅缓冲液	1.83 ± 0.64
TSH 0.3ng/mL	17.26 ± 1.5

10 μ g/mL 9D33	2.07±0.52
10 μ g/mL 5C9	0.38±0.2
10 μ g/mL 9D33+10 μ g/mL 5C9	0.96±0.14
10 μ g/mL9D33+TSH	3.57±0.58
10 μ g/mL 5C9+TSH	1.17±0.00
10 μ g/mL 9D33+10 μ g/mL 5C9+TSH	1.58±0.20
5 μ g/mL 9D33+TSH	3.71±0.10

[0446]

5 μ g/mL 5C9+TSH	1.21±0.36
1 μ g/mL 9D33+TSH	6.38±1.35
1 μ g/mL 5C9+TSH	2.57±0.65
1 μ g/mL 9D33+1 μ g/mL 5C9+TSH	1.46±0.59
0.1 μ g/mL 9D33+TSH	14.67±4.69
0.1 μ g/mL 5C9+TSH	12.43±1.59
0.1 μ g/mL 9D33+0.1 μ g/mL 5C9+TSH	9.99±3.78

[0447] 表 13

[0448] 5C9 加 9D33 在表达野生型 TSHR 的 CHO 细胞中对于阻断由 M22Fab 介导的对基础环 AMP 产生的刺激的效应

[0449] 实验 1

[0450]

环 AMP 测定缓冲液中的试验样品	环 AMP 浓度 (pmol/mL 平均值 ±SD ;n = 3)
仅缓冲液	1.45±0.46
M223ng/mL	49.1±9.8

100 μ g/mL 9D33	1.51 ± 0.22
100 μ g/mL 5C9	0.35 ± 0.30
100 μ g/mL 9D33+100 μ g/mL 5C9	1.57 ± 0.13
100 μ g/mL 9D33+M22	2.13 ± 0.74
100 μ g/mL 5C9+M22	0.35 ± 0.08
100 μ g/mL 9D33+100 μ g/mL 5C9+ M22	0.70 ± 0.40
10 μ g/mL 9D33+M22	2.5 ± 0.8
10 μ g/mL 5C9+M22	0.36 ± 0.25
10 μ g/mL 9D33+10 μ g/mL 5C9+M22	0.52 ± 0.12
1 μ g/mL 9D33+M22	5.25 ± 0.55
1 μ g/mL 5C9+M22	0.93 ± 0.07
1 μ g/mL 9D33+1 μ g/mL 5C9+M22	0.69 ± 0.13

[0451]

0.1 μ g/mL 9D33+M22	27.6 ± 2.5
0.1 μ g/mL 5C9+M22	6.0 ± 2.6
0.1 μ g/mL 9D33+0.1 μ g/mL 5C9+ M22	13.7 ± 7.5
0.01 μ g/mL 9D33+M22	47.5 ± 4.5
0.01 μ g/mL 5C9+M22	48.1 ± 5.4
0.01 μ g/mL 9D33+0.01 μ g/mL 5C9+ M22	47.5 ± 4.5

[0452] 实验 2

[0453]

环 AMP 测定缓冲液中的试验样品	环 AMP 浓度 (pmol/mL 平均值 $\pm$ SD ;n = 3)
仅缓冲液	1.69 $\pm$ 0.47
M223ng/mL	68.3 $\pm$ 6.3
100 μ g/L9D33	1.76 $\pm$ 0.43
100 μ g/mL 5C9	0.69 $\pm$ 0.18
100 μ g/mL 9D33+100 μ g/mL 5C9	1.16 $\pm$ 0.35
100 μ g/mL 9D33+M22	1.42 $\pm$ 1.20
100 μ g/mL 5C9+M22	不可测
100 μ g/mL 9D33+100 μ g/mL 5C9+ M22	0.14(n = 2)
10 μ g/mL 9D33+M22	0.67(n = 2)
10 μ g/mL 5C9+M22	0.14(n = 1)
10 μ g/mL 9D33+10 μ g/mL 5C9+M22	2.41(n = 1)
1 μ g/mL 9D33+M22	6.03 $\pm$ 1.15
1 μ g/mL 5C9+M22	2.54(n = 1)
1 μ g/mL 9D33+1 μ g/mL 5C9+M22	1.51(n = 1)
0.1 μ g/mL 9D33+M22	38.7 $\pm$ 8.1
0.1 μ g/mL 5C9+M22	4.17 $\pm$ 1.7
0.1 μ g/mL 9D33+0.1 μ g/mL 5C9+ M22	5.17 $\pm$ 2.85

[0454]

0.01 μ g/mL 9D33+M22	60.2 $\pm$ 8.0
0.01 μ g/mL 5C9+M22	57.3 $\pm$ 13.7
0.01 μ g/mL 9D33+0.01 μ g/mL 5C9+M22	40.4 $\pm$ 5.3
0.001 μ g/mL 9D33+M22	79.1 $\pm$ 26.3
0.001 μ g/mL 5C9+M22	63.3 $\pm$ 19.0
0.001 μ g/mL 9D33+0.001 μ g/mL 5C9+M22	40.2 $\pm$ 8.7

[0455] 实验 3

[0456]

环 AMP 测定缓冲液中的试验样品	环 AMP 浓度 (pmol/mL 平均值 $\pm$ SD ;n = 3)
仅缓冲液	0.86 $\pm$ 0.12
M220.3ng/mL	21.8 $\pm$ 3.23
100 μ g/mL 9D33	0.88 $\pm$ 0.30
100 μ g/mL 5C9	0.58 $\pm$ 0.28
100 μ g/mL 9D33+100 μ g/mL 5C9	0.81 $\pm$ 0.36
100 μ g/mL 9D33+M22	1.03 $\pm$ 0.32
100 μ g/mL 5C9+M22	0.05(n = 2)
100 μ g/mL 9D33+100 μ g/mL 5C9+M22	0.06(n = 2)
10 μ g/mL 9D33+M22	0.97 $\pm$ 0.48
10 μ g/mL 5C9+M22	0.20(n = 2)
10 μ g/mL 9D33+10 μ g/mL 5C9+M22	0.14 $\pm$ 0.08

1 μ g/mL 9D33+M22	0.83 $\pm$ 0.21
1 μ g/mL 5C9+M22	0.02(n = 2)
1 μ g/mL 9D33+1 μ g/mL 5C9+M22	0.13 $\pm$ 0.13
0.1 μ g/mL 9D33+M22	5.38 $\pm$ 1.71
0.1 μ g/mL 5C9+M22	1.43 $\pm$ 1.09
0.1 μ g/mL 9D33+0.1 μ g/mL 5C9+M22	2.39 $\pm$ 1.0

[0457]

0.01 μ g/mL 9D33+M22	15.2 $\pm$ 1.42
0.01 μ g/mL 5C9+M22	13.1 $\pm$ 1.34
0.01 μ g/mL 9D33+0.01 μ g/mL 5C9+M22	12.7 $\pm$ 3.4
0.001 μ g/mL 9D33+M22	12.8 $\pm$ 1.60
0.001 μ g/mL 5C9+M22	13.3 $\pm$ 0.89
0.001 μ g/mL 9D33+0.001 μ g/mL 5C9+M22	15.8 $\pm$ 2.15

[0458] 实验 4

[0459]

环 AMP 测定缓冲液中的试验样品	环 AMP 浓度 (pmol/mL 平均值 $\pm$ SD ;n = 3)
仅缓冲液	1.29 $\pm$ 0.68
M220.3ng/mL	31.1 $\pm$ 9.4
100 μ g/mL 9D33	2.38 $\pm$ 1.11

100 μ g/mL 5C9	0.12 ± 0.09
100 μ g/mL 9D33+100 μ g/mL 5C9	0.81 ± 0.15
100 μ g/mL 9D33+M22	2.00 ± 0.87
100 μ g/mL 5C9+M22	0.22 ± 0.11
100 μ g/mL 9D33+100 μ g/mL 5C9+ M22	0.40 ± 0.18
10 μ g/mL 9D33+M22	1.25 ± 0.09
10 μ g/mL 5C9+M22	0.40 ± 0.17
10 μ g/mL 9D33+10 μ g/mL 5C9+M22	0.45 ± 0.31
1 μ g/mL 9D33+M22	2.66 ± 0.64
1 μ g/mL 5C9+M22	0.21 ± 0.18
1 μ g/mL 9D33+1 μ g/mL 5C9+M22	0.14 ± 0.07
0.1 μ g/mL 9D33+M22	27.6 ± 2.5
0.1 μ g/mL 5C9+M22	6.0 ± 2.6
0.1 μ g/mL 9D33+0.1 μ g/mL 5C9+M22	7.2 ± 3.9
0.01 μ g/mL 9D33+M22	38.9 ± 6.4
0.01 μ g/mL 5C9+M22	31.5 ± 4.0

[0460]

0.01 μ g/mL 9D33+0.01 μ g/mL 5C9+ M22	20.6 ± 5.3
0.001 μ g/mL 9D33+M22	43.2 ± 7.9
0.001 μ g/mL 5C9+M22	33.1 ± 4.0

0.001 μ g/mL 9D33+0.001 μ g/mL 5C9+ M22	25.3 $\pm$ 6.0
--	----------------

[0461] 表 14

[0462] 5C9 和 9D33IgG 在表达野生型 TSHR 的 CHO 细胞（每个细胞大约 5×10^5 个受体）中对基础环 AMP 产生的效应

[0463] 实验 1

[0464]

试验样品	环 AMP 浓度 pmol/mL (平均值 $\pm$ SD ;n = 3)	基础环 AMP 产生量的抑制%
仅环 AMP 测定缓冲液	47.1 $\pm$ 11.7	0
3ng/mL TSH	152.0 $\pm$ 28.2	-ve
5B3 ^a IgG 100 μ g/mL	44.5 $\pm$ 5.2	5.3
5B3 ^a IgG 10 μ g/mL	45.4 $\pm$ 6.3	3.4
5B3 ^a IgG 1 μ g/mL	52.0 $\pm$ 12.1	-ve
9D33IgG 100 μ g/mL	74.2 $\pm$ 7.2	-ve
9D33IgG 10 μ g/mL	56.5 $\pm$ 4.0	-ve
9D33IgG 1 μ g/mL	65.8 $\pm$ 9.8	-ve
9D33IgG 0.1 μ g/mL	61.7 $\pm$ 13.3	-ve
9D33IgG 0.01 μ g/mL	52.0 $\pm$ 5.1	-ve
9D33IgG 0.001 μ g/mL	61.6 $\pm$ 3.8	-ve

[0465] 在不表达 TSHR 的对照 CHO 细胞中,在存在环 AMP 测定缓冲液的情况下基础环 AMP 产生量为 1.02 ± 0.06 pmol/mL(平均值 $\pm$ SD ;n = 3),且在存在 3ng/mL 的 TSH 的情况下为 0.74 ± 0.32 pmol/mL(平均值 $\pm$ SD ;n = 3)。

[0466] -ve = 阴性,即不抑制环 AMP 产生。

[0467] ^a5B3 是一种抗谷氨酸脱羧酶 (GAD) 的人单克隆抗体 (5C9 的阴性对照)。

[0468] 实验 2

[0469]

试验样品	环 AMP 浓度 pmol/mL (平均值 $\pm$ SD ;n = 3)	基础环 AMP 产生量的抑制%
仅环 AMP 测定缓冲液	58.0 $\pm$ 15.2	0
3ng/mL TSH	156.5 $\pm$ 22.2	-ve
5B3 ^a IgG 100 μ g/mL	52.7 $\pm$ 7.8	9.1
5B3 ^a IgG 10 μ g/mL	43.7 $\pm$ 10.4	24.7
5B3 ^a IgG 1 μ g/mL	55.9 $\pm$ 12.2	3.7
5C9 IgG 100 μ g/mL	26.2 $\pm$ 2.7	54.9
5C9 IgG 10 μ g/mL	14.7 $\pm$ 1.7	74.6
5C9 IgG 1 μ g/mL	16.8 $\pm$ 4.2	71.0
5C9 IgG 0.1 μ g/mL	31.5 $\pm$ 8.8	45.7
5C9 IgG 0.01 μ g/mL	36.4 $\pm$ 4.5	37.2
5C9 IgG 0.001 μ g/mL	51.7 $\pm$ 9.8	10.8

[0470] 在不表达 TSHR 的对照 CHO 细胞中,在存在环 AMP 测定缓冲液的情况下基础环 AMP 产生量为 0.03pmol/mL (n = 2),且在存在 3ng/mL 的 TSH 的情况下为 0.40 $\pm$ 0.09pmol/mL (平均值 $\pm$ SD ;n = 3)。

[0471] -ve = 阴性,即不抑制环 AMP 产生。

[0472] ^a5B3 是一种抗谷氨酸脱羧酶 (GAD) 的人单克隆抗体 (5C9 的阴性对照)。

[0473] 实验 3

[0474] 5C9Fab 和 F(ab') 在表达野生型 TSHR 的 CHO 细胞中对基础环 AMP 产生的效应

[0475]

环 AMP 测定缓冲液中的 试验样品	环 AMP 浓度 pmol/mL (平均值 $\pm$ SD ;n = 3)	基础环 AMP 产生量的抑制%
仅环 AMP 测定缓冲液	59.4 $\pm$ 8.6	0
9D33 IgG 100 μ g/mL	67.8 $\pm$ 1.0	-ve
9D33 IgG 10 μ g/mL	79.4 $\pm$ 9.8	-ve

9D33IgG 1 μ g/mL	71.5 $\pm$ 8.8	-ve
9D33IgG 0.1 μ g/mL	75.6 $\pm$ 8.9	-ve
9D33IgG 0.01 μ g/mL	60.5 $\pm$ 7.5	-ve
9D33IgG 0.001 μ g/mL	52.3 $\pm$ 6.3	12
5C9IgG 100 μ g/mL	26.2 $\pm$ 1.8	56
5C9IgG 10 μ g/mL	24.5 $\pm$ 5.8	59

[0476]

5C9IgG 1 μ g/mL	22.9 $\pm$ 2.1	61
5C9IgG 0.1 μ g/mL	59.1 $\pm$ 2.6	1
5C9IgG 0.01 μ g/mL	64.3 $\pm$ 8.4	-ve
5C9IgG 0.001 μ g/mL	67.3 $\pm$ 9.8	-ve
5C9Fab 100 μ g/mL	23.3 $\pm$ 2.3	61
5C9Fab 10 μ g/mL	32.1 $\pm$ 4.8	46
5C9Fab 1 μ g/mL	36.4 $\pm$ 1.5	39
5C9Fab 0.1 μ g/mL	52.8 $\pm$ 1.9	11
5C9Fab 0.01 μ g/mL	61.1 $\pm$ 2.4	-ve
5C9Fab 0.001 μ g/mL	62.5 $\pm$ 7.3	-ve
5C9F(ab') ₂ 100 μ g/mL	30.9 $\pm$ 2.6	48
5C9F(ab') ₂ 10 μ g/mL	36.5 $\pm$ 3.4	39
5C9F(ab') ₂ 1 μ g/mL	45.9 $\pm$ 4.5	23

[0477]

5C9F(ab') ₂ 0.1 μ g/mL	48.2 $\pm$ 3.1	19
5C9F(ab') ₂ 0.01 μ g/mL	62.3 $\pm$ 5.7	-ve

5C9F(ab') ₂ 0.001 μg/mL	57.9 ± 9.1	3
------------------------------------	------------	---

[0478] 在不表达 TSHR 的对照 CHO 细胞中,在存在环 AMP 测定缓冲液的情况下基础环 AMP 产生量为 0.03pmol/mL (n = 2),且在存在 3ng/mL 的 TSH 的情况下为 0.40 ± 0.09pmol/mL (平均值 ± SD ; n = 3)。

[0479] -ve = 阴性,即不抑制环 AMP 产生。

[0480] F(ab')₂ 是通过还原 F(ab')₂ 进行制备的 ; 详见正文。

[0481] 表 15

[0482] 具有拮抗剂活性的患者血清 TSHR 自身抗体 (B2-B5) 在表达 TSHR I568T 活性突变的 CHO 细胞中对基础环 AMP 水平的效应

[0483] 实验 1

[0484]

试验样品和血清稀释度	环 AMP 浓度 pmol/mL (平均值 ± SD ; n = 3)	基础环 AMP 产生量的抑制%
仅环 AMP 测定缓冲液	20.5 ± 8.7	0
HBD 混合物 /10	19.5 ± 3.4	5
HBD 混合物 /50	25.7 ± 2.8	-ve
N1/10	20.7 ± 5.5	-ve
N1/50	18.5 ± 1.5	10
N2/10	23.3 ± 1.7	-ve
N2/50	17.6 ± 1.8	14
N3/10	20.3 ± 2.4	1
N3/50	23.6 ± 5.9	-ve
B2/10	5.3 ± 1.3	74

[0485]

B2/50	9.6 ± 2.8	53
B3/10	8.3 ± 3.1	60
B3/50	10.5 ± 2.5	49

B4/10	2.2 ± 0.5	89
B4/50	3.0 ± 0.3	86
B5/10	15.9 ± 3.3	23
B5/50	14.5 ± 1.3	29

[0486] 实验 2

[0487]

试验样品和血清稀释度	环 AMP 浓度 pmol/mL (平均值 $\pm$ SD ; n = 3)	基础环 AMP 产生量的抑制%
仅环 AMP 测定缓冲液	19.7 ± 3.7	0
HBD 混合物 /10	28.0 ± 1.6	-ve
HBD 混合物 /50	18.1 ± 3.9	8
HBD 混合物 /100	18.0 ± 1.6	9
HBD 混合物 /500	17.8 ± 1.3	10
HBD 混合物 /1000	20.7 ± 2.9	-ve
HBD 混合物 /5000	15.6 ± 2.1	20
B3/10	14.7 ± 2.2	25
B3/50	13.7 ± 1.3	31
B3/100	12.6 ± 0.6	36
B3/500	19.0 ± 0.8	4
B3/1000	18.4 ± 4.6	7
B3/5000	17.6 ± 0.9	11
B4/10	4.0 ± 0.5	80
B4/50	3.6 ± 0.8	81

B4/100	3.8 ± 1.1	81
B4/500	7.2 ± 2.6	64
B4/1000	12.0 ± 0.6	39
B4/5000	17.7 ± 2.7	10

[0488] -ve = 阴性, 即不抑制环 AMP 产生。

[0489] HBD 混合物 = 健康捐血者血清的混合物

[0490] N1-N3 = 个体的健康捐血者血清

[0491] 所有血清都稀释于环 AMP 测定缓冲液中。

[0492] 表 16

[0493] 具有拮抗剂活性的患者血清 TSHR 自身抗体 (B2-B5) 在表达 TSHR S281I 活性突变的 CHO 细胞中对基础环 AMP 水平的效应

[0494]

试验样品和血清稀释度	环 AMP 浓度 pmol/mL (平均值 $\pm$ SD ; n = 3)	基础环 AMP 产量的抑制%
仅环 AMP 测定缓冲液	11.2 ± 2.0	0
HBD/10	12.1 ± 0.6	-8
HBD/50	10.0 ± 2.0	11
N1/10	8.0 ± 1.6	28
N1/50	10.8 ± 3.3	4
N2/10	8.8 ± 1.4	21
N2/50	8.8 ± 2.3	22
N3/10	10.0 ± 0.8	17
N3/50	9.3 ± 1.7	17
B2/10	7.7 ± 0.39	31

[0495]

B2/50	5.7 ± 1.3	49
-------	---------------	----

B3/10	5.4 ± 0.5	52
B3/50	6.6 ± 1.1	41
B4/10	5.4 ± 1.1	52
B4/50	4.9 ± 0.7	56
B5/10	9.1 ± 2.5	18
B5/50	7.6 ± 0.8	32

[0496] 参见表 15 的说明性脚注。

[0497] 在用 TSHR S281I 的实验中, $1 \mu\text{g/mL}$ 的 5C9IgG 引起对基础环 AMP 活性的 71% 抑制。

[0498] 表 17

[0499] 具有拮抗剂活性的患者血清 TSHR 自身抗体 (B2-B5) 在表达 TSHR A623I 活性突变的 CHO 细胞中对基础环 AMP 水平的效应

[0500]

试验样品和血清稀释度	环 AMP 浓度 pmol/mL (平均值 $\pm$ SD ; n = 3)	基础环 AMP 产生量的抑制%
仅环 AMP 测定缓冲液	43.5 ± 11.2	0
HBD 混合物 /10	34.7 ± 4.5	20
HBD 混合物 /50	49.9 ± 5.7	-15
N1/10	32.1 ± 2.5	26
N1/50	43.9 ± 12.0	-1
N2/10	51.1 ± 8.4	-17
N2/50	32.6 ± 2.1	26
N3/10	47.2 ± 7.1	-10
N3/50	57.3 ± 16.5	-32
B2/10	28.8 ± 1.1	34

B2/50	43.9±2.7	-1
B3/10	33.5±3.5	23
B3/50	44.2±12.7	-1
B4/10	27.2±6.6	37
B4/50	23.9±1.0	45
B5/10	19.2±6.3	56
B5/50	40.6±10.9	7

[0501] 参见表 15 的说明性脚注。

[0502] 在用 TSHR A623I 的实验中, 1 μg/mL 的 5C9IgG 引起对基础环 AMP 活性的 49% 抑制。

[0503] 表 18

[0504] 具有拮抗剂活性的患者血清 TSHR 自身抗体 (B2-B5) 在表达野生型 TSHR 的 CHO 细胞 (每个细胞大约 5×10^5 个受体) 中对基础环 AMP 水平的效应

[0505]

试验样品和血清稀释度	环 AMP 浓度 pmol/mL (平均值 ±SD ; n = 3)	基础环 AMP 产生量的变化 (%)
仅环 AMP 测定缓冲液	28.1±0.7	100
HBD/10	37.5±6.9	133
HBD/50	37.2±2.4	132
N1/10	27.7±5.7	99
N1/50	26.0±4.8	93
N2/10	41.0±2.7	146
N2/50	27.0±1.2	96
N3/10	34.3±2.7	122
N3/50	38.5±7.8	137

B2/10	39.7±1.7	141
B2/50	41.4±3.8	147
B3/10	74.0±11.2	263
B3/50	46.5±8.7	165
B4/10	8.7±0.3	31
B4/50	17.2±1.9	61
B5/10	54.2±6.0	193
B5/50	48.0±10.5	171

[0506]

基础环 AMP 产生量的改变 (%) =

[0507]

$$\frac{\text{存在试验样品的情况下的环AMP产生量}}{\text{存在环AMP测定缓冲液的情况下的环AMP产生量}} \times 100$$

[0508] 在存在 1 μ g/mL 的 5C9IgG 的情况下,基础环 AMP 水平降低至在存在环 AMP 测定缓冲液的情况下的水平的 33%。

[0509]

表 19
具有拮抗活性的患者血清 TSHR 自身抗体 (B2-B5) 在 TSHR 转染的 CHO 细胞中对基础环 AMP 水平的效应的
总结

CHO 细胞	存在以下物质的情况下环AMP的浓度(fmol/细胞孔; 平均值±SD, n = 3) :				
	HBD 混合物	B2	B3	B4	B5
转染有					5C9 IgG
野生型 TSHR	5531 ±1140	7949 ±340	14804 ±2240	1740 ±68	10849 ±1206
TSHR I568T	3900 ±671	1066 ±266	1660 ±628	438 ±90	3180 ±650
TSHR A623I	6420 ±968	5760 ±224	6700 ±704	5440 ±1324	7680 ±1260
TSHR S281I	2420 ±130	1538 ±175	1080 ±96	1080 ±218	1822 ±494

HBD 混合物 = 健康捐血者血清的混合物
所使用的 HBD 混合物和血清 B2-B5 为以 1:10 稀释于环 AMP 测定缓冲液中。
所使用的 5C9 IgG 为以 1 μg/mL 的浓度溶于环 AMP 测定缓冲液中。
B2-B5 在表达野生型 TSHR 的 CHO 细胞中阻断由 TSH 或 M22 对环 AMP 产生的刺激。

[0510] 表 20a
[0511] 5C9IgG 在表达野生型 TSHR 和 Asp43 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中对 pTSH

刺激的环 AMP 产生的效应

[0512]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	277 ±109	173 ±81	76
仅TSH	13924 ±717	11651 ±465	84
5B3 ^a 10 µg/mL + TSH	14263 ±2791	17452 ±2160	122
5B3 ^a 100 µg/mL + TSH	18892 ±1222	12685 ¹	67
5C9 0.01 µg/mL + TSH	13145 ¹	12722 ±695	97
5C9 0.1 µg/mL + TSH	7813 ±505	6726 ±488	86
5C9 1.0 µg/mL + TSH	2021 ±515	471 ±217	23
5C9 10 µg/mL + TSH	306 ±287	119 ±68	39
5C9 100 µg/mL + TSH	84 ±93	31 ²	37
仅 5C9 100 µg/mL	47 ±23	206 ±107	438

[0513] ¹ 两次测定的平均值

[0514] ² 单次测定

[0515] pTSH 浓度 = 3ng/mL

[0516] 所有稀释都是在环 AMP 测定缓冲液中

[0517] ^a5B3 是一种抗谷氨酸脱羧酶 (GAD) 的人单克隆抗体 (5C9 的阴性对照)。

[0518] 表 20b

[0519] 5C9IgG 在表达野生型 TSHR 和 Glu61 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中对 pTSH 刺激的环 AMP 产生的效应

[0520]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	210 ±101	146 ±22	70
仅TSH	12818 ±2224	15398 ±982	120
5B3 ^a 10 µg/mL + TSH	11522 ±2220	19750 ±2950	171
5B3 ^a 100 µg/mL + TSH	14090 ±2394	15680 ±2708	111
5C9 0.01 µg/mL + TSH	13806 ±1188	18050 ±2948	131
5C9 0.1 µg/mL + TSH	2886 ±422	2114 ±592	73
5C9 1.0 µg/mL + TSH	536 ±150	766 ±354	143
5C9 10 µg/mL + TSH	254 ±208	346 ±292	136
5C9 100 µg/mL + TSH	202 ¹	328 ±96	162
仅 5C9 100 µg/mL	218 ±46	254 ±48	117

[0521] 参见表 20a 的说明性脚注。

[0522] 表 20c

[0523] 5C9IgG 在表达野生型 TSHR 和 His105 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中对 pTSH 刺激的环 AMP 产生的效应

[0524]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	245 ±98	590 ±72	241
仅TSH	14214 ±2111	17979 ±1735	126
5B3 ^a 10 µg/mL + TSH	13214 ±3233	21359 ±1501	162
5B3 ^a 100 µg/mL + TSH	17232 ±2641	24044 ±3398	140
5C9 0.01 µg/mL + TSH	16652 ±2252	24168 ±1690	145
5C9 0.1 µg/mL + TSH	3511 ±590	2869 ±1460	82
5C9 1.0 µg/mL + TSH	454 ±11	561 ±393	124
5C9 10 µg/mL + TSH	289 ±84	434 ±392	150
5C9 100 µg/mL + TSH	223 ¹	134 ¹	60
仅 5C9 100 µg/mL	234 ±50	520 ±198	222

[0525] 参见表 20a 的说明性脚注。

[0526] 表 20d

[0527] 5C9IgG 在表达野生型 TSHR 和 Glu107 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中对 pTSH 刺激的环 AMP 产生的效应

[0528] 实验 1

[0529]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	326 ±157	1898 ±594	582
仅TSH	14838 ±1396	13435 ±2613	91
5B3 ^a 10 µg/mL + TSH	14018 ±3049	17074 ±1442	122
5B3 ^a 100 µg/mL + TSH	15949 ±1340	16009 ±4606	100
5C9 0.01 µg/mL + TSH	17001 ±5209	15008 ±1053	88
5C9 0.1 µg/mL + TSH	5950 [†]	5783 ±3213	97
5C9 1.0 µg/mL + TSH	1058 ±396	394 ±314	37
5C9 10 µg/mL + TSH	496 ±52	449 ±116	91
5C9 100 µg/mL + TSH	193 ±196	203 ±56	105
仅 5C9 100 µg/mL	1266 ±359	462 ±324	36

[0530] 参见表 20a 的说明性脚注。

[0531] 实验 2

[0532]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	167 ±148	1824 ±354	1092
仅TSH	17569 ±3919	19358 ±2365	110
5B3 ^a 10 µg/mL + TSH	11692 ±1161	21255 ±2597	182
5B3 ^a 100 µg/mL + TSH	24141 ±1869	22933 ±6554	95
5C9 0.01 µg/mL + TSH	18585 ±5353	21028 ±1432	113
5C9 0.1 µg/mL + TSH	4221 ±1003	1544 ±732	37
5C9 1.0 µg/mL + TSH	738 ±48	28 ¹	4
5C9 10 µg/mL + TSH	214 ±343	321 ±514	150
5C9 100 µg/mL + TSH	238 ¹	64 ²	27
仅 5C9 100 µg/mL	211 ±75	408 ±138	193

[0533] 参见表 20a 的说明性脚注。

[0534] 表 20e

[0535] 5C9IgG 在表达野生型 TSHR 和 Phe130 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中对 pTSH 刺激的环 AMP 产生的效应

[0536]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	345 ±119	410 ±85	119
仅TSH	15897 ±1291	16392 ±1318	103
5B3 ^a 10 µg/mL + TSH	18414 ±1662	15765 ±1088	86
5B3 ^a 100 µg/mL + TSH	19561 ±1078	21673 ±3165	111
5C9 0.01 µg/mL + TSH	15255 ±2166	17414 ±1020	114
5C9 0.1 µg/mL + TSH	2712 ±462	9015 ±1835	332
5C9 1.0 µg/mL + TSH	398 ±378	2235 ±1635	562
5C9 10 µg/mL + TSH	151 ±195	1139 ±146	754
5C9 100 µg/mL + TSH	240 ±199	603 ±141	251
仅 5C9 100 µg/mL	334 ±75	446 ±41	134

[0537] 参见表 20a 的说明性脚注。

[0538] 表 20f

[0539] 5C9IgG 在表达野生型 TSHR 和 Glu178 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中对 pTSH 刺激的环 AMP 产生的效应

[0540]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	183 ±77	366 ±300	200
仅TSH	8900 ±1185	7666 ±1659	86
5B3 ^a 10 µg/mL + TSH	9160 ±3180	10828 ±1650	118
5B3 ^a 100 µg/mL + TSH	12920 ±1300	9428 ±1350	73
5C9 0.01 µg/mL + TSH	12580 ±2700	8166 ±195	65
5C9 0.1 µg/mL + TSH	4354 ±920	7314 ±1830	168
5C9 1.0 µg/mL + TSH	688 ±140	3570 ±850	519
5C9 10 µg/mL + TSH	630 ±140	1904 ±360	302
5C9 100 µg/mL + TSH	712 ¹	894 ±120	126
仅 5C9 100 µg/mL	196 ±58	134 ±153	68

[0541] 参见表 20a 的说明性脚注。

[0542] 表 20g

[0543] 5C9IgG 在表达野生型 TSHR 和 Tyr185 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中对 pTSH 刺激的环 AMP 产生的效应

[0544]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	139 ±40	163 ±72	117
仅TSH	12649 ±1577	8305 ±870	66
5B3 ^a 10 µg/mL + TSH	16974 ±205	10088 ±1856	59
5B3 ^a 100 µg/mL + TSH	17089 ±2282	10920 ±2111	64
5C9 0.01 µg/mL + TSH	17264 ±4257	9368 ±2069	54
5C9 0.1 µg/mL + TSH	6217 ±2064	4536 ±724	73
5C9 1.0 µg/mL + TSH	1664 ±636	1199 ±1042	72
5C9 10 µg/mL + TSH	481 ±380	301 ±199	63
5C9 100 µg/mL + TSH	275 ±206	UD	
仅 5C9 100 µg/mL	123 ±38	163 ±60	133

[0545] UD = 低于测定检测的限值。

[0546] 参见表 20a 的说明性脚注。

[0547] 表 20h

[0548] 5C9IgG 在表达野生型 TSHR 和 Asp203 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中对 pTSH 刺激的环 AMP 产生的效应

[0549]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	298 ±164	742 ±122	249
仅TSH	11770 ±398	12594 ±400	107
5B3 ^a 10 µg/mL + TSH	13266 ±1105	12232 ±1819	92
5B3 ^a 100 µg/mL + TSH	14125 ±704	13006 ±2452	92
5C9 0.01 µg/mL + TSH	15454 ±422	14651 ±511	95
5C9 0.1 µg/mL + TSH	4445 ±405	13142 ±1589	296
5C9 1.0 µg/mL + TSH	1352 ±249	14678 ±6312	1086
5C9 10 µg/mL + TSH	807 ±479	12634 ±1036	1566
5C9 100 µg/mL + TSH	367 ±67	12721 ±3187	3446
仅 5C9 100 µg/mL	330 ±46	1368 ±206	415

[0550] 参见表 20a 的说明性脚注。

[0551] 表 20i

[0552] 5C9IgG 在表达野生型 TSHR 和 Tyr206 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中对 pTSH 刺激的环 AMP 产生的效应

[0553]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	380 ±166	402 ±96	106
仅TSH	15360 ±670	18440 ±1390	120
5B3 ^a 10 µg/mL + TSH	15880 ±1150	21000 ±2340	132
5B3 ^a 100 µg/mL + TSH	19100 ±3090	19680 ±3200	103
5C9 0.01 µg/mL + TSH	16100 ±2360	18420 ±670	114
5C9 0.1 µg/mL + TSH	6220 ±1500	10820 ±1750	174
5C9 1.0 µg/mL + TSH	1306 ±123	3460 ±360	265
5C9 10 µg/mL + TSH	396 ±158	1564 ±176	395
5C9 100 µg/mL + TSH	292 ±130	506 ±120	173
仅 5C9 100 µg/mL	444 ±98	482 ±286	109

[0554] 参见表 20a 的说明性脚注。

[0555] 表 20j

[0556] 5C9IgG 在表达野生型 TSHR 和 Lys209 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中对 pTSH 刺激的环 AMP 产生的效应

[0557]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	316 ±38	288 ±80	91
仅TSH	14200 ±1420	9500 ±1620	67
5B3 ^a 10 µg/mL + TSH	12280 ±610	11200 ±3000	91
5B3 ^a 100 µg/mL + TSH	16000 ±1470	13240 ±1530	83
5C9 0.01 µg/mL + TSH	15440 ±2180	5960 ±950	39
5C9 0.1 µg/mL + TSH	4700 ±339	278 ±40	6
5C9 1.0 µg/mL + TSH	1184 ±59	360 ±146	30
5C9 10 µg/mL + TSH	984 ±117	482 ±100	49
5C9 100 µg/mL + TSH	602 ±240	354 ±184	59
仅 5C9 100 µg/mL	272 ±49	280 ±104	103

[0558] 参见表 20a 的说明性脚注。

[0559] 表 20k

[0560] 5C9IgG 在表达野生型 TSHR 和 Asp232 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中对 pTSH 刺激的环 AMP 产生的效应

[0561]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	650 ±87	652 ±300	100
仅TSH	15681 ±866	14884 ±1587	95
5B3 ^a 10 µg/mL + TSH	15210 ±1697	17800 ±3219	117
5B3 ^a 100 µg/mL + TSH	19704 ±1173	17478 ±3150	89
5C9 0.01 µg/mL + TSH	17600 ±1347	15330 ±1593	87
5C9 0.1 µg/mL + TSH	7329 ±860	6556 ±1668	89
5C9 1.0 µg/mL + TSH	1072 ±705	1882 ±653	176
5C9 10 µg/mL + TSH	794 ±406	710 ±596	89
5C9 100 µg/mL + TSH	166 ±95	55 ±51	33
仅 5C9 100 µg/mL	522 ±84	99 ¹	19

[0562] 参见表 20a 的说明性脚注。

[0563] 表 201

[0564] 5C9IgG 在表达野生型 TSHR 和 Lys250 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中对 pTSH 刺激的环 AMP 产生的效应

[0565]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	590 ±86	1020 ±104	173
仅TSH	13332 ±1177	10933 ±1510	82
5B3 ^a 10 µg/mL + TSH	11292 ±1784	13410 ±2930	119
5B3 ^a 100 µg/mL + TSH	14236 ±3521	14049 ±3372	99
5C9 0.01 µg/mL + TSH	15191 ±4117	14460 ±2690	95
5C9 0.1 µg/mL + TSH	6295 ±1897	8486 ±2961	135
5C9 1.0 µg/mL + TSH	643 ±207	2567 ±841	399
5C9 10 µg/mL + TSH	286 ±116	862 ±398	301
5C9 100 µg/mL + TSH	158 ±244	96 ±57	61
仅 5C9 100 µg/mL	458 ±94	448 ±280	98

[0566] 参见表 20a 的说明性脚注。

[0567] 表 20m

[0568] 5C9IgG 在表达野生型 TSHR 和 Glu251 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中对 pTSH 刺激的环 AMP 产生的效应

[0569]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	380 ±84	960 ±372	253
仅TSH	18379 ±987	17492 ±1332	95
5B3 ^a 10 µg/mL + TSH	15152 ±4365	19951 ±2362	132
5B3 ^a 100 µg/mL + TSH	18169 ±3454	20461 ±1345	113
5C9 0.01 µg/mL + TSH	21197 ±1280	21950 ±936	104
5C9 0.1 µg/mL + TSH	8640 ±2123	15532 ±2571	180
5C9 1.0 µg/mL + TSH	915 ±139	5240 ±332	573
5C9 10 µg/mL + TSH	752 ±127	1881 ±212	250
5C9 100 µg/mL + TSH	496 ±166	1170 ±123	236
仅 5C9 100 µg/mL	460 ±102	406 ±212	88

[0570] 参见表 20a 的说明性脚注。

[0571] 表 20n

[0572] 5C9IgG 在表达野生型 TSHR 和 Thr257 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中对 pTSH 刺激的环 AMP 产生的效应

[0573]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	626 ±153	1140 ±153	182
仅TSH	16928 ±2079	18563 ±1573	110
5B3 ^a 10 µg/mL + TSH	17542 ±1874	23341 ±4203	133
5B3 ^a 100 µg/mL + TSH	18948 ±1444	20101 ±2902	106
5C9 0.01 µg/mL + TSH	18722 ±3876	21088 ±1810	113
5C9 0.1 µg/mL + TSH	6143 ±1233	7944 ±1138	129
5C9 1.0 µg/mL + TSH	1396 ±172	1594 ±156	114
5C9 10 µg/mL + TSH	638 ±58	972 ±12	152
5C9 100 µg/mL + TSH	591 ±99	611 ±52	103
仅 5C9 100 µg/mL	566 ±143	637 ±300	111

[0574] 参见表 20a 的说明性脚注。

[0575] 表 20o

[0576] 5C9IgG 在表达野生型 TSHR 和 Arg274 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中对 pTSH 刺激的环 AMP 产生的效应

[0577]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	124 ±103	86 ±38	69
仅TSH	21347 ±1112	11432 ±2511	54
5B3 ^a 10 µg/mL + TSH	18654 ±3700	12961 ±2609	69
5B3 ^a 100 µg/mL + TSH	26203 ±4753	13138 ±2248	50
5C9 0.01 µg/mL + TSH	16345 ±3974	9557 ±2479	58
5C9 0.1 µg/mL + TSH	4997 ±1392	1320 ±158	26
5C9 1.0 µg/mL + TSH	808 ±510	177 ±120	22
5C9 10 µg/mL + TSH	684 ±182	108 ¹	16
5C9 100 µg/mL + TSH	246 ±165	17 ²	7
仅 5C9 100 µg/mL	111 ±26	34 ±43	31

[0578] 参见表 20a 的说明性脚注。

[0579] 表 20p

[0580] 5C9IgG 在表达野生型 TSHR 和 Asp276 突变成丙氨酸的 TSHR 的 CHO 细胞中对 pTSH 刺激的环 AMP 产生的效应

[0581] 实验 1

[0582]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	365 ±166	1454 ±258	398
仅TSH	17500 ±727	22416 ±2570	128
5B3 ^a 10 µg/mL + TSH	19354 ±1794	25180 ±5609	130
5B3 ^a 100 µg/mL + TSH	21671 ±2064	25707 ±4101	119
5C9 0.01 µg/mL + TSH	17236 ±2705	26212 ±2597	152
5C9 0.1 µg/mL + TSH	5594 ±723	16856 ±2110	301
5C9 1.0 µg/mL + TSH	759 ¹	4788 ±553	631
5C9 10 µg/mL + TSH	366 ±145	1384 ±602	378
5C9 100 µg/mL + TSH	344 ±566	565 ±176	164
仅 5C9 100 µg/mL	300 ±242	602 ±274	201

[0583] 参见表 20a 的说明性脚注。

[0584] 实验 2

[0585]

试验样品	产生的环AMP (fmol/细胞孔; 平均值±SD, n=3)		突变/野生型 (%)
	野生型 TSHR	突变 TSHR	
仅环AMP测定缓冲液	156 ±30	601 ±190	385
仅TSH	13852 ±756	14616 ±453	106
5B3 ^a 10 µg/mL + TSH	13025 ±3292	17706 ¹	136
5B3 ^a 100 µg/mL + TSH	14245 ±1024	18041 ±4561	127
5C9 0.01 µg/mL + TSH	14066 ±2291	21213 ±3443	151
5C9 0.1 µg/mL + TSH	4462 ±363	7320 ±1614	164
5C9 1.0 µg/mL + TSH	657 ±257	1513 ±835	230
5C9 10 µg/mL + TSH	541 ±224	1301 ±911	240
5C9 100 µg/mL + TSH	286 ±184	288 ±87	101
仅 5C9 100 µg/mL	208 ±15	314 ±69	151

[0586] 参见表 20a 的说明性脚注。

[0587] 表 21

[0588] TSHR 突变（相对于野生型）在 TSHR 转染的 CHO 细胞中对以下方面的效应的总结：
5C9IgG 和 9D33IgG 阻断 TSH 对环 AMP 产生的刺激的能力

[0589]

TSHR 突变	pTSH 对环 AMP 产生的刺激（ 相对于野生型）	5C9IgG 对于 TSH 对 环 AMP 产生的刺激的 阻断（相对于 野生型）	9D33IgG 对于 TSH 对 环 AMP 产生的刺激的 阻断（相对于 野生型）
野生型	+++++	+++++	+++++
Asp 43Ala	+++	+++++	+++++
Lys 58Ala	+++++	+++++	0

Ile 60Ala	+++++	+++++	+++++
Glu 61Ala	++++	+++++	+++++
Arg 80Ala	+++++	+++++	0
Tyr 82Ala	+++++	+++++	0
Thr 104Ala	+++++	+++++	NT
His 105Ala	+++++	+++++	NT
Glu 107Ala	+++	+++++	+++++
Arg 109Ala	+++++	+++++	0
Lys 129Ala	+++++	0	0
Phe 130Ala	+++++	+++	+++++
Phe 134Ala	+++++	+++++	++
Asp 151Ala	+++++	++++	NT
Glu 178Ala	++++	+++	++++
Lys 183Ala	+++++	+	+++++
Tyr 185Ala	++++	+++++	+++++
Asp 203Ala	++++	0	+++++
Tyr 206Ala	++++	+++	+++++
Lys 209Ala	++++	++++++	+++++
Asp 232Ala	+++	+++++	+++++
Gln 235Ala	+++++	+++++	+++++

[0590]

Lys 250Ala	+++++	++++	++++
Glu 251Ala	+++++	+++	+++++
Arg 255Ala	+++++	+++++	+++++

Thr 257Ala	+++++	+++++	+++++
Trp 258Ala	+++++	+++++	+++++
Arg 274Ala	+++++	++++++	++++++
Asp 276Ala	+++++	++++	+++++
Ser 281Ala	++++	+++++	++++
Arg 80Asp	++++	+++++	0
Asp 151Arg	+++++	+++++	NT
Lys 183Asp	+++	+	+++++
Arg 255Asp	+++++	+++++	++++++
Asp 160Lys	0	+++++ ^a	NT

[0591] 所使用的 pTSH 浓度 = 3ng/mL。

[0592] TSHR 突变的相对效应表示为使用野生型所观察到的百分数,如下:-+++++ = 100%的野生型活性;++++ = < 100-80%的野生型活性;+++ = < 80-60%的野生型活性;++ = < 60-40%的野生型活性;+ = < 40-20%的野生型活性;0 = < 20%的野生型活性,以及相对于野生型的升高活性:> 100% = ++++++。NT = 未试验。

[0593] ^a 由于对 TSH 无应答,使用 M22 测验该实验中对环 AMP 的刺激(详见正文)。

[0594] 表 22

[0595] TSHR Asp203Ala 突变对以下方面的效应:具有拮抗剂活性的患者血清 TSHR 自身抗体(B2-B5)阻断由 TSH 对环 AMP 产生的刺激的能力

[0596]

试验样品和血清稀释度 ^a	野生型 TSHR 环 AMP 浓度 fmol/ 细胞孔。平均值 ± SD ;n = 3	野生型 TSHR 对 TSH 刺激的环 AMP 水平的抑制% ^b	TSHR Asp203Ala 环 AMP 浓度 fmol/ 细胞孔。平均值 ± SD ;n = 3	TSHR Asp203Ala 对 TSH 刺激的环 AMP 水平的抑制% ^b
环 AMP 测定缓冲液	242 ± 130		292 ± 89	
TSH ^c	9357 ± 1155		7591 ± 832	
TSH ^c +1 μg/mL 5C9	1110 ± 811	92	9400 ¹	4
HBD 混合物 /10	183 ± 67		496 ± 76	

TSH ^c +HBD pool/10	13303±1819	0	9756 ¹	0
B2/10	110±36		270±72	
TSH ^c +B2/10	454±381	97	1963±357	80
B3/10	329 ¹		582±74	
TSH ^c +B3/10	3407±1341	74	4027±278	59
B4/10	59±22		161±36	
TSH ^c +B4/10	278±73	98	150±41	98
B5/10	647±170		1064±228	
TSH ^c +B5/10	4173±515	69	6871±618	30

[0597] ^a 稀释于环 AMP 测定缓冲液中。

[0598] ^b 对 TSH 诱导的环 AMP 刺激的抑制%

[0599]

$$100 \times \left[1 - \frac{\text{存在试验样品/10和TSH (3 ng/mL) 的情况下产生的环AMP}}{\text{存在/10 HBD混合物和TSH (3 ng/mL) 的情况下产生的环AMP}} \right]$$

[0600] ¹ 双份样品的平均值

[0601] ^cpTSH 以 3ng/mL 的终浓度使用。

[0602] HBD 混合物 = 健康捐血者血清的混合物。

序列表

<110>RSR 有限公司

<120> 用作拮抗剂的抗促甲状腺激素受体的人单克隆抗体

<130>P108503PCT

<150>GB 0702990.3

<151>2007-02-15

<150>GB 0714036.1

<151>2007-07-18

<160>11

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>5

<212>PRT

<213> 人

<400>1

Ser Asn Tyr Met Ser

1 5

<210>2

<211>16

<212>PRT

<213> 人

<400>2

Val Thr Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210>3

<211>18

<212>PRT

<213> 人

<400>3

Gly Gly Arg Tyr Cys Ser Ser Ile Ser Cys Tyr Ala Arg Ser Gly Cys

1 5 10 15

Asp Tyr

<210>4

<211>11

<212>PRT

<213> 人

<400>4

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210>5

<211>7

<212>PRT

<213> 人

<400>5

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210>6

<211>10

<212>PRT

<213> 人

<400>6

Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Ser Thr Thr

1 5 10

<210>7

<211>699

<212>DNA

<213> 人

<400>7

gaagtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ctgatccagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctgggtt caccgtcagt agcaactaca tgagctgggt ccgccaggct	120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagtt acttatagcg gtggtagcac atcctacgca	180
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctt	240
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag aggggggcga	300
tattgtagta gtataagctg ctacgcgagg agcgggtgtg actactgggg ccagggaacc	360
ctggtcaccg tctctcagc ctccaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc	420
tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggccaagga ctacttcccc	480
gaaccggtga cgggtgctgt gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc	540
gctgtcctac agtctcagc actctactcc ctccagcagc tggtgaccgt gccctccagc	600
agcttgggca cccagacctc catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg	660
gacaagagag ttgagcccaa atcttgtgac aaaactagt	699

<210>8

<211>617

<212>DNA

<213> 人

<400>8

gccatccaga tgaccagtc tcttctctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc aactatttaa attggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagtt cccctccac cacttttggc	300
caggggacca agctggagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg	360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc	420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cccccaatc gggtaactcc	480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg	540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag	600
ggcctgagct cgcccg	617

<210>9

<211>233

<212>PRT

<213> 人

<400>9

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn

20	25	30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ser Val Thr Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys		
50	55	60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu		
65	70	75
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
85	90	95
Arg Gly Gly Arg Tyr Cys Ser Ser Ile Ser Cys Tyr Ala Arg Ser Gly		
100	105	110
Cys Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser		
115	120	125
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr		
130	135	140
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro		
145	150	155
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val		
165	170	175
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser		
180	185	190
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile		
195	200	205
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val		
210	215	220
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr Ser		
225	230	

<210>10

<211>205

<212>PRT

<213>人

<400>10

Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35	40	45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Ser		
85	90	95
Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala		
100	105	110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser		
115	120	125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu		
130	135	140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser		
145	150	155
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu		
165	170	175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val		
180	185	190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro		
195	200	205

<210>11

<211>764

<212>PRT

<213>人

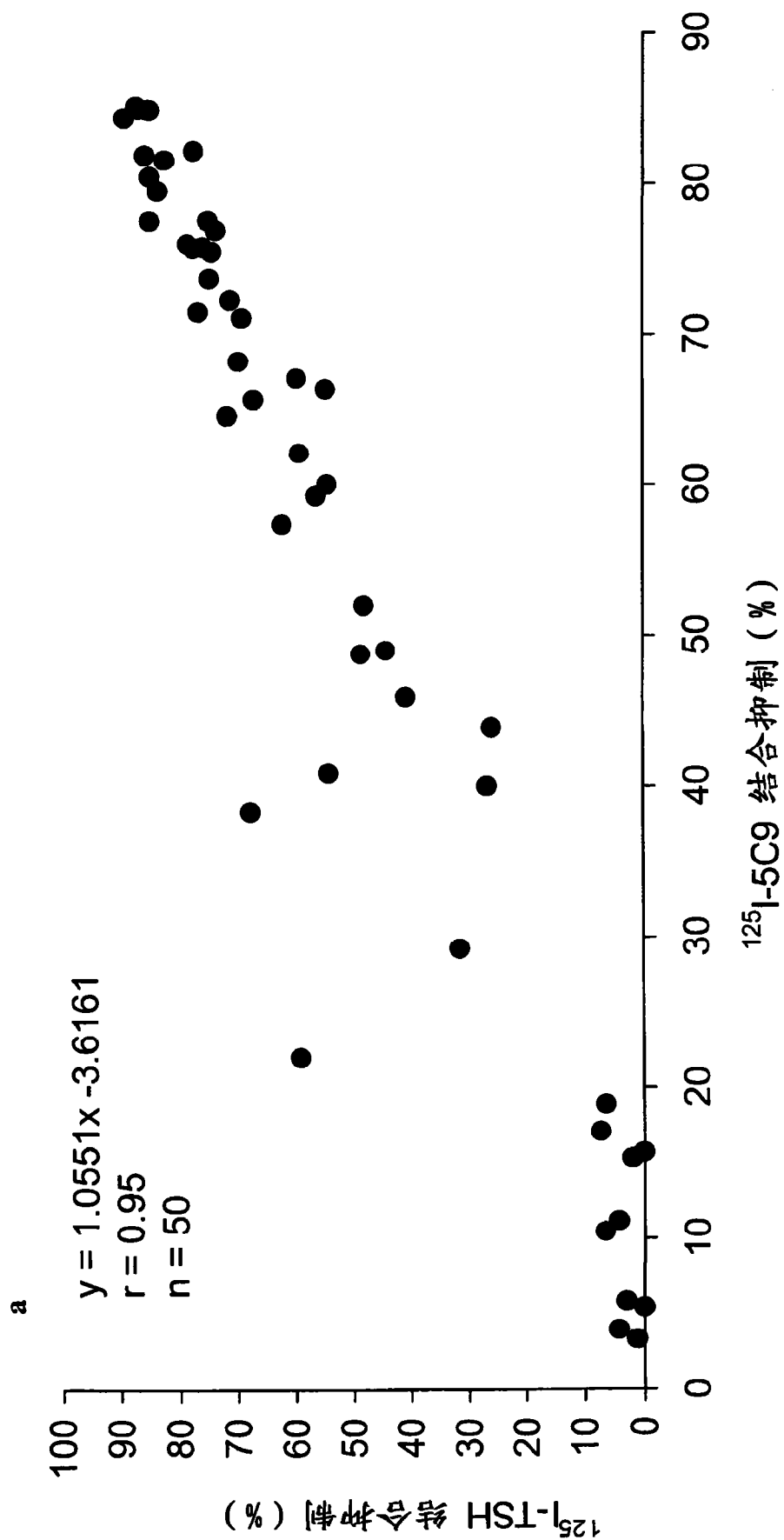
<400>11

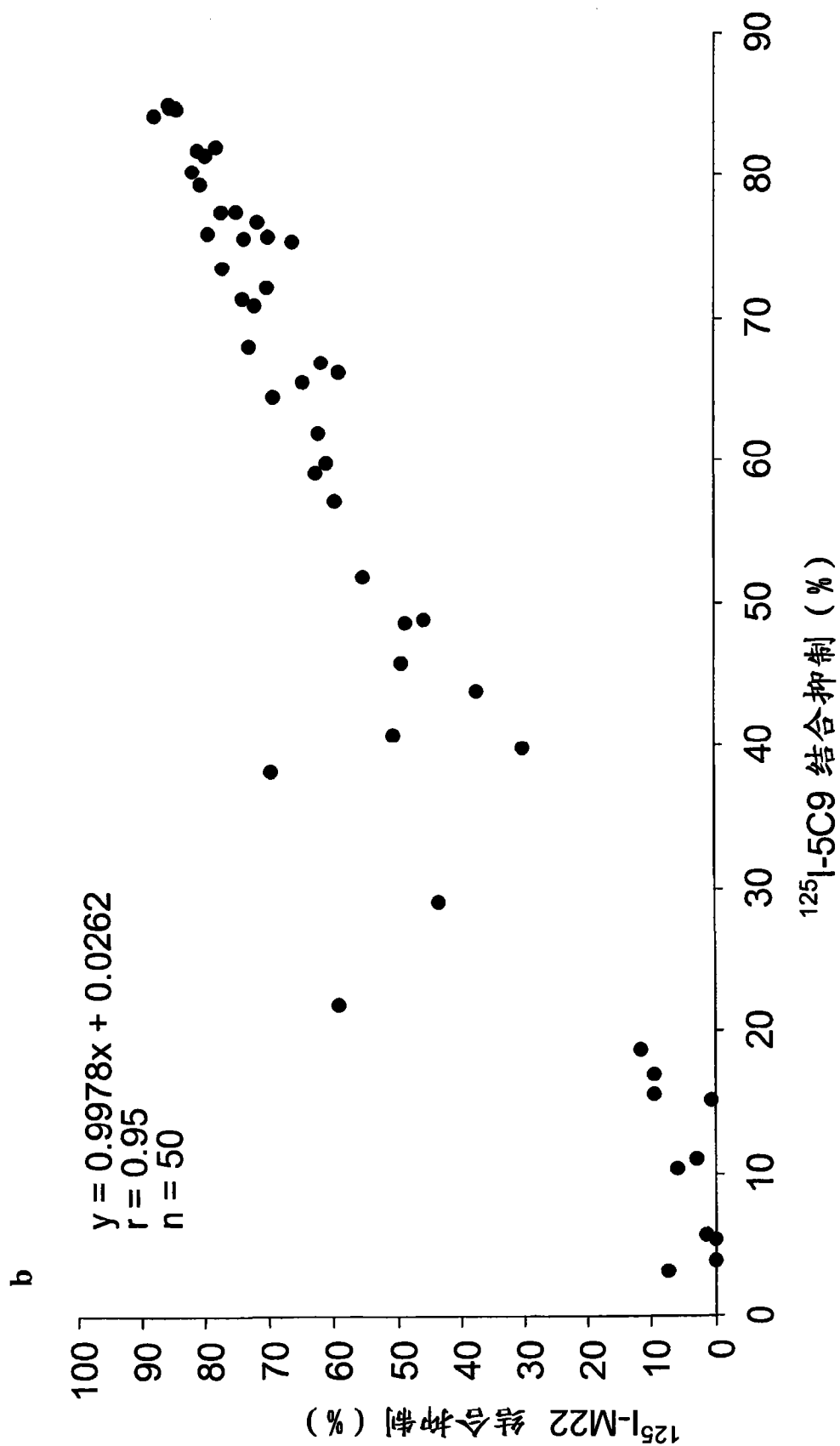
Met Arg Pro Ala Asp Leu Leu Gln Leu Val Leu Leu Leu Asp Leu Pro
1 5 10 15
Arg Asp Leu Gly Gly Met Gly Cys Ser Ser Pro Pro Cys Glu Cys His
20 25 30
Gln Glu Glu Asp Phe Arg Val Thr Cys Lys Asp Ile Gln Arg Ile Pro
35 40 45
Ser Leu Pro Pro Ser Thr Gln Thr Leu Lys Leu Ile Glu Thr His Leu
50 55 60
Arg Thr 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	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		
3853					90					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	
Val Phe Val Leu Leu Ile Leu Leu Thr Ser His Tyr Lys Leu Asn Val			
435	440	445	
Pro Arg Phe Leu Met Cys Asn Leu Ala Phe Ala Asp Phe Cys Met Gly			
450	455	460	
Met Tyr Leu Leu Leu Ile Ala Ser Val Asp Leu Tyr Thr His Ser Glu			
465	470	475	480
Tyr Tyr Asn His Ala Ile Asp Trp Gln Thr Gly Pro Gly Cys Asn Thr			
485	490	495	
Ala Gly Phe Phe Thr Val Phe Ala Ser Glu Leu Ser Val Tyr Thr Leu			
500	505	510	
Thr Val Ile Thr Leu Glu Arg Trp Tyr Ala Ile Thr Phe Ala Met Arg			
515	520	525	
Leu Asp Arg Lys Ile Arg Leu Arg His Ala Cys Ala Ile Met Val Gly			
530	535	540	
Gly Trp Val Cys Cys Phe Leu Leu Ala Leu Leu Pro Leu Val Gly Ile			
545	550	555	560
Ser Ser Tyr Ala Lys Val Ser Ile Cys Leu Pro Met Asp Thr Glu Thr			
565	570	575	
Pro Leu Ala Leu Ala Tyr Ile Val Phe Val Leu Thr Leu Asn Ile Val			
580	585	590	
Ala Phe Val Ile Val Cys Cys Cys Tyr Val Lys Ile Tyr Ile Thr Val			
595	600	605	
Arg Asn Pro Gln Tyr Asn Pro Gly Asp Lys Asp Thr Lys Ile Ala Lys			
610	615	620	
Arg Met Ala Val Leu Ile Phe Thr Asp Phe Ile Cys Met Ala Pro Ile			
625	630	635	640
Ser Phe Tyr Ala Leu Ser Ala Ile Leu Asn Lys Pro Leu Ile Thr Val			
645	650	655	
Ser Asn Ser Lys Ile Leu Leu Val Leu Phe Tyr Pro Leu Asn Ser Cys			
660	665	670	
Ala Asn Pro Phe Leu Tyr Ala Ile Phe Thr Lys Ala Phe Gln Arg Asp			
675	680	685	
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 Asp 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		





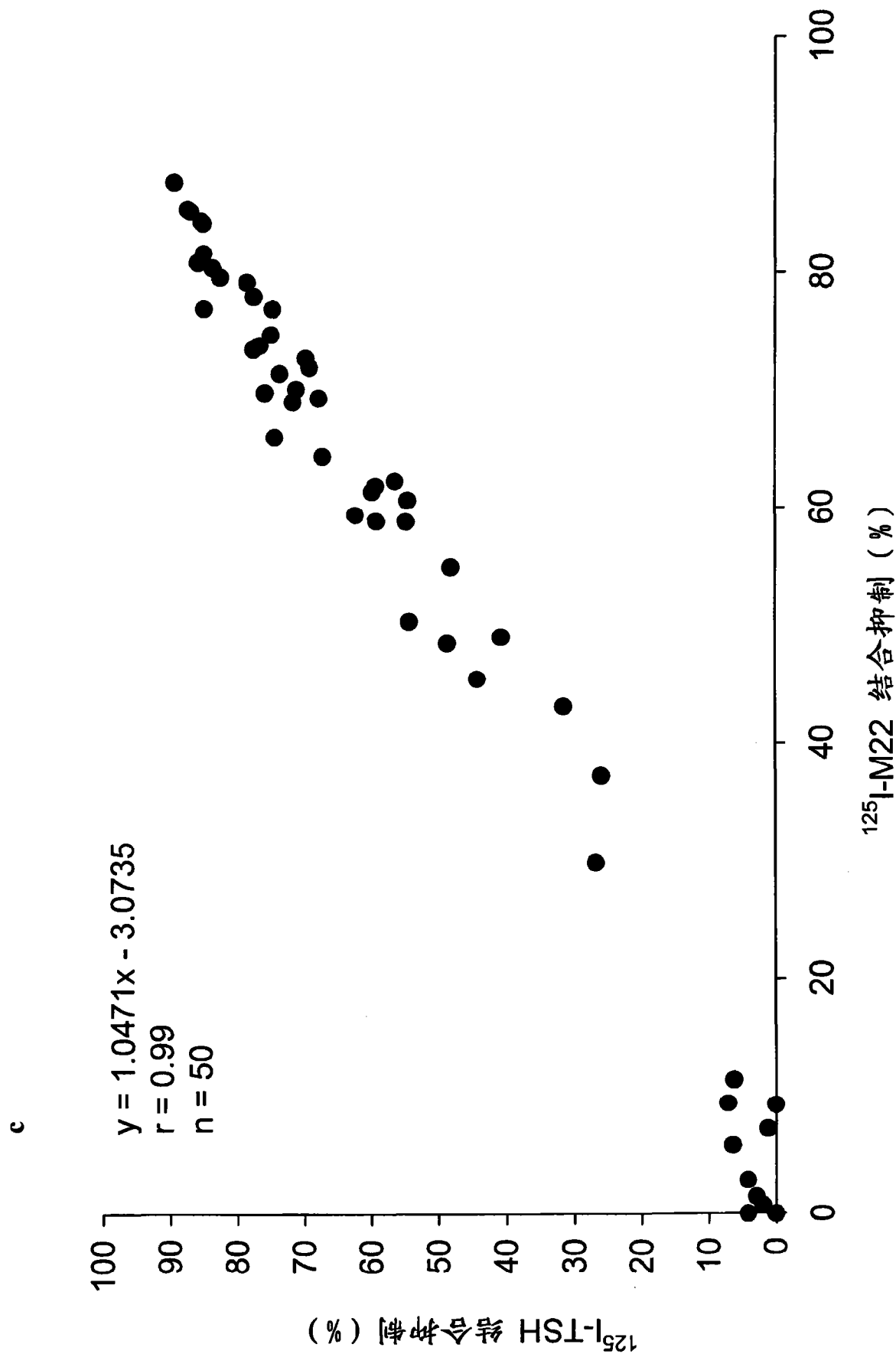


图 1

a

gaagtgcagctggtggagtctggaggaggcctgatccagcctgggggggtc
 cctgagactctcctgtgcagcctctgggttcaccgtcagtagcaactaca
 tgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctcagtt
 acttatagcgggtggtagcacatcctacgcagactccgtgaagggccgatt
 caccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatcttcaaatgaaca
 gcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagagggggggcga
 tattgtagtagtataagctgctacgcgaggagcgggtgtgactactgggg
 ccagggaaccctgggtcacctctcctcagcctccaccaagggcccatcgg
 tcttccccctggcacctctcctccaagagcacctctgggggcacagcggcc
 ctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgtcgtg
 gaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctac
 agtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagc
 agcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaa
 caccaagggtggacaagagagttgagcccaaactcttgtgacaaaactagt

PCR 引物

<u>gaagtgcagctggtggagtctggaggaggcctgatccagcctgggggggtc</u>	50
cctgagactctcctgtgcagcctctgggttcaccgtcagtagcaactaca	100
<u>tgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctcagtt</u>	150
acttatagcgggtggtagcacatcctacgcagactccgtgaagggccgatt	200
caccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatcttcaaatgaaca	250
gcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagagggggggcga	300
tattgtagtagtataagctgctacgcgaggagcgggtgtgactactgggg	350
ccagggaaccctgggtcacctctcctcagcctccaccaagggcccatcgg	400
tcttccccctggcacctctcctccaagagcacctctgggggcacagcggcc	450
ctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgtcgtg	500
gaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctac	550
agtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagc	600
agcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaa	650
caccaagggtggacaagagagttgagcccaaactcttgtgacaaaactagt	699

CDR 1

CDR 2

CDR 3

恒定区

b

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWVSV
 TYSGGSTSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGR
 YCSSISCYARSGCDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
 LGCLVKDYFPEPVTFSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
 SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTS

PCR 引物	CDR 1	CDR 2	
EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVS	SNYMS	WVRQAPGKGLEWVSV	50
TYSGGSTSYADSVKGR		FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	100
	恒定区		
YCSSISCYARSGCDY	WGQGLTVTVSS	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA	150
LGCLVKDYFPEPVTFSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS			200
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTS			233

图 2

a

gccatccagatgacccagtcctccttcctccctgtctgcatctgtaggaga
 cagagtcaccatcacttgccgggcaagtcagagcattagcaactatttaa
 attggtatcagcagaaaccagggaaagcccctaagctcctgatctatgct
 gcatccagtttgcaaagtgggggtcccatcaagggttcagtggcagtggtac
 tgggacagatttcactctcaccatcagcagtcctgcaacctgaagattttg
 caacttactactgtcaacagagttacagttccccctccaccacttttggc
 caggggaccaagctggagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtctt
 catcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttg
 tgtgcctgctgaataactttctatcccagagaggccaaagtacagtggag
 gtggataaacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgctcacagagca
 ggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccttgacgctgagca
 aagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcag
 ggctgagctcgcccg

PCR 引物

gccatccagatgacccagtcctccttcctccctgtctgcatctgtaggaga	50
cagagtcaccatcacttgccgggcaagtcagagcattagcaactatttaa	100
atggtatcagcagaaaccagggaaagcccctaagctcctgatctatgct	150
gcatccagtttgcaaagtgggggtcccatcaagggttcagtggcagtggtac	200
tgggacagatttcactctcaccatcagcagtcctgcaacctgaagattttg	250
caacttactactgtcaacagagttacagttccccctccaccacttttggc	300
caggggaccaagctggagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtctt	350
catcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttg	400
tgtgcctgctgaataactttctatcccagagaggccaaagtacagtggag	450
gtggataaacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgctcacagagca	500
ggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccttgacgctgagca	550
aagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcag	600
ggctgagctcgcccg	617

b

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI
 SNYLNWYQOKPGKAPKLLIYA
 ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQSYSSPSTTFG
 QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
 GLSSP

PCR 引物	CDR 1	CDR 2	
AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQSI	SNYLNWYQOKPGKAPKLLIYA	50
ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYC	CDR 3	QSYSSPSTTFG	100
恒定区			
QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK			150
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ			200
GLSSP			205

图 3

1	MRPADLLQLV	LLLDLPRDLG	GMGCSSPPCE	CHQEEDFRVT	CKDIQRIPSL	PPSTQTLKLI	60
61	ETHLRTIPSH	AFSNLPNISR	IYVSIDVTLQ	QLESHSFYNL	SKVTHIEIRN	TRNLTYIDPD	120
121	ALKELPLLKF	LGIFNTGLKM	FPDLTKVYST	DIFFILEITD	NPYMTSIPVN	AFQGLCNETL	180
181	TLKLYNNGFT	SVQGYAFNGT	KLDAVYLNKN	KYLTVIDKDA	FGGVYSGPSL	LDVSQTSVTA	240
241	LPSKGLEHLK	ELIARNTWTL	KKLPLSLSFL	HLTRADLSYP	SHCCAFKNQK	KIRGILESML	300
301	CNESSMQSLR	QRKSVNALNS	PLHQEYEENL	GDSIVGYKEK	SKFQDTHNNA	HYVVFEEQE	360
361	DEIIGFGQEL	KNPQEETLQA	FDSHYDYTIC	GDSEDMVCTP	KSDEFNPCED	IMGYKFLRIV	420
421	VWFSVLLALL	GNVFVLLILL	TSHYKLNVP	FLMCNLAFAD	FCMGMYLLLI	ASVDLYTHSE	480
481	YYNHAIDWQT	GPGCNTAGFF	TVFASELSVY	TLTVITLERW	YAITFAMRLD	RKIRLRHACA	540
541	IMVGGWVCCF	LLALLPLVGI	SSYAKVSICL	PMDTETPLAL	AYIVFVLTIN	IVAFVIVCCC	600
601	YVKIYITVRN	PQYNPGDKDT	KIAKRMAVLI	FTDFICMAPI	SFYALSAILN	KPLITVSNK	660
661	ILLVLFYPLN	SCANPFLYAI	FTKAFQRDVF	ILLSKFGICK	RQAQAYRGQR	VPPKNSTDIQ	720
721	VQKVTHDMRQ	GLHNMEDVYE	LIENSHLTPK	KQGQISEEYM	QTVL		764

图 4