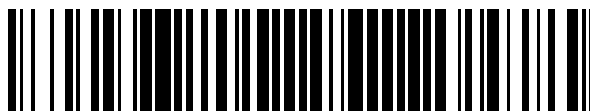


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 217**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 5/08** (2006.01)

**C12N 15/13** (2006.01)

**C12N 5/24** (2006.01)

**C12N 5/28** (2006.01)

**G01N 33/564** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2008 E 08709409 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 2121758**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales humanos para el receptor de tirotropina que actúan como antagonistas**

30 Prioridad:

**15.02.2007 US 901332 P**

**15.02.2007 GB 0702990**

**18.07.2007 GB 0714036**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.11.2014**

73 Titular/es:

**R S R LIMITED (100.0%)  
Avenue Park, Pentwyn  
Cardiff CF23 8HE , GB**

72 Inventor/es:

**REES SMITH, BERNARD;  
FURMANIAK, JADWIGA y  
SANDERS, JANE**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 523 217 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales humanos para el receptor de tirotrópina que actúan como antagonistas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos que son reactivos con el receptor de tirotrópina (TSH) (TSHR) y, en particular, aunque no exclusivamente, a anticuerpos que se unen con el TSHR y que pueden bloquear la estimulación del TSHR por anticuerpos estimulantes de TSH o TSHR.

10

**Antecedentes**

La tirotrópina, u hormona estimulante del tiroides (TSH), es una hormona de la hipófisis que regula la función tiroidea mediante el TSHR (Szkudlinski MW, Fremont V, Ronin C, Weintraub BD 2002 Thyroid-stimulating hormone and TSHR structure function relationships. *Physiological Reviews* 82: 473-502). El TSHR es un receptor acoplado a proteína G y está compuesto de tres dominios: un dominio rico en leucina (LRD), un dominio de escisión (CD) y un dominio transmembrana (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). La unión de TSH con el TSHR desencadena la señalización del receptor que conduce a la estimulación de la formación y liberación de hormonas tiroideas; tiroxina (T4) y triyodotironina (T3). Un mecanismo de retroalimentación negativa que implica los niveles T4 y T3 en la circulación controla la liberación de TSH de la hipófisis (y hormona liberadora de tirotrópina secretada por el hipotálamo) que a su vez controla la estimulación del tiroides y los niveles de hormonas tiroideas en el suero.

15

20

25

30

35

Está bien documentado en la técnica que algunos pacientes con enfermedad de tiroides autoinmunitaria (AITD) tienen autoanticuerpos reactivos con TSHR (Rees Smith B, McLachlan SM, Furmaniak J 1988 Autoantibodies to the thyrotropin receptor. *Endocrine Reviews* 9: 106-121). En la mayoría de los casos, estos anticuerpos se unen con el TSHR e imitan las acciones de la TSH estimulando de este modo al tiroides para que produzca altos niveles de T4 y T3. Estos autoanticuerpos se describen como autoanticuerpos estimulantes del tiroides o autoanticuerpos de TSHR (TRAb) con actividad estimulante o actividad agonista de TSH. El mecanismo de retroalimentación fisiológica de control de la función tiroidea mencionado anteriormente no es eficaz en presencia de dichos anticuerpos estimulantes del tiroides y pacientes presentes con síntomas de hiperactividad tiroidea o tirotoxicosis (exceso de hormonas tiroideas en el suero). Esta afección se conoce como enfermedad de Graves. En algunos pacientes se cree que los TRAb con actividad estimulante son responsables de la interacción con TSHR en tejidos retro-orbitales y que contribuyen a las señales oculares de la enfermedad de Graves. Se ha descrito con detalle un autoanticuerpo monoclonal humano que actúa como un potente estimulante del tiroides (hMAb TSHR1) en la Solicitud de Patente WO2004/050708A2.

40

45

50

A diferencia de algunos pacientes con AITD, los autoanticuerpos se unen con el TSHR, impiden que la TSH se una con el receptor pero no tienen la capacidad de estimular al TSHR. Estos tipos de autoanticuerpos se conocen como TRAb con actividad de bloqueo o actividad antagonista de TSH, y los pacientes que tienen TRAb de bloqueo en su suero pueden presentar síntomas de un tiroides hipofuncionante (hipotiroidismo) (Rees Smith B, McLachlan SM, Furmaniak J 1988 Autoantibodies to the thyrotropin receptor. *Endocrine Reviews* 9: 106-121). En particular, los TRAb con actividad de bloqueo cuando están presentes en el suero de mujeres embarazadas cruzan la placenta y pueden bloquear los TSHR de tiroides fetal conduciendo a hipotiroidismo neonatal y consecuencias graves para el desarrollo. Además, pueden encontrarse TRAb con actividad de bloqueo en la leche materna de madres afectadas y esto puede contribuir además al hipotiroidismo clínico en el bebé. Hasta la fecha no han estado disponibles autoanticuerpos monoclonales humanos para el TSHR con actividad antagonista de TSH. En consecuencia, los estudios detallados de cómo este tipo de autoanticuerpos interacciona con el TSHR, y cómo sus interacciones con el TSHR se comparan con las de tipo estimulante de autoanticuerpos (tales como M22) y con TSH, han estado limitados.

55

La gonadotropina coriónica humana es una hormona producida durante el embarazo que tiene efectos estimulantes del tiroides leves.

60

65

La caracterización de las propiedades de TRAb con actividades de estimulación o bloqueo es de importancia crítica en estudios que se dirigen a mejorar el diagnóstico y control de enfermedades asociadas con una respuesta autoinmunitaria al TSHR. La invención descrita en la Solicitud de Patente WO2004/050708A2 proporciona detalles acerca de las propiedades de un autoanticuerpo monoclonal humano con actividad estimulante potente y su interacción con el TSHR. Además la Solicitud de Patente WO2006/016121A desvela una preparación de TSHR mutado que incluye al menos una mutación puntual que puede usarse en la exploración e identificación diferencial de autoanticuerpos de TSHR estimulantes en suero de pacientes, autoanticuerpos de TSHR de bloqueo en suero de pacientes y TSH en una muestra de fluido corporal de un paciente que se explora. La Solicitud de Patente WO2004/050708A2 también describe un anticuerpo monoclonal de ratón (9D33) con actividad de bloqueo de TSHR. 9D33 se une con el TSHR con alta afinidad ( $2 \times 10^{10}$  l/mol) y es un antagonista eficaz de TSH, hMAb TSHR1 (M22) y TRAb en suero de pacientes con actividades de estimulación o de bloqueo (Solicitud de Patente WO2004/050708A2

y 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). Aunque el anticuerpo monoclonal de ratón 9D33 muestra al menos algunas de las características de los TRAb de suero de pacientes con actividad de bloqueo, es un anticuerpo de ratón generado por inmunización de un animal experimental con el TSHR y como tal puede no ser verdaderamente representativo de autoanticuerpos de TSHR generados en el proceso de una respuesta autoinmunitaria al TSHR en seres humanos. Como un anticuerpo monoclonal de ratón sería necesario humanizar 9D33 para aplicaciones *in vivo* en seres humanos. Esto puede ser desventajoso a la vista del gasto y la complicación implicados en el proceso de humanización.

Los efectos de una serie de mutaciones en el dominio rico en leucina de TSHR sobre la capacidad de los anticuerpos monoclonales estimulantes del tiroides y la TSH para unirse con el receptor y estimular la producción de AMP cíclico en células CHO transfectadas con TSHR se conocen de Jane Sanders Jane Bolton, Paul Sanders, Jennifer Jeffreys, Nobuhiro Nakatake, Tonya Richards, Michele Evans, Angela Kiddie, Sara Summerhayes, Emma Roberts, Ricardo Nunez Miguel, Jadwiga Furmaniak y Bernard Rees Smith 2006 Effects of TSH Receptor Mutations on Binding and Biological Activity of Monoclonal Antibodies and TSH. *Thyroid* 16: 1195-1206.

La presente invención resulta de la producción y propiedades de un autoanticuerpo monoclonal humano (5C9) para el TSHR que es un antagonista eficaz de TSH y de TRAb estimulantes en sueros de pacientes. Se ha aislado 5C9 de los linfocitos periféricos de un paciente con hipotiroidismo y altos niveles de autoanticuerpos de TSHR. Los linfocitos se inmortalizaron por infección con virus de Epstein Barr (EBV) y clones positivos fusionados con una línea celular de ratón/humana para generar un clon estable. Se purificó IgG de sobrenadantes de cultivos de clones y se evaluó la capacidad del IgG 5C9 para unirse con el TSHR e influir en la actividad del TSHR. En particular, se estudió la capacidad de 5C9 para inhibir la unión de TSH con el TSHR, y para inhibir la actividad estimulante de AMP cíclico de TSH. Además, también se evaluó la capacidad de 5C9 para inhibir la unión de TRAb del suero de pacientes estimulantes o de bloqueo con el TSHR y para inhibir su actividad biológica. Además, se investigó el uso de 5C9 en ensayos para anticuerpos de TSHR, TSH y compuestos relacionados. Se secuenciaron genes de región variable (región V) de las cadenas pesada (HC) y ligera (LC) de 5C9 y se asignaron las regiones determinantes de complementariedad (CDR).

### Sumario de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona un anticuerpo monoclonal humano aislado para el Receptor de la Hormona Estimulante del Tiroides (TSHR) que es un antagonista de la Hormona Estimulante del Tiroides (TSHR) y tiene una afinidad de unión por el TSHR humano de longitud completa de  $10^9$  l/mol, en el que el anticuerpo comprende una región  $V_H$  que comprende: SNYMS (CDR1); VTYSGGSTSYADSVKKG (CDR2); y GGRYCSSISCYARSGCDY (CDR3), y una región  $V_L$  que comprende: RASQISNYLN (CDR1); AASSLQS (CDR2); y QQSYSSPSTT (CDR3).

Un anticuerpo de acuerdo con la invención puede comprender adicionalmente la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9, o una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 7 y la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10, o una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 8.

Un anticuerpo de acuerdo con la invención puede tener una afinidad de unión por el TSHR de longitud completa humano de aproximadamente  $10^9$  l/mol. Preferentemente, un anticuerpo de acuerdo con la invención tiene una afinidad de unión por el TSHR de longitud completa humano de aproximadamente  $10^9$  l/mol.

La invención ayuda al experto destinatario a entender los mecanismos inmunológicos que conducen el desarrollo y producción de autoanticuerpos de TSHR de estimulación y bloqueo. Adicionalmente, la invención ayuda al destinatario experto a entender las diferencias moleculares entre los autoanticuerpos de TSHR con actividad estimulante del tiroides y con actividad de bloqueo. Además, el método de tratamiento médico y composiciones farmacéuticas de la invención proporcionan nuevos tratamientos para afecciones relacionadas con el tiroides.

Un anticuerpo preferido de acuerdo con la invención es 5C9. Se ha descubierto que 5C9 inhibe inesperadamente la actividad constitutiva del receptor de hormonas estimulantes del tiroides, es decir la producción de AMP cíclico en un sistema de ensayo en ausencia de hormona estimulante del tiroides o M22. Esto puede ser particularmente ventajoso en el planteamiento de células cancerosas de tiroides que permanecen en el tiroides, o en metástasis, especialmente en la prevención o el retardo del crecimiento ya que las células crecerán más rápidamente como consecuencia de la actividad constitutiva del receptor de la hormona estimulante del tiroides.

El término "anticuerpo" y términos afines, tales como "anticuerpos", usados en el presente documento abarca según el contexto restos de unión basados en inmunoglobulinas tales como anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos multispecíficos y también restos de unión, con los que el destinatario experto puede sustituir dichos restos de unión basados en inmunoglobulina, tales como anticuerpos de dominio, diacuerpos, IgG $\Delta$ C<sub>H2</sub>, F(ab')<sub>2</sub>, Fab, scFv, V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>, dsFv, Minicuerpo, Triacuerpo, Tetracuerpo, (scFv)<sub>2</sub>, scFv-Fc,

F(ab')<sub>3</sub> (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).

5 El término "TSHR" se refiere a receptores de la hormona estimulante del tiroides humano de longitud completa que tienen la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 4 o variantes o fragmentos de los mismos que tienen alta homología con receptores de la hormona estimulante del tiroides. Preferentemente, dichas variantes y fragmentos tienen del 70 al 99,9 % de homología con la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 4.

10 De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporciona un nucleótido que comprende:

a) una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

15 De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporciona un vector que comprende un nucleótido de acuerdo con el aspecto anterior de la invención.

El vector puede ser un plásmido, virus o fragmento del mismo. Se conocen muchos tipos de vectores diferentes por el destinatario experto.

20 De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporciona una célula aislada que incluye un anticuerpo; nucleótidos y/o vector de acuerdo con la invención. La célula aislada puede expresar un anticuerpo de acuerdo con la invención. Preferentemente, la célula aislada secreta un anticuerpo de acuerdo con la invención. Preferentemente, una célula aislada de acuerdo con la invención es de una línea celular de hetero-hibridoma estable.

25 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona una composición que comprende una concentración definida de autoanticuerpos de TSHR e incluyendo un anticuerpo de acuerdo con la invención. Dicha composición puede comprender una concentración definida de autoanticuerpos de TSHR con actividad antagonista de TSH, e incluye un anticuerpo de acuerdo con la invención.

30 Como alternativa, una composición de acuerdo con este aspecto de la invención puede comprender una concentración definida de autoanticuerpos de TSHR que son antagonistas de anticuerpos estimulantes del tiroides, e incluye un anticuerpo de acuerdo con la invención. Una composición puede comprender una concentración definida de autoanticuerpos del TSHR con actividad antagonista de TSH y que son antagonistas de anticuerpos estimulantes del tiroides, e incluye un anticuerpo de acuerdo con la invención.

35 De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporciona una composición farmacéutica para su administración en un sujeto mamífero para su uso en el tratamiento de una afección relacionada con el tiroides que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La afección relacionada con el tiroides puede seleccionarse de hiperactividad tiroidea, enfermedad ocular de Graves, hipertiroidismo neonatal, hipertiroidismo inducido por gonadotropina coriónica humana, mixoedema pre-tibial, cáncer de tiroides y tiroiditis.

40 Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede ser adecuada para administración humana. Preferentemente una composición farmacéutica de acuerdo con la invención no tiene ningún efecto adverso significativo en el sistema inmunitario del sujeto.

45 Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede incluir un antagonista del receptor de la hormona estimulante del tiroides adicional. Un antagonista del receptor de la hormona estimulante del tiroides adicional adecuado es 9D33 como se desvela en el documento WO2004/050708.

50 Se contemplan diversos formatos para composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención. Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de una afección relacionada con el tiroides puede ser en un formato inyectable. Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de mixoedema pre-tibial está preferentemente en un formato tópico. Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de enfermedad ocular de Graves está preferentemente en forma de colirio.

55 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenderán cualquier anticuerpo de acuerdo con la invención de la presente invención, con cualquier transportador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. Los transportadores, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero sin limitación, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas del suero, tales como albúmina de suero humano, sustancias tamponantes tales como fosfatos, glicina, ácido ascórbico, sorbato potásico, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, fosfatos de hidrógeno disódico, fosfato de hidrógeno potásico, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilatos, ceras,

polímeros en bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y lanolina.

5 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse por vía oral, por vía parenteral, por pulverización de inhalación, por vía tópica, por colirios, por vía rectal, por vía nasal, por vía bucal, por vía vaginal o mediante un depósito implantado. Los inventores prefieren la administración oral o administración por inyección. El término "parenteral" como se usa en el presente documento incluye técnicas de inyección o infusión subcutáneas, intracutáneas, intravenosas, intramusculares, intraarticulares, intrasinoviales, intraesternales, intratecales, intralesionales e intracraneales.

10 Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una preparación inyectable estéril, por ejemplo, como una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse de acuerdo con técnicas conocidas en este campo usando agentes de dispersión o humectantes adecuados (tales, por ejemplo, Tween 80) y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable  
15 estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están manitol, agua, solución de Ringer y solución de cloruro sódico isotónico. Además, se emplean convencionalmente aceites fijos, estériles como un disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite fijo insípido incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados de glicéridos son útiles en la  
20 preparación de inyectables, como lo son los aceites farmacéuticamente aceptables naturales, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones oleosas también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga tal como Ph. Helv o un alcohol similar.

25 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por vía oral en cualquier forma de dosificación aceptable por vía oral incluyendo, pero sin limitación, cápsulas, comprimidos y suspensiones y soluciones acuosas. En el caso de comprimidos para uso oral, los vehículos que se usan habitualmente incluyen lactosa y almidón de maíz. También se añaden normalmente agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para administración oral en una forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se administran suspensiones acuosas por vía oral, el principio activo se combina con agentes  
30 emulsionantes y de suspensión. Si se desea, pueden añadirse ciertos agentes edulcorantes, saporíferos y/o colorantes.

35 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden administrarse en forma de supositorios para administración rectal. Estas composiciones pueden prepararse mezclando un compuesto de la presente invención con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperatura ambiente pero líquido a temperatura rectal y por lo tanto se fundirá en el recto para liberar los componentes activos. Dichos materiales incluyen, pero sin limitación, manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.

40 La administración tópica de las composiciones farmacéuticas de la presente invención es especialmente útil cuando el tratamiento deseado implica áreas u órganos fácilmente accesibles por aplicación tópica. Para aplicación por vía tópica a la piel, la composición farmacéutica debería formularse con una pomada adecuada que contiene los componentes activos suspendidos o disueltos en un vehículo. Los vehículos para administración tópica de los compuestos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, compuesto de polioxietileno polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Como alternativa, la  
45 composición farmacéutica puede formularse con una loción o crema adecuada que contiene el compuesto activo suspendido o disuelto en un vehículo. Los vehículos adecuados incluyen, pero sin limitación, aceite mineral, sorbitán monoestearato, polisorbato 60, cera de cetil ésteres, alcohol cetárico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden aplicarse por vía tópica al tracto intestinal inferior por formulación de supositorio rectal o en una formulación de enema adecuada. También se  
50 incluyen parches transdérmicos por vía tópica en la presente invención.

55 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por aerosol nasal o inhalación. Dichas composiciones se preparan de acuerdo con técnicas bien conocidas en el campo de la formulación farmacéutica y pueden prepararse como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad, fluorocarburos y/u otros agentes solubilizantes o de dispersión conocidos en la técnica.

60 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un método para producir un anticuerpo de acuerdo con la invención, comprendiendo el método cultivar una o más células aisladas de acuerdo con la dimensión por lo que el anticuerpo se expresa por la célula. Preferentemente, el anticuerpo se secreta por la célula.

65 De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporciona un anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de una afección relacionada con el tiroides. Como alternativa, se proporciona un anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección relacionada con el tiroides.

También se proporciona un anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso en la terapia médica. En particular, se proporciona un anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de una afección relacionada con el tiroides. La afección relacionada con el tiroides puede seleccionarse de la hiperactividad del tiroides, enfermedad ocular de Graves, hipertiroidismo neonatal, hipertiroidismo inducido por gonadotropina coriónica humana, mixoedema pre-tibial, cáncer de tiroides y tiroiditis.

De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporciona un método para caracterizar anticuerpos de TSHR que comprende determinar la unión de un anticuerpo de TSHR que se ensaya con un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos relacionada con TSHR en el que el método implica una etapa de método que incluye el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención. Preferentemente, el método comprende determinar los efectos de un anticuerpo de acuerdo con la invención en la unión de un anticuerpo de TSHR con ese polipéptido. El polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos relacionada con TSHR preferentemente comprende TSHR humano de longitud completa.

De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporciona un método para caracterizar la TSH y moléculas relacionadas, que comprende determinar la unión de la TSH, o una molécula relacionada que se ensaya, con un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos relacionada con TSHR, en el que el método implica una etapa del método que incluye el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención. Los métodos para caracterizar anticuerpos de TSHR o TSH y métodos relacionados descritos anteriormente pueden ser en un formato de ELISA.

De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporciona un método para determinar los aminoácidos de TSHR implicados en la unión de los autoanticuerpos de TSHR que actúan como antagonistas, comprendiendo el método proporcionar un polipéptido que tiene una primera secuencia de aminoácidos relacionada con TSHR con la que se une un anticuerpo de acuerdo con la invención, modificar al menos un aminoácido en la secuencia de aminoácidos relacionada con TSHR y determinar el efecto de dicha modificación en la unión del anticuerpo.

Un método de modificación de un anticuerpo de acuerdo con la invención, comprendiendo el método modificar al menos un aminoácido del anticuerpo y determinar un efecto de dicha modificación en la unión con una secuencia relacionada con TSHR. Preferentemente se seleccionan anticuerpos de TSHR modificados que tienen una afinidad potenciada por el TSHR.

De acuerdo un otro aspecto de la invención se proporciona un método para identificar moléculas que inhiben los anticuerpos estimulantes del tiroides que se unen con el TSHR, comprendiendo el método proporcionar al menos un anticuerpo de acuerdo con la invención como referencia. Preferentemente, se seleccionan moléculas que se ensayan que impiden la unión de los anticuerpos estimulantes del tiroides con el TSHR.

También se proporciona un método para identificar moléculas que inhiben la unión de los anticuerpos de bloqueo del tiroides con el TSHR, comprendiendo el método proporcionar al menos un anticuerpo de acuerdo con la invención como referencia. Preferentemente se seleccionan moléculas que impiden la unión de los anticuerpos que bloquean el tiroides con TSHR.

### Breve descripción de los dibujos

Se describirán ahora anticuerpos y métodos de acuerdo con la invención, solamente como ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos, Figuras 1 a 4, en los que

La Figura 1 es una serie de tres gráficos que ilustra una comparación de los efectos de los sueros de pacientes con enfermedad de Graves ( $n = 40$ ) y donantes de sangre sanos ( $n = 10$ ) en la unión de  $^{125}\text{I}$ - IgG 5C9,  $^{125}\text{I}$ -TSH o  $^{125}\text{I}$ -M22 con tubos recubiertos con TSHR.

a unión de  $^{125}\text{I}$ - IgG 5C9 frente a  $^{125}\text{I}$ -TSH

b unión de  $^{125}\text{I}$ - IgG 5C9 frente a  $^{125}\text{I}$ - IgG M22

c unión de  $^{125}\text{I}$ -TSH frente a  $^{125}\text{I}$ - IgG M22;

la Figura 2 proporciona secuencias de las secuencias de región variable de cadena pesada (HC) de 5C9

a la secuencia oligonucleotídica de HC 5C9 mostrada en formas no anotada y anotada. En las formas anotadas, las secuencias usadas para cebadores de PCR son las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR) individuales están encuadradas; y las regiones constantes están en negrita.

b la secuencia de aminoácidos de HC 5C9 derivada de la secuencia oligonucleotídica mostrada en formas anotada y no anotada;

la Figura 3 proporciona secuencias de las secuencias de región variable de la cadena ligera (LC) 5C9:

a la secuencia oligonucleotídica de LC 5C9 mostrada en formas no anotada y anotada (según la figura 2)

5 b la secuencia de aminoácidos de LC 5C9 derivada de la secuencia oligonucleotídica mostrada en formas no anotada y anotada; y

la Figura 4 ilustra la secuencia de aminoácidos consenso del TSHR humano (nº de referencia P16473, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=62298994>).

10

## Descripción detallada

### Métodos

15 *Aislamiento de linfocitos y clonación del autoanticuerpo de TSHR monoclonal humano 5C9*

El autoanticuerpo monoclonal 5C9 se aisló generalmente usando el procedimiento descrito en el documento WO2004/050708A2. Los linfocitos se aislaron en primer lugar de una muestra de sangre recogida de un paciente con hipotiroidismo posparto y niveles altos de TRAb (se obtuvo la aprobación del Comité de Ética Local). Los linfocitos se infectaron con Virus de Epstein Barr (VEB) (Colección Europea de Cultivos Celulares - ECACC; Porton Down, SP4 0JG, Reino Unido) y se cultivaron en capas de alimentación de macrófagos de ratón como se describe en el documento WO2004/050708A2. Se fusionaron linfocitos inmortalizados que secretan autoanticuerpos de TSHR con una línea celular híbrida de ratón/humana K6H6/B5 (ECACC) y se clonaron cuatro veces por dilución limitante para obtener una única colonia. La presencia de autoanticuerpos de TSHR en sobrenadantes de cultivo celular en diferentes estadios de clonación se detectó mediante la inhibición de la unión de TSH marcada con <sup>125</sup>I con el TSHR (documento WO2004/050708A2). Se expandió un único clon que producía el autoanticuerpo de TSHR y se recogieron sobrenadantes de los cultivos para purificación de autoanticuerpos.

20

25

### *Purificación y marcaje de preparaciones de IgG de 5C9*

30

Se purificó IgG 5C9 de sobrenadantes de cultivo usando cromatografía de afinidad de proteína A en MabSelect™ (GE Healthcare, Reino Unido) como se describe en Sanders J, Jeffreys J, Depraetere H, Evans M, Richards T, Kiddie A, Brereton K, Premawardhana 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 y se evaluó la pureza por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (PAGE).

35

El isotipo de cadena pesada de 5C9 se determinó usando un ensayo de difusión radial (The Binding Site; Birmingham, B29 6AT, Reino Unido), y se determinó el isotipo de cadena ligera por transferencia de Western con anticuerpos monoclonales de ratón específicos anti-cadena kappa humana y anti-cadena lambda humana (Sigma-Aldrich Company Ltd, Poole, Reino Unido).

40

Se incubó IgG 5C9 a 10 mg/ml en acetato sódico 20 mmol/l pH 4,5 con pepsina inmovilizada preparada de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Perbio Science UK Ltd, Cramlington, Reino Unido) durante 4½ horas a temperatura ambiente con agitación. A continuación, se retiró la pepsina inmovilizada por centrifugación (1000 x g, 5 minutos a temperatura ambiente) y el sobrenadante se dializó frente a NaCl 300 mmol/l, Tris-HCl 10 mmol/l pH 7,5 durante una noche a 4 °C. La mezcla dializada que contenía F(ab')<sub>2</sub> 5C9 y cantidades pequeñas de IgG intacto se separó usando una Matriz de Alta Resolución S-300 de Sephacryl (GE Healthcare, Chalfont St Giles, Reino Unido). Las preparaciones de F(ab')<sub>2</sub> 5C9 purificadas de esta manera no contenían IgG como se valoró por análisis de filtración en gel de SDS-PAGE y HPLC.

45

Además, se redujo F(ab')<sub>2</sub> usando una concentración final de L-cisteína 100 mmol/l durante 1 hora a 37 °C. La reacción se detuvo con una concentración final de yodoacetamida de 50 mmol/l durante 30 minutos a temperatura ambiente. El F(ab') se purificó usando una columna S-300 Sephacryl como anteriormente. Las preparaciones de F(ab') purificadas de esta manera no contenían F(ab')<sub>2</sub> como se valoró por análisis de filtración en gel SDS-PAGE y HPLC.

50

Además, se trató IgG 5C9 con mercuripapaína (Sigma, Reino Unido) a una relación de enzima/proteína de 1:100, se dializó en NaCl 50 mmol/l, Tris-HCl pH 9,0 y se pasó a través de una columna de Sepharose de intercambio aniónico (Q-Sepharose Fast flow de GE Healthcare) para separar IgG intacto o Fc de la preparación de Fab. El análisis por SDS-PAGE y la filtración en gel (columna de S-300 Sephacryl; como anteriormente) indicó que IgG intacto era indetectable en la preparación de Fab.

55

IgG 5C9 se marcó con <sup>125</sup>I como se describe en 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 <sup>125</sup>I-labelled TSH receptor. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1999 84: 3797-3802) o con hidracida de biotina (Perbio Science, Cramlington, Reino Unido).

60

65

*Inhibición de la unión de <sup>125</sup>I-TSH o <sup>125</sup>I-M22 o <sup>125</sup>I-5C9 con el TSHR*

Se llevaron a cabo ensayos de inhibición de la unión usando tubos recubiertos con TSHR como se describe en el documento WO2004/050708A2. En el ensayo, se incubaron 100 µl de muestra de ensayo (preparación de MAb, suero de pacientes o TSH no marcado) y 50 µl de tampón de partida (RSR Ltd) en tubos recubiertos con TSHR durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Después de la aspiración, los tubos se lavaron y se añadieron 100 µl de proteína marcada con <sup>125</sup>I (5 x 10<sup>4</sup> cpm) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Después los tubos se aspiraron, lavaron y contaron en un contador gamma.

10 La inhibición de unión de proteína marcada se calculó como:

$$100 \times \left[ 1 - \frac{\text{cpm unido en presencia de material de ensayo}}{\text{cpm unido en presencia de material de control}} \right]$$

15 El material de control fue un grupo de sueros de donantes de sangre sanos o sueros de donantes de sangre sanos individuales u otros materiales como se indica en los resultados de diversos experimentos.

*Análisis de Scatchard de la unión de IgG 5C9 con el TSHR*

20 Se incubaron IgG 5C9 no marcado en 50 µl de tampón de ensayo (NaCl 50 mmol/l, Tris 10 mmol/l pH 7,8 y Triton X-100 1 %) y 50 µl de IgG 5C9 marcado con <sup>125</sup>I (30.000 cpm en tampón de ensayo) en tubos recubiertos con TSHR durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación (la unión máxima se produjo en estas condiciones), se aspiraron, se lavaron dos veces con 1 ml de tampón de ensayo y se contaron en un contador gamma. La concentración de IgG unido frente a unido/libre se representó (Scatchard G 1949 The attraction of proteins for small molecules and ions. Annals of the New York Academy of Sciences 51: 660-672) para derivar la constante de asociación.

*Análisis de la estimulación de la producción de AMP cíclico*

30 La capacidad de IgG 5C9 y otras preparaciones para estimular la producción de AMP cíclico en células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con el TSHR humano se ensayó como se describe en el documento WO2004/050708A2. Se sembraron células CHO que expresaban aproximadamente 5 x 10<sup>4</sup> o aproximadamente 5 x 10<sup>5</sup> TSHR por célula en placas de 96 pocillos a 3 x 10<sup>4</sup> por pocillo, se adaptaron en DMEM (Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido) sin suero de ternero fetal y después se añadieron muestras de ensayo (TSH, IgG o suero de paciente) (100 µl diluidos en tampón de ensayo de AMP cíclico, es decir, solución de Sales Tamponadas de Hank sin NaCl que contenían glucosa 1 g/l, HEPES 20 mmol/l, sacarosa 222 mmol/l, albúmina de suero bovino 15 g/l y 3 isobutil-1-metilxantina 0,5 mmol/l pH 7,4) y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Después de la retirada de las soluciones de ensayo, las células se lisaron y se ensayó la concentración de AMP cíclico en los lisados por uno de dos métodos: 1) usando un sistema de inmunoensayo de enzimas Biotrak de GE Healthcare, Chalfont St Giles, Reino Unido; o 2) usando kits Correlate-EIA de AMP Cíclico Directo de Assay Designs; Cambridge Bioscience, Reino Unido. Los resultados se expresan como pmol/ml de AMP cíclico en el lisado celular (200 µl) o como fmol por pocillo celular.

*Medición de la actividad antagonista (bloqueo)*

45 Se evaluó la capacidad de IgG 5C9 y otras preparaciones para inhibir la actividad estimulante de TSH porcina (p), TSH humana nativa (h) y TSH humana recombinante (rh), MAb M22 y TRAb de suero de pacientes en células CHO que expresaban TSHR. Esto se llevó a cabo comparando el efecto estimulante de TSH, M22 o TRAb en ausencia y en presencia de IgG 5C9 (u otras preparaciones que se ensayan). El ensayo se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente excepto que se añadieron 50 µl de 5C9 (u otras preparaciones que se ensayan) diluidas en tampón de ensayo de AMP cíclico a la célula seguido de 50 µl de TSH o M22 o suero de pacientes (diluido según sea apropiado en tampón de ensayo de AMP cíclico) y se incubó y se ensayó como para el ensayo de estimulación descrito anteriormente.

Se ensayaron otros MAb y sueros de pacientes con TRAb de tipo bloqueo en este ensayo además de 5C9.

55 *Análisis de genes de región variable*

Los genes de región variable de las cadenas pesada y ligera de 5C9 se determinaron como se describe en el documento WO2004/050708A2, usando ARN total preparado a partir de 1 x 10<sup>7</sup> células de hetero-hibridoma que secretaban IgG 5C9 para producir ARNm para reacciones de RT-PCR (PCR de transcriptasa inversa). Se diseñaron cebadores oligonucleotídicos de cadena con sentido y antisentido IgG1 HC y LC kappa específicos usando el V-base de Medical Research Council (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) y se sintetizaron por Invitrogen (Paisley, PA4 9RF, Reino Unido). La reacción de RT se llevó a cabo a 50 °C durante 15 minutos seguido de 40 ciclos de PCR a 94 °C durante 15 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos. Se clonaron productos de ADN

en pUC18 y se secuenciaron por el método de Sanger-Coulson (Sanger F, Nicklen S, Coulson AR 1977 DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 74: 5463-5467). Las secuencias de región V se compararon con secuencias disponibles de genes Ig humanos usando Ig blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>).

#### 5 *Análisis de los efectos de mutaciones de aminoácidos en la secuencia de TSHR humano en la actividad de 5C9*

Los métodos usados para introducir mutaciones específicas en la secuencia de TSHR se han descrito en la Solicitud de Patente WO2006/016121A. Además, la transfección de construcciones de TSHR mutado en células CHO usando el sistema Flp-In también se describe en el documento WO2006/016121A.

Se sembraron células Flp-In-CHO que expresaban TSHR de tipo silvestre o mutados en placas de 96 pocillos y se usaron para ensayar la capacidad de preparaciones de 5C9 para bloquear la actividad estimulante de TSH, M22 o TRAb de suero de pacientes como se ha descrito anteriormente.

#### 15 *Ensayos basados en 5C9 para anticuerpos de TSHR, TSH y moléculas relacionadas*

Se dializó IgG 5C9 a 2,55 mg/ml en tampón de fosfato sódico 100 mmol/l pH 8,5 y se hizo reaccionar con NHS-LC-Biotina EZ-Link (Perbio) usando una relación molar de IgG y biotina de 1/10. Se incubaron muestras de suero en ensayo (75 µl) en pocillos de placas de ELISA recubiertos con TSHR (RSR Ltd) durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación (500 agitaciones por minuto). Después de retirar las muestras de ensayo y lavar, se añadió IgG 5C9 marcado con biotina (2 ng en 100 µl) y se continuó la incubación durante 25 min a temperatura ambiente sin agitación. Los pocillos se vaciaron, se lavaron y se añadieron 100 µl de estreptavidina-peroxidasa (10 ng en 100 µl; RSR Ltd) y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente sin agitación. Los pocillos se lavaron después tres veces, se añadió el sustrato de peroxidasa tetrametil bencidina (TMB; 100 µl; RSR Ltd) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad sin agitación. Después se añadieron 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mol/l para detener la reacción y se leyó la absorbancia de cada pocillo de la placa a 450 nm usando un lector de placas de ELISA. La inhibición de la unión de IgG 5C9-biotina se calculó como:

$$30 \quad 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{absorbancia de muestra de ensayo a 450 nm}}{\text{absorbancia de suero de control negativo a 450 nm}} \right]$$

### **Resultados**

#### 35 *Aislamiento y clonación de la línea celular secretora de 5C9*

Se infectaron linfocitos ( $27 \times 10^6$ ) obtenidos de 20 ml de la sangre del paciente con VEB y se sembraron a  $1 \times 10^6$  células por pocillo en una placa de 48 pocillos en capas de alimentación de macrófagos de ratón. El día 13 después de la infección por VEB los sobrenadantes de pocillos de placas se controlaron con respecto a inhibición de la unión de <sup>125</sup>I-TSH. Se expandieron células de los pocillos positivos y se fusionaron con la línea celular de hibridoma K6H6/B5 y se sembraron en placas de 96 pocillos. Se obtuvo un clon que producía de forma estable anticuerpo con actividad inhibidora de la unión de <sup>125</sup>I-TSH y se volvió a clonar 4 veces. El anticuerpo monoclonal, designado 5C9, purificado de sobrenadantes de cultivo de hetero-hibridoma era de la subclase de IgG1 con cadenas ligeras kappa.

#### 45 *Actividades de unión con TSHR y bloqueo de IgG 5C9*

La capacidad de diferentes concentraciones de IgG 5C9 para inhibir la unión de TSH marcada o M22 marcado o 5C9 marcado en sí mismo con el TSHR se muestra en la Tabla 1. Como se muestra en la Tabla 1, se observó 12 % de inhibición de la unión de <sup>125</sup>I-TSH con tan poco como 0,005 µg/ml de IgG 5C9 y la inhibición aumentó de una manera dependiente de la dosis hasta el 84 % de la inhibición a 100 µg/ml de 5C9. Esto puede compararse con la inhibición de la unión de <sup>125</sup>I-TSH por IgG de suero donante; 13 % de inhibición a 0,05 mg/ml aumentando de una manera dependiente de dosis hasta 94 % de inhibición a 1 mg/ml. En el caso del plasma donante, se observó 16 % de inhibición de la unión de <sup>125</sup>I-TSH a una dilución 1:160 en suero agrupado de donantes de sangre sanos y 95 % de inhibición a dilución 1:10.

55 IgG 5C9 también tuvo un efecto en la unión de <sup>125</sup>I-IgG M22 con el TSHR que recubría los tubos (Tabla 1). Se observó 9 % de inhibición de la unión de <sup>125</sup>I-IgG M22 a 0,01 µg/ml de IgG 5C9 y el aumento de las concentraciones dio como resultado un aumento dependiente de dosis de la inhibición hasta el 85 % a 100 µg/ml. IgG de suero donante fue eficaz a 0,01 mg/ml provocando 9 % de inhibición y el efecto aumentó de una manera dependiente de dosis al 89 % de inhibición a 1 mg/ml. El plasma de suero de donante mostró 13 % de inhibición de la unión de <sup>125</sup>I-IgG M22 a una dilución 1:320 y 91 % de inhibición a una dilución 1:10.

60 IgG 5C9 no marcado fue capaz de inhibir la unión de <sup>125</sup>I-5C9 con los tubos recubiertos con TSHR de una manera dependiente de dosis (11 % de inhibición a 0,005 µg/ml hasta 88 % de inhibición a 100 µg/ml) (Tabla 1). La unión de

$^{125}\text{I}$ -5C9 también se inhibió por IgG de suero de donante (15 % de inhibición a 0,05 mg/ml y 91 % de inhibición a 1 mg/ml) así como diluciones de plasma donante (10 % de inhibición a una dilución 1:320 y 92 % a una dilución 1:10).

5 La capacidad de IgG 5C9 para bloquear la estimulación mediada por M22 y TSH del AMP cíclico en células CHO que expresaban el TSHR se muestran en las Tablas 2a-c. La TSH porcina (3 ng/ml) estimuló fuertemente la producción de AMP cíclico ( $19.020 \pm 2154$  fmol/pocillo celular; media  $\pm$  DT; n = 3) (Tabla 2a). En presencia de IgG 5C9 0,1  $\mu\text{g/ml}$  la actividad estimulante de TSH porcina se redujo a  $11874 \pm 4214$  fmol/pocillo celular; (media  $\pm$  DT; n = 3) y el efecto inhibidor fue dependiente de la concentración de 5C9 produciéndose solamente  $2.208 \pm 329$  fmol/pocillo celular de AMP cíclico en presencia de 5C9 1  $\mu\text{g/ml}$  (Tabla 2a). El suero de donante de linfocitos también tuvo un fuerte efecto inhibidor en la estimulación de AMP cíclico mediada por TSH en células CHO-TSHR. Como se muestra en la Tabla 2a, la inhibición de la producción de AMP cíclico hasta aproximadamente 6000 fmol/pocillo celular se produjo en presencia de suero donante a dilución 1:10 (concentración de IgG en suero total a esta dilución de 1,43 mg/ml) en comparación con 19000 fmol/pocillo celular en ausencia de suero. Este efecto correspondía al efecto de aproximadamente 0,37  $\mu\text{g/ml}$  de IgG 5C9 purificado (calculado a partir de la curva de dilución del efecto de diferentes concentraciones de IgG 5C9 mostrado en la Tabla 2a). Esto indica que IgG 5C9 purificado es aproximadamente 3900 veces más activo que el IgG de suero de donante con respecto a la capacidad para bloquear la capacidad de TSH para estimular la producción de AMP cíclico.

20 Fragmentos de 5C9, tales como  $\text{F(ab')}_2$  5C9 y Fab 5C9 también fueron inhibidores eficaces de la estimulación de TSH. En particular, la actividad inhibidora de la estimulación por TSH de IgG 5C9,  $\text{F(ab')}_2$  5C9 y Fab 5C9 a 100  $\mu\text{g/ml}$  fue igual (Tabla 2b). A 10  $\mu\text{g/ml}$  las tres preparaciones: IgG 5C9,  $\text{F(ab')}_2$  5C9 y Fab 5C9 también fueron inhibidores potentes de la actividad estimulante de TSH. Sin embargo, IgG 5C9 parecía ser más eficaz que  $\text{F(ab')}_2$  5C9 o Fab 5C9 (Tabla 2b).

25 Fab M22 (3 ng/ml) es un estimulante potente de AMP cíclico  $9.432 \pm 822$  fmol/pocillo celular) (Tabla 2c) y en presencia de 5C9 el efecto estimulante de Fab M22 se inhibió de una manera dependiente de dosis, con niveles de AMP cíclicos reducidos a  $1.298 \pm 134$  fmol/pocillo celular en presencia de IgG 5C9 0,1  $\mu\text{g/ml}$ . Se produjo inhibición completa de la estimulación por M22 a 100  $\mu\text{g/ml}$  de 5C9 (Tabla 2c).

30 El análisis de Scatchard indicó que 5C9 marcado con  $^{125}\text{I}$  se unía con el TSHR con una constante de asociación de  $4 \times 10^{10}$  l/mol.

#### *Inhibición de la unión de $^{125}\text{I}$ -IgG 5C9 con el TSHR por TRAb del suero*

35 Se muestra la capacidad de TRAb del suero para inhibir la unión de  $^{125}\text{I}$ -IgG 5C9 con tubos recubiertos con TSHR en la Tabla 3 y la Figura 1. Se muestra también para comparar el efecto de los mismos TRAb del suero en la unión de  $^{125}\text{I}$ -TSH y la unión de  $^{125}\text{I}$ -IgG M22.

40 La unión de  $^{125}\text{I}$ -IgG 5C9 con el TSHR no se inhibió notablemente (intervalo de inhibición 3,4-18,9 %) por sueros de 10 donantes de sangre sanos diferentes (N1-N10, Tabla 3). Los sueros de 40 pacientes con enfermedad de Graves (G1-G40, Tabla 3) todos positivos para autoanticuerpos de TSHR en ensayos de inhibición de  $^{125}\text{I}$ -TSH y  $^{125}\text{I}$ -M22 (Tabla 3) inhibieron la unión de  $^{125}\text{I}$ -5C9 con tubos recubiertos con TSHR (intervalo de inhibición 22,0 – 85,2 %) en un mayor grado que los sueros de donantes de sangre sanos (Tabla 3). La capacidad de los TRAb de suero de pacientes para inhibir la unión de  $^{125}\text{I}$ -IgG 5C9,  $^{125}\text{I}$ -TSH o  $^{125}\text{I}$ -IgG M22 con el TSHR fue comparable con un coeficiente de correlación de Pearson  $r = 0,95$  ( $^{125}\text{I}$ -IgG 5C9 frente a  $^{125}\text{I}$ -TSH; Figura 1a) y  $r = 0,95$  ( $^{125}\text{I}$ -IgG 5C9 frente a  $^{125}\text{I}$ -IgG M22; Figura 1b). La Figura 1c muestra la comparación de la inhibición de  $^{125}\text{I}$ -TSH y  $^{125}\text{I}$ -IgG M22 por los mismos sueros (coeficiente de Pearson  $r = 0,99$ ).

50 Estos experimentos muestran que la unión de IgG 5C9 con el TSHR se inhibe eficazmente por TRAb del suero y que el efecto inhibidor de TRAb del suero en la unión de IgG 5C9 es similar a su efecto inhibidor en la unión de TSH o M22.

55 La Tabla 4 muestra la inhibición de la unión de  $^{125}\text{I}$ -IgG 5C9 por diferentes diluciones de TRAb de suero de pacientes con actividad de bloqueo de TSH (B1-B5) y TRAb de suero de pacientes con potente actividad estimulante de tiroides (S1, S2, S4). Se inhibió la unión de  $^{125}\text{I}$ -IgG 5C9 de una manera dependiente de dosis por los sueros B1-B5 así como por los sueros S1, S2 y S4. Los mismos sueros de bloqueo y estimulación también inhibieron la unión de  $^{125}\text{I}$ -TSH y  $^{125}\text{I}$ -IgG M22 de una manera dependiente de dosis. Además el porcentaje de inhibición con los tres ligandos marcados fue comparable a las mismas diluciones de sueros (Tabla 4a y b).

60 Estos resultados indican que los autoanticuerpos de TSHR con actividades tanto de estimulación como de bloqueo inhiben la unión de 5C9 con el TSHR.

*Inhibición de la unión de <sup>125</sup>I-IgG 5C9 con el TSHR por MAb de ratón con actividad de inhibición de la unión de TSH*

La capacidad de diferentes MAb de TSHR de ratón con actividad de inhibición de la unión <sup>125</sup>I-TSH para inhibir la unión de <sup>125</sup>I-5C9 con el TSHR se ensayó y se comparó con el efecto en la unión de <sup>125</sup>I-IgG M22 (Tabla 5). Como se muestra en la Tabla 5 todos los MAb que tenían la capacidad para inhibir la unión de <sup>125</sup>I-TSH y <sup>125</sup>I-IgG M22 también inhibieron la unión de <sup>125</sup>I-5C9 aunque en el caso de algunos MAb el efecto inhibitorio en la unión de <sup>125</sup>I-5C9 y <sup>125</sup>I-M22 fue más débil que en la unión de <sup>125</sup>I-TSH.

Estos experimentos que sugieren que hay un solapamiento considerable entre los sitios de unión en el TSHR para 5C9 y para MAb de TSHR de ratón que tiene la capacidad de inhibir la unión de TSH.

*Efecto de IgG 5C9 en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que expresan TSHR por sueros de pacientes*

Como se muestra en la Tabla 2, IgG 5C9 fue capaz de bloquear la estimulación por TSH o M22 de los niveles de AMP cíclico en células CHO que expresaban TSHR. En una serie diferente de experimentos se ensayó el efecto de IgG 5C9 en la actividad estimulante de TRAb de suero de pacientes y los resultados se muestran en la Tabla 6a. Los sueros T1-T9 y T11-T18 estimularon la producción de AMP cíclico en células CHO-TSHR y la incubación con un MAb de control IgG (2G4 específico para peroxidasa de tiroides humano) no tuvo ningún efecto en sus actividades estimulantes. Sin embargo, en presencia de IgG 5C9 (50 µl de 200 µg/ml), la actividad estimulante de todos los sueros ensayados se redujo notablemente (Tabla 6a).

Se muestran efectos de respuesta a dosis de 6 sueros diferentes (T1, T6, T3, T19, T20, T21) en las Tablas 6b-g. En estos experimentos, las concentraciones de IgG 5C9 que variaban de 0,1 µg/ml a 100 µg/ml provocaron una reducción dependiente de la dosis de la actividad estimulante de suero y el efecto de IgG 5C9 fue comparable al efecto de 9D33, un anticuerpo monoclonal de ratón para el TSHR con actividad de bloqueo (descrito en el documento WO2004/050708A2) en todos los sueros ensayados excepto el suero T3. En el caso del suero T3 (Tabla 6a y 6d) se observó una inhibición de aproximadamente el 50 % de la producción de AMP cíclico en presencia de IgG 5C9 100 µg/ml, mientras que IgG 9D33 100 µg/ml dio como resultado inhibición casi completa. Esto sugirió que podría haber algunas diferencias menores entre los epítotos reconocidos por 5C9 y 9D33.

*Efecto de IgG 5C9 en la producción de AMP cíclico basal (es decir, no estimulada) en células CHO que expresaban TSHR*

Además de inhibir la actividad estimulante de anticuerpos de TSH y TSHR, 5C9 inhibió la cantidad de AMP cíclico producida en ausencia de estos estimulantes de tiroides. En particular, la Tabla 6b muestra 1207 ± 123 fmol/pocillo celular de AMP cíclico producido en presencia de IgG monoclonal de control (2G4) 100 µg/ml reducido a 301 ± 38 fmol/pocillo celular en presencia de IgG 5C9 100 µg/ml. Los efectos de IgG 9D33 fueron menores con 721 ± 183 fmol/pocillo celular producidos en presencia de IgG 9D33 100 µg/ml. Se obtuvieron resultados similares en los experimentos separados mostrados en las Tablas 6d, 6e, 6f y 6g. Esto indica que IgG 5C9 tiene un efecto notable en la actividad basal o constitutiva del TSHR.

*Efecto de IgG 5C9 en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que expresan TSHR que contienen mutaciones de aminoácidos*

Los efectos de mutaciones de aminoácidos individuales en el TSHR en la capacidad de 5C9 para bloquear la actividad estimulante de AMP cíclico de TSH porcino en células CHO-TSHR se muestran en la Tabla 7. En particular, el efecto de 5C9 en la estimulación de la producción de AMP cíclico se estudió en células CHO que expresaban el TSHR con los siguientes restos mutados a alanina: Lys 58, Ile 60, Arg 80, Tyr 82, Thr 104, Arg 109, Lys 129, Phe 134, Asp 151, Lys 183, Gln 235, Arg 255, Trp 258, Ser 281. Además, se estudió el efecto de una mutación de cambio de carga en el caso de restos de TSHR: Arg80Asp, Asp151Arg, Lys183Asp, Arg255Asp, en los que de acuerdo con la notación convencional el resto de aminoácido que se reemplaza, y su posición en el polipéptido de secuencia primaria, se indica antes del resto de aminoácido de reemplazo. Estudios previos han mostrado que la mutación de cambio de carga de Asp160Lys de TSHR provocaba una pérdida de sensibilidad del TSHR a TSH mientras que la respuesta a M22 no se veía afectada (Solicitud de Patente WO2006/016121A). En consecuencia, se estudió el efecto de la mutación Asp160Lys de TSHR en la actividad biológica de 5C9 usando M22 como un estimulante de AMP cíclico en células CHO-TSHR (Tabla 7).

De todas las mutaciones de TSHR estudiadas, se descubrió que solamente tres mutaciones afectaban a la capacidad de 5C9 para actuar como un antagonista. La mutación de Lys129 a Ala (Tabla 7h) dio como resultado una pérdida completa de la capacidad de IgG 5C9 para bloquear la estimulación por TSH de la producción de AMP cíclico.

Además la mutación de TSHR Lys183Ala provocó una reducción parcial de la actividad de bloqueo de IgG 5C9; se observó una inhibición del 28 % de la estimulación de TSH a 1 µg/ml cuando se ensayó con la mutación Lys183Ala

de TSHR en comparación con 84 % de inhibición con TSHR de tipo silvestre (Tabla 7m). Incluso a 100 µg/l de IgG 5C9, solamente era detectable inhibición parcial de la estimulación de TSH (43 %) en los experimentos con mutación Lys183Ala de TSHR mientras que a esta concentración se observaba un bloqueo completo de la actividad estimulante de TSH (93 %) en los experimentos con receptores de tipo silvestre (Tabla 7m). Cuando se mutó Lys 183 con carga positiva a ácido aspártico con carga negativa, el efecto de la actividad biológica de 5C9 era similar al observado con la mutación Lys 183 Ala (Tabla 7m). Esto sugiere que Lys183 es importante para la actividad biológica de 5C9. En el caso de la mutación de Asp151Ala, se observó una ligera reducción de la actividad de bloqueo de IgG 5C9: 49 % de inhibición a 1 µg/ml en comparación con 88 % de inhibición con el tipo silvestre (Tabla 7j). Sin embargo, en presencia de IgG 5C9 100 µg/ml la actividad era igual que con el TSHR de tipo silvestre. Cuando Asp151 con carga negativa se mutó a arginina con carga positiva, no se observó una reducción significativa en la actividad de bloqueo de IgG 5C9 (Tabla 7k).

El efecto de las mutaciones de TSHR en la actividad de 5C9 puede compararse con los efectos de las mutaciones de TSHR en la actividad de 9D33. Como se describe en la Solicitud de Patente WO2006/016121A, las mutaciones de TSHR Lys 58, Arg 80, Tyr 82, Arg 109, Lys 129 y Phe 134 tuvieron un efecto en la actividad de 9D33. Ninguna de estas mutaciones excepto Lys129, sin embargo, tuvo ningún efecto además en la actividad de 5C9. Además, ninguna de las mutaciones excepto Lys 129 que afectaron a la actividad de M22 (Arg 80, Tyr 82, Glu 107, Arg 109, Lys 129, Phe 130, Lys 183, Tyr 185, Arg 255 y Trp 258) como se describe en la Solicitud de Patente WO 2006/016121 A afectó a la actividad de 5C9. Además, la mutación de Lys 183 tuvo un efecto parcial en la actividad de 5C9 y la actividad de M22 pero no tuvo ningún efecto en la actividad de 9D33.

Estos resultados indican que hay diferencias con respecto a los restos de TSHR importantes para la interacción con el autoanticuerpo humano estimulante de tiroides M22, con el anticuerpo de bloqueo de ratón 9D33 y con el autoanticuerpo de bloqueo humano 5C9. En consecuencia, una combinación de 5C9 con otros anticuerpos de TSHR con actividades antagonistas (tales como 9D33) puede ser un medio particularmente eficaz para inhibir la actividad estimulante de TRAb de suero de pacientes, otros estimulantes y/o la actividad constitutiva de TSHR.

#### *Secuencias de región variable de 5C9*

El análisis de secuencia de los genes que codificaban 5C9 indicó que los genes de la región V HC eran de la familia VH3-53, los genes D de la familia D2-2 y los genes J de la familia JH4. En el caso de la LC, los genes de la región V eran de la familia 012 y los genes de la región J de la línea germinal JK2. Se muestran las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de HC en las Figuras 2a y 2b, respectivamente, y se muestran las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de LC en las Figuras 3a y 3b, respectivamente.

Hay mutaciones somáticas en la secuencia génica de HC comparada con las secuencias de línea germinal; en particular 1 mutación silenciosa en FWR1, 2 mutaciones de reemplazo en CDR2, 1 mutación silenciosa y 1 de reemplazo en CDR3 y una mutación silenciosa en FWR4. Sin embargo, la secuencia de región V HC se caracteriza por dos inserciones; una de 6 pares de bases de longitud entre los genes V y D y una de 15 pares de bases de longitud entre los genes D y J. En consecuencia, la CDR1 HC es de 5 aminoácidos de longitud, la CDR2 es de 16 aminoácidos de longitud y la CDR3 es de 18 aminoácidos de longitud (Figura 2b).

En la secuencia de LC hay: 1 mutación silenciosa en FWR1, 1 mutación de reemplazo en CDR1, 1 mutación de reemplazo en CDR3 y una inserción de 6 pares de bases de longitud entre los genes V y J. La CDR1 LC está compuesta de 11 aminoácidos, CDR2 de 7 aminoácidos y CDR3 de 10 aminoácidos (Figura 3b).

#### *Ensayos basados en 5C9 para la detección de TSH o TRAb*

Se muestra un ejemplo de un ELISA basado en la unión de IgG 5C9 biotina con pocillos de placas recubiertos con TSHR para la detección de autoanticuerpos de TSHR en la Tabla 8. En este ensayo todas las muestras positivas para la inhibición de la unión de TSH-biotina también fueron positivas para la unión de IgG 5C9-biotina. Además, la señal de absorbancia, el porcentaje de inhibición y los valores de unidades/l derivados eran comparables en los ensayos de TSH-biotina y 5C9-biotina (Tabla 8).

#### *Efecto de IgG 5C9 en la actividad estimulante de anticuerpos monoclonales estimulantes del tiroides de ratón (MAB de TSHR de ratón; TSMAB) en células CHO que expresan TSHR*

Como se muestra en la Tabla 9, IgG 5C9 fue capaz de bloquear la estimulación de la producción de AMP cíclico por los cinco TSMAB (1, 2, 4, 5 y 7) ensayados. Por ejemplo, TSMAB1 (Tabla 9) estimuló los niveles de AMP cíclico a  $18,94 \pm 7,4$  pmol/ml mientras que en presencia de IgG 5C9 100 µg/ml solamente se producían  $1,24 \pm 0,07$  pmol/ml de AMP cíclico. Esto puede compararse con los niveles de AMP cíclico de  $16,5 \pm 1,1$  pmol/ml en presencia del MAB 2G4 de control 100 µg/ml (Tabla 9).

Los niveles de AMP cíclico mostrados en la Tabla 9, así como en las Tablas 10-15 posteriores, se expresan en pmol/ml, es decir, los niveles de AMP cíclico por pocillo celular son: pmol/ml ÷ 5 (que representa 200 µl de la

muestra de cada pocillo ensayado).

*Efecto de IgG 5C9 en la actividad estimulante de TSH humana nativa y TSH humana recombinante en células CHO que expresan TSHR*

5 La capacidad de IgG 5C9 para bloquear la estimulación de AMP cíclico de TSH porcina se muestra en la Tabla 2 y en la Tabla 10. Además IgG 5C9 mostró la capacidad de inhibir la estimulación de AMP cíclico tanto de TSH humana nativa (preparación de referencia NIBSC 81/565 del Instituto Nacional para los Patrones y Control Biológicos, South Mimms, Potters Bar EN6 3QG Reino Unido) como de TSH recombinante (preparación de referencia de NIBS 94/674) (Tabla 10). En particular la estimulación de la producción de AMP cíclico por 100 ng/ml de TSH humana recombinante o nativa requiere 0,1 – 1,0 µg/ml de IgG 5C9 para obtener la inhibición completa de la producción de AMP cíclico. En el momento de la recogida de sangre para el aislamiento de 5C9 los niveles de TSH en circulación en el suero donante fueron de 160 mU/l (aproximadamente 32 ng/ml), los resultados obtenidos (Tabla 2a y Tabla 10) indican que este nivel de TSH en circulación se bloquearía completamente en presencia de IgG 5C9 32-320 ng/ml en el suero. Se estimó que los niveles de autoanticuerpos de TSHR en el suero donante, usando la inhibición de la unión de <sup>125</sup>I-M22 con el TSHR (como se describe en 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), eran de 1700 ng/ml (120 ng/ml), es decir, varias veces mayores que la concentración de 5C9 requerida para bloquear la estimulación de tiroides por TSH.

*Efecto de IgG 5C9 en la actividad de AMP cíclico basal (es decir, no estimulada) en células CHO que expresan TSHR con las mutaciones de activación S281I, I568T y A623I*

25 IgG 5C9 fue capaz de reducir la cantidad de AMP cíclico producido en células CHO que expresaban TSHR con mutaciones de activación cuando estaban ausentes estimulantes del tiroides (es decir, anticuerpos de TSH o TSHR). Como se muestra en la Tabla 11a la concentración de AMP cíclico basal en células CHO que expresaban el TSHR con la mutación de activación S281I fue de  $9,90 \pm 1,51$  pmol/ml en ausencia de 5C9 y esta se redujo a  $4,17 \pm 0,60$  pmol/ml en presencia de IgG 5C9 0,01 µg/ml y a  $3,44 \pm 0,63$  pmol/ml en presencia de IgG 5C9 1 µg/ml. El MAb de TSHR de ratón de bloqueo 9D33 tuvo poco efecto, como también lo tuvo el MAb 2G4 de control (Tabla 11a).

30 Se obtuvieron resultados similares con la mutación de activación de TSHR I568T (Tabla 11b), que mostró una concentración de AMP cíclico basal de  $21,39 \pm 5,31$  pmol/ml. Esta se redujo a  $5,29 \pm 0,75$  pmol/ml tras la adición de IgG 5C9 1 µg/ml en comparación con  $20,52 \pm 0,95$  pmol/ml y  $21,65 \pm 1,99$  pmol/ml en el caso de la adición de IgG 2G4 e IgG 5C9, respectivamente. En el caso de una tercera mutación de activación de TSHR estudiada, es decir, A623I con concentración de AMP cíclico basal de  $36,89$  pmol/ml, la adición de IgG 5C9 1 µg/ml redujo los niveles de AMP cíclico a  $16,43 \pm 1,27$  pmol/ml en comparación con pocos efectos con IgG 2G4 de control 1 µg/ml ( $28,96 \pm 2,29$  pmol/ml) o IgG 9D33 1 µg/ml ( $40,09 \pm 7,73$  pmol/ml) (Tabla 11c).

40 Estos resultados indican que 5C9 a diferencia del MAb de bloqueo de ratón 9D33 tiene un efecto notable en la producción de AMP cíclico asociada con las mutaciones de activación de TSHR incluso cuando las mutaciones están en diferentes partes del TSHR (es decir, S281I en el dominio extracelular, I568T en el segundo bucle extracelular del dominio transmembrana y A623I en el tercer bucle intracelular del dominio transmembrana).

*Comparación del efecto de 5C9 y un anticuerpo monoclonal de bloqueo de TSHR de ratón 9D33 y la mezcla de los dos anticuerpos en la estimulación mediada por TSH de la producción de AMP cíclico en células CHO que expresan el TSHR de tipo silvestre*

50 El MAb 5C9 que bloquea el TSHR humano y el MAb 9D33 que bloquea el TSHR de ratón a concentraciones tan bajas como 1 µg/ml tienen la capacidad de bloquear la actividad estimulante de AMP cíclico de TSHR de TSH en células CHO-TSHR como se ha mostrado en experimentos previos y en la Tabla 12. Los efectos de IgG 9D33 e IgG 5C9 en la estimulación mediada por TSH del AMP cíclico fueron aditivos como se muestra en la Tabla 12; Experimentos 1-5. Se observó el mismo efecto aditivo cuando se usaron dos concentraciones diferentes de TSH (3 ng/ml y 0,3 ng/ml) para estimulación (Tabla 12; Experimentos 1-3 y Experimentos 4 y 5, respectivamente).

*Comparación del efecto de 5C9 y un anticuerpo monoclonal de bloqueo de TSHR de ratón 9D33 y la mezcla de los dos anticuerpos en la estimulación mediada por M22 de la producción de AMP cíclico en células CHO que expresan el TSHR de tipo silvestre*

60 Como se ha mostrado antes, 5C9 y 9D33 también eran capaces de inhibir la estimulación mediada por Fab M22 del AMP cíclico en células CHO-TSHR. Los efectos del IgG 9D33 e IgG 5C9 en la estimulación mediada por M22 del AMP cíclico fueron aditivos (Tabla 13 Experimentos 1-4). Se observó el mismo efecto aditivo cuando se usaron dos concentraciones diferentes de Fab M22 (3 ng/ml y 0,3 ng/ml) para estimulación (Tabla 13; Experimentos 1 y 2 y Experimentos 3 y 4, respectivamente).

65

Los efectos aditivos de IgG 5C9 e IgG 9D33 fueron similares para la estimulación mediada tanto por TSH como por M22 de la producción de AMP cíclico (Tablas 12 y 13).

5 *Efecto de 5C9 en la actividad de AMP cíclico basal (es decir no estimulada) en células CHO que expresan un número alto de TSHR de tipo silvestre por célula*

Una línea celular CHO que expresaba aproximadamente  $5 \times 10^5$  receptores por célula mostró niveles mayores de AMP cíclico basal (es decir no estimulado) en comparación con una línea celular CHO convencional (que expresaba aproximadamente  $5 \times 10^4$  TSHR por célula) usada en experimentos previos (por ejemplo Tablas 9-13) es decir  $47,1 \pm 11,7$  pmol/ml en comparación con aproximadamente 1,0 pmol/ml, respectivamente. El efecto de IgG 5C9 e IgG 9D33 en la actividad basal de TSHR de tipo silvestre se evaluó usando la línea celular que expresaba un número alto de receptores por célula. La incubación con IgG 9D33 y un anticuerpo de control negativo para GAD (5B3) dio como resultado una inhibición de la actividad de AMP cíclico basal de 0-5,3 % (Tabla 14; Experimento 1) lo que indica que el MAb de ratón de bloqueo 9D33 o el MAb de control no tienen ningún efecto en la producción de AMP cíclico basal en las células CHO que expresan el TSHR de tipo silvestre. Sin embargo, en el caso de IgG 5C9 se observó una clara inhibición de la actividad de AMP cíclico basal (Tabla 14; Experimento 2) provocando 0,1  $\mu$ g/ml y 10  $\mu$ g/ml una inhibición del 45,7 % y 74,6 % respectivamente. Además, Fab 5C9 y F(ab') 5C9 también fueron inhibidores eficaces de la actividad de AMP cíclico basal en células CHO que expresaban un alto número de TSHR por célula (Tabla 14 experimento 3). Por ejemplo, Fab 5C9 1  $\mu$ g/ml y 100  $\mu$ g/ml mostraron 39 % y 61 % de inhibición de la producción de AMP cíclico basal, respectivamente en comparación con el 48 % de inhibición por F(ab') 5C9 a 100  $\mu$ g/ml (Tabla 14 experimento 3).

25 *Efecto de los autoanticuerpos de TSHR de suero del paciente con actividad antagonista (es decir de bloqueo) en la actividad de AMP cíclico basal (es decir, no estimulada) en células CHO que expresan TSHR con la mutación de activación I568T*

La producción de AMP cíclico basal por células TSHR I568T en presencia de tampón de ensayo de AMP cíclico de  $20,5 \pm 8,7$  pmol/ml esencialmente no se vio afectada por la adición de sueros agrupados normales de donantes de sangre sanos (NPS) o 3 sueros de donantes de sangre sanos individuales (N1-N3) ensayados a una dilución 1/10 y 1/50. La producción de AMP cíclico basal en presencia de NPS y sueros N1-N3 mostró una inhibición del 0-14 % en comparación con la producción de AMP cíclico basal en presencia de tampón de ensayo de AMP cíclico (Tabla 15). Sin embargo, en presencia de 4 sueros diferentes con altos niveles de TRAb de tipo bloqueo (B2-B5) se observó una inhibición de la producción de AMP cíclico basal del 23-89 % (Tabla 15). En presencia de IgG 5C9 (1  $\mu$ g/ml), se observó una inhibición de la actividad de AMP cíclico basal por TSHR I568T del 83 %. También se muestra el efecto de respuesta a dosis de 2 sueros de bloqueo (B3 y B4) en la producción de AMP cíclico basal en células CHO que expresan TSHR con mutación I568T en la Tabla 15.

40 Estos resultados indican que 5C9 tienen la característica de actividad de bloqueo de TSHR de autoanticuerpos de TSHR de bloqueo de pacientes en particular con respecto a la inhibición de la producción de AMP cíclico basal en el mutante de activación de TSHR I568T.

45 *Efecto de los autoanticuerpos de TSHR de suero de pacientes con actividad antagonista en la actividad de AMP cíclico basal (es decir no estimulada) en células CHO que expresan TSHR con la mutación de activación S281I*

La producción de AMP cíclico basal por células TSHR S281I en presencia de tampón de ensayo de AMP cíclico fue de  $11,2 \pm 2,0$  pmol/ml y la incubación con sueros agrupados de donantes de sangre sanos o sueros de donantes de sangre sanos individuales (diluidos 1/10 o 1/50) no tuvo ningún efecto (Tabla 16). Por el contrario, en presencia de 4 sueros diferentes con altos niveles de tipo bloqueo de TRAb (B2-B5) se observó una inhibición de la producción de AMP cíclico basal del 31-56 % (Tabla 16). IgG 5C9 a 1  $\mu$ g/ml provocó una inhibición del 71 % de la actividad de AMP cíclico basal en los experimentos con TSHR S281I.

55 *Efecto de los autoanticuerpos de TSHR de suero de pacientes con actividad antagonista en la actividad de AMP cíclico basal (es decir no estimulada) en células CHO que expresan TSHR con la mutación de activación A623I*

La producción de AMP cíclico basal en el caso de células de TSHR A623I fue de  $43,5 \pm 11,2$  pmol/ml en presencia de tampón de ensayo de AMP cíclico y esencialmente no se vio afectada por la incubación con sueros agrupados o individuales de donantes de sangre sanos (Tabla 17). La incubación con cuatro sueros diferentes con altos niveles de tipo de bloqueo de TRAb (B2-B5) provocó una inhibición del -1 % al 56 % del AMP cíclico en estos experimentos (Tabla 17). Esto puede compararse con la inhibición del 49 % por IgG 5C9 a 1  $\mu$ g/ml en el mismo experimento.

60 *Efecto de los autoanticuerpos de TSHR de suero de pacientes con actividad antagonista en la actividad de AMP cíclico basal (es decir no estimulada) en células CHO que expresan aproximadamente  $5 \times 10^5$  TSHR de tipo silvestre por célula.*

65 La producción de AMP cíclico basal en células CHO que expresaban un mayor número de TSHR de tipo silvestre

por célula fue de  $28,1 \pm 0,7$  pmol/ml en esta serie de experimentos. Cuando las células se incubaron con sueros agrupados o individuales de donantes de sangre sanos (N1-N3) a diluciones de 1/10 los niveles de AMP cíclico basales variaron entre el 99 % y el 146 % de los niveles de AMP cíclico en presencia de tampón de ensayo de AMP cíclico mientras que a las diluciones 1/50 el intervalo fue del 93 % al 137 %. De 4 sueros con autoanticuerpos de TSHR de tipo bloqueo ensayados, un suero (B2) no tuvo ningún efecto en la producción de AMP cíclico basal (Tabla 18). En el caso de dos sueros (B3 y B5) los niveles de AMP cíclico aumentaron en relación con los niveles observados en presencia de tampón de ensayo de AMP cíclico (Tabla 18). Podría ser que los sueros B3 y B5 contengan una mezcla de autoanticuerpos de TSHR con actividades estimulantes y de bloqueo. Por el contrario, el suero B4 tuvo un claro efecto inhibitor en la producción de AMP cíclico basal a dilución 1/10 y 1/50, es decir, 31 % y 61 % respectivamente de los niveles de AMP cíclico basales en relación con los niveles en presencia de tampón de ensayo de AMP cíclico (Tabla 18). Esto puede compararse con los niveles en presencia de IgG 5C9 a 1  $\mu$ g/ml de 33 % en relación con los niveles en presencia de tampón de ensayo de AMP cíclico (Tabla 18).

En general IgG 5C9 muestra efectos similares en la producción de AMP cíclico basal en células CHO transfectadas con TSHR de tipo silvestre o con TSHR con mutaciones de activación a los efectos observados con sueros de pacientes positivos para autoanticuerpos de TSHR de tipo bloqueo. Sin embargo, el efecto de los sueros de pacientes individuales varía en el caso de mutaciones diferentes (Tabla 19). En el caso de TSHR de tipo silvestre algunos sueros muestran un efecto estimulante supuestamente debido a la presencia de autoanticuerpos estimulantes de TSHR así como autoanticuerpos de bloqueo (Tabla 19).

*Efecto de 5C9 en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que expresan TSHR que contienen mutaciones de aminoácidos*

El efecto de 5C9 en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que expresan TSHR con mutaciones de aminoácidos se extendió para incluir las siguientes mutaciones a alanina: Asp43, Glu61, His105, Glu107, Phe130, Glu178, Tyr185, Asp203, Tyr206, Lys209, Asp232, Lys250, Glu251, Thr257, Arg274, Asp276 (Tabla 20 a-p y resumido en la Tabla 21).

La mutación de los aminoácidos de TSHR Asp43, Glu61, His105, Glu107, Tyr185, Asp232 y Thr257 a alanina no tuvo ningún efecto en la capacidad de IgG 5C9 para inhibir la producción de AMP cíclico estimulada por TSH. La capacidad de 5C9 para inhibir la producción de AMP cíclico estimulada por TSH se redujo por mutación de TSHR Phe130, Glu178, Asp203, Tyr206, Lys250, Glu251 y Asp276 a alanina. En el caso de 2 mutaciones Lys209Ala y Arg274Ala, se potenció la capacidad de IgG 5C9 para inhibir la producción de AMP cíclico mediada por TSH.

En resumen (Tablas 7, 20 y 21), todos los 10 restos de TSHR Lys129, Phe130, Asp151, Glu178, Lys183, Asp203, Tyr206, Lys250, Glu251 y Asp276 redujeron la capacidad de 5C9 para inhibir la estimulación de AMP cíclico por TSH en comparación con el TSHR de tipo silvestre. La mutación de TSHR Lys129 y Asp203 mostró el mayor efecto y provocó inhibición completa de la actividad de 5C9.

*Efecto de los sueros de bloqueo B2-B5 en la estimulación mediada por TSH de la producción de AMP cíclico en células CHO que expresaban TSHR de tipo silvestre en comparación con TSHR mutado Asp203Ala*

El efecto de bloqueo de 5C9 1  $\mu$ g/ml en el TSHR de tipo silvestre (92 % de inhibición de la estimulación de AMP cíclico inducida por TSH) se redujo al 4 % en el caso de la mutación de TSHR Asp203Ala (Tabla 22).

La actividad de suero de bloqueo B4 no se vio afectada por la mutación de TSHR Asp203Ala mientras que se vio una ligera reducción del porcentaje de inhibición de la estimulación de AMP cíclico inducida por TSH con los sueros de bloqueo B2 y B3 en el caso de TSHR Asp203Ala en comparación con el TSHR de tipo silvestre.

En el caso de un suero B5, se observó una reducción notable en el porcentaje de inhibición de la estimulación de AMP cíclico inducida por TSH; es decir 69 % de inhibición en comparación con el 30 % de inhibición en TSHR de tipo silvestre y mutado respectivamente.

El efecto de la mutación de TSHR Asp203Ala en la actividad de 5C9 fue mayor que el efecto en la actividad de los sueros de bloqueo, sin embargo, la actividad de bloqueo de 3/4 sueros ensayados se vio afectada en diversos grados. Esto puede indicar que los sitios de unión para los autoanticuerpos de TSHR de bloqueo y 5C9 se solapan pero hay algunas diferencias en los aminoácidos de TSHR que de hecho están en contacto con sueros diferentes.

### **Sumario y conclusiones**

Los experimentos descritos anteriormente proporcionan pruebas de que un anticuerpo de acuerdo con la invención tal como 5C9 es capaz de bloquear la actividad de estimulación de diferentes estimulantes de tiroides, incluyendo anticuerpos estimulantes de TSHR humano y de ratón, TSH humana y animal nativa y TSH humana recombinante. Además, se proporcionan pruebas de que dos anticuerpos de tipo bloqueo diferentes, es decir, un MAb 5C9 humano y un MAb 9D33 de ratón que, cuando se ensayan individualmente, tienen la capacidad de bloquear la estimulación mediada por TSH o M22 del AMP cíclico en células CHO que expresan el TSHR, muestran efecto de bloqueo aditivo

en la estimulación por TSH o M22 cuando se mezclan entre sí.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención tales como 5C9 tienen un efecto nuevo en la actividad de AMP cíclico basal (es decir no estimulada) por TSHR. Estos efectos se han estudiado por experimentos usando células CHO transfectadas con TSHR que tienen mayores niveles de AMP cíclico basal, es decir, el efecto de bloqueo de los anticuerpos de acuerdo con la invención, tal como 5C9, en la actividad de AMP cíclico basal se ha confirmado. Además, se ha mostrado que algunos sueros con autoanticuerpos de TSHR con actividad de bloqueo (antagonista) tienen la capacidad de bloquear la actividad de AMP cíclico basal en estas células transfectadas con TSHR. Los experimentos también proporcionan pruebas del efecto de bloqueo de los anticuerpos de acuerdo con la invención, tales como 5C9, y los autoanticuerpos de bloqueo de TSHR del suero en la actividad de AMP cíclico basal asociada con mutaciones de TSHR de activación.

Estos resultados enfatizan que 5C9 es un MAb humano que muestra las características de autoanticuerpos de TSHR de tipo bloqueo, es decir que es representativo de los autoanticuerpos de TSHR del suero de pacientes asociados con enfermedad de tiroides autoinmunitarias.

Los experimentos descritos también permitieron la identificación de algunos de los aminoácidos de TSHR importantes para la actividad de bloqueo de los anticuerpos de acuerdo con la invención.

En general, los resultados indican que los anticuerpos de acuerdo con la invención, tales como 5C9, muestran actividad de unión a TSHR similar y efectos biológicos similares en la función de TSHR como autoanticuerpos de bloqueo de TSHR hallados en diferentes sueros de pacientes con enfermedad de tiroides autoinmunitaria. En consecuencia, teniendo características y actividad biológica de autoanticuerpos de TSHR de bloqueo de suero, los anticuerpos de acuerdo con la invención, tales como 5C9, tienen aplicaciones para la inactivación del TSHR en diversas condiciones clínicas. Estas condiciones incluyen la activación de TSHR mediada por TSH, la activación de TSHR mediada por autoanticuerpos de TSHR estimulantes del tiroides, actividad de TSHR basal (no estimulada, constitutiva) y la activación de TSHR asociada con mutaciones de TSHR activadoras. En consecuencia, los anticuerpos de acuerdo con la invención, tales como 5C9 tienen aplicaciones para el tratamiento y control de las afecciones asociadas con la activación de TSHR mencionadas anteriormente; por ejemplo enfermedad de Graves, oftalmopatía de Graves, hipertiroidismo debido a mutaciones activadoras de TSHR, hipertiroidismo debido a niveles anómalos de TSH (patológicos o farmacológicos), cáncer de tiroides y metástasis de cáncer de tiroides.

Tabla 1

Inhibición de la unión de <sup>125</sup> I-TSH, <sup>125</sup> I-IgG M22 o <sup>125</sup> I-IgG 5C9 con tubos recubiertos con TSHR por IgG 5C9, IgG de donante de linfocitos y plasma de donante de linfocitos			
Muestra	<sup>125</sup> I-TSH (% de inhibición)	<sup>125</sup> I-IgG M22 (% de inhibición)	<sup>125</sup> I-5C9 (% de inhibición)
Plasma donante (diluido en grupo de HBD)			
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
IgG de donante (diluido en IgG agrupado de HBD 1 mg/ml)			
1 mg/ml	94	89	91
0,5 mg/ml	90	86	89
0,25 mg/ml	63	79	64
0,1 mg/ml	29	51	26
0,05 mg/ml	13	29	15
0,025 mg/ml	2	17	5
0,01 mg/ml	5	9	1
IgG 5C9 (diluido en 2G4 100 µg/ml)			
100 µg/ml	84	85	88
50 µg/ml	76	81	80
25 µg/ml	67	69	71

ES 2 523 217 T3

10 µg/ml	54	60	59
5 µg/ml	47	53	54
2,5 µg/ml	42	43	49
1 µg/ml	37	31	42
0,5 µg/ml	33	32	41
0,1 µg/ml	29	22 3	4
0,05 µg/ml	25	19	30
0,01 µg/ml	13	9	15
0,005 µg/ml	12	5	11
0,001 µg/ml	3	2	3

El % promedio de unión de indicador marcado con tubos recubiertos con TSHR fue:

14 % en los experimentos con <sup>125</sup>I-TSH;

21 % en los experimentos con <sup>125</sup>I-IgG M22

y 20 % en los experimentos con <sup>125</sup>I-5C9

Grupo de HBD = grupo de sueros de donantes de sangre sanos

2G4 = IgG de control (MAb humano para peroxidasa de tiroides)

Tabla 2a

Efecto de IgG 5C9 o IgG de suero de donante de linfocitos en la estimulación por TSH de la producción de AMP cíclico en células CHO que expresan TSHR humano

Muestra	Concentración de IgG	AMP cíclico (fmol/pocillo celular; media ± DT, n=3)
pTSH (3 ng/ml) solamente		19020 ± 2154
IgG 5C9 solamente	1 µg/ml	141 ± 5
IgG 5C9 + pTSH (3 ng/ml)	1 µg/ml	2208 ± 329
IgG 5C9 + pTSH (3 ng/ml)	0,5 µg/ml	4754 ± 876
IgG 5C9 + pTSH (3 ng/ml)	0,1 µg/ml	11874 ± 4214
IgG 5C9 + pTSH (3 ng/ml)	0,08 µg/ml	14525 ± 3690
IgG 5C9 + pTSH (3 ng/ml)	0,06 µg/ml	13290 <sup>1</sup>
IgG 5C9 + pTSH (3 ng/ml)	0,04 µg/ml	13928 ± 1572
IgG 5C9 + pTSH (3 ng/ml)	0,02 µg/ml	16432 ± 9286
IgG 5C9 + pTSH (3 ng/ml)	0,01 µg/ml	18969 ± 5308
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente		207 ± 51
Suero de donante <sup>a</sup> 1/10	1,43 mg/ml <sup>b</sup>	1102 ± 46
Suero de donante 1/10 + pTSH (3 ng/ml)	1,43 mg/ml	5931 ± 350
Suero de donante 1/20 + pTSH (3 ng/ml)	0,715 mg/ml	16886 ± 728
Suero de donante 1/30 + pTSH (3 ng/ml)	0,477 mg/ml	16453 ± 3455
Suero de donante 1/40 + pTSH (3 ng/ml)	0,358 mg/ml	17716 ± 1753
Suero de donante 1/50 + pTSH (3 ng/ml)	0,286 mg/ml	17928 ± 4772
Suero de donante 1/100 + pTSH (3 ng/ml)	0,143 mg/ml	18226 ± 2268

<sup>1</sup>Determinación individual

<sup>a</sup>El suero del donante se diluyó en tampón de ensayo de AMP cíclico como se indica

<sup>b</sup>La concentración de IgG de suero no diluido determinada por nefelometría fue de 14,3 mg/ml

IgG 5C9 y TSH se diluyeron en tampón de ensayo de AMP cíclico

Tabla 2b

Inhibición de la producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR por IgG 5C9, fragmentos F(ab')<sub>2</sub> y Fab

Ejemplo 1

Muestra	AMP cíclico (fmol/pocillo celular; media ± DT, n=3)
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	586 ± 148
TSH 3 ng/ml solamente	18557 ± 363
Fab 5C9 100 µg/ml solamente	235 ± 35
Fab 5C9 100 µg/ml + TSH	938 ± 93
Fab 5C9 10 µg/ml + TSH	1283 ± 239
F(ab') <sub>2</sub> 5C9 100 µg/ml solamente	204 ± 12
F(ab') <sub>2</sub> 5C9 100 µg/ml + TSH	877 ± 195
F(ab') <sub>2</sub> 5C9 10 µg/ml + TSH	916 ± 188
IgG 5C9 100 µg/ml solamente	237 ± 54
IgG 5C9 100 µg/ml + TSH	754 ± 177
IgG 5C9 10 µg/ml + TSH	247 ± 115

ES 2 523 217 T3

IgG 2G4 100 µg/ml + TSH	6082 <sup>1</sup>
Ejemplo 2	
Muestra	AMP cíclico (fmol/pocillo celular; media ± DT, n=3)
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	584 ± 111
TSH 3 ng/ml solamente	19363 ± 5198
IgG 2G4 100 µg/ml solamente	608 ± 169
IgG 2G4 100 µg/ml + TSH	18147 ± 972
IgG 2G4 10 µg/ml + TSH	18114 ± 6544
F(ab') <sub>2</sub> 5C9 100 µg/ml solamente	414 ± 22
F(ab') <sub>2</sub> 5C9 100 µg/ml + TSH	1058 ± 223
F(ab') <sub>2</sub> 5C9 10 µg/ml + TSH	1333 ± 443
IgG 5C9 100 µg/ml solamente	338 ± 108
IgG 5C9 100 µg/ml + TSH	1109 ± 375
IgG 5C9 10 µg/ml + TSH	723 ± 71
Fab 5C9 100 µg/ml solamente	212 ± 37
Fab 5C9 100 µg/ml + TSH	867 ± 127
Fab 5C9 10 µg/ml + TSH	4131 ± 776
<sup>1</sup> media de muestras por duplicado 2G4 = IgG de control (MAb humano para peroxidasa de tiroides). Las preparaciones de anticuerpo y TSH se diluyeron en tampón de ensayo de AMP cíclico.	

Tabla 2c

Efecto de IgG 5C9 e IgG 9D33 en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que expresan TSHR humano por TSH o Fab M22	
Muestra de ensayo	Producción de AMP cíclico (fmol/pocillo celular; media ± DT, n=3)
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	473 ± 21
pTSH 3 ng/ml solamente	12.270 ± 980
IgG 5C9 100 µg/ml solamente	426 ± 27
IgG 5C9 10 µg/ml solamente	360 ± 53
IgG 5C9 1 µg/ml solamente	376 ± 18
IgG 5C9 0,1 µg/ml solamente	404 ± 42
IgG 5C9 0,01 µg/ml solamente	578 ± 65
IgG 5C9 0,001 µg/ml solamente	554 ± 47
IgG 5C9 100 µg/ml + pTSH 3 ng/ml	1094 ± 70
IgG 5C9 10 µg/ml + pTSH 3 ng/ml	1028 ± 47
IgG 5C9 1 µg/ml + pTSH 3 ng/ml	1872 ± 168
IgG 5C9 0,1 µg/ml + pTSH 3 ng/ml	3920 ± 464
IgG 5C9 0,01 µg/ml + pTSH 3 ng/ml	15.050 ± 386
IgG 5C9 0,001 µg/ml + pTSH 3 ng/ml	14.147 ± 1,310
IgG 9D33 100 µg/ml solamente	626 ± 127
IgG 9D33 100 µg/ml + pTSH 3 ng/ml	2.218 ± 5
Fab M22 3 ng/ml solamente	9.432 ± 822
IgG 5C9 100 µg/ml + Fab M22 3 ng/ml	354 ± 56
IgG 5C9 10 µg/ml + Fab M22 3 ng/ml	638 <sup>1</sup> ± 190
IgG 5C9 1 µg/ml + Fab M22 3 ng/ml	956 ± 169
IgG 5C9 0,1 µg/ml + Fab M22 3 ng/ml	1.298 ± 134
IgG 5C9 0,01 µg/ml + Fab M22 3 ng/ml	9.978 ± 919
IgG 5C9 0,001 µg/ml + Fab M22 3 ng/ml	11.614 ± 393
IgG 9D33 100 µg/ml + Fab M22 3 ng/ml	1.048 ± 10
<sup>1</sup> media de muestras por duplicado 9D33 es un anticuerpo de ratón que bloquea la estimulación mediada tanto por TSH como por TRAb de la producción de AMP cíclico en células CHO que expresan el TSHR. Se diluyeron preparaciones de anticuerpo y TSH en tampón de ensayo de AMP cíclico.	

Tabla 3

Unión de <sup>125</sup> I-IgG 5C9, <sup>125</sup> I-TSH y <sup>125</sup> I-IgG M22 con tubos recubiertos con TSHR e inhibición por muestras de suero de pacientes			
Muestra de suero	Inhibición de la unión de <sup>125</sup> I-5C9 (%)	Inhibición de la unión de <sup>125</sup> I-TSH (%)	Inhibición de la unión de <sup>125</sup> I-M22 (%)
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
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
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

N1-10 = sueros de donantes de sangre sanos  
G1-G40 = sueros de pacientes con un historial de enfermedad de Graves

Los resultados son la media de determinaciones por duplicado en estrecho acuerdo.

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

ES 2 523 217 T3

en la que A = unión en presencia de suero de ensayo; B = unión en presencia de un grupo de sueros de donantes de sangre sanos (grupo de HBD).

5 <sup>125</sup>I-5C9 en presencia del grupo de HBD proporcionó 20 % de unión, <sup>125</sup>I-TSH en presencia del grupo de HBD proporcionó 12 % de unión y <sup>125</sup>I-M22 en presencia del grupo de HBD proporcionó 17 % de unión.

Tabla 4a

Comparación de la inhibición de la unión de <sup>125</sup> I-IgG 5C9, <sup>125</sup> I-TSH y <sup>125</sup> I-IgG M22 con tubos recubiertos con TSHR por suero de pacientes con actividad de bloqueo o estimulante			
Muestras de ensayo	Inhibición de la unión de <sup>125</sup> I-5C9 (%)	Inhibición de la unión de <sup>125</sup> I-TSH (%)	Inhibición de la unión de <sup>125</sup> I-M22 (%)
Calibradores de ensayo			
40 U/l	87	90	84,4
8 U/l	62	67	63,0
2 U/l	15	27	25,6
1 U/l	4,3	15	14,8
Suero de control positivo	34	35	38,7
Sueros de bloqueo			
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
B2			
1/5	92	91	86,6
1/10	85	85	79,5
1/20	NE	73	66,2
1/40	68	51	50,0
1/80	42	34	29,7
1/160	19	22	20,3
1/320	NE	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	NE	12	16,6
1/320	NE	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
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

ES 2 523 217 T3

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
Suero de estimulación 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

Tabla 4b

Muestras de ensayo	Inhibición de la unión de <sup>125</sup> I-5C9 (%)	Inhibición de la unión de <sup>125</sup> I-TSH (%)	Inhibición de la unión de <sup>125</sup> I-M22 (%)
Calibradores de ensayo			
40 U/l	87,2	90,4	82,2
8 U/l	62,0	67,2	63,3
2 U/l	21,3	22,0	27,9
1 U/l	15,0	13,0	21,8
Suero de control positivo	34,2	31,4	38,6
Grupo de HBD	6,2	-0,6	12,5
S2			
Puro	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			
Puro	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
B1-B5 son sueros de pacientes con altos niveles de TRAb con actividad antagonista (de bloqueo). B3 es suero del donante de linfocitos para 5C9 S1, S2 y S4 son sueros de pacientes con altos niveles de TRAb con actividad agonista (estimulante).			

- 5 Los calibradores de ensayo 40 U/l, 8 U/l, 2 U/l y 1 U/l son diluciones de IgG M22 en un grupo de sueros de donantes de sangre sanos (grupo de HBD) con actividades en U/l de NIBSC 90/672 evaluadas por la inhibición de la unión de TSH marcada con tubos recubiertos de TSHR.

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

- 10 en la que A = muestra de ensayo; B = grupo de HBD

NE = No Ensayado

1/5, 1/10, etc. indican el factor de dilución de sueros de ensayo en grupo de HBD, puro = suero no diluido

ES 2 523 217 T3

En presencia del grupo de HBD aproximadamente el 20 %, 17 % y 12 % del IgG M22, IgG 5C9 y TSH marcados con <sup>125</sup>I se unieron respectivamente con los tubos recubiertos con TSHR.

Tabla 5

Inhibición de la unión de TSH marcada con <sup>125</sup> I, <sup>125</sup> I-IgG M22 y <sup>125</sup> I-IgG 5C9 con tubos recubiertos con TSHR por diferentes concentraciones de MAb de ratón con el TSHR				
Muestra de ensayo		<sup>125</sup> I-TSH (% de inhib.)	<sup>125</sup> I-IgG M22 (% de inhib.)	<sup>125</sup> I-IgG 5C9 (% de inhib.)
IgG 5C9	100 µg/ml	50	53	65,5
IgG 5C9	10 µg/ml	30	22	42
IgG 5C9	1 µg/ml	21	14	27
IgG 5C9	0,1 µg/ml	8	6	10
IgG 5C9	0,01 µg/ml	2	5	0
IgG 7C71 <sup>1</sup>	100 µg/ml	65	68	82
IgG 7C71	10 µg/ml	55	64	65
IgG 7C71	1 µg/ml	47	58	53
IgG 7C71	0,1 µg/ml	28	37	17
IgG 7C71	0,01 µg/ml	8	14	5
IgG 10C31 <sup>1</sup>	100 µg/ml	68	69	76
IgG 10C31	10 µg/ml	56	71	62
IgG 10C31	1 µg/ml	52	62	54
IgG 10C31	0,1 µg/ml	39	48	36
IgG 10C31	0,01 µg/ml	15	24	8
IgG 2E71 <sup>1</sup>	100 µg/ml	51	63	60
IgG 2E71	10 µg/ml	41	62	52
IgG 2E71	1 µg/ml	35,5	59	48
IgG 2E71	0,1 µg/ml	30	43	32
IgG 2E71	0,01 µg/ml	14,5	15	17,5
IgG 3E71 <sup>1</sup>	100 µg/ml	49	51	65
IgG 3E71	10 µg/ml	37	51	50
IgG 3E71	1 µg/ml	37	45	40
IgG 3E71	0,1 µg/ml	21,5	28	21
IgG 3E71	0,01 µg/ml	12	15	3
IgG 14D3 <sup>1</sup>	100 µg/ml	57	62	63
IgG 14D3	10 µg/ml	52	60	50,5
IgG 14D3	1 µg/ml	37	37	35
IgG 14D3	0,1 µg/ml	12,5	15	10
IgG 14D3	0,01 µg/ml	4	3	1
IgG 16E5 <sup>1</sup>	100 µg/ml	48	53	59
IgG 16E5	10 µg/ml	44	51	53
IgG 16E5	1 µg/ml	39	40	47
IgG 16E5	0,1 µg/ml	26	22	34
IgG 16E5	0,01 µg/ml	9	12	20
IgG 17D2 <sup>1</sup>	100 µg/ml	56	49	55
IgG 17D2	10 µg/ml	43	39	43
IgG 17D2	1 µg/ml	24	24	26
IgG 17D2	0,1 µg/ml	7	13	11
IgG 17D2	0,01 µg/ml	3	1	3
IgG M22	100 µg/ml	95	95	88
IgG M22	10 µg/ml	95	94	89
IgG M22	1 µg/ml	94	93	87
IgG M22	0,1 µg/ml	77	79	72
IgG M22	0,01 µg/ml	22	32	24
IgG 9D33 <sup>2</sup>	100 µg/ml	69	61	70
IgG 9D33	10 µg/ml	65	60	60
IgG 9D33	1 µg/ml	55	48	48
IgG 9D33	0,1 µg/ml	31	27	29
IgG 9D33	0,01 µg/ml	8	13	13
IgG 2G4 <sup>3</sup>	100 µg/ml	3	3	6
IgG 2G4	10 µg/ml	3	4	10
IgG 2G4	1 µg/ml	0	0	8
IgG 2G4	0,1 µg/ml	4	6	4

ES 2 523 217 T3

IgG 2G4	0,01 µg/ml	0	0	0
IgG 2B4 <sup>4</sup>	100 µg/ml	88,5	30	72
IgG 2B4	10 µg/ml	85	19	48
IgG 2B4	1 µg/ml	82	9	42
IgG 2B4	0,1 µg/ml	56	12	23
IgG 2B4	0,01 µg/ml	13,5	1	8
IgG 8E3 <sup>4</sup>	100 µg/ml	82,5	27	65
IgG 8E3	10 µg/ml	72	18	42
IgG 8E3	1 µg/ml	53	8	23
IgG 8E3	0,1 µg/ml	17	0,5	9
IgG 8E3	0,01 µg/ml	5	0	0
IgG 4E2 <sup>4</sup>	100 µg/ml	76	24	32
IgG 4E2	10 µg/ml	74	21	32
IgG 4E2	1 µg/ml	57	15	20
IgG 4E2	0,1 µg/ml	25	2	11
IgG 4E2	0,01 µg/ml	4	1	5
IgG 1D5 <sup>4</sup>	100 µg/ml	77	26	26
IgG 1D5	10 µg/ml	72	20	20
IgG 1D5	1 µg/ml	55	8	13
IgG 1D5	0,1 µg/ml	23	0	3
IgG 1D5	0,01 µg/ml	4	0	0
IgG 7C4 <sup>4</sup>	100 µg/ml	78	24	51
IgG 7C4	10 µg/ml	76	22	35
IgG 7C4	1 µg/ml	72	22	36
IgG 7C4	0,1 µg/ml	38	7	19
IgG 7C4	0,01 µg/ml	9	6	6
IgG 3E6 <sup>4</sup>	100 µg/ml	84	46	55
IgG 3E6	10 µg/ml	79	31	40
IgG 3E6	1 µg/ml	71	16	29
IgG 3E6	0,1 µg/ml	28	5	9
IgG 3E6	0,01 µg/ml	3	0	6
IgG 1C52 <sup>4</sup>	100 µg/ml	64	22	30
IgG 1C52	10 µg/ml	39	9	15
IgG 1C52	1 µg/ml	22	5	15
IgG 1C52	0,1 µg/ml	5	4	11
IgG 1C52	0,01 µg/ml	0	2	10
IgG 7B72 <sup>4</sup>	100 µg/ml	88	32	39
IgG 7B72	10 µg/ml	77	21	27
IgG 7B72	1 µg/ml	50	14	22
IgG 7B72	0,1 µg/ml	16	2	13
IgG 7B72	0,01 µg/ml	8	1	4
IgG 8E2 <sup>5</sup>	100 µg/ml	52	52	32
IgG 8E2	10 µg/ml	24,5	24	12
IgG 8E2	1 µg/ml	8	3	1
IgG 8E2	0,1 µg/ml	13	1	8
IgG 8E2	0,01 µg/ml	0	0	13
IgG 18C5 <sup>6</sup>	100 µg/ml	57	50	51
IgG 18C5	10 µg/ml	17	14	24
IgG 18C5	1 µg/ml	3,5	2	17
IgG 18C5	0,1 µg/ml	3	0	13
IgG 18C5	0,01 µg/ml	0,7	0	14
IgG 2G2 <sup>7</sup>	100 µg/ml	0,1	0	11
IgG 2G2	10 µg/ml	3	0,6	10
IgG 2G2	1 µg/ml	6	1,5	12
IgG 2G2	0,1 µg/ml	2	0,2	9
IgG 2G2	0,01 µg/ml	2	1,4	11

<sup>1</sup>MAb de TSHR de ratón con actividad estimulante del tiroides

<sup>2</sup>MAb de TSHR de ratón que bloquea la estimulación mediada tanto por TSH como por TRAb de la producción de AMP cíclico (véase Tabla 2)

<sup>3</sup>MAb humano para MAb de peroxidasa de tiroides (control negativo)

<sup>4</sup>MAb de TSHR de ratón con actividad de bloqueo de TSH (reconoce un epítipo formado por los aminoácidos

de TSHR 381-385)  
<sup>5</sup>MAb de TSHR de ratón con actividad de bloqueo de TSH (reconoce un epítipo formado por los aminoácidos de TSHR 36-42)  
<sup>6</sup>MAb de TSHR de ratón con actividad de bloqueo de TSH (reconoce un epítipo formado por los aminoácidos de TSHR 246-260)  
<sup>7</sup>MAb de Tg de ratón (control negativo)

Los anticuerpos se diluyeron en un grupo de sueros de donantes de sangre sanos (grupo de HBD)

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

5

en la que A = % de unión en presencia de muestra de ensayo; B = % de unión en presencia de grupo de HBD.

En presencia del grupo de HBD, aproximadamente el 13 %, 24 % y 15 % de IgG 5C9, IgG M22 y TSH marcados con <sup>125</sup>I se unieron respectivamente con los tubos recubiertos con TSHR.

10

Tabla 6a

Efecto de IgG 5C9 en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que expresaban TSHR humano por TRAb en sueros de pacientes	
Experimento 1a	
Muestra de ensayo	AMP cíclico (fmol/pocillo celular media ± DT; n = 3)
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	378 ± 21
Grupo de HBD solamente	352 ± 38
Grupo de HBD + IgG 2G4	316 ± 54
Grupo de HBD + IgG 5C9	136 ± 46
T1 solamente	13734 ± 580
T1 + IgG 2G4	10928 ± 740
T1 + IgG 5C9	142 ± 4
T2 solamente	1716 ± 185
T2 + IgG 2G4	1362 ± 190
T2 + IgG 5C9	146 ± 4
T3 solamente	11722 ± 1280
T3 + IgG 2G4	11948 ± 3200
T3 + IgG 5C9	5660 ± 790
T4 solamente	6388 ± 820
T4 + IgG 2G4	6022 ± 710
T4 + IgG 5C9	188 ± 65
T5 solamente	3084 ± 990
T5 + IgG 2G4	2152 ± 240
T5 + IgG 5C9	152 ± 15
T6 solamente	14802 ± 1475
T6 + IgG 2G4	10878 ± 675
T6 + IgG 5C9	232 ± 25
Experimento 1b	
Muestra de ensayo	AMP cíclico (fmol/pocillo celular media ± DT; n = 3)
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	434 ± 52
Grupo de HBD solamente	518 ± 216
Grupo de HBD + IgG 2G4	378 ± 34
Grupo de HBD + IgG 5C9	178 ± 47
T7 solamente	7388 ± 1250
T7 + IgG 2G4	5696 ± 715
T7 + IgG 5C9	id
T8 solamente	1736 <sup>1</sup>
T8 + IgG 2G4	1392 <sup>1</sup>
T8 + IgG 5C9	id
T9 solamente	5052 <sup>1</sup>
T9 + IgG 2G4	5000 <sup>1</sup>
T9 + IgG 5C9	id

ES 2 523 217 T3

Experimento 1c	
Muestra	AMP cíclico (fmol/pocillo celular media $\pm$ DT; n = 3)
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	366 $\pm$ 316
Grupo de HBD solamente	646 $\pm$ 62
Grupo de HBD + IgG 2G4	496 $\pm$ 42
Grupo de HBD + IgG 5C9	294 $\pm$ 92
T13 solamente	4030 $\pm$ 1146
T13 + IgG 2G4	3330 $\pm$ 63
T13 + IgG 5C9	540 $\pm$ 36
T14 solamente	5490 $\pm$ 197
T14 + IgG 2G4	4470 $\pm$ 1867
T14 + IgG 5C9	510 $\pm$ 146
Tr15 solamente	2130 $\pm$ 387
T15 + IgG 2G4	2380 $\pm$ 320
T15 + IgG 5C9	id
T16 solamente	4990 $\pm$ 155
T16 + IgG 2G4	5270 $\pm$ 941
T16 + IgG 5C9	id
T17 solamente	4410 $\pm$ 470
T17 + IgG 2G4	4460 $\pm$ 288
T17 + IgG 5C9	id
T18 solamente	910 $\pm$ 126
T18 + IgG 2G4	830 $\pm$ 21
T18 + IgG 5C9	id
Experimento 1d	
Muestra	AMP cíclico (fmol/pocillo celular media $\pm$ DT; n = 3)
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	487 $\pm$ 75
Grupo de HBD solamente	285 $\pm$ 71
Grupo de HBD + IgG 2G4	311 $\pm$ 68
Grupo de HBD + IgG 5C9	108 $\pm$ 33
T11 solamente	4052 $\pm$ 233
T11 + IgG 2G4	4659 $\pm$ 1260
T11 + IgG 5C9	154 $\pm$ 33
T12 solamente	4058 $\pm$ 721
T12 + IgG 2G4	5556 $\pm$ 593
T12 + IgG 5C9	145 $\pm$ 24
id = indetectable <sup>1</sup> = determinación por duplicado El grupo de HBD es un grupo de suero de donante de sangre sano; se usó dilución 1:10 en tampón de ensayo de AMP cíclico en estos experimentos. T1-T9 y T11-T18 son sueros que estimulan la producción de AMP cíclico en células CHO que expresan el TSHR. T1-T9 y T11-T18 se ensayaron diluidos 1:10 en tampón de ensayo de AMP cíclico 2G4 es un anticuerpo monoclonal humano para peroxidasa de tiroides (control negativo). Se ensayaron IgG 2G4 e IgG 5C9 a 100 $\mu$ g/ml.	

Tabla 6b

Efectos de respuesta a dosis de IgG 5C9 e IgG 9D33 en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que expresan TSHR humano por TRAb en sueros de pacientes	
Experimento 2	
Muestras de ensayo	AMP cíclico (fmol/pocillo celular media $\pm$ DT; n = 3)
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	707 $\pm$ 147
Grupo de HBD solamente	503 $\pm$ 80
T1 solamente	20336 $\pm$ 1539
IgG 2G4 100 $\mu$ g/ml (IgG de control negativo) solamente	1207 $\pm$ 123

ES 2 523 217 T3

T1 + IgG 2G4 100 µg/ml	22078 ± 6 2546
T1 + IgG 2G4 10 µg/ml	18868 ± 1806
T1 + IgG 2G4 1 µg/ml	19025 ± 6 1450
T1 + IgG 2G4 0,1 µg/ml	16659 ± 1031
T1 + IgG 2G4 0,01 µg/ml	20876 ± 1887
T1 + IgG 2G4 0,001 µg/ml	18134 ± 2126
IgG 9D33 100 µg/ml solamente	721 ± 183
T1 + IgG 9D33 100 µg/ml	1061 ± 104
T1 + IgG 9D33 10 µg/ml	1464 ± 191
T1 + IgG 9D33 1 µg/ml	4990 ± 1670
T1 + IgG 9D33 0,1 µg/ml	17867 ± 2220
T1 + IgG 9D33 0,01 µg/ml	19943 ± 1834
T1 + IgG 9D33 0,001 µg/ml	21648 ± 502
IgG 5C9 100 µg/ml solamente	301 ± 38
T1 + IgG 5C9 100 µg/ml	724 ± 28
T1 + IgG 5C9 10 µg/ml	1119 ± 348
T1 + IgG 5C9 1 µg/ml	2428 ± 594
T1 + IgG 5C9 0,1 µg/ml	16152 ± 3577
T1 + IgG 5C9 0,01 µg/ml	20314 ± 279
T1 + IgG 5C9 0,001 µg/ml	16868 ± 912
<p>T1 es una muestra de suero de paciente que estimula la producción de AMP cíclico en células CHO que expresan el TSHR; se usó una dilución 1:10 en el tampón de ensayo de AMP cíclico en estos experimentos. 2G4 es un anticuerpo monoclonal humano para peroxidasa de tiroides (control negativo). 9D33 es un anticuerpo monoclonal de ratón para el TSHR que bloquea la producción de AMP cíclico estimulada tanto por TSH como por TRAb (véase Tabla 2).</p>	

Tabla 6c

Efectos de respuesta a dosis de IgG 5C9 en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que expresan TSHR humano por TRAb de sueros de pacientes	
Experimento 3	
Muestras de ensayo	AMP cíclico (fmol/pocillo celular media ± DT; n = 3)
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	757 ± 138
Grupo de HBD solamente	512 ± 76
T6 solamente	14216 ± 3985
IgG 9D33 100 µg/ml solamente	729 ± 31
T6 + IgG 9D33 100 µg/ml	1052 ± 702
T6 + IgG 9D33 10 µg/ml	2256 ± 1088
T6 + IgG 9D33 1 µg/ml	5447 ± 313
T6 + IgG 9D33 0,1 µg/ml	8700 ± 665

ES 2 523 217 T3

T6 + IgG 9D33 0,01 µg/ml	10290 ± 495
T6 + IgG 9D33 0,001 µg/ml	10296 <sup>1</sup>
IgG 5C9 100 µg/ml solamente	360 ± 38
T6 + IgG 5C9 100 µg/ml	295 ± 30
T6 + IgG 5C9 10 µg/ml	1027 ± 368
T6 + IgG 5C9 1 µg/ml	2368 ± 528
T6 + IgG 5C9 0,1 µg/ml	9533 ± 1679
T6 + IgG 5C9 0,01 µg/ml	13883 ± 1718
T6 + IgG 5C9 0,001 µg/ml	11843 ± 1241
<sup>1</sup> determinación individual Véase Tabla 6a y 6b para notas explicativas.	

Tabla 6d

Efectos de respuesta a dosis de IgG 5C9 en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que expresan TSHR humano por TRAb en sueros de pacientes	
Muestra	AMP cíclico (fmol/pocillo celular media ± DT; n = 3)
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	622 ± 79
Grupo de HBD solamente	479 ± 53
T3 solamente	14023 ± 2487
IgG 2G4 100 µg/ml solamente	745 ± 136
T3 + IgG 2G4 100 µg/ml	12086 ± 2613
T3 + IgG 2G4 10 µg/ml	12862 ± 250
T3 + IgG 2G4 1 µg/ml	12931 ± 891
T3 + IgG 2G4 0,1 µg/ml	13853 ± 1589
T3 + IgG 2G4 0,01 µg/ml	11939 ± 131
T3 + IgG 2G4 0,001 µg/ml	13650 ± 1679
IgG 9D33 100 µg/ml solamente	616 ± 111
T3 + IgG 9D33 100 µg/ml	1597 ± 323
T3 + IgG 9D33 10 µg/ml	4262 ± 367
T3 + IgG 9D33 1 µg/ml	7385 ± 554
T3 + IgG 9D33 0,1 µg/ml	11960 ± 1390
T3 + IgG 9D33 0,01 µg/ml	12178 ± 1676
T3 + IgG 9D33 0,001 µg/ml	12159 ± 2970
IgG 5C9 100 µg/ml solamente	212 ± 40
T3 + IgG 5C9 100 µg/ml	6136 ± 558
T3 + IgG 5C9 10 µg/ml	7806 ± 793

ES 2 523 217 T3

T3 + IgG 5C9 1 µg/ml	8075 ± 610
T3 + IgG 5C9 0,1 µg/ml	10414 ± 1094
T3 + IgG 5C9 0,01 µg/ml	13743 ± 1687
T3 + IgG 5C9 0,001 µg/ml	11641 ± 2168
Véase Tabla 6a y 6b para notas explicativas.	

Tabla 6e

Efectos de respuesta a dosis de IgG 5C9 en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que expresan TSHR humano por TRAb de sueros de pacientes	
Muestra	AMP cíclico (fmol/pocillo celular media ± DT; n = 3)
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	616 ± 161
Grupo de HBD solamente	312 ± 56
T19 solamente	6014 ± 280
IgG 2G4 100 µg/ml solamente	1058 ± 75
T19 + IgG 2G4 100 µg/ml	7142 ± 215
T19 + IgG 2G4 10 µg/ml	6182 ± 46
T19 + IgG 2G4 1 µg/ml	7280 ± 1052
T19 + IgG 2G4 0,1 µg/ml	7275 ± 145
T19 + IgG 2G4 0,01 µg/ml	6820 ± 729
T19 + IgG 2G4 0,001 µg/ml	7620 ± 870
IgG 9D33 100 µg/ml solamente	592 ± 168
T19 + IgG 9D33 100 µg/ml	550 ± 65
T19 + IgG 9D33 10 µg/ml	448 ± 76
T19 + IgG 9D33 1 µg/ml	404 ± 36
T19 + IgG 9D33 0,1 µg/ml	2394 <sup>1</sup>
T19 + IgG 9D33 0,01 µg/ml	5765 <sup>1</sup>
T19 + IgG 9D33 0,001 µg/ml	7088 ± 668
IgG 5C9 100 µg/ml solamente	186 <sup>2</sup>
T19 + IgG 5C9 100 µg/ml	220 ± 90
T19 + IgG 5C9 10 µg/ml	275 ± 150
T19 + IgG 5C9 1 µg/ml	187 ± 34
T19 + IgG 5C9 0,1 µg/ml	375 ± 129
T19 + IgG 5C9 0,01 µg/ml	5747 ± 411
T19 + IgG 5C9 0,001 µg/ml	6467 <sup>1</sup>
<sup>1</sup> media de muestras por duplicado	
<sup>2</sup> determinación individual	
Véase Tabla 6a y 6b para notas explicativas.	

Tabla 6f

Efectos de respuesta a dosis de IgG 5C9 en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que expresan TSHR humano por TRAb en sueros de pacientes	
Muestra	AMP cíclico (fmol/pocillo celular media $\pm$ DT; n = 3)
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	255 $\pm$ 40
Grupo de HBD solamente	200 $\pm$ 82
T20 solamente	4764 $\pm$ 732
IgG 2G4 100 $\mu$ g/ml solamente	835 $\pm$ 94
T20 + IgG 2G4 100 $\mu$ g/ml	6684 $\pm$ 931
T20 + IgG 2G4 10 $\mu$ g/ml	4571 $\pm$ 776
T20 + IgG 2G4 1 $\mu$ g/ml	5744 $\pm$ 727
T20 + IgG 2G4 0,1 $\mu$ g/ml	4323 $\pm$ 849
T20 + IgG 2G4 0,01 $\mu$ g/ml	6396 $\pm$ 1314
T20 + IgG 2G4 0,001 $\mu$ g/ml	6789 $\pm$ 893
IgG 9D33 100 $\mu$ g/ml solamente	382 $\pm$ 142
T20 + IgG 9D33 100 $\mu$ g/ml	287 $\pm$ 164
T20 + IgG 9D33 10 $\mu$ g/ml	204 $\pm$ 49
T20 + IgG 9D33 1 $\mu$ g/ml	980 <sup>1</sup>
T20 + IgG 9D33 0,1 $\mu$ g/ml	5362 $\pm$ 574
T20 + IgG 9D33 0,01 $\mu$ g/ml	5389 $\pm$ 1139
T20 + IgG 9D33 0,001 $\mu$ g/ml	7514 $\pm$ 785
IgG 5C9 100 $\mu$ g/ml solamente	224 $\pm$ 109
T20 + IgG 5C9 100 $\mu$ g/ml	NE
T20 + IgG 5C9 10 $\mu$ g/ml	NE
T20 + IgG 5C9 1 $\mu$ g/ml	181 <sup>1</sup>
T20 + IgG 5C9 0,1 $\mu$ g/ml	2184 $\pm$ 1078
T20 + IgG 5C9 0,01 $\mu$ g/ml	6486 $\pm$ 436
T20 + IgG 5C9 0,001 $\mu$ g/ml	4856 <sup>1</sup>
<sup>1</sup> media de muestras por duplicado NE = No Ensayado Véase Tabla 6a y 6b para notas explicativas.	

Tabla 6g

Efectos de respuesta a dosis de IgG 5C9 en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que expresan TSHR humano por TRAb en sueros de pacientes	
Muestra	AMP cíclico (fmol/pocillo celular media $\pm$ DT; n = 3)
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	466 $\pm$ 65
Grupo de HBD solamente	390 $\pm$ 118
T21 solamente	9781 $\pm$ 1672

ES 2 523 217 T3

IgG 2G4 100 µg/ml solamente	999 ± 55
T21 + IgG 2G4 100 µg/ml	10848 ± 373
T21 + IgG 2G4 10 µg/ml	10355 ± 469
T21 + IgG 2G4 1 µg/ml	10831 ± 140
T21 + IgG 2G4 0,1 µg/ml	12215 ± 793
T21 + IgG 2G4 0,01 µg/ml	13014 ± 855
T21 + IgG 2G4 0,001 µg/ml	10500 ± 162
IgG 9D33 100 µg/ml solamente	534 ± 89
T21 + IgG 9D33 100 µg/ml	442 ± 32
T21 + IgG 9D33 10 µg/ml	605 ± 254
T21 + IgG 9D33 1 µg/ml	1383 ± 66
T21 + IgG 9D33 0,1 µg/ml	8719 ± 389
T21 + IgG 9D33 0,01 µg/ml	10772 ± 799
T21 + IgG 9D33 0,001 µg/ml	10229 ± 714
IgG 5C9 100 µg/ml solamente	253 ± 25
T21 + IgG 5C9 100 µg/ml	210 ± 60
T21 + IgG 5C9 10 µg/ml	303 ± 107
T21 + IgG 5C9 1 µg/ml	418 ± 65
T21 + IgG 5C9 0,1 µg/ml	7483 ± 415
T21 + IgG 5C9 0,01 µg/ml	10441 ± 122
T21 + IgG 5C9 0,001 µg/ml	11281 ± 911
Véase Tabla 6a y 6b para notas explicativas.	

Tabla 7a

Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Lys58 mutada a Alanina. Efecto de diferentes diluciones de IgG 5C9			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media ± DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	315 ± 39	822 ± 52	260
TSH solamente	10730 ± 1737	13228 ± 1428	123
2G4 10 µg/ml + TSH	11707 ± 2291	12883 ± 2107	110
2G4 100 µg/ml + TSH	9640 ± 1664	10148 ± 3680	105
5C9 0,01 µg/ml + TSH	7341 ± 343	7913 ± 880	108
5C9 0,1 µg/ml + TSH	4635 ± 257	4815 <sup>1</sup>	104

ES 2 523 217 T3

5C9 1,0 µg/ml + TSH	918 ± 159	1794 ± 308	195
5C9 10 µg/ml + TSH	351 ± 187	955 ± 405	272
5C9 100 µg/ml + TSH	528 ± 363	1001 ± 306	190
5C9 100 µg/ml solamente	47 ± 15	<25	-
<sup>1</sup> media de determinaciones por duplicado concentración de pTSH = 3 ng/ml Todas las diluciones en tampón de ensayo de AMP cíclico 2G4 es un anticuerpo monoclonal humano para peroxidasa de tiroides (control negativo para 5C9).			

Tabla 7b

Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Ile60 mutada a Alanina. Efecto de diferentes diluciones de IgG 5C9			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media ± DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	470 ± 92	837 ± 78	114
TSH solamente	18654 <sup>1</sup>	22935 ± 2542	123
2G4 10 µg/ml + TSH	17555 <sup>1</sup>	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
5C9 100 µg/ml solamente	61 ± 8	260 ± 43	426
Véase Tabla 7a para notas explicativas.			

Tabla 7c

Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Arg80 mutada a Alanina. Efecto de diferentes diluciones de IgG 5C9			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media ± DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	775 ± 66	1165 ± 32	150
TSH solamente	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

ES 2 523 217 T3

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
5C9 100 µg/ml solamente	244 ± 92	494 ± 163	202
Véase Tabla 7a para notas explicativas.			

Tabla 7d

Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Arg80 mutada a ácido Aspártico. Efecto de diferentes diluciones de IgG 5C9			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media ± DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	548 ± 67	637 ± 96	116
TSH solamente	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 <sup>1</sup>	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
5C9 100 µg/ml solamente	300 ± 45	523 ± 3	174
Véase Tabla 7a para notas explicativas.			

Tabla 7e

Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Tyr80 mutada a Alanina. Efecto de diferentes diluciones de IgG 5C9			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media ± DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	557 ± 27	1219 ± 49	219
TSH solamente	12674 ± 234	15327 ± 2041	121
2G4 10 mg/ml + TSH	13587 ± 967	17585 <sup>1</sup>	129
2G4 100 mg/ml + TSH	13518 ± 894	15395 ± 1777	113
5C9 0,01 mg/ml + TSH	13902 ± 1970	15737 ± 1442	113

ES 2 523 217 T3

5C9 0,1 mg/ml + TSH	6250 ± 1143	12692 ± 3138	203
5C9 1,0 mg/ml + TSH	1600 ± 467	2955 ± 732	185
5C9 10 mg/ml + TSH	822 ± 99	1646 ± 308	200
5C9 100 mg/ml + TSH	978 ± 102	1028 ± 216	105
5C9 100 mg/ml solamente	289 ± 30	1427 ± 419	494
Véase Tabla 7a para notas explicativas.			

Tabla 7f

Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Thr104 mutada a Alanina. Efecto de diferentes diluciones de IgG 5C9			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media ± DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	590 ± 59	640 ± 95	108
TSH solamente	11294 ± 1307	14247 ± 3093	126
2G4 10 µg/ml + TSH	14255 ± 1410	13227 ± 1782	93
2G4 100 µg/ml + TSH	13422 ± 2337	15499 ± 2042	115
5C9 0,01 µg/ml + TSH	12307 ± 1080	11733 ± 422	95
5C9 0,1 µg/ml + TSH	7097 ± 79	9506 ± 738	134
5C9 1,0 µg/ml + TSH	3699 ± 391	6196 ± 1075	168
5C9 10 µg/ml + TSH	1796 ± 417	3094 ± 740	172
5C9 100 µg/ml + TSH	2218 ± 395	3110 ± 412	140
5C9 100 µg/ml solamente	195 ± 23	264 ± 102	135
Véase Tabla 7a para notas explicativas.			

Tabla 7g

Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Arg109 mutada a Alanina. Efecto de diferentes diluciones de IgG 5C9			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media ± DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	381 ± 28	675 ± 50	177
TSH solamente	13823 ± 5141	9769 ± 372	71
2G4 10 µg/ml + TSH	14428 ± 8959	9524 ± 1014	66
2G4 100 µg/ml + TSH	19307 ± 3130	8800 ± 631	46
5C9 0,01 µg/ml + TSH	10820 ± 1644	9651 ± 1066	89

ES 2 523 217 T3

5C9 0,1 µg/ml + TSH	4011 ± 1290	1719 ± 40	43
5C9 1,0 µg/ml + TSH	1206 ± 88	827 ± 157	69
5C9 10 µg/ml + TSH	706 ± 282	827 ± 147	117
5C9 100 µg/ml + TSH	1230 ± 120	561 ± 164	46
5C9 100 µg/ml solamente	228 ± 45	335 ± 14	147
Véase Tabla 7a para notas explicativas.			

Tabla 7h

Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Lys129 mutada a Alanina. Efecto de diferentes diluciones de IgG 5C9			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media ± DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	370 ± 97	590 ± 17	159
TSH solamente	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 <sup>1</sup>	2039
5C9 100 µg/ml + TSH	491 ± 73	15929 ± 1228	3244
5C9 100 µg/ml solamente	107 ± 18	217 ± 36	203
Véase Tabla 7a para notas explicativas.			

Tabla 7i

Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Phe134 mutada a Alanina. Efecto de diferentes diluciones de IgG 5C9			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media ± DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	347 ± 88	867 ± 129	250
TSH solamente	17641 ± 2133	15497 ± 1691	88
2G4 10 µg/ml + TSH	13759 ± 116	17235 ± 1602	125
2G4 100 µg/ml + TSH	11224 ± 4039	16213 ± 1948	144
5C9 0,01 µg/ml + TSH	13584 ± 1268	15872 ± 1140	117

ES 2 523 217 T3

5C9 0,1 µg/ml + TSH	8702 ± 1542	6368 ± 778	73
5C9 1,0 µg/ml + TSH	4542 ± 104	1944 ± 838	43
5C9 10 µg/ml + TSH	2394 ± 44	1058 ± 189	44
5C9 100 µg/ml + TSH	1393 ± 128	1069 ± 65	77
5C9 100 µg/ml solamente	212 ± 6	337 ± 60	159
Véase Tabla 7a para notas explicativas.			

Tabla 7j

Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Asp151 mutada a Alanina. Efecto de diferentes diluciones de IgG 5C9			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media ± DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	508 ± 341	1236 ± 88	243
TSH solamente	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
5C9 100 mg/ml solamente	176 ± 49	395 ± 42	224
Véase Tabla 7a para notas explicativas.			

Tabla 7k

Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Asp151 mutada a Arginina. Efecto de diferentes diluciones de IgG 5C9			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media ± DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	703 ± 107	768 ± 82	109
TSH solamente	11131 ± 3208	19990 ± 458	180
2G4 10 µg/ml + TSH	15927 ± 2244	18846 ± 3293	118
2G4 100 µg/ml + TSH	13643 ± 3195	21275 ± 1580	156
5C9 0,01 µg/ml + TSH	12351 ± 5559	18254 ± 1877	148

ES 2 523 217 T3

5C9 0,1 µg/ml + TSH	6694 ± 3111	10561 ± 1025	158
5C9 1,0 µg/ml + TSH	2754 ± 166	2591 ± 472	94
5C9 10 µg/ml + TSH	1217 <sup>1</sup>	1609 ± 69	132
5C9 100 µg/ml + TSH	1572 ± 515	2330 ± 273	148
5C9 100 µg/ml solamente	260 ± 156	409 ± 88	157
Véase Tabla 7a para notas explicativas.			

Tabla 7l

Producción de AMP cíclico inducida por M22 en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Asp160 mutada a Lisina. Efecto de diferentes diluciones de IgG 5C9			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media ± DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	787 ± 119	1252 ± 274	159
M22 solamente	16750 ± 1515	14288 ± 1260	85
2G4 10 µg/ml + M22	16188 ± 1463	15476 ± 468	96
2G4 100 µg/ml + M22	15505 ± 2665	12638 ± 819	82
5C9 0,01 µg/ml + M22	16719 ± 541	15239 ± 445	91
5C9 0,1 µg/ml + M22	9385 ± 4006	7704 ± 703	82
5C9 1,0 µg/ml + M22	821 ± 268	963 ± 204	117
5C9 10 µg/ml + M22	208 ± 89	642 ± 386	309
5C9 100 µg/ml + M22	301 ± 182	657 ± 87	218
5C9 100 µg/ml solamente	429 ± 49	458 ± 8	107
M22 solamente (determinación repetida)	16702 ± 2170	18892 ± 2113	113
concentración de M22 = 3 ng/ml			

Véase Tabla 7a para otras notas explicativas.

5

Tabla 7m

Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Lys183 mutada a Alanina. Efecto de diferentes diluciones de IgG 5C9			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media ± DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	642 ± 34	1153 ± 236	180
TSH solamente	22385 ± 532	20210 ± 1366	90
2G4 10 µg/ml + TSH	20148 ± 2625	23254 ± 3027	115

ES 2 523 217 T3

Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Lys183 mutada a Alanina. Efecto de diferentes diluciones de IgG 5C9			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media $\pm$ DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
2G4 100 $\mu$ g/ml + TSH	19926'	22442 $\pm$ 2489	113
5C9 0,01 $\mu$ g/ml + TSH	17974 <sup>1</sup>	23284 $\pm$ 2243	130
5C9 0,1 $\mu$ g/ml + TSH	11499 $\pm$ 892	24289 $\pm$ 720	211
5C9 1,0 $\mu$ g/ml + TSH	3489 $\pm$ 606	14586 $\pm$ 155	418
5C9 10 $\mu$ g/ml + TSH	1234 $\pm$ 357	7568 $\pm$ 605	618
5C9 100 $\mu$ g/ml + TSH	1456 $\pm$ 838	11448 $\pm$ 933	786
5C9 100 $\mu$ g/ml solamente	384 $\pm$ 19	747 $\pm$ 230	195
Véase Tabla 7a para notas explicativas.			

Tabla 7n

Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Lys183 mutada a ácido Aspártico. Efecto de diferentes diluciones de IgG 5C9			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media $\pm$ DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	486 $\pm$ 151	737 $\pm$ 54	152
TSH solamente	14730 $\pm$ 1647	17668 $\pm$ 597	120
2G4 10 $\mu$ g/ml + TSH	14234 $\pm$ 1097	17133 $\pm$ 2281	120
2G4 100 $\mu$ g/ml + TSH	14737 $\pm$ 1905	16071 $\pm$ 1188	109
5C9 0,01 $\mu$ g/ml + TSH	12911 $\pm$ 2357	20614 $\pm$ 2552	160
5C9 0,1 $\mu$ g/ml + TSH	8577 $\pm$ 615	17344 $\pm$ 2898	202
5C9 1,0 $\mu$ g/ml + TSH	3424 $\pm$ 135	12655 $\pm$ 835	370
5C9 10 $\mu$ g/ml + TSH	1114 $\pm$ 112	6587 $\pm$ 1480	591
5C9 100 $\mu$ g/ml + TSH	1720 $\pm$ 119	9007 $\pm$ 1295	524
5C9 100 $\mu$ g/ml solamente	<12,5	54 $\pm$ 8	-
Véase Tabla 7a para notas explicativas.			

ES 2 523 217 T3

Tabla 7o

Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Gln235 mutada a Alanina. Efecto de diferentes diluciones de IgG 5C9			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media $\pm$ DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	478 $\pm$ 94	713 $\pm$ 52	149
TSH solamente	14882 $\pm$ 944	15844 $\pm$ 922	106
2G4 10 $\mu$ g/ml + TSH	17754 $\pm$ 3150	18900 $\pm$ 3098	106
2G4 100 $\mu$ g/ml + TSH	12991 <sup>1</sup>	18598 $\pm$ 2708	143
5C9 0,01 $\mu$ g/ml + TSH	7181 $\pm$ 618	17535 $\pm$ 3692	244
5C9 0,1 $\mu$ g/ml + TSH	7784 $\pm$ 1111	7437 $\pm$ 1183	96
5C9 1,0 $\mu$ g/ml + TSH	2545 $\pm$ 471	2416 $\pm$ 423	95
5C9 10 $\mu$ g/ml + TSH	532 $\pm$ 65	1023 $\pm$ 400	192
5C9 100 $\mu$ g/ml + TSH	747 $\pm$ 114	727 $\pm$ 168	97
5C9 100 $\mu$ g/ml solamente	119 $\pm$ 28	256 $\pm$ 86	215
Véase Tabla 7a para notas explicativas.			

Tabla 7p

Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Arg255 mutada a Alanina. Efecto de diferentes diluciones de IgG 5C9			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media $\pm$ DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	538 $\pm$ 12	797 $\pm$ 113	148
TSH solamente	14362 $\pm$ 3305	15143 $\pm$ 2093	106
2G4 10 $\mu$ g/ml + TSH	14444 $\pm$ 3161	19042 $\pm$ 1085	132
2G4 100 $\mu$ g/ml + TSH	16810 $\pm$ 3461	17710 $\pm$ 4886	105
5C9 0,01 $\mu$ g/ml + TSH	6624 $\pm$ 1236	8124 $\pm$ 395	123
5C9 0,1 $\mu$ g/ml + TSH	3788 $\pm$ 838	4137 $\pm$ 537	109
5C9 1,0 $\mu$ g/ml + TSH	966 $\pm$ 150	1941 $\pm$ 113	201
5C9 10 $\mu$ g/ml + TSH	867 $\pm$ 100	692 $\pm$ 152	80
5C9 100 $\mu$ g/ml + TSH	1013 $\pm$ 247	809 $\pm$ 248	80
5C9 100 $\mu$ g/ml solamente	32 <sup>1</sup>	248 $\pm$ 94	775
Véase Tabla 7a para notas explicativas.			

Tabla 7q

Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Arg255 mutada a ácido Aspártico. Efecto de diferentes diluciones de IgG 5C9			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media $\pm$ DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	620 $\pm$ 33	616 <sup>1</sup>	99
TSH solamente	17531 $\pm$ 1730	18081 $\pm$ 2439	103
2G4 10 $\mu$ g/ml + TSH	19870 $\pm$ 2766	15519 $\pm$ 702	78
2G4 100 $\mu$ g/ml + TSH	18265 $\pm$ 1999	19638 $\pm$ 1505	108
5C9 0,01 $\mu$ g/ml + TSH	17518 $\pm$ 2407	15654 $\pm$ 148	89
5C9 0,1 $\mu$ g/ml + TSH	6604 $\pm$ 1552	5583 $\pm$ 655	85
5C9 1,0 $\mu$ g/ml + TSH	3375 $\pm$ 227	1932 $\pm$ 677	57
5C9 10 $\mu$ g/ml + TSH	1244 $\pm$ 565	735 $\pm$ 9	59
5C9 100 $\mu$ g/ml + TSH	1506 $\pm$ 151	1414 $\pm$ 568	94
5C9 100 $\mu$ g/ml solamente	278 $\pm$ 125	559 $\pm$ 97	201
Véase Tabla 7a para notas explicativas.			

Tabla 7r

Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Trp258 mutada a Alanina. Efecto de diferentes diluciones de IgG 5C9			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media $\pm$ DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	354 $\pm$ 28	382 $\pm$ 55	108
TSH solamente	21023 $\pm$ 2104	7095 $\pm$ 1086	33
2G4 10 $\mu$ g/ml + TSH	19564 $\pm$ 1076	7070 $\pm$ 148	36
2G4 100 $\mu$ g/ml + TSH	21591 $\pm$ 2652	6066 $\pm$ 336	28
5C9 0,01 $\mu$ g/ml + TSH	19471 $\pm$ 1456	6619 $\pm$ 511	34
5C9 0,1 $\mu$ g/ml + TSH	10455 $\pm$ 1968	1944 $\pm$ 168	19
5C9 1,0 $\mu$ g/ml + TSH	2616 $\pm$ 118	1127 $\pm$ 24	43
5C9 10 $\mu$ g/ml + TSH	1192 $\pm$ 253	357 $\pm$ 11	30
5C9 100 $\mu$ g/ml + TSH	1316 $\pm$ 283	484 $\pm$ 247	37
5C9 100 $\mu$ g/ml solamente	211 6 35	423 $\pm$ 109	200
Véase Tabla 7a para notas explicativas.			

ES 2 523 217 T3

Tabla 7s

Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Ser281 mutada a Alanina. Efecto de diferentes diluciones de IgG 5C9			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media $\pm$ DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	496 $\pm$ 72	1094 $\pm$ 132	221
TSH solamente	13562 $\pm$ 3416	26450 <sup>1</sup>	195
2G4 10 $\mu$ g/ml + TSH	16805 $\pm$ 1139	25086 $\pm$ 1730	149
2G4 100 $\mu$ g/ml + TSH	14334 $\pm$ 860	27672 $\pm$ 3549	193
5C9 0,01 $\mu$ g/ml + TSH	13791 $\pm$ 3221	28966 $\pm$ 3443	210
5C9 0,1 $\mu$ g/ml + TSH	9071 $\pm$ 1696	15560 $\pm$ 5836	172
5C9 1,0 $\mu$ g/ml + TSH	3732 $\pm$ 514	3550 $\pm$ 725	95
5C9 10 $\mu$ g/ml + TSH	802 $\pm$ 215	1551 $\pm$ 545	193
5C9 100 $\mu$ g/ml + TSH	1078 $\pm$ 158	1601 $\pm$ 720	149
5C9 100 $\mu$ g solamente	201 $\pm$ 41	78 $\pm$ 188	391
Véase Tabla 7a para notas explicativas.			

Tabla 8

Comparación de los resultados de ensayo de TRAb de suero obtenidos con ELISA basados en la inhibición de la unión de TSH-biotina o la unión de IgG 5C9-biotina						
Muestras de ensayo	Ensayo de referencia de TSH-biotina			Ensayo de IgG 5C9-biotina		
	Abs 450 nm	% de inhibición	Concentración (U/l)	Abs 450 nm	% de inhibición	Concentración (U/l)
Control de ensayo negativo	2,143	0	0	2,421	0	0
Calibradores de ensayo						
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
Control de ensayo positivo	1,273	41	3,22	1,344	44	3,28
Sueros de pacientes						
A	2,122	1	0,14	2,209	9	0,44
B	1,081	50	4,24	1,029	58	4,54

ES 2 523 217 T3

C	0,225	90	26,03	0,173	93	18,4
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
Sueros de donantes de sangre sanos						
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

Los calibradores de ensayo 40 U/l, 8 U/l, 2 U/l y 1 U/l son diluciones de IgG M22 en un grupo de sueros de donantes de sangre sanos (grupo de HBD) con actividades en U/l de NIBSC 90/672 evaluadas por inhibición de la unión de TSH marcada con tubos recubiertos de TSHR.  
El control de ensayo negativo es un grupo de HBD.

Tabla 9

Efectos de IgG 5C9 en la estimulación de TSHR por MAB de ratón estimulantes del tiroides (mTSMAB)			
	Concentración de AMP cíclico (media de pmol/ml $\pm$ DT; n = 3) en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre después de la adición de TSMAB y:-		
Muestra de ensayo <sup>a</sup>	Tampón solamente	IgG 5C9 100 $\mu$ g/ml	IgG 2G4 <sup>b</sup> 100 $\mu$ g/ml
TSMAB 1 1 $\mu$ g/ml	18,94 $\pm$ 7,4	1,24 $\pm$ 0,07	16,5 $\pm$ 1,1
TSMAB 2 1 $\mu$ 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
Tampón solamente	3,39 $\pm$ 1,35	1,56 $\pm$ 1,84	4,32 $\pm$ 0,95

<sup>a</sup>dilución en tampón de ensayo de AMP cíclico  
<sup>b</sup>2G4 es un autoanticuerpo monoclonal humano de control para peroxidasa de tiroides.

Tabla 10

Efecto de IgG 5C9 en la estimulación de TSHR por diferentes preparaciones de TSH Experimento 1	
Muestra de ensayo diluida en tampón de ensayo de AMP cíclico	Concentración de AMP cíclico (pmol/ml media $\pm$ DT; n = 3) en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre
Tampón solamente	0,37 $\pm$ 0,15
TSH humana nativa 100 ng/ml solamente	36,14 $\pm$ 1,83
TSH humana nativa 100 ng/ml e IgG 5C9 0,001 $\mu$ g/ml.	36,0 $\pm$ 6,1
TSH humana nativa 100 ng/ml e IgG 5C9 0,01 $\mu$ g/ml	18,0 $\pm$ 5,4
TSH humana nativa 100 ng/ml e IgG 5C9 0,1 $\mu$ g/ml	0,20 $\pm$ 0,06
TSH humana nativa 100 ng/ml e IgG 5C9 1,0 $\mu$ g/ml	0,14 $\pm$ 0,02
TSH humana nativa 100 ng/ml e IgG 5C9 10 $\mu$ g/ml	0,11 $\pm$ 0,04
TSH humana nativa 100 ng/ml e IgG 5C9 100 $\mu$ g/ml	0,16 $\pm$ 0,03
TSH humana recombinante 100 ng/ml solamente	12,73 $\pm$ 4,0
TSH humana recombinante 100 ng/ml e IgG 5C9 0,001 $\mu$ g/ml.	13,63 $\pm$ 1,7
TSH humana recombinante 100 ng/ml e IgG 5C9 0,01 $\mu$ g/ml	8,13 $\pm$ 2,13
TSH humana recombinante 100 ng/ml e IgG 5C9 0,1 $\mu$ g/ml	0,12 $\pm$ 0,06
TSH humana recombinante 100 ng/ml e IgG 5C9 1,0 $\mu$ g/ml	0,10 $\pm$ 0,03
TSH humana recombinante 100 $\mu$ g/ml e IgG 5C9 10 $\mu$ g/ml	0,12 $\pm$ 0,05
TSH humana recombinante 100 ng/ml e IgG 5C9 100 $\mu$ g/ml	0,19 $\pm$ 0,08
Experimento 2	
Muestra de ensayo diluida en tampón de ensayo de AMP cíclico	Concentración de AMP cíclico (pmol/ml media $\pm$ DT; n = 3) en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre
Tampón solamente	0,18 $\pm$ 0,08
TSH 100 humana nativa ng/ml solamente	40,8 $\pm$ 6,92
TSH humana nativa 100 ng/ml e IgG 5C9 0,001 $\mu$ g/ml,	37,6 $\pm$ 6,35
TSH humana nativa 100 ng/ml e IgG 5C9 0,01 $\mu$ g/ml	34,4 $\pm$ 2,28
TSH humana nativa 100 ng/ml e IgG 5C9 0,1 $\mu$ g/ml	15,8 $\pm$ 1,39

ES 2 523 217 T3

TSH humana nativa 100 ng/ml e IgG 5C9 1,0 µg/ml	0,13 ± 0,03
TSH humana nativa 100 ng/ml e IgG 5C9 10 µg/ml	0,18 ± 0,05
TSH humana nativa 100 ng/ml e IgG 5C9 100 µg/ml	0,21 ± 0,10
TSH humana recombinante 100 ng/ml solamente	16,72 ± 2,90
TSH humana recombinante 100 ng/ml e IgG 5C9 0,001 µg/ml,	20,0 ± 1,73
TSH humana recombinante 100 ng/ml e IgG 5C9 0,01 µg/ml	20,6 ± 1,57
TSH humana recombinante 100 ng/ml e IgG 5C9 0,1 µg/ml	7,39 ± 1,74
TSH 100 humana recombinante ng/ml e IgG 5C9 1,0 µg/ml	0,07 ± 0,01
TSH humana recombinante 100 ng/ml e IgG 5C9 10 mg/ml	0,07 ± 0,01
TSH humana recombinante 100 ng/ml e IgG 5C9 100 µg/ml	0,11 ± 0,03
TSH porcina nativa 0,3 ng/ml solamente	40,2 ± 4,0
TSH porcina nativa 0,3 ng/ml e IgG 5C9 0,001 µg/ml,	32,7 ± 4,0
TSH porcina nativa 0,3 ng/ml e IgG 5C9 0,01 µg/ml	28,2 ± 2,04
TSH porcina nativa 0,3 ng/ml e IgG 5C9 0,1 µg/ml	18,0 ± 1,36
TSH nativa porcina 0,3 ng/ml e IgG 5C9 1,0 µg/ml	2,14 ± 0,85
TSH porcina nativa 0,3 ng/ml e IgG 5C9 10 µg/ml	0,20 ± 0,14
TSH porcina nativa 0,3 ng/ml e IgG 5C9 100 µg/ml	0,18 ± 0,13
Experimento 3	
<b>Muestra de ensayo diluida en tampón de ensayo de AMP cíclico</b>	<b>Concentración de AMP cíclico (pmol/ml media ± DT; n = 3) en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre</b>
Tampón solamente	2,0 ± 0,8
TSH humana nativa 100 ng/ml solamente	31,1 ± 2,55
TSH humana nativa 100 ng/ml e IgG 5C9 0,001 µg/ml,	36,0 ± 3,27
TSH humana nativa 100 ng/ml e IgG 5C9 0,01 µg/ml	28,4 ± 3,55
TSH humana nativa 100 ng/ml e IgG 5C9 0,1 µg/ml	7,22 ± 3,20

ES 2 523 217 T3

TSH humana nativa 100 ng/ml e IgG 5C9 1,0 µg/ml	0,67 ± 0,46
TSH humana nativa 100 ng/ml e IgG 5C9 10 µg/ml	0,8 ± 0,45
TSH humana nativa 100 ng/ml e IgG 5C9 100 µg/ml	1,35 ± 1,0
TSH humana recombinante 100 ng/ml solamente	26,4 ± 3,53
TSH humana recombinante 100 ng/ml e IgG 5C9 0,001 mg/ml,	25,6 ± 2,45
TSH humana recombinante 100 ng/ml e IgG 5C9 0,01 mg/ml	22,9 ± 7,4
TSH humana recombinante 100 ng/ml e IgG 5C9 0,1 mg/ml	1,18 ± 0,49
TSH humana recombinante 100 ng/ml e IgG 5C9 1,0 µg/ml	0,81 ± 0,05
TSH humana recombinante 100 ng/ml e IgG 5C9 10 µg/ml	0,74 ± 0,42
TSH humana recombinante 100 ng/ml e IgG 5C9 100 µg/ml	0,88 ± 0,55
TSH porcina nativa 0,3 ng/ml solamente	35,7 ± 4,82
TSH porcina nativa 0,3 ng/ml e IgG 5C9 0,001 µg/ml,	38,2 ± 2,54
TSH porcina nativa 0,3 ng/ml e IgG 5C9 0,01 µg/ml	26,6 ± 3,22
TSH porcina nativa 0,3 ng/ml e IgG 5C9 0,1 µg/ml	10,1 ± 1,79
TSH porcina nativa 0,3 ng/ml e IgG 5C9 1,0 µg/ml	2,28 ± 0,71
TSH porcina nativa 0,3 ng/ml e IgG 5C9 10 µg/ml	0,68 ± 0,21
TSH porcina nativa 0,3 ng/ml e IgG 5C9 100 µg/ml	1,03 ± 0,63

Tabla 11a

Efectos de IgG 5C9 e IgG 9D33 en la actividad constitutiva de TSHR con una mutación activadora S281I	
Muestra de ensayo diluida en tampón de ensayo de AMP cíclico	Concentración de AMP cíclico (pmol/ml media ± DT; n = 3) en células CHO que expresan TSHR S281I
Tampón solamente	9,90 ± 1,51
IgG 2G4 <sup>a</sup> 0,001 µg/ml	6,83 ± 0,37
IgG 2G4 0,01 µg/ml	7,74 ± 0,78
IgG 2G4 0,1 µg/ml	8,58 ± 1,12
IgG 2G4 1 µg/ml	8,37 ± 1,10
IgG 5C9 0,001 µg/ml	4,31 ± 0,16

ES 2 523 217 T3

IgG 5C9 0,01 µg/ml	4,17 ± 0,60
IgG 5C9 0,1 µg/ml	3,20 ± 0,63
IgG 5C9 1 µg/ml	3,44 ± 0,63
IgG 9D33 0,001 µg/ml	5,97 ± 0,94
IgG 9D33 0,01 µg/ml	9,27 ± 1,4
IgG 9D33 0,1 µg/ml	8,13 ± 0,72
IgG 9D33 1 µg/ml	7,33 ± 1,17
<sup>a</sup> 2G4 es un anticuerpo monoclonal humano de control para peroxidasa de tiroides.	

Tabla 11b

Efecto de IgG 5C9 e IgG 9D33 en la actividad constitutiva de TSHR con una mutación activadora I568T	
Muestra de ensayo diluida en tampón de ensayo de AMP cíclico	Concentración de AMP cíclico (pmol/ml media ± DT; n = 3) en células CHO que expresan TSHR I568T
Tampón solamente	21,39 ± 5,31
IgG 2G4 0,001 µg/ml	19,13 ± 2,77
IgG 2G4 0,01 µg/ml	16,67 ± 1,87
IgG 2G4 0,1 µg/ml	19,92 ± 0,91
IgG 2G4 1 µg/ml	20,52 ± 0,95
IgG 5C9 0,001 µg/ml	18,81 ± 1,39
IgG 5C9 0,01 µg/ml	9,24 ± 0,83
IgG 5C9 0,1 µg/ml	6,02 ± 1,93
IgG 5C9 1 µg/ml	5,29 ± 0,75
IgG 9D33 0,001 µg/ml	16,58 ± 0,00
IgG 9D33 0,01 µg/ml	17,03 ± 2,36
IgG 9D33 0,1 µg/ml	19,96 ± 1,66
IgG 9D33 1 µg/ml	21,65 ± 1,99

Tabla 11c

Efecto de IgG 5C9 e IgG 9D33 en la actividad constitutiva de TSHR con una mutación activadora A623I	
Muestra de ensayo diluida en tampón de ensayo de AMP cíclico	Concentración de AMP cíclico (pmol/ml media ± DT; n = 3) en células CHO que expresan TSHR A623I
Tampón solamente	36,89 <sup>a</sup>
IgG 2G4 0,001 µg/ml	28,46 ± 2,31
IgG 2G4 0,01 µg/ml	33,44 ± 1,12
IgG 2G4 0,1 µg/ml	30,40 ± 7,93

ES 2 523 217 T3

IgG 2G4 1 µg/ml	28,96 ± 2,29
IgG 5C9 0,001 µg/ml	26,52 ± 1,33
IgG 5C9 0,01 µg/ml	27,03 ± 2,13
IgG 5C9 0,1 µg/ml	19,79 ± 0,48
IgG 5C9 1 µg/ml	16,43 ± 1,27
IgG 9D33 0,001 µg/ml	29,55 ± 3,15
IgG 9D33 0,01 µg/ml	27,64 ± 3,49
IgG 9D33 0,1 µg/ml	31,78 ± 9,18
IgG 9D33 1 µg/ml	40,09 ± 7,73
<sup>a</sup> determinación por duplicado	

Tabla 12

Efectos de 5C9 más 9D33 en el bloqueo de la estimulación por pTSH de la producción de AMP cíclico en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre	
Experimento 1	
<b>Muestra de ensayo en tampón de ensayo de AMP cíclico</b>	<b>Concentración de AMP cíclico (pmol/ml media ± DT; n = 3)</b>
Tampón solamente	1,9 ± 1,0
TSH 3 ng/ml	48,5 ± 14
9D33 10 µg/ml	2,9 ± 1,0
5C9 10 µg/ml	0,45 ± 0,31
9D33 10 µg/ml + 5C9 10 µg/ml	1,12 ± 0,4
9D33 10 µg/ml + TSH	23,8 ± 8,7
5C9 10 µg/ml + TSH	3,7 ± 2,7
9D33 10 µg/ml + 5C9 10 µg/ml + TSH	4,9 (n = 2)
9D33 1 µg/ml + TSH	28,7 ± 1,8
5C9 1 µg/ml + TSH	13,9 ± 3,1
9D33 1 µg/ml + 5C9 1 µg/ml + TSH	12,6 ± 2,5
Experimento 2	
<b>Muestra de ensayo en tampón de ensayo de AMP cíclico</b>	<b>Concentración de AMP cíclico (pmol/ml media ± DT; n = 3)</b>
Tampón solamente	0,72 ± 0,63
TSH 3 ng/ml	34,3 ± 3,1

ES 2 523 217 T3

9D33 10 µg/ml	1,6 ± 1,3
5C9 10 µg/ml	0,4 ± 0,4
9D33 10 µg/ml + 5C9 10 µg/ml	0,03 (n = 1)
9D33 10 µg/ml + TSH	9,5 ± 1,7
5C9 10 µg/ml + TSH	3,1 ± 1,0
9D33 10 µg/ml + 5C9 10 µg/ml + TSH	3,3 ± 2,0
9D33 1 mg/ml + TSH	19,0 ± 3,2
5C9 1 mg/ml + TSH	6,1 ± 0,6
9D33 1 mg/ml + 5C9 1 mg/ml + TSH	5,9 ± 0,6
Experimento 3	
<b>Muestra de ensayo en el tampón de ensayo de AMP cíclico</b>	<b>Concentración de AMP cíclico (pmol/ml media ± DT; n = 3)</b>
Tampón solamente	0,99 ± 0,03
TSH 3 ng/ml	51,3 ± 5,0
9D33 100 µg/ml	1,14 ± 0,13
5C9 100 µg/ml	0,50 ± 0,04
9D33 100 µg/ml + 5C9 100 µg/ml	0,66 ± 0,9
9D33 100 µg/ml + TSH	10,53 ± 0,84
5C9 100 µg/ml + TSH	1,4 ± 0,18
9D33 100 µg/ml + 5C9 100 µg/ml + TSH	1,3 ± 0,36
9D33 10 µg/ml + TSH	13,5 ± 2,9
5C9 10 µg/ml + TSH	1,9 ± 1,1
9D33 10 µg/ml + 5C9 10 µg/ml + TSH	1,2 ± 0,1
9D33 1 µg/ml + TSH	27,8 ± 2,2
5C9 1 µg/ml + TSH	5,4 ± 1,8
9D33 1 µg/ml + 5C9 1 µg/ml + TSH	5,2 ± 0,3
9D33 0,1 µg/ml + TSH	35,1 ± 2,3
5C9 0,1 µg/ml + TSH	18,7 ± 3,4
9D33 0,1 µg/ml + 5C9 0,1 mg/ml + TSH	14,4 ± 1,0

ES 2 523 217 T3

9D33 0,01 µg/ml + TSH	47,1 ± 1,9
5C9 0,01 µg/ml + TSH	33,9 ± 7,8
9D33 0,01 µg/ml + 5C9 0,01 µg/ml + TSH	27,8 ± 1,3
Tampón solamente	1,4 ± 0,5
TSH 0,3 µg/ml	46,6 ± 12,9
9D33 100 µg/ml	0,99 ± 0,62
5C9 100 µg/ml	0,15 ± 0,12
9D33 100 µg/ml + 5C9 100 µg/ml	0,41 ± 0,40
9D33 100 µg/ml + TSH	3,53 ± 1,1
5C9 100 µg/ml + TSH	0,29 ± 0,15
9D33 100 µg/ml + 5C9 100 mg/ml + TSH	0,63 ± 0,38
9D33 10 µg/ml + TSH	4,23 ± 0,81
5C9 10 µg/ml + TSH	0,23 ± 0,08
9D33 10 µg/ml + 5C9 10 µg/ml + TSH	0,52 ± 0,15
9D33 1 µg/ml + TSH	9,01 ± 0,67
5C9 1 µg/ml + TSH	1,65 ± 0,47
9D33 1 µg/ml + 5C9 1 µg/ml + TSH	1,21 ± 0,67
9D33 0,1 µg/ml + TSH	20,2 ± 2,2
5C9 0,1 µg/ml + TSH	6,2 ± 1,8
9D33 0,1 µg/ml + 5C9 0,1 µg/ml + TSH	7,6 ± 1,3
Experimento 5	
<b>Muestra de ensayo en el tampón de ensayo de AMP cíclico</b>	<b>Concentración de AMP cíclico (pmol/ml media ± DT; n = 3)</b>
Tampón solamente	1,83 ± 0,64
TSH 0,3 ng/ml	17,26 ± 1,5
9D33 10 µg/ml	2,07 ± 0,52
5C9 10 µg/ml	0,38 ± 0,2
9D33 10 µg/ml + 5C9 10 µg/ml	0,96 ± 0,14

ES 2 523 217 T3

9D33 10 µg/ml + TSH	3,57 ± 0,58
5C9 10 µg/ml + TSH	1,17 ± 0,00
9D33 10 µg/ml + 5C9 10 µg/ml + TSH	1,58 ± 0,20
9D33 5 µg/ml + TSH	3,71 ± 0,10
5C9 5 µg/ml + TSH	1,21 ± 0,36
9D33 1 µg/ml + TSH	6,38 ± 1,35
5C9 1 µg/ml + TSH	2,57 ± 0,65
9D33 1 µg/ml + 5C9 1 µg/ml + TSH	1,46 ± 0,59
9D33 0,1 µg/ml + TSH	14,67 ± 4,69
5C9 0,1 µg/ml + TSH	12,43 ± 1,59
9D33 0,1 µg/ml + 5C9 0,1 µg/ml + TSH	9,99 ± 3,78

Tabla 13

Efecto de 5C9 más 9D33 en el bloqueo de la estimulación mediada por Fab M22 de la producción de AMP cíclico en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre Experimento 1	
Muestra de ensayo en tampón de ensayo de AMP cíclico	Concentración de AMP cíclico (pmol/ml media ± DT; n = 3)
Tampón solamente	1,45 ± 0,46
M22 3 µg/ml	49,1 ± 9,8
9D33 100 µg/ml	1,51 ± 0,22
5C9 100 µg/ml	0,35 ± 0,30
9D33 100 µg/ml + 5C9 100 µg/ml	1,57 ± 0,13
9D33 100 µg/ml + M22	2,13 ± 0,74
5C9 100 µg/ml + M22	0,35 ± 0,08
9D33 100 µg/ml + 5C9 100 µg/ml + M22	0,70 ± 0,40
9D33 10 µg/ml + M22	2,5 ± 0,8
5C9 10 µg/ml + M22	0,36 ± 0,25
9D33 10 µg/ml + 5C9 10 µg/ml + M22	0,52 ± 0,12
9D33 1 µg/ml + M22	5,25 ± 0,55
5C9 1 µg/ml + M22	0,93 ± 0,07
9D33 1 µg/ml + 5C9 1 µg/ml + M22	0,69 ± 0,13

ES 2 523 217 T3

9D33 0,1 µg/ml + M22	27,6 ± 2,5
5C9 0,1 µg/ml + M22	6,0 ± 2,6
9D33 0,1 µg/ml + 5C9 0,1 µg/ml + M22	13,7 ± 7,5
9D33 0,01 µg/ml + M22	47,5 ± 4,5
5C9 0,01 µg/ml + M22	48,1 ± 5,4
9D33 0,01 µg/ml + 5C9 0,01 µg/ml + M22	47,5 ± 4,5
Experimento 2	
<b>Muestra de ensayo en tampón de ensayo de AMP cíclico</b>	<b>Concentración de AMP cíclico (pmol/ml media ± DT; n = 3)</b>
Tampón solamente	1,69 ± 0,47
M22 3 ng/ml	68,3 ± 6,3
9D33 100 µg/ml	1,76 ± 0,43
5C9 100 µg/ml	0,69 ± 0,18
9D33 100 µg/ml + 5C9 100 µg/ml	1,16 ± 0,35
9D33 100 µg/ml + M22	1,42 ± 1,20
5C9 100 µg/ml + M22	indetectable
9D33 100 µg/ml + 5C9 100 µg/ml + M22	0,14 (n=2)
9D33 10 µg/ml + M22	0,67 (n=2)
5C9 10 µg/ml + M22	0,14 (n=1)
9D33 10 µg/ml + 5C9 10 µg/ml + M22	2,41 (n=1)
9D33 1 µg/ml + M22	6,03 ± 1,15
5C9 1 µg/ml + M22	2,54 (n=1)
9D33 1 µg/ml + 5C9 1 µg/ml + M22	1,51 (n=1)
9D33 0,1 µg/ml + M22	38,7 ± 8,1
5C9 0,1 µg/ml + M22	4,17 ± 1,7
9D33 0,1 µg/ml + 5C9 0,1 µg/ml + M22	5,17 ± 2,85
9D33 0,01 µg/ml + M22	60,2 ± 8,0
5C9 0,01 µg/ml + M22	57,3 ± 13,7
9D33 0,01 µg/ml + 5C9 0,01 µg/ml + M22	40,4 ± 5,3
9D33 0,001 µg/ml + M22	79,1 ± 26,3
5C9 0,001 µg/ml + M22	63,3 ± 19,0

ES 2 523 217 T3

9D33 0,001 µg/ml + 5C9 0,001 µg/ml + M22	40,2 ± 8,7
Experimento 3	
<b>Muestra de ensayo en tampón de ensayo de AMP cíclico</b>	<b>Concentración de AMP cíclico (pmol/ml media ± DT; n = 3)</b>
Tampón solamente	0,86 ± 0,12
M22 0,3 ng/ml	21,8 ± 3,23
9D33 100 µg/ml	0,88 ± 0,30
5C9 100 µg/ml	0,58 ± 0,28
9D33 100 µg/ml + 5C9 100 µg/ml	0,81 ± 0,36
9D33 100 µg/ml + M22	1,03 ± 0,32
5C9 100 µg/ml + M22	0,05 (n=2)
9D33 100 µg/ml + 5C9 100 µg/ml + M22	0,06 (n=2)
9D33 10 µg/ml + M22	0,97 ± 0,48
5C9 10 µg/ml + M22	0,20 (n=2)
9D33 10 µg/ml + 5C9 10 µg/ml + M22	0,14 ± 0,08
9D33 1 µg/ml + M22	0,83 ± 0,21
5C9 1 µg/ml + M22	0,02 (n=2)
9D33 1 µg/ml + 5C9 1 µg/ml + M22	0,13 ± 0,13
9D33 0,1 µg/ml + M22	5,38 ± 1,71
5C9 0,1 µg/ml + M22	1,43 ± 1,09
9D33 0,1 µg/ml + 5C9 0,1 µg/ml + M22	2,39 ± 1,0
9D33 0,01 µg/ml + M22	15,2 ± 1,42
5C9 0,01 µg/ml + M22	13,1 ± 1,34
9D33 0,01 µg/ml + 5C9 0,01 µg/ml + M22	12,7 ± 3,4
9D33 0,001 µg/ml + M22	12,8 ± 1,60
5C9 0,001 µg/ml + M22	13,3 ± 0,89
9D33 0,001 µg/ml + 5C9 0,001 µg/ml + M22	15,8 ± 2,15
Experimento 4	
<b>Muestra de ensayo en tampón de ensayo de AMP cíclico</b>	<b>Concentración de AMP cíclico (pmol/ml media ± DT; n = 3)</b>
Tampón solamente	1,29 ± 0,68
M22 0,3 ng/ml	31,1 ± 9,4

ES 2 523 217 T3

9D33 100 µg/ml	2,38 ± 1,11
5C9 100 µg/ml	0,12 ± 0,09
9D33 100 µg/ml + 5C9 100 µg/ml	0,81 ± 0,15
9D33 100 µg/ml + M22	2,00 ± 0,87
5C9 100 µg/ml + M22	0,22 ± 0,11
9D33 100 µg/ml + 5C9 100 µg/ml + M22	0,40 ± 0,18
9D33 10 µg/ml + M22	1,25 ± 0,09
5C9 10 µg/ml + M22	0,40 ± 0,17
9D33 10 µg/ml + 5C9 10 µg/ml + M22	0,45 ± 0,31
9D33 1 µg/ml + M22	2,66 ± 0,64
5C9 1 µg/ml + M22	0,21 ± 0,18
9D33 1 µg/ml + 5C9 1 µg/ml + M22	0,14 ± 0,07
9D33 0,1 µg/ml + M22	27,6 ± 2,5
5C9 0,1 µg/ml + M22	6,0 ± 2,6
9D33 0,1 µg/ml + 5C9 0,1 µg/ml + M22	7,2 ± 3,9
9D33 0,01 µg/ml + M22	38,9 ± 6,4
5C9 0,01 µg/ml + M22	31,5 ± 4,0
9D33 0,01 µg/ml + 5C9 0,01 µg/ml + M22	20,6 ± 5,3
9D33 0,001 µg/ml + M22	43,2 ± 7,9
5C9 0,001 µg/ml + M22	33,1 ± 4,0
9D33 0,001 µg/ml + 5C9 0,001 µg/ml + M22	25,3 ± 6,0

Tabla 14

Efecto de IgG 5C9 y 9D33 en la producción de AMP cíclico basal en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre (aproximadamente $5 \times 10^5$ receptores por célula)		
Experimento 1		
Muestra de ensayo	Concentración de AMP cíclico pmol/ml (media ± DT; n = 3)	% de inhibición de la producción de AMP cíclico basal.
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	47,1 ± 11,7	0
TSH 3 ng/ml	152,0 ± 28,2	-vo
IgG 5B3 <sup>a</sup> 100 µg/ml	44,5 ± 5,2	5,3
IgG 5B3 <sup>a</sup> 10 µg/ml	45,4 ± 6,3	3,4
IgG 5B3 <sup>a</sup> 1 µg/ml	52,0 ± 12,1	-vo

ES 2 523 217 T3

IgG 9D33 100 µg/ml	74,2 ± 7,2	-vo
IgG 9D33 10 µg/ml	56,5 ± 4,0	-vo
IgG 9D33 1 µg/ml	65,8 ± 9,8	-vo
IgG 9D33 0,1 µg/ml	61,7 ± 13,3	-vo
IgG 9D33 0,01 µg/ml	52,0 ± 5,1	-vo
IgG 9D33 0,001 µg/ml	61,6 ± 3,8	-vo
Experimento 2		
<b>Muestra de ensayo</b>	<b>Concentración de AMP cíclico pmol/ml (media ± DT; n = 3)</b>	<b>% de inhibición de la producción de AMP cíclico basal.</b>
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	58,0 6 15,2	0
TSH 3 ng/ml	156,5 6 22,2	-vo
IgG 5B3 <sup>a</sup> 100 µg/ml	52,7 6 7,8	9,1
IgG 5B3 <sup>a</sup> 10 µg/ml	43,7 6 10,4	24,7
IgG 5B3 <sup>a</sup> 1 µg/ml	55,9 6 12,2	3,7
IgG 5C9 100 mg/ml	26,2 6 2,7	54,9
IgG 5C9 10 mg/ml	14,7 6 1,7	74,6
IgG 5C9 1 mg/ml	16,8 6 4,2	71,0
IgG 5C9 0,1 mg/ml	31,5 6 8,8	45,7
IgG 5C9 0,01 mg/ml	36,4 6 4,5	37,2
IgG 5C9 0,001 mg/ml	51,7 6 9,8	10,8
Experimento 3		
Efectos de Fab y F(ab') 5C9 en la producción de AMP cíclico basal en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre		
<b>Muestra de ensayo en tampón de ensayo de AMP cíclico</b>	<b>Concentración de AMP cíclico pmol/ml (media ± DT; n = 3)</b>	<b>% de inhibición de la producción de AMP cíclico basal.</b>
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	59,4 ± 8,6	0
IgG 9D33 100 µg/ml	67,8 ± 1,0	-vo
IgG 9D33 10 µg/ml	79,4 ± 9,8	-vo
IgG 9D33 1 µg/ml	71,5 ± 8,8	-vo
IgG 9D33 0,1 µg/ml	75,6 ± 8,9	-vo
IgG 9D33 0,01 µg/ml	60,5 ± 7,5	-vo
IgG 9D33 0,001 µg/ml	52,3 ± 6,3	12
IgG 5C9 100 µg/ml	26,2 ± 1,8	56
IgG 5C9 10 µg/ml	24,5 ± 5,8	59
IgG 5C9 1 µg/ml	22,9 ± 2,1	61
IgG 5C9 0,1 µg/ml	59,1 ± 2,6	1

IgG 5C9 0,01 µg/ml	64,3 ± 8,4	-vo
IgG 5C9 0,001 µg/ml	67,3 ± 9,8	-vo
Fab 5C9 100 µg/ml	23,3 ± 2,3	61
Fab 5C9 10 µg/ml	32,1 ± 4,8	46
Fab 5C9 1 µg/ml	36,4 ± 1,5	39
Fab 5C9 0,1 µg/ml	52,8 ± 1,9	11
Fab 5C9 0,01 µg/ml	61,1 ± 2,4	-vo
Fab 5C9 0,001 µg/ml	62,5 ± 7,3	-vo
F(ab') 5C9 100 µg/ml	30,9 ± 2,6	48
F(ab') 5C9 10 µg/ml	36,5 ± 3,4	39
F(ab') 5C9 1 µg/ml	45,9 ± 4,5	23
F(ab') 5C9 0,1 µg/ml	48,2 ± 3,1	19
F(ab') 5C9 0,01 µg/ml	62,3 ± 5,7	-vo
F(ab') 5C9 0,001 µg/ml	57,9 ± 9,1	3
<p>En células CHO de control, que no expresan el TSHR, la producción de AMP cíclico basal en presencia de tampón de ensayo de AMP cíclico fue de 0,03 pmol/ml (n = 2) y en presencia de TSH 3 ng/ml fue de 0,40 ± 0,09 pmol/ml (media ± DT; n = 3).</p> <p>-vo = negativo es decir sin inhibición de la producción de AMP cíclico.</p> <p><sup>a</sup>5B3 es un anticuerpo monoclonal humano para ácido glutámico descarboxilasa (GAD) (control negativo para 5C9). En células CHO de control, que no expresan el TSHR, la producción de AMP cíclico basal en presencia de tampón de ensayo de AMP cíclico fue de 0,03 pmol/ml (n = 2) y en presencia de TSH 3 ng/ml fue de 0,40 ± 0,09 pmol/ml (media ± DT; n = 3).</p> <p>-vo = negativo es decir sin inhibición de la producción de AMP cíclico.</p> <p><sup>a</sup>5B3 es un anticuerpo monoclonal humano para ácido glutámico descarboxilasa (GAD) (control negativo para 5C9). En células CHO de control, que no expresan el TSHR, la producción de AMP cíclico basal en presencia de tampón de ensayo de AMP cíclico fue de 0,03 pmol/ml (n = 2) y en presencia de TSH 3 ng/ml fue de 0,40 ± 0,09 pmol/ml (media ± DT; n = 3).</p> <p>-vo = negativo, es decir sin inhibición de la producción de AMP cíclico.</p> <p>F(ab') preparado por reducción de F(ab')<sub>2</sub>; véase el texto para detalles.</p>		

Tabla 15

Efecto de los autoanticuerpos de TSHR de sueros de pacientes con actividad antagonista (B2-B5) en los niveles de AMP cíclico basales en células CHO que expresan la mutación activadora de TSHR I568T		
Experimento 1		
Muestra de ensayo y dilución de suero	Concentración de AMP cíclico pmol/ml (media ± DT; n = 3)	% de inhibición de la producción de AMP cíclico basal.
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	20,5 ± 8,7	0
Grupo de HBD /10	19,5 ± 3,4	5
Grupo de HBD /50	25,7 ± 2,8	-vo
N1 /10	20,7 ± 5,5	-vo
N1 /50	18,5 ± 1,5	10
N2 /10	23,3 ± 1,7	-vo
N2 /50	17,6 ± 1,8	14
N3 /10	20,3 ± 2,4	1

ES 2 523 217 T3

N3 /50	23,6 ± 5,9	-vo
B2 /10	5,3 ± 1,3	74
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
Experimento 2		
<b>Muestra de ensayo y dilución de suero</b>	<b>Concentración de AMP cíclico pmol/ml (media ± DT; n = 3)</b>	<b>% de inhibición de la producción de AMP cíclico basal.</b>
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	19,7 ± 3,7	0
Grupo de HBD /10	28,0 ± 1,6	-vo
Grupo de HBD /50	18,1 ± 3,9	8
Grupo de HBD /100	18,0 ± 1,6	9
Grupo de HBD /500	17,8 ± 1,3	10
Grupo de HBD /1000	20,7 ± 2,9	-vo
Grupo de HBD /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
-vo = negativo, es decir sin inhibición de la producción de AMP cíclico. Grupo de HBD = grupo de sueros de donantes de sangre sanos N1-N3 = suero de donantes de sangre sanos individuales Todos los sueros se diluyeron en tampón de ensayo de AMP cíclico.		

ES 2 523 217 T3

Tabla 16

Efecto de los autoanticuerpos de TSHR de sueros de pacientes con actividad antagonista (B2-B5) en los niveles de AMP cíclico basales en células CHO que expresan la mutación activadora de TSHR S2811		
Muestras de ensayo y dilución de suero	Concentración de AMP cíclico pmol/ml (media $\pm$ DT; n = 3)	% de inhibición de la producción de AMP cíclico basal.
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	11,2 $\pm$ 2,0	0
HBD /10	12,1 $\pm$ 0,6	-8
HBD /50	10,0 $\pm$ 2,0	11
N1 /10	8,0 $\pm$ 1,6	28
N1 /50	10,8 $\pm$ 3,3	4
N2 /10	8,8 $\pm$ 1,4	21
N2 /50	8,8 $\pm$ 2,3	22
N3 /10	10,0 $\pm$ 0,8	17
N3 /50	9,3 $\pm$ 1,7	17
B2 /10	7,7 $\pm$ 0,39	31
B2 /50	5,7 $\pm$ 1,3	49
B3 /10	5,4 $\pm$ 0,5	52
B3 /50	6,6 $\pm$ 1,1	41
B4 /10	5,4 $\pm$ 1,1	52
B4 /50	4,9 $\pm$ 0,7	56
B5 /10	9,1 $\pm$ 2,5	18
B5 /50	7,6 $\pm$ 0,8	32
Véase Tabla 15 para notas explicativas. IgG 5C9 a 1 $\mu$ g/ml provocó 71 % de inhibición de la actividad de AMP cíclico basal en los experimentos con TSHR S2811.		

Tabla 17

Efecto de los autoanticuerpos de TSHR de sueros de pacientes con actividad antagonista (B2-B5) en los niveles de AMP cíclico basales en células CHO que expresan la mutación activadora de TSHR A6231		
Muestras de ensayo y dilución de suero	Concentración de AMP cíclico pmol/ml (media $\pm$ DT; n = 3)	% de inhibición de la producción de AMP cíclico basal
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	43,5 $\pm$ 11,2	0
Grupo de HBD /10	34,7 $\pm$ 4,5	20
Grupo de HBD /50	49,9 $\pm$ 5,7	-15
N1 /10	32,1 $\pm$ 2,5	26
N1 /50	43,9 $\pm$ 12,0	-1
N2 /10	51,1 $\pm$ 8,4	-17
N2 /50	32,6 $\pm$ 2,1	26
N3 /10	47,2 $\pm$ 7,1	-10
N3 /50	57,3 $\pm$ 16,5	-32

ES 2 523 217 T3

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

Véase Tabla 15 para notas explicativas.

IgG 5C9 a 1 µg/ml provocó 49 % de inhibición de la actividad de AMP cíclico basal en experimentos con TSHR A623I.

*Tabla 18*

Efecto de los autoanticuerpos de TSHR de sueros de pacientes con actividad antagonista (B2-B5) en los niveles de AMP cíclico basales en una línea celular CHO que expresa TSHR de tipo silvestre (aproximadamente  $5 \times 10^5$  receptores por célula)

Muestras de ensayo y dilución de suero	Concentración de AMP cíclico pmol/ml (media ± DT; n = 3)	Cambio en la producción de AMP cíclico basal (%)
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	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

**Cambio en la producción de AMP cíclico basal (%) =**

$$\frac{\text{producción de AMP cíclico en presencia de muestra de ensayo}}{\text{producción de AMP cíclico en presencia de tampón de ensayo de AMP cíclico}} \times 100$$

5 En presencia de IgG 5C9 a 1 µg/ml, los niveles de AMP cíclico basales se redujeron al 33 % en relación con los niveles en presencia de tampón de ensayo de AMP cíclico.

*Tabla 19*

Sumario de los efectos de los autoanticuerpos de TSHR de sueros de pacientes con actividad antagonista (B2-B5) en los niveles de AMP cíclico basales en células CHO transfectadas con TSHR

Células CHO transfectadas con	Concentración de AMP cíclico (fmol/pocillo celular; media ± DT, n = 3) en presencia de:-					
	Grupo de HBD	B2	B3	B4	B5	IgG 5C9
TSHR de tipos silvestre	5531 ± 1140	7949 ± 340	14804 ± 2240	1740 ± 68	10849 ± 1206	1872 ± 288
TSHR I568T	3900 ± 671	1066 ± 266	1660 ± 628	438 ± 90	3180 ± 650	548 ± 78
TSHR A623I	6420 ± 968	5760 ± 224	6700 ± 704	5440 ± 1324	7680 ± 1260	1914 ± 176
TSHR S281I	2420 ± 130	1538 ± 175	1080 ± 96	1080 ± 218	1822 ± 494	655 ± 60

Grupo de HBD = grupo de sueros de donantes de sangre sanos.

El grupo de HBD y los sueros B2-B5 se usaron a dilución 1:10 en tampón de ensayo de AMP cíclico.

IgG 5C9 se usó a una concentración de 1 µg/ml en tampón de ensayo de AMP cíclico.

B2-B5 bloqueó la estimulación tanto de TSH como de M22 de la producción de AMP cíclico en células CHO que expresaban TSHR de tipo silvestre.

*Tabla 20a*

Efecto de IgG 5C9 en la producción de AMP cíclico estimulada por pTSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Asp43 mutado a Alanina.

Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media ± DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	277 ± 109	173 ± 81	76
TSH solamente	13924 ± 717	11651 ± 465	84
5B3 <sup>a</sup> 10 µg/ml + TSH	14263 ± 2791	17452 ± 2160	122
5B3 <sup>a</sup> 100 µg/ml + TSH	18892 ± 1222	12685 <sup>1</sup>	67
5C9 0,01 µg/ml + TSH	13145 <sup>1</sup>	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 <sup>2</sup>	37
5C9 100 µg/ml solamente	47 ± 23	206 ± 107	438

<sup>1</sup>media de determinaciones por duplicado

<sup>2</sup>determinación individual

concentración de pTSH = 3 ng/ml

Todas las diluciones en tampón de ensayo de AMP cíclico

<sup>a</sup>5B3 es un anticuerpo monoclonal humano para ácido glutámico descarboxilasa (GAD) (control negativo para 5C9).

Tabla 20b

Efecto de IgG 5C9 en la producción de AMP cíclico estimulada por pTSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Glu61 mutado a Alanina.			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media $\pm$ DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	210 $\pm$ 101	146 $\pm$ 22	70
TSH solamente	12818 $\pm$ 2224	15398 $\pm$ 982	120
5B3 <sup>a</sup> 10 $\mu$ g/ml + TSH	11522 $\pm$ 2220	19750 $\pm$ 2950	171
5B3 <sup>a</sup> 100 $\mu$ g/ml + TSH	14090 $\pm$ 2394	15680 $\pm$ 2708	111
5C9 0,01 $\mu$ g/ml + TSH	13806 $\pm$ 1188	18050 $\pm$ 2948	131
5C9 0,1 $\mu$ g/ml + TSH	2886 $\pm$ 422	2114 $\pm$ 592	73
5C9 1,0 $\mu$ g/ml + TSH	536 $\pm$ 150	766 $\pm$ 354	143
5C9 10 $\mu$ g/ml + TSH	254 $\pm$ 208	346 $\pm$ 292	136
5C9 100 $\mu$ g/ml + TSH	202 <sup>1</sup>	328 $\pm$ 96	162
5C9 100 $\mu$ g/ml solamente	218 $\pm$ 46	254 $\pm$ 48	117
Véase Tabla 20a para notas explicativas.			

Tabla 20c

Efecto de IgG 5C9 en la producción de AMP cíclico estimulada por pTSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con His 105 mutado a Alanina.			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media $\pm$ DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	245 $\pm$ 98	590 $\pm$ 72	241
TSH solamente	14214 $\pm$ 2111	17979 $\pm$ 1735	126
5B3 <sup>a</sup> 10 $\mu$ g/ml + TSH	13214 $\pm$ 3233	21359 $\pm$ 1501	162
5B3 <sup>a</sup> 100 $\mu$ g/ml + TSH	17232 $\pm$ 2641	24044 $\pm$ 3398	140
5C9 0,01 $\mu$ g/ml + TSH	16652 $\pm$ 2252	24168 $\pm$ 1690	145
5C9 0,1 $\mu$ g/ml + TSH	3511 $\pm$ 590	2869 $\pm$ 1460	82
5C9 1,0 $\mu$ g/ml + TSH	454 $\pm$ 11	561 $\pm$ 393	124
5C9 10 $\mu$ g/ml + TSH	289 $\pm$ 84	434 $\pm$ 392	150
5C9 100 $\mu$ g/ml + TSH	223 <sup>1</sup>	134 <sup>1</sup>	60
5C9 100 $\mu$ g/ml solamente	234 $\pm$ 50	520 $\pm$ 198	222
Véase Tabla 20a para notas explicativas.			

ES 2 523 217 T3

Tabla 20d

Efecto de IgG 5C9 en la producción de AMP cíclico estimulada por pTSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Glu107 mutado a Alanina.			
Experimento 1			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media $\pm$ DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	326 $\pm$ 157	1898 $\pm$ 594	582
TSH solamente	14838 $\pm$ 1396	13435 $\pm$ 2613	91
5B3 <sup>a</sup> 10 $\mu$ g/ml + TSH	14018 $\pm$ 3049	17074 $\pm$ 1442	122
5B3 <sup>a</sup> 100 $\mu$ g/ml + TSH	15949 $\pm$ 1340	16009 $\pm$ 4606	100
5C9 0,01 $\mu$ g/ml + TSH	17001 $\pm$ 5209	15008 $\pm$ 1053	88
5C9 0,1 $\mu$ g/ml + TSH	5950 <sup>1</sup>	5783 $\pm$ 3213	97
5C9 1,0 $\mu$ g/ml + TSH	1058 $\pm$ 396	394 $\pm$ 314	37
5C9 10 $\mu$ g/ml + TSH	496 $\pm$ 52	449 $\pm$ 116	91
5C9 100 $\mu$ g/ml + TSH	193 $\pm$ 196	203 $\pm$ 56	105
5C9 100 $\mu$ g/ml solamente	1266 $\pm$ 359	462 $\pm$ 324	36
Experimento 2			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media $\pm$ DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	167 $\pm$ 148	1824 $\pm$ 354	1092
TSH solamente	17569 $\pm$ 3919	19358 $\pm$ 2365	110
5B3 <sup>a</sup> 10 $\mu$ g/ml + TSH	11692 $\pm$ 1161	21255 $\pm$ 2597	182
5B3 <sup>a</sup> 100 $\mu$ g/ml + TSH	24141 $\pm$ 1869	22933 $\pm$ 6554	95
5C9 0,01 $\mu$ g/ml + TSH	18585 $\pm$ 5353	21028 $\pm$ 1432	113
5C9 0,1 $\mu$ g/ml + TSH	4221 $\pm$ 1003	1544 $\pm$ 732	37
5C9 1,0 $\mu$ g/ml + TSH	738 $\pm$ 48	28 <sup>1</sup>	4
5C9 10 $\mu$ g/ml + TSH	214 $\pm$ 343	321 $\pm$ 514	150
5C9 100 $\mu$ g/ml + TSH	238 <sup>1</sup>	64 <sup>2</sup>	27
5C9 100 $\mu$ g/ml solamente	211 $\pm$ 75	408 $\pm$ 138	193
Véase Tabla 20a para notas explicativas.			

Tabla 20e

Efecto de IgG 5C9 en la producción de AMP cíclico estimulada por pTSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Phe130 mutado a Alanina.			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media $\pm$ DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	345 $\pm$ 119	410 $\pm$ 85	119
TSH solamente	15897 $\pm$ 1291	16392 $\pm$ 1318	103
5B3 <sup>a</sup> 10 $\mu$ g/ml + TSH	18414 $\pm$ 1662	15765 $\pm$ 1088	86
5B3 <sup>a</sup> 100 $\mu$ g/ml + TSH	19561 $\pm$ 1078	21673 $\pm$ 3165	111
5C9 0,01 $\mu$ g/ml + TSH	15255 $\pm$ 2166	17414 $\pm$ 1020	114
5C9 0,1 $\mu$ g/ml + TSH	2712 $\pm$ 462	9015 $\pm$ 1835	332
5C9 1,0 $\mu$ g/ml + TSH	398 $\pm$ 378	2235 $\pm$ 1635	562
5C9 10 $\mu$ g/ml + TSH	151 $\pm$ 195	1139 $\pm$ 146	754
5C9 100 $\mu$ g/ml + TSH	240 $\pm$ 199	603 $\pm$ 141	251
5C9 100 $\mu$ g/ml solamente	334 $\pm$ 75	446 $\pm$ 41	134
Véase Tabla 20a para notas explicativas.			

Tabla 20f

Efecto de IgG 5C9 en la producción de AMP cíclico estimulada por pTSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Glu178 mutado a Alanina.			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media $\pm$ DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	183 $\pm$ 77	366 $\pm$ 300	200
TSH solamente	8900 $\pm$ 1185	7666 $\pm$ 1659	86
5B3 <sup>a</sup> 10 $\mu$ g/ml + TSH	9160 $\pm$ 3180	10828 $\pm$ 1650	118
5B3 <sup>a</sup> 100 $\mu$ g/ml + TSH	12920 $\pm$ 1300	9428 $\pm$ 1350	73
5C9 0,01 $\mu$ g/ml + TSH	12580 $\pm$ 2700	8166 $\pm$ 195	65
5C9 0,1 $\mu$ g/ml + TSH	4354 $\pm$ 920	7314 $\pm$ 1830	168
5C9 1,0 $\mu$ g/ml + TSH	688 $\pm$ 140	3570 $\pm$ 850	519
5C9 10 $\mu$ g/ml + TSH	630 $\pm$ 140	1904 $\pm$ 360	302
5C9 100 $\mu$ g/ml + TSH	712 <sup>1</sup>	894 $\pm$ 120	126
5C9 100 $\mu$ g/ml solamente	196 $\pm$ 58	134 $\pm$ 153	68
Véase Tabla 20a para notas explicativas.			

Tabla 20g

Efecto de IgG 5C9 en la producción de AMP cíclico estimulada por pTSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Try185 mutado a Alanina.			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media $\pm$ DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	139 $\pm$ 40	163 $\pm$ 72	117
TSH solamente	12649 $\pm$ 1577	8305 $\pm$ 870	66
5B3 <sup>a</sup> 10 $\mu$ g/ml + TSH	16974 $\pm$ 205	10088 $\pm$ 1856	59
5B3 <sup>a</sup> 100 $\mu$ g/ml + TSH	17089 $\pm$ 2282	10920 $\pm$ 2111	64
5C9 0,01 $\mu$ g/ml + TSH	17264 $\pm$ 4257	9368 $\pm$ 2069	54
5C9 0,1 $\mu$ g/ml + TSH	6217 $\pm$ 2064	4536 $\pm$ 724	73
5C9 1,0 $\mu$ g/ml + TSH	1664 $\pm$ 636	1199 $\pm$ 1042	72
5C9 10 $\mu$ g/ml + TSH	481 $\pm$ 380	301 $\pm$ 199	63
5C9 100 $\mu$ g/ml + TSH	275 $\pm$ 206	ID	
5C9 100 $\mu$ g/ml solamente	123 $\pm$ 38	163 $\pm$ 60	133
ID = por debajo del límite de detección del ensayo. Véase Tabla 20a para otras notas explicativas.			

Tabla 20h

Efecto de IgG 5C9 en la producción de AMP cíclico estimulada por pTSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Asp203 mutado a Alanina.			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media $\pm$ DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	298 $\pm$ 164	742 $\pm$ 122	249
TSH solamente	11770 $\pm$ 398	12594 $\pm$ 400	107
5B3 <sup>a</sup> 10 $\mu$ g/ml + TSH	13266 $\pm$ 1105	12232 $\pm$ 1819	92
5B3 <sup>a</sup> 100 $\mu$ g/ml + TSH	14125 $\pm$ 704	13006 $\pm$ 2452	92
5C9 0,01 $\mu$ g/ml + TSH	15454 $\pm$ 422	14651 $\pm$ 511	95
5C9 0,1 $\mu$ g/ml + TSH	4445 $\pm$ 405	13142 $\pm$ 1589	296
5C9 1,0 $\mu$ g/ml + TSH	1352 $\pm$ 249	14678 $\pm$ 6312	1086
5C9 10 $\mu$ g/ml + TSH	807 $\pm$ 479	12634 $\pm$ 1036	1566
5C9 100 $\mu$ g/ml + TSH	367 $\pm$ 67	12721 $\pm$ 3187	3446
5C9 100 $\mu$ g/ml solamente	330 $\pm$ 46	1368 $\pm$ 206	415
Véase Tabla 20a para notas explicativas.			

Tabla 20i

Efecto de IgG 5C9 en la producción de AMP cíclico estimulada por pTSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Try206 mutado a Alanina.			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media $\pm$ DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	380 $\pm$ 166	402 $\pm$ 96	106
TSH solamente	15360 $\pm$ 670	18440 $\pm$ 1390	120
5B3 <sup>a</sup> 10 $\mu$ g/ml + TSH	15880 $\pm$ 1150	21000 $\pm$ 2340	132
5B3 <sup>a</sup> 100 $\mu$ g/ml + TSH	19100 $\pm$ 3090	19680 $\pm$ 3200	103
5C9 0,01 $\mu$ g/ml + TSH	16100 $\pm$ 2360	18420 $\pm$ 670	114
5C9 0,1 $\mu$ g/ml + TSH	6220 $\pm$ 1500	10820 $\pm$ 1750	174
5C9 1,0 $\mu$ g/ml + TSH	1306 $\pm$ 123	3460 $\pm$ 360	265
5C9 10 $\mu$ g/ml + TSH	396 $\pm$ 158	1564 $\pm$ 176	395
5C9 100 $\mu$ g/ml + TSH	292 $\pm$ 130	506 $\pm$ 120	173
5C9 100 $\mu$ g/ml solamente	444 $\pm$ 98	482 $\pm$ 286	109
Véase Tabla 20a para notas explicativas.			

Tabla 20j

Efecto de IgG 5C9 en la producción de AMP cíclico estimulada por pTSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Lys209 mutado a Alanina.			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media $\pm$ DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	316 $\pm$ 38	288 $\pm$ 80	91
TSH solamente	14200 $\pm$ 1420	9500 $\pm$ 1620	67
5B3 <sup>a</sup> 10 $\mu$ g/ml + TSH	12280 $\pm$ 610	11200 $\pm$ 3000	91
5B3 <sup>a</sup> 100 $\mu$ g/ml + TSH	16000 $\pm$ 1470	13240 $\pm$ 1530	83
5C9 0,01 $\mu$ g/ml + TSH	15440 $\pm$ 2180	5960 $\pm$ 950	39
5C9 0,1 $\mu$ g/ml + TSH	4700 $\pm$ 339	278 $\pm$ 40	6
5C9 1,0 $\mu$ g/ml + TSH	1184 $\pm$ 59	360 $\pm$ 146	30
5C9 10 $\mu$ g/ml + TSH	984 $\pm$ 117	482 $\pm$ 100	49
5C9 100 $\mu$ g/ml + TSH	602 $\pm$ 240	354 $\pm$ 184	59
5C9 100 $\mu$ g/ml solamente	272 $\pm$ 49	280 $\pm$ 104	103
Véase Tabla 20a para notas explicativas.			

ES 2 523 217 T3

Tabla 20k

Efecto de IgG 5C9 en la producción de AMP cíclico estimulada por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Asp232 mutado a Alanina.			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media $\pm$ DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	650 $\pm$ 87	652 $\pm$ 300	100
TSH solamente	15681 $\pm$ 866	14884 $\pm$ 1587	95
5B3 <sup>a</sup> 10 $\mu$ g/ml + TSH	15210 $\pm$ 1697	17800 $\pm$ 3219	117
5B3 <sup>a</sup> 100 $\mu$ g/ml + TSH	19704 $\pm$ 1173	17478 $\pm$ 3150	89
5C9 0,01 $\mu$ g/ml + TSH	17600 $\pm$ 1347	15330 $\pm$ 1593	87
5C9 0,1 $\mu$ g/ml + TSH	7329 $\pm$ 860	6556 $\pm$ 1668	89
5C9 1,0 $\mu$ g/ml + TSH	1072 $\pm$ 705	1882 $\pm$ 653	176
5C9 10 $\mu$ g/ml + TSH	794 $\pm$ 406	710 $\pm$ 596	89
5C9 100 $\mu$ g/ml + TSH	166 $\pm$ 95	55 $\pm$ 51	33
5C9 100 $\mu$ g/ml solamente	522 $\pm$ 84	99 <sup>1</sup>	19
Véase Tabla 20a para notas explicativas.			

Tabla 20l

Efecto de IgG 5C9 en la producción de AMP cíclico estimulada por pTSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Lys250 mutado a Alanina.			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media $\pm$ DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	590 $\pm$ 86	1020 $\pm$ 104	173
TSH solamente	13332 $\pm$ 1177	10933 $\pm$ 1510	82
5B3 <sup>a</sup> 10 $\mu$ g/ml + TSH	11292 $\pm$ 1784	13410 $\pm$ 2930	119
5B3 <sup>a</sup> 100 $\mu$ g/ml + TSH	14236 $\pm$ 3521	14049 $\pm$ 3372	99
5C9 0,01 $\mu$ g/ml + TSH	15191 $\pm$ 4117	14460 $\pm$ 2690	95
5C9 0,1 $\mu$ g/ml + TSH	6295 $\pm$ 1897	8486 $\pm$ 2961	135
5C9 1,0 $\mu$ g/ml + TSH	643 $\pm$ 207	2567 $\pm$ 841	399
5C9 10 $\mu$ g/ml + TSH	286 $\pm$ 116	862 $\pm$ 398	301
5C9 100 $\mu$ g/ml + TSH	158 $\pm$ 244	96 $\pm$ 57	61
5C9 100 $\mu$ g/ml solamente	458 $\pm$ 94	448 $\pm$ 280	98
Véase Tabla 20a para notas explicativas.			

ES 2 523 217 T3

Tabla 20m

Efecto de IgG 5C9 en la producción de AMP cíclico estimulada por pTSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Glu251 mutado a Alanina.			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media $\pm$ DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	380 $\pm$ 84	960 $\pm$ 372	253
TSH solamente	18379 $\pm$ 987	17492 $\pm$ 1332	95
5B3 <sup>a</sup> 10 $\mu$ g/ml + TSH	15152 $\pm$ 4365	19951 $\pm$ 2362	132
5B3 <sup>a</sup> 100 $\mu$ g/ml + TSH	18169 $\pm$ 3454	20461 $\pm$ 1345	113
5C9 0,01 $\mu$ g/ml + TSH	21197 $\pm$ 1280	21950 $\pm$ 936	104
5C9 0,1 $\mu$ g/ml + TSH	8640 $\pm$ 2123	15532 $\pm$ 2571	180
5C9 1,0 $\mu$ g/ml + TSH	915 $\pm$ 139	5240 $\pm$ 332	573
5C9 10 $\mu$ g/ml + TSH	752 $\pm$ 127	1881 $\pm$ 212	250
5C9 100 $\mu$ g/ml + TSH	496 $\pm$ 166	1170 $\pm$ 123	236
5C9 100 $\mu$ g/ml solamente	460 $\pm$ 102	406 $\pm$ 212	88
Véase Tabla 20a para notas explicativas.			

Tabla 20n

Efecto de IgG 5C9 en la producción de AMP cíclico estimulada por pTSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Thr257 mutado a Alanina.			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media $\pm$ DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	626 $\pm$ 153	1140 $\pm$ 153	182
TSH solamente	16928 $\pm$ 2079	18563 $\pm$ 1573	110
5B3 <sup>a</sup> 10 $\mu$ g/ml + TSH	17542 $\pm$ 1874	23341 $\pm$ 4203	133
5B3 <sup>a</sup> 100 $\mu$ g/ml + TSH	18948 $\pm$ 1444	20101 $\pm$ 2902	106
5C9 0,01 $\mu$ g/ml + TSH	18722 $\pm$ 3876	21088 $\pm$ 1810	113
5C9 0,1 $\mu$ g/ml + TSH	6143 $\pm$ 1233	7944 $\pm$ 1138	129
5C9 1,0 $\mu$ g/ml + TSH	1396 $\pm$ 172	1594 $\pm$ 156	114
5C9 10 $\mu$ g/ml + TSH	638 $\pm$ 58	972 $\pm$ 12	152
5C9 100 $\mu$ g/ml + TSH	591 $\pm$ 99	611 $\pm$ 52	103
5C9 100 $\mu$ g/ml solamente	566 $\pm$ 143	637 $\pm$ 300	111
Véase Tabla 20a para notas explicativas.			

Tabla 20o

Efecto de IgG 5C9 en la producción de AMP cíclico estimulada por pTSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Arg274 mutado a Alanina.			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media ± DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	124 ± 103	86 ± 38	69
TSH solamente	21347 ± 1112	11432 ± 2511	54
5B3 <sup>a</sup> 10 µg/ml + TSH	18654 ± 3700	12961 ± 2609	69
5B3 <sup>a</sup> 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 <sup>1</sup>	16
5C9 100 µg/ml + TSH	246 ± 165	17 <sup>2</sup>	7
5C9 100 µg/ml solamente	111 ± 26	34 ± 43	31
Véase Tabla 20a para notas explicativas.			

Tabla 20p

Efecto de IgG 5C9 en la producción de AMP cíclico estimulada por pTSH en células CHO que expresan TSHR de tipo silvestre y TSHR con Asp276 mutado a Alanina.			
Experimento 1			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media ± DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)
	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	365 ± 166	1454 ± 258	398
TSH solamente	17500 ± 727	22416 ± 2570	128
5B3 <sup>a</sup> 10 µg/ml + TSH	19354 ± 1794	25180 ± 5609	130
5B3 <sup>a</sup> 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 <sup>1</sup>	4788 ± 553	631
5C9 10 µg/ml + TSH	366 ± 145	1384 ± 602	378
5C9 100 µg/ml + TSH	344 ± 566	565 ± 176	164
5C9 100 µg/ml solamente	300 ± 242	602 ± 274	201
Experimento 2			
Muestra de ensayo	AMP cíclico producido (fmol/pocillo celular; media ± DT, n=3)		Mutado/tipo silvestre (%)

ES 2 523 217 T3

	TSHR de tipo silvestre	TSHR mutado	
Tampón de ensayo de AMP cíclico solamente	156 ± 30	601 ± 190	385
TSH solamente	13852 ± 756	14616 ± 453	106
5B3 <sup>a</sup> 10 µg/ml + TSH	13025 ± 3292	17706 <sup>1</sup>	136
5B3 <sup>a</sup> 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
5C9 100 µg/ml solamente	208 ± 15	314 ± 69	151
Véase Tabla 20a para notas explicativas.			

Tabla 21

Sumario de efectos de las mutaciones de TSHR (en relación con el tipo silvestre) en la capacidad de IgG 5C9 e IgG 9D33 para bloquear la estimulación por TSH de la producción de AMP cíclico en células CHO transfectadas con TSHR			
Mutación de TSHR	Estimulación (en relación con el tipo silvestre) de la producción de AMP cíclico por pTSH	Bloqueo (en relación con el tipo silvestre) de la estimulación por TSH de la producción de AMP cíclico por IgG 5C9	Bloqueo (en relación con el tipo silvestre) de la estimulación por TSH de la producción de AMP cíclico por IgG 9D33
Tipo silvestre	+++++	+++++	+++++
Asp 43 Ala	+++	+++++	+++++
Lys 58 Ala	+++++	+++++	0
Ile 60 Ala	+++++	+++++	+++++
Glu 61 Ala	++++	+++++	+++++
Arg 80 Ala	+++++	+++++	0
Tyr 82 Ala	+++++	+++++	0
Thr 104 Ala	+++++	+++++	NE
His 105 Ala	+++++	+++++	NE
Glu 107 Ala	+++	+++++	+++++
Arg 109 Ala	+++++	+++++	0
Lys 129 Ala	+++++	0	0
Phe 130 Ala	+++++	+++	+++++
Phe 134 Ala	+++++	+++++	++
Asp 151 Ala	+++++	++++	NE
Glu 178 Ala	++++	+++	++++
Lys 183 Ala	+++++	+	+++++
Tyr 185 Ala	++++	+++++	+++++

ES 2 523 217 T3

Asp 203 Ala	++++	0	+++++
Tyr 206 Ala	++++	+++	+++++
Lys 209 Ala	++++	+++++++	+++++
Asp 232 Ala	+++	+++++	+++++
Gln 235 Ala	+++++	+++++	+++++
Lys 250 Ala	+++++	++++	++++
Glu 251 Ala	+++++	+++	+++++
Arg 255 Ala	+++++	+++++	+++++
Thr 257 Ala	+++++	+++++	+++++
Trp 258 Ala	+++++	+++++	+++++
Arg 274 Ala	+++++	+++++++	+++++++
Asp 276 Ala	+++++	++++	+++++
Ser 281 Ala	++++	+++++	++++
Arg 80 Asp	++++	+++++	0
Asp 151 Arg	+++++	+++++	NE
Lys 183 Asp	+++	+	+++++
Arg 255 Asp	+++++	+++++	+++++++
Asp 160 Lys	0	+++++ <sup>a</sup>	NE

concentración de pTSH usada = 3 ng/ml.  
 Los efectos relativos de las mutaciones de TSHR se expresaron como un porcentaje de la actividad observada con el tipo silvestre de la siguiente manera: +++++ = 100 % de actividad de tipo silvestre; ++++ = < 100-80 % de actividad de tipo silvestre; +++ = <80-60 % de actividad de tipo silvestre; ++ = <60-40 % de actividad de tipo silvestre; + = <40-20 % de actividad de tipo silvestre; 0 = <20 % de actividad de tipo silvestre, y actividad aumentada en relación con el tipo silvestre: >100 % = ++++++. NE = No Ensayado.  
<sup>a</sup>La estimulación de AMP cíclico para este experimento se ensayó usando M22 debido a la falta de respuesta a TSH (véase el texto para detalles)

Tabla 22

Efecto de la mutación de TSHR Asp203Ala en la capacidad de los autoanticuerpos de TSHR de sueros de pacientes con actividad antagonista (B2-B5) para bloquear la estimulación por TSH de la producción de AMP cíclico		Concentración de AMP cíclico por % de inhibición por TSHR de tipo silvestre fmol/pocillo tipo silvestre fmol/pocillo celular. Media ± DT; n=3		Concentración de AMP cíclico por % de inhibición por TSHR Asp203Ala fmol/pocillo celular. Media ± DT; n=3	
Muestra de Ensayo y dilución de suero <sup>a</sup>	Tampón de ensayo de AMP cíclico	% de inhibición por TSHR de tipo silvestre fmol/pocillo tipo silvestre fmol/pocillo celular. Media ± DT; n=3	% de inhibición por TSHR Asp203Ala fmol/pocillo celular. Media ± DT; n=3	% de inhibición por TSHR de tipo silvestre fmol/pocillo tipo silvestre fmol/pocillo celular. Media ± DT; n=3	% de inhibición por TSHR Asp203Ala fmol/pocillo celular. Media ± DT; n=3
TSH <sup>c</sup>	9357 ± 1155	92	7591 ± 832	4	292 ± 89
TSH <sup>c</sup> + 5C9 1 µg/ml	1110 ± 811	0	9400 <sup>1</sup>	0	7591 ± 832
Grupo de HBD /10	183 ± 67	97	496 ± 76	80	9400 <sup>1</sup>
TSH <sup>c</sup> + Grupo de HBD /10	13303 ± 1819	74	9756 <sup>1</sup>	59	496 ± 76
B2 /10	110 ± 36	98	270 ± 72	98	9756 <sup>1</sup>
TSH <sup>c</sup> + B2 /10	454 ± 381	69	1963 ± 357	30	270 ± 72
B3/10	329 <sup>1</sup>	98	582 ± 74	30	1963 ± 357
TSH <sup>c</sup> + B3 /10	3407 ± 1341	98	4027 ± 278	30	582 ± 74
B4 /10	59 ± 22	98	161 ± 36	30	4027 ± 278
TSH <sup>c</sup> + B4 /10	278 ± 73	98	150 ± 41	30	161 ± 36
B5 /10	647 ± 170	98	1064 ± 228	30	150 ± 41
TSH <sup>c</sup> + B5 /10	4173 ± 515	98	6871 ± 618	30	1064 ± 228

<sup>a</sup> Dilución en tampón de ensayo de AMP cíclico.  
<sup>b</sup> % de inhibición de la estimulación de AMP cíclico inducida por TSH

$$100 \times \left[ 1 - \frac{\text{AMP cíclico producido en presencia de muestra de ensayo/10 y TSH (3 ng/ml)}}{\text{AMP cíclico producido en presencia de grupos de HBD/10 y TSH (3 ng/ml)}} \right]$$

<sup>1</sup> media de muestras por duplicado  
<sup>c</sup> pTSH usado a una concentración final de 3 ng/ml.  
 Grupo de HBD = grupo de sueros de donantes de sangre sanos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> R S R Limited

5 <120> Productos

<130> P108503PCT

10 <150> GB 0702990.3  
<151> 15-02-2007

<150> GB 0714036.1  
<151> 18-07-2007

15 <160> 11

<170> PatentIn versión 3.3

20 <210> 1  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 1

**Ser Asn Tyr Met Ser**  
**1 5**

30 <210> 2  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

**Val Thr Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly**  
**1 5 10 15**

35 <210> 3  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 3

**Gly Gly Arg Tyr Cys Ser Ser Ile Ser Cys Tyr Ala Arg Ser Gly Cys**  
**1 5 10 15**

**Asp Tyr**

45 <210> 4  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

50 <400> 4

**Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr Leu Asn**  
**1 5 10**

55 <210> 5  
<211> 7

ES 2 523 217 T3

<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

5

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser  
1 5

<210> 6  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 6

Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Ser Thr Thr  
1 5 10

15

<210> 7  
<211> 699  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 7

```

gaagtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ctgatccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggggt caccgtcagt agcaactaca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagtt acttatagcg gtggtagcac atcctacgca 180
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctt 240
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gccgtgtatt actgtgagag agggggggcga 300
tattgtagta gtataagctg ctacgcgagg agcgggtgtg actactgggg ccaggggaacc 360
ctggtcaccg tctcctcagc etccaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc 420
tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggccaagga ctacttcccc 480
gaaccggtga cgggtgctgtg gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg 540
gctgtcctac agtctcagc actctactcc ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc 600
agcttgggca cccagacctc catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg 660
gacaagagag ttgagcccaa atcttgtgac aaaactagt 699
    
```

25

<210> 8  
<211> 617  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

30

<400> 8

ES 2 523 217 T3

```

gcatccaga tgacccagtc tccttcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc aactatttaa attggtatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca 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 ccctccaatc gggtaactcc      480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg      540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag      600
ggcctgagct cgcccgt                                     617

```

<210> 9  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 9

5

ES 2 523 217 T3

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 80  
 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  
 145 150 155 160  
 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> *Homo sapiens*

5

<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 80

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  
 145 150 155 160

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> *Homo sapiens*  
 <400> 11

5

ES 2 523 217 T3

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



Thr Val Ile Thr Leu Glu Arg Trp Tyr Ala Ile Thr Phe Ala Met Arg  
 515 520 525  
 Leu Asp Arg Lys Ile Arg Leu Arg His Ala Cys Ala Ile Met Val Gly  
 530 535 540  
 Gly Trp Val Cys Cys Phe Leu Leu Ala Leu Leu Pro Leu Val Gly Ile  
 545 550 555  
 Ser Ser Tyr Ala Lys Val Ser Ile Cys Leu Pro Met Asp Thr Glu Thr  
 565 570 575  
 Pro Leu Ala Leu Ala Tyr Ile Val Phe Val Leu Thr Leu Asn Ile Val  
 580 585 590  
 Ala Phe Val Ile Val Cys Cys Cys Tyr Val Lys Ile Tyr Ile Thr Val  
 595 600 605  
 Arg Asn Pro Gln Tyr Asn Pro Gly Asp Lys Asp Thr Lys Ile Ala Lys  
 610 615 620  
 Arg Met Ala Val Leu Ile Phe Thr Asp Phe Ile Cys Met Ala Pro Ile  
 625 630 635 640  
 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

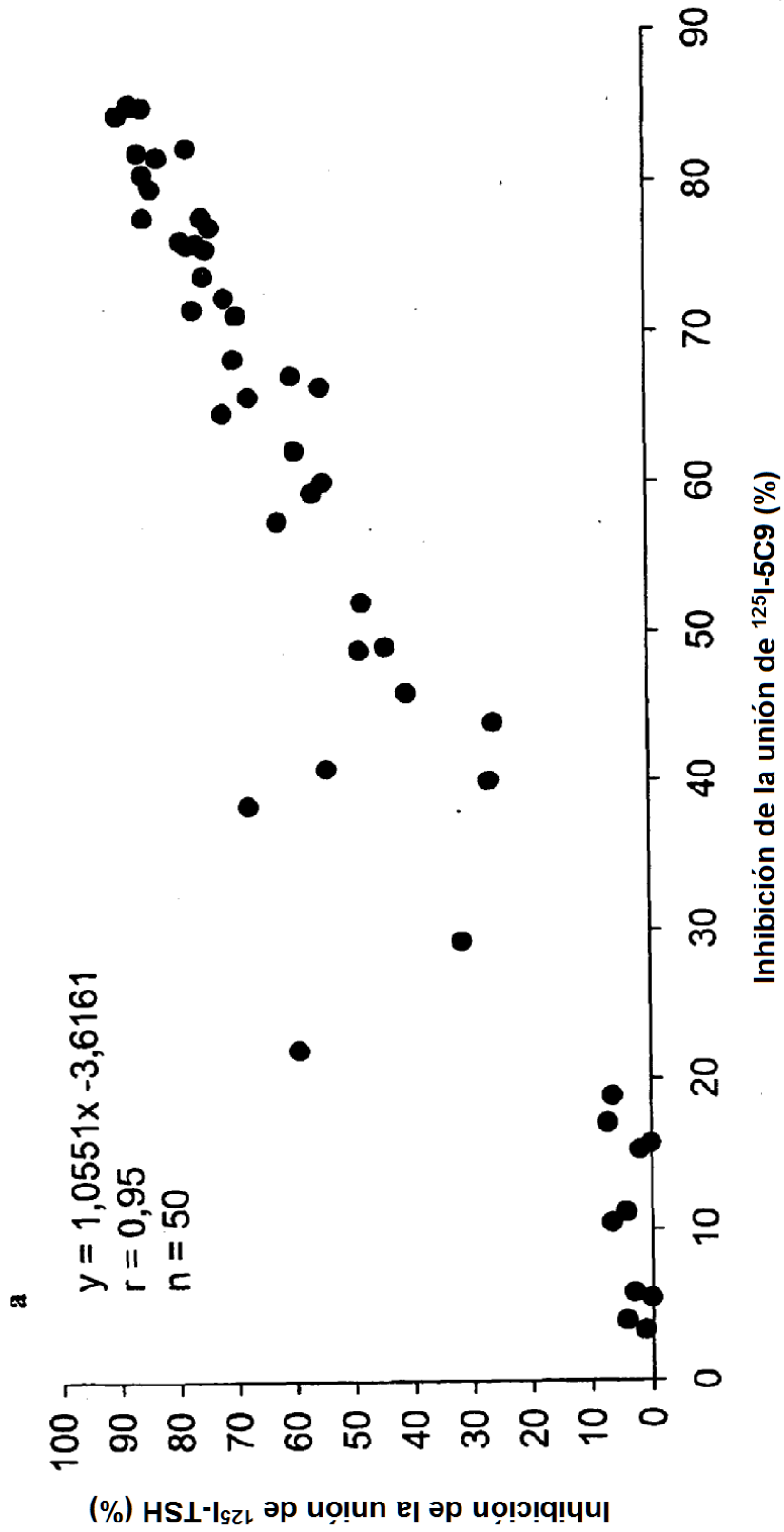
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal humano aislado para el Receptor de Hormona Estimulante del Tiroides (TSHR) que es un antagonista de la Hormona Estimulante del Tiroides (TSH) y tiene una afinidad de unión por el TSHR humano de longitud completa de aproximadamente  $10^9$  l/mol, en donde el anticuerpo comprende una región  $V_H$  que comprende:
- 10 SNYMS (CDR1);  
VTYSGGSTSYADSVKG (CDR2); y  
GGRYCSSISCYARSGCDY (CDR3),
- y una región  $V_L$  que comprende:
- 15 RASQISISNYLN (CDR1);  
AASSLQS (CDR2); y  
QQSYSSPSTT (CDR3).
- 20 2. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9 o una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 7 y la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10 o una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 8.
3. Un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 que tiene una afinidad de unión por el TSHR de longitud completa humano de aproximadamente  $10^{10}$  l/mol.
- 25 4. Un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 o 3 que inhibe la actividad constitutiva de TSHR.
5. Un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2, 3 o 4 que es un antagonista de anticuerpos estimulantes del tiroides.
- 30 6. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5 que es un antagonista de la TSH y es un antagonista de anticuerpos estimulantes del tiroides.
7. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que es un inhibidor de la unión con TSHR o una parte del mismo por TSH, por anticuerpos con actividad estimulante o anticuerpos con actividad de bloqueo para el TSHR.
- 35 8. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7 en el que la parte de TSHR incluye el Dominio Rico en Leucina (LRD) de TSHR o una parte sustancial del mismo.
- 40 9. Un nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Un vector que comprende un nucleótido de acuerdo con la reivindicación 9.
- 45 11. Una célula aislada que incluye un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
12. Una composición que comprende una concentración definida de autoanticuerpos de TSHR y que incluye un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 50 13. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
14. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13, incluyendo la composición uno o más antagonistas del receptor de la hormona estimulante del tiroides adicionales.
- 55 15. Un método para producir un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, comprendiendo el método cultivar una célula de acuerdo con la reivindicación 11 por lo que el anticuerpo es expresado por la célula.
- 60 16. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso en terapia médica.
17. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso en el tratamiento de una afección relacionada con el tiroides.
- 65 18. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 17 en el que la afección relacionada con el tiroides se selecciona de hiperactividad del tiroides, enfermedad ocular de Graves, hipertiroidismo neonatal, hipertiroidismo inducido por

gonadotropina coriónica humana, mixoedema pretibial, cáncer de tiroides y tiroiditis.

- 5 19. Un método para caracterizar anticuerpos de TSHR, comprendiendo el método determinar la unión de un anticuerpo de TSHR que se ensaya con un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos relacionada con TSHR en donde el método implica una etapa de método que incluye el uso de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 10 20. Un método de acuerdo con la reivindicación 18, comprendiendo el método determinar los efectos de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en la unión de un anticuerpo de TSHR con ese polipéptido.
21. Un método de acuerdo con la reivindicación 20 en el que el polipéptido relacionado con TSHR comprende TSHR humano de longitud completa.
- 15 22. Un método para caracterizar la TSH y moléculas relacionadas, que comprende determinar la unión de la TSH o de una molécula relacionada que se ensaya con un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos relacionada con TSHR, en donde el método implica una etapa de método que incluye el uso de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 20 23. Un método de acuerdo con la reivindicación 22 en un formato de ELISA.
- 25 24. Un método para determinar los aminoácidos de TSHR implicados en la unión de autoanticuerpos de TSHR que actúan como antagonistas, comprendiendo el método proporcionar un polipéptido que tiene una primera secuencia de aminoácidos relacionada con TSHR a la que se une un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, modificar al menos un aminoácido en la secuencia de aminoácidos relacionada con TSHR y determinar el efecto de dicha modificación en la unión del anticuerpo.
- 30 25. Un método para modificar un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, comprendiendo el método modificar al menos un aminoácido del anticuerpo y determinar un efecto de dicha modificación en la unión con una secuencia relacionada con TSHR.
- 35 26. Un método para identificar moléculas que inhiben anticuerpos estimulantes del tiroides que se unen con el TSHR, comprendiendo el método proporcionar al menos un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 como referencia.
- 40 27. Un método para identificar moléculas que inhiben anticuerpos de bloqueo del tiroides que se unen con el TSHR, comprendiendo el método proporcionar al menos un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 como referencia.
28. Un método de acuerdo con la reivindicación 27 en el que se seleccionan moléculas que impiden la unión de anticuerpos de bloqueo del tiroides con TSHR.

Figura 1



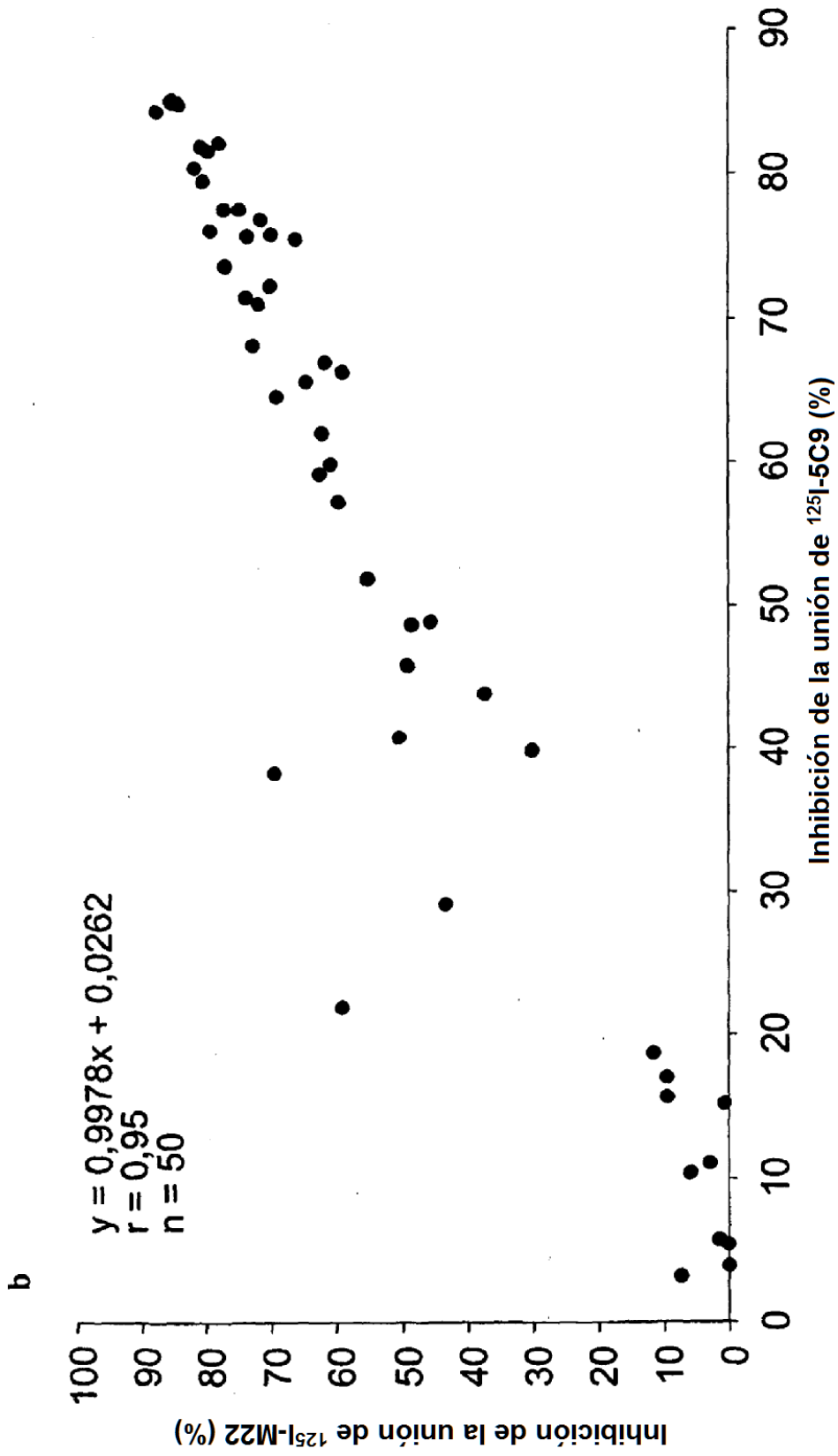




Figura 2

a

gaagtgcagctggaggagtctggaggaggcctgatccagcctgggggggtc  
 cctgagactctcctgtgcagcctctgggttcaccgtcagtagcaactaca  
 tgagctgggtccgccaggctccaggggaaggggctggagtgggtctcagtt  
 acttatagcggtagcacaatcctacgcagactccgtgaagggccgatt  
 caccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatcttcaaataaaca  
 gcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagagggggcga  
 tattgtagtagtataaagctgctacgcgaggagcgggtgtgactactgggg  
 ccagggaaaccctgggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcccacgg  
 tcttccccctggcaccctctccaagagcacctctgggggacacagcggcc  
 ctgggtgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctgtg  
 gaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccggctgtcctac  
 agtcctcaggactctactcctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagc  
 agcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaa  
 caccaaggtggacaagagagttgagcccaaatcttgtgacaaaactagt

cebador de PCR

gaagtgcagctggaggagtctggaggaggcctgatccagcctgggggggtc	50
cctgagactctcctgtgcagcctctgggttcaccgtcagtagcaactaca	100
tgagctgggtccgccaggctccaggggaaggggctggagtgggtctcagtt	150
acttatagcggtagcacaatcctacgcagactccgtgaagggccgatt	200
caccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatcttcaaataaaca	250
gcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagagggggcga	300
tattgtagtagtataaagctgctacgcgaggagcgggtgtgactactgggg	350
ccagggaaaccctgggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcccacgg	400
tcttccccctggcaccctctccaagagcacctctgggggacacagcggcc	450
ctgggtgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctgtg	500
gaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccggctgtcctac	550
agtcctcaggactctactcctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagc	600
agcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaa	650
caccaaggtggacaagagagttgagcccaaatcttgtgacaaaactagt	699

CDR 1  
 CDR 2  
 CDR 3

región constante

b

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWVSV  
 TYSGGSTSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGR  
 YCSSISCYARSGCDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA  
 LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS  
 SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTS

cebador de PCR			
EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWVSV	CDR 1	CDR 2	50
TYSGGSTSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGR		CDR 3	100
YCSSISCYARSGCDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA	región constante		150
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS			200
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTS			233

Figura 3

a

gccatccagatgacccagttccttcctccctgtctgcatctgtaggaga  
 cagagtcaccatcacttgccgggcaagtacagagcattagcaactatttaa  
 attggtatcagcagaaaccagggaaagcccctaagctcctgatctatgct  
 gcatccagtttgcaaagtggggtcccatcaaggttcagtggcagtgatc  
 tgggacagatttcactctcaccatcagcagctctgcaacctgaagatttg  
 caacttactactgtcaacagagttacagttccccctccaccacttttggc  
 caggggaccaagctggagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtctt  
 catcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttg  
 tgtgectgctgaataaacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaag  
 gtggataaacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgccacagagca  
 ggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagca  
 aagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcag  
 ggectgagctcgccgt

cebador de PCR

<u>gccatccagatgacccagttccttcctccctgtctgcatctgtaggaga</u>	50
<u>cagagtcaccatcacttgccgggcaagtacagagcattagcaactatttaa</u>	100
<u>at</u> tgggtatcagcagaaaccagggaaagcccctaagctcctgatctat <u>gct</u>	150
<u>gcatccagtttgcaaagt</u> ggggtcccatcaaggttcagtggcagtgatc	200
tgggacagatttcactctcaccatcagcagctctgcaacctgaagatttg	250
caacttactactgt <u>caacagagttacagttccccctccaccact</u> tttggc	300
caggggaccaagctggagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtctt	350
catcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttg	400
tgtgectgctgaataaacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaag	450
gtggataaacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgccacagagca	500
ggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagca	550
aagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcag	600
ggectgagctcgccgt	617

b

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SNYLNWYQKPGKAPKLLIYA  
 ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLOPEDFATYYCQOSYSSPSTTFG  
 QGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK  
 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ  
 GLSSP

cebador de PCR			
	CDR 1	CDR 2	
AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	<u>RASQSI SNYLN</u>	WYQKPGKAPKLLIYA	50
<u>ASSLQS</u>		CDR 3	
GVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLOPEDFATYYC	<u>QOSYSSPSTTFG</u>		100
	región constante		
QGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK			150
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ			200
GLSSP			205

Figura 4

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	KLDVAVLNKN	KYLTVIDKDA	FGGVYSGPSL	LDVVSQTSVTA	240
241	LPSKGLEHLK	ELIARNTWTL	KKLPLSLSFL	HLTRADLSYP	SHCCAFKNQK	KIRGILESML	300
301	CNESSMQSLR	QRKSVNALNS	PLHQEYEENL	GDSIVGYKEK	SKFQDTHNNA	HYYVFFEEQE	360
361	DEIIGFGQEL	KNPQEETLQA	FDSHYDYTIC	GDSEDMVCTP	KSDEFNPCED	IMGYKFLRIV	420
421	VWFVSLIALL	GNVFLVLLLL	TSHYKLVNPR	FLMCNLAFAD	FCMGMYLLLI	ASVDLYTHSE	480
481	YYNHAIDWQT	GPGCNTAGFF	TVFASELSVY	TLTVITLERW	YAITFAMRLD	RKIRLRHACA	540
541	IMVGGWVCCF	LLALLPLVGI	SSYAKVSICL	PMDTETPLAL	AYIVFVLTLN	IVAFVIVCCC	600
601	YVKIYITVRN	PQYNPGDKDT	KIAKRMAVLI	FTDFICMAPI	SFYALSAILN	KPLITVSNK	660
661	ILLVLFYPLN	SCANPFLYAI	FTKAFQDVVF	ILLSKFGICK	RQAQAYRGQR	VPPKNSTDIQ	720
721	VQKVTHDMRQ	GLHNMEDVYE	LIENSHLTPK	KQGQISEEYM	QTVL		764