(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2010-521139
(P2010-521139A)
(43)公表日　平成22年6月24日(2010.6.24)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	2G045
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28		4B024
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08		4B064
C12N 15/02	(2006.01)	C12N	15/00	C	4B065
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	102	4C085

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 139 頁）　最終頁に続く

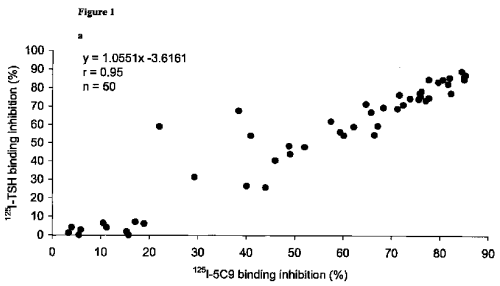
(21)出願番号　特願2009-549848 (P2009-549848)
(86)(22)出願日　平成20年2月14日 (2008.2.14)
(85)翻訳文提出日　平成21年10月19日 (2009.10.19)
(86)国際出願番号　PCT/GB2008/000518
(87)国際公開番号　WO2008/099185
(87)国際公開日　平成20年8月21日 (2008.8.21)
(31)優先権主張番号　60/901,332
(32)優先日　平成19年2月15日 (2007.2.15)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　0702990.3
(32)優先日　平成19年2月15日 (2007.2.15)
(33)優先権主張国　英国 (GB)
(31)優先権主張番号　0714036.1
(32)優先日　平成19年7月18日 (2007.7.18)
(33)優先権主張国　英国 (GB)

(71)出願人　507044468
アールエスアール　リミテッド
イギリス国，カーディフ　シーエフ２３　８エイチイー，ペントゥィン，アヴェニュー・パーク（番地なし）
(74)代理人　100100549
弁理士　川口　嘉之
(74)代理人　100090516
弁理士　松倉　秀実
(74)代理人　100106622
弁理士　和久田　純一
(74)代理人　100089244
弁理士　遠山　勉
(74)代理人　100126505
弁理士　佐貫　伸一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アンタゴニストとして作用する、サイロトロピンレセプターに対するヒトモノクローナル抗体

(57)【要約】
本発明はＴＳＨのアンタゴニストである、ＴＳＨＲに対する単離抗体を提供する。本発明はまた、本発明の抗体の使用法に関する。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
甲状腺刺激ホルモン（ＴＳＨ）のアンタゴニストである、甲状腺刺激ホルモンレセプター（ＴＳＨＲ）に対する単離されたヒト抗体。
【請求項２】
ＴＳＨのアンタゴニストである、ＴＳＨＲに対する単離されたヒト化抗体。
【請求項３】
甲状腺刺激性抗体のアンタゴニストである、請求項１または２に記載の抗体。
【請求項４】
ＴＳＨのアンタゴニストである患者血清ＴＳＨＲ自己抗体のＴＳＨアンタゴニスト特性を有する、請求項１、２、または３に記載の抗体。
【請求項５】
ＴＳＨのアンタゴニストおよび甲状腺刺激性抗体のアンタゴニストである、請求項３または４に記載の抗体。
【請求項６】
甲状腺刺激性抗体のアンタゴニストである患者血清ＴＳＨＲ自己抗体のアンタゴニスト特性を有する、請求項１～５のいずれか１項に記載の抗体。
【請求項７】
ＴＳＨ、Ｍ２２、ＴＳＨＲへの刺激活性を有する抗体、または遮断活性を有する抗体によるＴＳＨＲもしくはその一部への結合の阻害剤である、請求項１～６のいずれか１項に記載の抗体。
【請求項８】
該ＴＳＨＲの一部がＴＳＨＲのロイシンリッチドメイン（ＬＲＤ）またはその実質的な一部を含む、請求項７に記載の抗体。
【請求項９】
前記結合を阻止する、請求項７または８に記載の抗体。
【請求項１０】
モノクローナルもしくはリコンビナント抗体であるか、またはその断片を含むかもしくはその断片よりなる、請求項１～９のいずれか１項に記載の抗体。
【請求項１１】
１または２以上の相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むV_H領域を含む請求項１～１０のいずれか１項に記載の抗体であって、該ＣＤＲが、
ａ）ＳＮＹＭＳ（ＣＤＲ１）；
ｂ）ＶＴＹＳＧＧＳＴＳＹＡＤＳＶＫＧ（ＣＤＲ２）；または
ｃ）ＧＧＲＹＣＳＳＩＳＣＹＡＲＳＧＣＤＹ（ＣＤＲ３）
またはこれらのＣＤＲに実質的な相同性を有する１または２以上のアミノ酸配列から選択される抗体。
【請求項１２】
１または２以上のＣＤＲを含むV_L領域を含む請求項１～１１のいずれか１項に記載の抗体であって、該ＣＤＲが、
ａ）ＲＡＳＱＳＩＳＮＹＬＮ（ＣＤＲ１）；
ｂ）ＡＡＳＳＬＱＳ（ＣＤＲ２）；または
ｃ）ＱＱＳＹＳＳＰＳＴＴ（ＣＤＲ３）
またはこれらのＣＤＲに実質的な相同性を有する１または２以上のアミノ酸配列から選択される抗体。
【請求項１３】
ヒト完全長ＴＳＨＲに対して約10^{10}Ｌ／ｍｏｌの結合アフィニティーを有する、請求項１～１２のいずれか１項に記載の抗体。
【請求項１４】
ヒト完全長ＴＳＨＲに対して約10^{9}Ｌ／ｍｏｌの結合アフィニティーを有する、請求

項１～１２のいずれか１項に記載の抗体。
【請求項１５】
ヌクレオチドであって、
ａ．請求項１～１４のいずれか１項に記載の抗体をコードするヌクレオチド配列；
ｂ．
ｉ．
gaagtgcagctggtggagtctggaggaggcctgatccagcctgggggtc cctgagactctcctgtgcagcctctgggt
tcaccgtcagtagcaactaca tgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctcagtt acttata
gcggtggtagcacatcctacgcagactccgtgaagggccgatt
caccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatcttcaaatgaaca gcctgagagccgaggacacggccgtgtat
tactgtgcgagaggggggcga tattgtagtagtataagctgctacgcgaggagcgggtgtgactactgggg ccaggga
accctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcccatcgg tcttcccccctggcaccctcctccaagagcacctctg
ggggcacagcggcc ctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtg gaactcaggcgccc
tgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctac agtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcc
ctccagc agcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaa caccaaggtggacaagagagt
tgagcccaaatcttgtgacaaaactagt ；または
ｉｉ．
gccatccagatgacccagtctccttcctccctgtctgcatctgtaggaga cagagtcaccatcacttgccgggcaagtc
agagcattagcaactatttaa attggtatcagcagaaaccagggaaagcccctaagctcctgatctatgct gcatcca
gtttgcaaagtggggtcccatcaaggttcagtggcagtggatc tgggacagatttcactctcaccatcagcagtctgca
acctgaagattttg caacttactactgtcaacagagttacagttccccctccaccacttttggc caggggaccaagct
ggagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtctt catcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcc
tctgttg tgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaag gtggataacgccctccaatcg
ggtaactcccaggagagtgtcacagagca ggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagca
aagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcag
ggcctgagctcgcccgt
から選択され、
抗体V_Hドメイン；および抗体V_Lドメインまたは
ｉ．ＳＮＹＭＳ（ＣＤＲ１）；
ｉｉ．ＶＴＹＳＧＧＳＴＳＹＡＤＳＶＫＧ（ＣＤＲ２）；
ｉｉｉ．ＧＧＲＹＣＳＳＩＳＣＹＡＲＳＧＣＤＹ（ＣＤＲ３）；
ｉｖ．ＲＡＳＱＳＩＳＮＹＬＮ（ＣＤＲ１）；
ｖ．ＡＡＳＳＬＱＳ（ＣＤＲ２）；または
ｖｉ．ＱＱＳＹＳＳＰＳＴＴ（ＣＤＲ３）
から選択されるＣＤＲのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列もしくはその一部分；または
ｃ．ａ．またはｂ．のヌクレオチド配列への高い相同性を有し、かつ少なくとも約10^9Ｌ／ｍｏｌのアフィニティーでＴＳＨＲに結合する抗体をコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド。
【請求項１６】
請求項１５に記載のヌクレオチドを含むベクター。
【請求項１７】
請求項１～１４のいずれか１項に記載の抗体を含む単離細胞。
【請求項１８】
請求項１～１４のいずれか１項に記載の抗体を発現する単離細胞。
【請求項１９】
請求項１～１４のいずれか１項に記載の抗体を分泌する単離細胞。
【請求項２０】
安定ヘテロ－ハイブリドーマ細胞株由来である、請求項１７，１８、または１９に記載の単離細胞。

【請求項２１】
請求項１～１４のいずれか１項に記載の抗体を含む、規定濃度の、ＴＳＨＲ自己抗体を含む組成物。
【請求項２２】
請求項１～１４のいずれか１項に記載の抗体を含む、規定濃度の、ＴＳＨアンタゴニスト活性を有するＴＳＨＲ自己抗体を含む組成物。
【請求項２３】
請求項１～１４のいずれか１項に記載の抗体を含む、規定濃度の、甲状腺刺激性抗体のアンタゴニストであるＴＳＨＲ自己抗体を含む組成物。
【請求項２４】
請求項１～１４のいずれか１項に記載の抗体を含む、規定濃度の、ＴＳＨアンタゴニスト活性を有し、かつ甲状腺刺激性抗体のアンタゴニストであるＴＳＨＲ自己抗体を含む組成物。
【請求項２５】
請求項１～１４のいずれか１項に記載の抗体を薬理学的に許容される担体と共に含み、甲状腺関連疾患の治療のために哺乳類被療体に投与するための医薬組成物。
【請求項２６】
該甲状腺関連疾患が甲状腺活動亢進症、グレーブス眼病、新生児甲状腺機能亢進症、ヒト絨毛性ゴナドトロピン誘導性甲状腺機能亢進症、前頚骨粘液水腫、甲状腺癌、および甲状腺炎から選択される、請求項２５に記載の医薬組成物。
【請求項２７】
ヒトへの投与に適する、請求項２５または２６に記載の医薬組成物。
【請求項２８】
該抗体が被療体の免疫システムにおいて有意な有害作用をもたない、請求項２５、２６または２７に記載の医薬組成物。
【請求項２９】
該組成物が１または２以上のさらなる甲状腺刺激ホルモンレセプターアンタゴニストを含む、請求項２５～２８のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項３０】
該さらなる甲状腺刺激ホルモンレセプターアンタゴニストが９Ｄ３３である、請求項２９に記載の医薬組成物。
【請求項３１】
注射用の形式である、甲状腺関連疾患の治療における使用のための請求項２５～３０のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項３２】
局所用の形式である、前頚骨粘液水腫の治療における使用のための請求項２５～３０のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項３３】
点眼薬の形式である、グレーブス眼病の治療における使用のための請求項２５～３０のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項３４】
請求項１～１４のいずれか１項に記載の抗体の産生方法であって、請求項１７～２０のいずれか１項に記載の細胞を培養することにより該細胞に該抗体を発現させることを含む方法。
【請求項３５】
該抗体が該細胞により分泌される、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
哺乳類被療体または該被療体由来の細胞における甲状腺関連疾患の治療方法であって、該被療体、または該細胞を請求項１～１４のいずれか１項に記載の抗体に接触させることを含む方法。

【請求項３７】
該甲状腺関連疾患が甲状腺活動亢進症、グレーブス眼病、新生児甲状腺機能亢進症、ヒト絨毛性ゴナドトロピン誘導性甲状腺機能亢進症、前頚骨粘液水腫、甲状腺癌、および甲状腺炎から選択される、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
哺乳類被療体の甲状腺中のＴＳＨＲを刺激する甲状腺刺激性自己抗体の阻害方法であって、該被療体を請求項１～１４のいずれか１項に記載の抗体に接触させることを含む方法。
【請求項３９】
甲状腺刺激性自己抗体のＴＳＨＲへの結合が阻止される、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
哺乳類被療体の甲状腺外ＴＳＨＲに結合する甲状腺刺激性自己抗体の阻害方法であって、該被療体を請求項１～１４のいずれか１項に記載の抗体に接触させることを含む方法。
【請求項４１】
該甲状腺外ＴＳＨＲが該被療体の後眼窩組織および／または前頚骨組織に存在する、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
該抗体が、甲状腺外ＴＳＨＲに結合するＴＳＨＲ自己抗体を遮断する、請求項４０または４１に記載の方法。
【請求項４３】
甲状腺内にあるか、または転移した甲状腺癌を、被療体内か、または被療体由来の甲状腺細胞において治療する方法であって、細胞内の恒常的甲状腺刺激ホルモンレセプター活性を阻害するために、癌性細胞を請求項１～１４のいずれか１項に記載の抗体に接触させることを含む方法。
【請求項４４】
甲状腺癌細胞の再増殖が阻止または遅延される、請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
恒常的な甲状腺活性による甲状腺活動亢進症を、被療体内か、または被療体由来の甲状腺細胞において治療する方法であって、このような甲状腺活動亢進を阻害するために、被療体または細胞を請求項１～１４のいずれか１項に記載の抗体に接触させることを含む方法。
【請求項４６】
該被療体がヒトである、請求項３６～４５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４７】
甲状腺関連疾患の治療における、請求項１～１４のいずれか１項に記載の抗体の使用。
【請求項４８】
甲状腺関連疾患の治療のための薬剤の調製における、請求項１～１４のいずれか１項に記載の抗体の使用。
【請求項４９】
医学的治療における使用のための、請求項１～１４のいずれか１項に記載の抗体。
【請求項５０】
甲状腺関連疾患の治療における使用のための、請求項１～１４のいずれか１項に記載の抗体。
【請求項５１】
該甲状腺関連疾患が甲状腺活動亢進症、グレーブス眼病、新生児甲状腺機能亢進症、ヒト絨毛性ゴナドトロピン誘導性甲状腺機能亢進症、前頚骨粘液水腫、甲状腺癌、および甲状腺炎から選択される、請求項５０に記載の抗体。
【請求項５２】
ＴＳＨＲ抗体を特徴付けるための方法であって、ＴＳＨＲ関連アミノ酸配列を有するポリペプチドへの試験されるＴＳＨＲ抗体の結合を決定することを含み、請求項１～１４の

いずれか１項に記載の抗体の使用を含む方法工程に関わる方法。
【請求項５３】
ＴＳＨＲ抗体の該ポリペプチドへの結合における請求項１～１４のいずれか１項に記載の抗体の効果を決定することを含む、請求項５２に記載の方法。
【請求項５４】
該ＴＳＨＲ関連ポリペプチドが完全長ヒトＴＳＨＲを含む、請求項５３に記載の方法。
【請求項５５】
ＴＳＨおよび関連分子を特徴付けるための方法であって、ＴＳＨＲ関連アミノ酸配列を有するポリペプチドへの、試験されるＴＳＨ、または関連分子の結合を決定することを含み、請求項１～１４のいずれか１項に記載の抗体の使用を含む方法工程に関わる方法。
【請求項５６】
ＥＬＩＳＡ形式である、請求項５５に記載の方法。
【請求項５７】
アンタゴニストとして作用するＴＳＨＲ自己抗体の結合に関わるＴＳＨＲアミノ酸を決定する方法であって、請求項１～１４のいずれか１項に記載の抗体が結合する第一のＴＳＨＲ関連アミノ酸配列を有するポリペプチドを提供すること、該ＴＳＨＲ関連アミノ酸配列において少なくとも１個のアミノ酸を改変すること、およびこのような改変の効果を抗体の結合において決定することを含む方法。
【請求項５８】
請求項１～１４のいずれか１項に記載の抗体を改変するための方法であって、該抗体の少なくとも１個のアミノ酸を改変すること、およびこのような改変の効果をＴＳＨＲ関連配列への結合において決定することを含む方法。
【請求項５９】
改変ＴＳＨＲ抗体は、ＴＳＨＲに対する増強されたアフィニティーを有するものが選択される、請求項５８に記載の方法。
【請求項６０】
ＴＳＨＲに結合する甲状腺刺激性抗体を阻害する分子を同定するための方法であって、請求項１～１４のいずれか１項に記載の少なくとも１種の抗体を参照として提供することを含む方法。
【請求項６１】
ＴＳＨＲに結合する甲状腺刺激性抗体を阻止する分子が選択される、請求項６０に記載の方法。
【請求項６２】
ＴＳＨＲに結合する甲状腺遮断性抗体を阻害する分子を同定するための方法であって、請求項１～１４のいずれか１項に記載の少なくとも１種の抗体を参照として提供することを含む方法。
【請求項６３】
ＴＳＨＲに結合する甲状腺遮断性抗体を阻止する分子が選択される、請求項６２に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明はサイロトロピン（ＴＳＨ）レセプター（ＴＳＨＲ）と反応する抗体に関し、限定はされないが、特に、ＴＳＨＲに結合して、ＴＳＨまたはＴＳＨＲ刺激性抗体によるＴＳＨＲへの刺激を阻害できる抗体に関する。
【背景技術】
【０００２】
サイロトロピン、すなわち甲状腺刺激ホルモン（ＴＳＨ）は、ＴＳＨＲを通して甲状腺機能を調節する下垂体ホルモンである（Szkudlinski MW, Fremont V, Ronin C, Weintraub BD 2002 Thyroid-stimulating hormone and TSHR structure-function relationships.

Physiological Reviews 82: 473-502）。ＴＳＨＲはＧタンパク質共役型レセプターであり、ロイシンリッチドメイン（ＬＲＤ）、切断ドメイン（ＣＤ）、および膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）の３つのドメインよりなる（Nunez Miguel R, Sanders J, Jeffreys J, Depraetere H, Evans M, Richards T, Blundell TL, Rees Smith B, Furmaniak J 2004 Analysis of the thyrotropin receptor- thyrotropin interaction by comparative modelling. Thyroid 14: 991-1011）。ＴＳＨのＴＳＨＲへの結合により、甲状腺ホルモンであるサイロキシン（Ｔ４）およびトリヨードサイロニン（Ｔ３）の形成および放出への刺激を導くレセプターシグナルを引き起こされる。循環しているＴ４およびＴ３の濃度に関わる負のフィードバックのメカニズムは下垂体からのＴＳＨの放出（および視床下部から分泌されるサイロトロピン放出ホルモン）を制御し、これが次に甲状腺刺激、および血清中の甲状腺ホルモンの濃度を制御する。

【０００３】

当該技術分野において、ある自己免疫性甲状腺疾患（ＡＩＴＤ）の患者がＴＳＨＲと反応する自己抗体を有することはよく実証されている（Rees Smith B, McLachlan SM, Furmaniak J 1988 Autoantibodies to the thyrotropin receptor. Endocrine Reviews 9: 106-121）。大部分の場合、これらの自己抗体はＴＳＨＲに結合してＴＳＨの作用を模倣することにより、甲状腺を刺激して高濃度のＴ４およびＴ３を産生する。これらの自己抗体は、刺激活性またはＴＳＨアゴニスト活性を有する、甲状腺刺激性自己抗体またはＴＳＨＲ自己抗体（ＴＲＡｂ）として記載されている。上述の甲状腺機能制御の生理的フィードバックメカニズムは、このような甲状腺刺激性自己抗体の存在下、および甲状腺機能亢進または甲状腺中毒症（血清中の過剰な甲状腺ホルモン）の徴候をもつ患者には有効でない。この疾患はグレーブス病として知られる。ある患者において、刺激活性のあるＴＲＡｂは後眼窩組織のＴＳＨＲとの相互作用に関与し、かつグレーブス病の目の徴候の一因となると考えられている。強力な甲状腺刺激剤として作用するヒトモノクローナル自己抗体（ｈＭＡｂであるＴＳＨＲ１）の詳細が、特許出願の国際公開第２００４／０５０７０８Ａ２号に記載されている。

【０００４】

一方ＡＩＴＤのある患者においては、自己抗体はＴＳＨＲに結合してＴＳＨのレセプターへの結合を阻止するが、ＴＳＨＲへの刺激能はもたない。このタイプの自己抗体は遮断活性またはＴＳＨアンタゴニスト活性をもつＴＲＡｂとして知られており、血清中に遮断性のＴＲＡｂを有する患者は、不活発な甲状腺の症状（甲状腺機能低下症）を有し得る（Rees Smith B, McLachlan SM, Furmaniak J 1988 Autoantibodies to the thyrotropin receptor. Endocrine Reviews 9: 106-121）。特に、妊婦の血清中に遮断活性を有するＴＲＡｂが存在すると、これが胎盤を通過して胎児の甲状腺ＴＳＨＲを遮断する場合があり、新生児甲状腺機能低下症および発育における重篤な結果を引き起こす。さらに、遮断活性を有するＴＲＡｂは発症した母親の母乳中に見出され、これが乳児の臨床的な甲状腺機能低下症のさらなる一因となり得る。現在までのところ、ＴＳＨアンタゴニスト活性を有する、ＴＳＨＲに対するヒトモノクローナル自己抗体は入手不可能である。従って、このタイプの自己抗体がどのようにＴＳＨＲと相互作用するか、およびそのＴＳＨＲとの相互作用が、刺激性の自己抗体（例えばＭ２２）およびＴＳＨとＴＳＨＲとの相互作用とどのように比較されるかについての詳細な研究は限られている。

【０００５】

ヒト絨毛性ゴナドトロピンは、妊娠中に産生される、軽度の甲状腺刺激効果をもつホルモンである。

【０００６】

刺激活性または遮断活性によりＴＲＡｂの性質を特徴づけることは、ＴＳＨＲへの自己免疫反応に関連する疾患の診断および管理を改善することを目標とする研究において決定的に重要である。特許出願の国際公開第２００４／０５０７０８Ａ２号に記載されている発明は、強力な刺激活性をもつヒトモノクローナル自己抗体の性質およびそのＴＳＨＲとの相互作用についての詳細を提供する。さらに、特許出願の国際公開第２００６／０１６

１２１Ａ号は、少なくとも１つの点突然変異を含む変異ＴＳＨＲ製剤を開示しており、これは患者血清刺激性ＴＳＨＲ自己抗体、患者血清遮断性ＴＳＨＲ自己抗体、およびスクリーニングされた患者体液サンプル中のＴＳＨの識別スクリーニングおよび同定に用いられる。特許出願の国際公開第２００４／０５０７０８Ａ２号はまた、ＴＳＨＲ遮断活性をもつマウスモノクローナル抗体（９Ｄ３３）について記載している。９Ｄ３３は高アフィニティー（２ｘ１０^{10}Ｌ／ｍｏｌ）でＴＳＨＲに結合する、ＴＳＨ、ｈＭＡｂであるＴＳＨＲ１（Ｍ２２）、および刺激活性または遮断活性をもつ患者血清ＴＲＡｂの効果的なアンタゴニストである（特許出願国際公開第２００４／０５０７０８Ａ２号およびSanders J, Allen F, Jeffreys J, Bolton J, Richards T, Depraetere H, Nakatake N, Evans M, Kiddie A, Premawardhana LD, Chirgadze DY, Miguel RN, Blundell TL, Furmaniak J, Rees Smith B 2005 Characteristics of a monoclonal antibody to the thyrotropin receptor that acts as a powerful thyroid-stimulating autoantibody antagonist. Thyroid 15: 672-682）。このマウスモノクローナル抗体９Ｄ３３は、遮断活性をもつ患者血清ＴＲＡｂの特性の少なくとも幾つかを示すものの、これは実験動物をＴＳＨＲで免役することにより作られたマウス抗体であり、ヒトにおけるＴＳＨＲへの自己免疫反応過程で産生されるＴＳＨＲ自己抗体を真に表し得ない。マウスモノクローナル抗体として、９Ｄ３３はヒトにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ応用のためにヒト化される必要がある。このことは、ヒト化の過程に関わる費用および複雑化を考慮すれば不利であり得る。

【０００７】

本発明は、患者血清中のＴＳＨおよび刺激性ＴＲＡｂの効果的なアンタゴニストである、ＴＳＨＲに対するヒトモノクローナル自己抗体（５Ｃ９）の産生および特性に由来する。５Ｃ９は、甲状腺機能低下症および高濃度のＴＳＨＲ自己抗体を有する患者の末梢リンパ球から単離された。このリンパ球をエプスタイン・バーウィルス（ＥＢＶ）の感染により不死化させ、安定クローンを作製するために陽性クローンをマウス／ヒト細胞株と融合した。クローン培養の上清からＩｇＧを精製し、５Ｃ９ＩｇＧのＴＳＨＲへの結合能、およびＴＳＨＲ活性への影響を評価した。特に、ＴＳＨＲへのＴＳＨの結合の阻害、およびＴＳＨのサイクリックＡＭＰ刺激活性の阻害に対する５Ｃ９の能力について調べた。さらに、刺激性または遮断性の患者血清ＴＲＡｂのＴＳＨＲへの結合の阻害、およびそれらの生物活性の阻害に対する５Ｃ９の能力もまた評価した。加えて、ＴＳＨＲ抗体、ＴＳＨ、および関連化合物のアッセイにおける５Ｃ９の使用も検討した。５Ｃ９の、重鎖（ＨＣ）および軽鎖（ＬＣ）の可変領域（Ｖ領域）の遺伝子の配列を決定し、相補性決定領域（ＣＤＲ）を特定した。

【発明の概要】

【０００８】

本発明の第一の態様によれば、ＴＳＨのアンタゴニストである、ＴＳＨＲに対する単離されたヒト抗体が提供される。

【０００９】

本発明の第二の態様によれば、ＴＳＨのアンタゴニストである、ＴＳＨＲに対する単離されたヒト化抗体が提供される。

【００１０】

本発明の第一または第二の態様いずれかによる抗体は、「本発明による抗体」である。

【００１１】

本発明による抗体は甲状腺刺激性抗体のアンタゴニストであってよい。

【００１２】

本発明による抗体は、ＴＳＨアンタゴニストである患者血清ＴＳＨＲ自己抗体のＴＳＨアンタゴニスト特性を有してよい。

【００１３】

本発明による抗体は、ＴＳＨのアンタゴニストおよび甲状腺刺激性抗体のアンタゴニストであってよい。

【００１４】

本発明による抗体は、甲状腺刺激性抗体のアンタゴニストである患者血清ＴＳＨＲ自己抗体のアンタゴニスト特性を有してよい。

【００１５】

本発明による抗体は、ＴＳＨ、Ｍ２２、またはＴＳＨＲへの刺激活性をもつ抗体または遮断活性をもつ抗体による、ＴＳＨＲまたはその一部への結合の阻害剤であってよい。ＴＳＨＲの一部はＬＲＤまたはその実質的な一部を含んでよい。好ましくは、このような結合を阻止する抗体である。

【００１６】

本発明による抗体は、モノクローナルもしくはリコンビナント抗体であってよいか、またはＴＳＨのアンタゴニストであるその断片を含むかもしくはその断片からなってよい。本発明による抗体は、図２に示されるＣＤＲ１、ＣＤＲ２、またはＣＤＲ３から選択される１または２以上のＣＤＲ、またはこれらＣＤＲに実質的な相同性を有する１または２以上のアミノ酸配列を含むV_H領域を含んでよい。さらに、またはあるいは、本発明による抗体は図３に示されるＣＤＲ１、ＣＤＲ２、またはＣＤＲ３から選択される１または２以上のＣＤＲ、またはこれらＣＤＲに実質的な相同性を有する１または２以上のアミノ酸配列を含むV_L領域を含んでよい。

【００１７】

本発明による抗体は、ヒト完全長ＴＳＨＲに対し、約10^{10}Ｌ／ｍｏｌの結合アフィニティーを有してよい。本発明による抗体は、好ましくはヒト完全長ＴＳＨＲに対し、約10^{9}Ｌ／ｍｏｌの結合アフィニティーを有する。

【００１８】

本発明は当業者が、刺激性および遮断性ＴＳＨＲ自己抗体の発生および産生を推進する免疫メカニズムを理解するのに役立つ。さらに、本発明は当業者が、ＴＳＨＲ自己抗体の甲状腺刺激活性を有するものと遮断活性を有するものの間の分子的相違を理解するのに役立つ。さらに、本発明の医学的治療法および薬理学的組成物は甲状腺関連疾患に対する新しい治療法を提供する。

【００１９】

本発明による好ましい抗体は５Ｃ９である。５Ｃ９は、甲状腺刺激ホルモンレセプターの恒常的活性、すなわち甲状腺刺激ホルモンまたはＭ２２の非存在下での試験システムにおけるサイクリックＡＭＰの産生を阻害することが予想外に見出された。これは特に、甲状腺内に残存、または転移した甲状腺癌細胞の治療、とりわけこれらの細胞が甲状腺刺激ホルモンレセプターの恒常的活性の結果としてさらに迅速に増殖し得る再増殖を防止または遅延させることに有利である。

【００２０】

ここで用いられる「抗体(単数形：antibody）」および類似語、例えば「抗体(複数形：antibodies）」の語は、状況に従い、モノクローナルおよびポリクローナル抗体、単鎖抗体、多重特異性抗体のような免疫グロブリンを基礎とした結合部分を包含し、かつ当業者によってこのような免疫グロブリンを基礎とした結合部分へ置換されてもよい結合部分、例えばドメイン抗体、二重特異性抗体、ＩｇＧΔC_H2、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆａｂ、ｓｃＦｖ、V_L、V_H、ｄｓＦｖ、ミニボディ（Minibody）、トリアボディ（Triabody）、テトラボディ（Tetrabody）、（ｓｃＦｖ）$_2$、ｓｃＦｖ－Ｆｃ、Ｆ（ａｂ’）$_3$もまた包含する（Holliger P, Prospero T, Winter G 1993 "Diabodies: small bivalent and bispecific antibody fragments" Proc Natl Acad Sci USA 90: 6444-6448.）、（Carter PJ 2006 "Potent antibody therapeutics by design" Nat Rev Immunol 6: 343-357）。

【００２１】

「ＴＳＨＲ」との語は、図４に示されるアミノ酸配列を有する完全長のヒト甲状腺刺激ホルモンレセプター、またはその変異体または断片で、甲状腺刺激ホルモンレセプターとの高い相同性を有するものに適用される。好ましくはこのような変異体および断片は、図４に示されるアミノ酸配列と７０から９９．９％の相同性を有する。

【００２２】

本発明の他の態様によれば、
ａ）本発明の第一の態様による抗体をコードするヌクレオチド配列；
ｂ）図２または３に示される抗体V_Hドメイン、抗体V_Lドメイン、またはＣＤＲのアミノ酸配列をコードする、図２または３に示されるヌクレオチド配列；または
ｃ）ａ）またはｂ）のヌクレオチド配列と高い相同性を有し、かつ少なくとも約10^9Ｌ／ｍｏｌのアフィニティーでｈＴＳＨＲに結合する抗体をコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチドが提供される。

【００２３】
本発明の他の態様によれば、上記本発明の態様によるヌクレオチドを含むベクターが提供される。

【００２４】
該ベクターはプラスミド、ウィルスまたはその断片であってよい。当業者には多くの異なるタイプのベクターが知られている。

【００２５】
本発明の他の態様によれば、本発明による抗体；ヌクレオチドまたは／ベクターを含む、単離細胞が提供される。該単離細胞は本発明による抗体を発現してよい。好ましくは、該単離細胞は本発明による抗体を分泌する。好ましくは、本発明による単離細胞は安定ヘテローハイブリドーマ細胞株由来である。

【００２６】
本発明のさらなる態様によれば、ＴＳＨＲ自己抗体の規定濃度を含み、かつ本発明による抗体を含む組成物が提供される。このような組成物は、ＴＳＨアンタゴニスト活性をもつＴＳＨＲ自己抗体の規定濃度を含んでよく、かつ本発明による抗体を含む。

【００２７】
あるいは、本発明のこの態様による組成物は、甲状腺刺激性抗体のアンタゴニストであるＴＳＨＲ自己抗体の規定濃度を含んでよく、かつ本発明による抗体を含む。組成物は、甲状腺刺激性抗体のアンタゴニストである、ＴＳＨアンタゴニスト活性をもつＴＳＨＲ自己抗体の規定濃度を含んでよく、かつ本発明による抗体を含む。

【００２８】
本発明の他の態様によれば、甲状腺関連疾患の治療のために哺乳類被療体に投与するための、本発明による抗体を薬理学的に許容される担体と共に含む医薬組成物が提供される。該甲状腺関連疾患は、甲状腺活動亢進症、グレーブス眼病、新生児甲状腺機能亢進症、ヒト絨毛性ゴナドトロピン誘導性甲状腺機能亢進症、前頚骨粘液水腫、甲状腺癌、および甲状腺炎から選択されてよい。

【００２９】
本発明による医薬組成物は、ヒトへの投与に適してよい。好ましくは本発明による医薬組成物は、被療体の免疫システムにおいて有意な有害作用をもたない。

【００３０】
本発明による医薬組成物は、さらなる甲状腺刺激ホルモンレセプターアンタゴニストを含んでよい。適切な、さらなる甲状腺刺激ホルモンレセプターアンタゴニストは、国際公開第２００４／０５０７０８号に開示されている９Ｄ３３である。

【００３１】
本発明による医薬組成物のために様々な形式が企図される。甲状腺関連疾患の治療における使用のための本発明による医薬組成物は、注射用の形式であってよい。前頚骨粘液水腫の治療における使用のための本発明による医薬組成物は、好ましくは局所用の形式である。グレーブス眼病の治療における使用のための本発明による医薬組成物は、好ましくは点眼薬の形式である。

【００３２】
本発明の医薬組成物は、本発明の発明に従ったいずれかの抗体を、いずれかの薬理学的に許容される担体、アジュバント、またはビヒクルと共に含む。本発明の医薬組成物に使用されてよい薬理学的に許容される担体、アジュバント、およびビヒクルは、イオン交換

体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、ヒト血清アルブミンのような血清タンパク質、リン酸塩のような緩衝物質、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物性脂肪酸の部分的グリセリド混合物、水、硫酸プロタミンのような塩または電解質、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイドシリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロースを基礎とした物質、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸塩、ワックス、ポリエチレン－ポリオキシプロピレン－ブロック重合体、ポリエチレングリコール、および羊毛脂を含むがこれらに限定されない。

【００３３】

本発明の医薬組成物は、経口で、吸入噴霧により非経口で、点眼薬により局所的に、経直腸、経鼻、口腔経由で、経膣で、または埋め込み型リザーバー経由で投与されてよい。好ましくは経口投与、または注射による投与である。ここで用いられる「非経口」との語は、皮下、皮内、静脈内、筋肉内、関節内、滑膜内、胸骨内、包膜内、病巣内、および頭蓋内への注射または注入方法を含む。

【００３４】

該医薬組成物は、例えば水性または油性の無菌注射用懸濁液のような、無菌注射用製剤の形であってよい。この懸濁液は当該技術分野で公知の方法により、適切な分散剤または湿潤剤(例えば、Ｔｗｅｅｎ８０)および懸濁剤を用いて処方されてよい。該無菌注射用製剤はまた、無毒性の非経口投与可能な希釈剤または溶媒、例えば１，３－ブタンジオール溶液としての無菌注射用溶液または懸濁液であってよい。許容されるビヒクルおよび溶媒のうちで使用されてよいものは、マンニトール、水、リンゲル液および生理食塩水である。さらに、従来から、無菌の固定油が溶媒または懸濁化剤として使用されている。この目的のため、合成モノ－またはジグリセリドを含む、いずれの無菌性固定油も使用されてよい。オレイン酸のような脂肪酸およびそのグリセリド誘導体は、オリーブオイルまたはヒマシ油のような天然の薬理学的に許容される油、特にこれらのポリオキシエチル化された形として、注射液の製剤に有用である。これらの油溶液または懸濁液はまた、Ph. Helvまたは類似アルコールのような長鎖アルコール希釈液または分散剤を含んでよい。

【００３５】

本発明の医薬組成物は、カプセル、錠剤、および水性懸濁液および溶液を含むがこれらに限定されない、いずれかの経口に使用可能な剤形により経口投与されてよい。経口使用のための錠剤の場合、一般に用いられる担体はラクトースおよびコーンスターチを含む。ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤もまた、典型的に添加される。カプセルの形による経口投与のための有用な希釈剤は、ラクトースおよび乾燥コーンスターチを含む。水性懸濁液を経口投与する場合、有効成分は乳化剤および懸濁剤と組み合わされる。必要に応じ、特定の甘味料および／または香料および／または着色料が添加されてよい。

【００３６】

本発明の医薬組成物はまた、直腸内投与のための坐薬の形で投与されてよい。これらの組成物は、本発明の化合物を適切な非刺激性の賦形剤と混合することにより調製できる。この賦形剤は室温では固体であるが直腸温では液体であることにより、有効成分を放出するために直腸内で溶解し得る。このような物質はココアバター、蜜ろうおよびポリエチレングリコールを含むが、これらに限定されない。

【００３７】

本発明の医薬組成物の局所投与は、望ましい治療が局所投与により容易に利用できる部位または臓器に関わる場合に特に有用である。皮膚への局所投与のために該医薬組成物は、担体中に懸濁または溶解した有効成分を含む適切な軟膏剤により処方されなければならない。本発明の化合物の局所投与のための担体は、ミネラルオイル、鉱油、ホワイトペトロリアム（white petroleum）、プロピレングリコール、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン化合物、乳化ワックスおよび水を含むがこれらに限定されない。あるいは該医薬組成物は、担体中に懸濁または溶解した有効成分を含む適切なローションまたはクリームにより処方できる。適切な担体は、ミネラルオイル、モノステアリン酸ソルビタン、ポ

リソルベート６０、セチルエステルワックス、セテアリルアルコール、２－オクチルドデカノール、ベンジルアルコールおよび水を含むがこれらに限定されない。本発明の医薬組成物はまた、直腸坐薬製剤または適切な浣腸製剤により下部腸管に局所投与されてよい。局所的な経皮パッチもまた、本発明に含まれる。

【００３８】

本発明の医薬組成物は、経鼻エアロゾルまたは吸入により投与されてよい。このような組成物は医薬品処方の技術分野における公知の方法により調製され、ベンジルアルコールまたはその他の適切な保存料、生物学的利用能を増強させるための吸収促進剤、フッ化炭素、および／またはその他の当該技術分野で公知の可溶化剤または分散剤を用いた、生理食塩水溶液として調製されてよい。

【００３９】

本発明のさらなる態様によれば、本発明による１または２以上の単離細胞を培養することにより該細胞が抗体を発現することを含む、本発明による抗体の産生方法が提供される。好ましくは、該抗体は該細胞により分泌される。

【００４０】

本発明のさらなる態様によれば、哺乳類被療体、または該被療体由来の細胞における甲状腺関連疾患の治療方法が提供され、該方法は該被療体、または該細胞を本発明による抗体に接触させることを含む。

【００４１】

本発明の他の態様によれば、哺乳類被療体の甲状腺中のＴＳＨＲを刺激する甲状腺刺激性自己抗体の阻害方法が提供され、該方法は該被療体を本発明による抗体に接触させることを含む。好ましくは、甲状腺刺激性自己抗体のＴＳＨＲへの結合が阻止される。

【００４２】

本発明の他の態様によれば、哺乳類被療体の甲状腺外ＴＳＨＲに結合する甲状腺刺激性自己抗体の阻害方法が提供され、該方法は該被療体を本発明による抗体に接触させることを含む。該甲状腺外ＴＳＨＲは、該被療体の後眼窩組織および／または前頚骨組織に存在してよい。本発明による抗体は、該方法において使用される際、甲状腺外ＴＳＨＲに結合するＴＳＨＲ自己抗体を好ましく遮断する。

【００４３】

本発明の他の態様によれば、甲状腺内にあるか、または転移した甲状腺癌を、被療体内か、または被療体由来の甲状腺細胞において治療する方法が提供され、該方法は細胞内の恒常的甲状腺刺激ホルモンレセプター活性を阻害するために、癌性細胞を本発明による抗体に接触させることを含む。好ましくは、甲状腺癌細胞の再増殖は阻止または遅延される。

【００４４】

恒常的な甲状腺活性による甲状腺活動亢進症を、被療体内か、または被療体由来の甲状腺細胞において治療する方法もまた提供され、該方法は恒常的な甲状腺活性による甲状腺活動亢進を阻害するために、被療体または甲状腺細胞を本発明による抗体に接触させることを含む。

【００４５】

上記本発明の様々な方法において治療される被療体は、好ましくはヒトである。

【００４６】

本発明の他の態様によれば、甲状腺関連疾患の治療における本発明による抗体の使用が提供される。あるいは、甲状腺関連疾患の治療のための薬剤の調製における本発明による抗体の使用が提供される。

【００４７】

医学的治療における使用のための、本発明による抗体もまた提供される。特に、甲状腺関連疾患の治療における使用のための、本発明による抗体の使用が提供される。該甲状腺関連疾患は、甲状腺活動亢進症、グレーブス眼病、新生児甲状腺機能亢進症、ヒト絨毛性ゴナドトロピン誘導性甲状腺機能亢進症、前頚骨粘液水腫、甲状腺癌、および甲状腺炎か

ら選択されてよい。

【００４８】

本発明の他の態様によれば、ＴＳＨＲ関連アミノ酸配列を有するポリペプチドへの、試験されるＴＳＨＲ抗体の結合を決定することを含む、ＴＳＨＲ抗体を特徴付けるための方法が提供され、ここで該方法は本発明による抗体の使用を含む方法工程に関わる。好ましくは、該方法はＴＳＨＲ抗体の該ポリペプチドへの結合において、本発明による抗体の効果を決定することを含む。ＴＳＨＲ関連アミノ酸配列を有する該ポリペプチドは、好ましくは完全長のヒトＴＳＨＲを含む。

【００４９】

本発明の他の態様によれば、ＴＳＨＲ関連アミノ酸配列を有するポリペプチドへの、試験されるＴＳＨ、または関連分子の結合を決定することを含む、ＴＳＨおよび関連分子を特徴付けるための方法が提供され、ここで該方法は本発明による抗体の使用を含む方法工程に関わる。

【００５０】

上記のＴＳＨＲ抗体、またはＴＳＨを特徴付けるための方法および関連方法はＥＬＩＳＡ形式によるものであってよい。

【００５１】

本発明の他の態様によれば、アンタゴニストとして作用するＴＳＨＲ自己抗体の結合に関わるＴＳＨＲアミノ酸を決定する方法が提供され、該方法は、本発明による抗体が結合する第一のＴＳＨＲ関連アミノ酸配列を有するポリペプチドを提供すること、該ＴＳＨＲ関連アミノ酸配列において少なくとも１個のアミノ酸を改変すること、およびこのような改変の効果を抗体の結合において決定することを含む。

【００５２】

本発明による抗体を改変するための方法は、該抗体の少なくとも１個のアミノ酸を改変すること、およびこのような改変の効果をＴＳＨＲ関連配列への結合において決定することを含む。改変ＴＳＨＲ抗体は、ＴＳＨＲに対する増強されたアフィニティーを有するものが好ましく選択される。

【００５３】

本発明の他の態様によれば、ＴＳＨＲに結合する甲状腺刺激性抗体を阻害する分子を同定するための方法が提供され、該方法は、本発明による少なくとも１種の抗体を参照として提供することを含む。試験される分子は、ＴＳＨＲに結合する甲状腺刺激性抗体を阻止するものが好ましく選択される。

【００５４】

ＴＳＨＲに結合する甲状腺遮断性抗体を阻害する分子を同定するための方法もまた提供され、該方法は、本発明による少なくとも１種の抗体を参照として提供することを含む。好ましくは、ＴＳＨＲに結合する甲状腺遮断性抗体を阻止する分子が選択される。

【図面の簡単な説明】

【００５５】

これより本発明による抗体および方法を、例としてのみの目的で、添付する図１から図４への参照により記述する。

【００５６】

【図１－１】ＴＳＨＲをコートしたチューブへの^{125}Ｉ－５Ｃ９ＩｇＧ、^{125}Ｉ－ＴＳＨ、または^{125}Ｉ－Ｍ２２の結合における、グレーブス病の患者（ｎ＝４０）および健常血液ドナー（ｎ＝１０）からの血清の効果の比較を図示する一連の３グラフ。　ａ．^{125}Ｉ－５Ｃ９ＩｇＧ対^{125}Ｉ－ＴＳＨ結合

【図１－２】ＴＳＨＲをコートしたチューブへの^{125}Ｉ－５Ｃ９ＩｇＧ、^{125}Ｉ－ＴＳＨ、または^{125}Ｉ－Ｍ２２の結合における、グレーブス病の患者（ｎ＝４０）および健常血液ドナー（ｎ＝１０）からの血清の効果の比較を図示する一連の３グラフ。　ｂ．^{125}Ｉ－５Ｃ９ＩｇＧ対^{125}Ｉ－Ｍ２２ＩｇＧ結合

【図１－３】ＴＳＨＲをコートしたチューブへの^{125}Ｉ－５Ｃ９ＩｇＧ、^{125}Ｉ－ＴＳＨ、

または^{125}Ｉ－Ｍ２２の結合における、グレーブス病の患者（ｎ＝４０）および健常血液ドナー（ｎ＝１０）からの血清の効果の比較を図示する一連の３グラフ。　ｃ．^{125}Ｉ－ＴＳＨ対^{125}Ｉ－Ｍ２２ＩｇＧ結合

【図２－１】５Ｃ９重鎖（ＨＣ）の可変領域配列の配列を示す。　ａ．５Ｃ９ＨＣのオリゴヌクレオチド配列を、注釈なし、および注釈付きの形式で示す。注釈付きの形式では、ＰＣＲプライマーに使用した配列を下線で示し、個々の相補性決定領域（ＣＤＲ）を四角で囲み、定常領域を太字で示す。

【図２－２】５Ｃ９重鎖（ＨＣ）の可変領域配列の配列を示す。　ｂ．オリゴヌクレオチド配列由来の５Ｃ９ＨＣのアミノ酸配列を、注釈なし、および注釈付きの形式で示す。

【図３－１】５Ｃ９軽鎖（ＬＣ）の可変領域配列の配列を示す。　ａ．５Ｃ９ＬＣのオリゴヌクレオチド配列を、注釈なし、および注釈付き（図２の通り）の形式で示す。

【図３－２】５Ｃ９軽鎖（ＬＣ）の可変領域配列の配列を示す。　ｂ．オリゴヌクレオチド配列由来の５Ｃ９ＬＣのアミノ酸配列を、注釈なし、および注釈付きの形式で示す。

【図４】ヒトＴＳＨＲ（受入番号Ｐ１６４７３、http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=62298994）のコンセンサスアミノ酸配列を図示する。

【発明を実施するための形態】

【００５７】

方法

リンパ球分離およびヒトモノクローナルＴＳＨＲ自己抗体５Ｃ９のクローニング

モノクローナル自己抗体５Ｃ９は通常、国際公開第２００４／０５０７０８Ａ２号に記載された方法を用いて分離した。リンパ球は最初に、産後甲状腺機能低下症で高濃度のＴＲＡｂを有する患者から集めた血液サンプルより分離した（地域の倫理委員会の承認を得た）。該リンパ球はエプスタイン・バーウィルス（ＥＢＶ）（European Collection of Cell Cultures - ECACC; Porton Down, SP4 OJG5,UK）に感染させ、国際公開第２００４／０５０７０８Ａ２号に記載されているように、マウスマクロファージフィーダー層上で培養した。ＴＳＨＲ自己抗体を分泌する不死化リンパ球はマウス／ヒトのハイブリッド細胞株であるＫ６Ｈ６／Ｂ５（ＥＣＡＣＣ）と融合させ、単一コロニーを得るため、限界希釈による４回のクローニングを行った。クローニングの様々な段階における、細胞培養上清中のＴＳＨＲ自己抗体の存在は、^{125}Ｉで標識したＴＳＨのＴＳＨＲへの結合の阻害により検出した（国際公開第２００４／０５０７０８Ａ２号）。ＴＳＨＲ自己抗体を産生する単一クローンを増殖させ、自己抗体の精製のために培養上清を回収した。

【００５８】

５Ｃ９ＩｇＧ製剤の精製および標識化

５Ｃ９ＩｇＧは、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に記載されている、MabSelect(商標）（GE Healthcare、英国）によるプロテインＡアフィニティークロマトグラフィーを用いて培養上清より精製し、純度はＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動法（ＰＡＧＥ）により評価した。

【００５９】

５Ｃ９の重鎖アイソタイプは、放射拡散アッセイ（The Binding Site；バーミンガム、Ｂ２９　６ＡＴ、英国）を用いて決定し、軽鎖のアイソタイプは、抗ヒトカッパ鎖、および抗ヒトラムダ鎖特異的マウスモノクローナル抗体（Sigma-Aldrich Company Ltd；プール、英国）を用いたウェスタンブロッティングにより決定した。

【００６０】

２０ｍｍｏｌ／Ｌの酢酸ナトリウム（ｐＨ４．５）中における１０ｍｇ／ｍＬの５Ｃ９ＩｇＧを、製造者（Perbio Science UK Ltd、クラムリントン、英国）の指示に従い調製した固定化ペプシンと共に、室温で４時間半、振とうしながらインキュベートした。その後、固定化ペプシンを遠心（１０００ｘｇ、室温で５分間）により除去し、上清を３００

ｍｍｏｌ／ＬのＮａＣｌ，１０ｍｍｏｌ／ＬのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．５に対し、４℃においてオーバーナイトで透析した。５Ｃ９Ｆ（ａｂ’）$_2$および少量のインタクトなＩｇＧを含む透析された混合物は、Sephacryl S-300 High Resolution Matrix（GE Healthcare、チャルフォント・セント・ジャイルズ、英国）を用いて分離した。この方法で精製された５Ｃ９Ｆ（ａｂ’）$_2$製剤は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＨＰＬＣゲルろ過分析での判断によればインタクトなＩｇＧを含まなかった。

【００６１】

さらにＦ（ａｂ’）$_2$は、最終濃度１００ｍｍｏｌ／ＬのＬ－システインを用い、３７℃、１時間で還元した。この反応は、最終濃度５０ｍｍｏｌ／Ｌのヨードアセトアミドにより、室温、３０分間で停止させた。Ｆ（ａｂ’）は、上記のようにSephacryl S-300カラムを用いて精製した。この方法で精製されたＦ（ａｂ’）製剤は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＨＰＬＣゲルろ過分析での判断によればＦ（ａｂ’）$_2$を含まなかった。

【００６２】

さらに、５Ｃ９ＩｇＧをマーキュリーパパイン（Sigma、英国）により、１：１００の酵素／タンパク質の比において処理し、５０ｍｍｏｌ／ＬのＮａＣｌ，Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ９．０中へ透析し、Ｆａｂ製剤からインタクトなＩｇＧまたはＦｃを分離するため、陰イオン交換セファロース（GE Healthcareから入手したQ-Sepharose Fast flow）カラムを通した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびゲルろ過（Sephacryl S- 300カラム；上記）による分析は、該Ｆａｂ製剤中にインタクトなＩｇＧは検出されないことを示した。

【００６３】

５Ｃ９ＩｇＧは、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 ^{125}I-labelled TSH receptor. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 1999 84: 3797-3802に記載されているように^{125}Ｉにて標識するか、またはビオチンヒドラジド（Perbio Science、クラムリントン、英国）にて標識した。

【００６４】

^{125}Ｉ－ＴＳＨまたは^{125}Ｉ－Ｍ２２または^{125}Ｉ－５Ｃ９のＴＳＨＲへの結合の阻害

国際公開第２００４／０５０７０８Ａ２号の記述に従い、ＴＳＨＲをコートしたチューブを用いて結合阻害アッセイを行った。このアッセイにおいて、１００μＬの試験サンプル（ＭＡｂ製剤、患者血清または非標識ＴＳＨ）および５０μＬの開始緩衝液（RSR Ltd）を、ＴＳＨＲをコートしたチューブ内で穏やかに振とうしながら、室温で２時間インキュベートした。吸引後チューブを洗浄し、１００μＬの^{125}Ｉ－標識タンパク質（５ｘ１０^{4}ｃｐｍ）を加え、振とうしながら室温で１時間インキュベートした。その後チューブを吸引、洗浄し、ガンマカウンター中で計数した。

【００６５】

標識タンパク質の結合の阻害は以下のように算出した。

【数１】

$$100\times\left[1-\frac{\text{試験物質存在下での結合ｃｐｍ}}{\text{コントロール物質存在下での結合ｃｐｍ}}\right]$$

コントロール物質は種々の実験結果に示すように、健常血液ドナー血清のプール、または個々の健常血液ドナー血清、またはその他の物質であった。

【００６６】

５Ｃ９ＩｇＧのＴＳＨＲへの結合のスキャッチャード解析

５０μＬのアッセイ緩衝液（５０ｍｍｏｌ／ＬのＮａＣｌ、１０ｍｍｏｌ／ＬのＴｒｉｓ、ｐＨ７．８、および１％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００）中の非標識５Ｃ９ＩｇＧおよび５０μＬの^{125}Ｉ－標識５Ｃ９ＩｇＧ（アッセイ緩衝液中で３０，０００ｃｐｍ）を、ＴＳＨＲをコートしたチューブ内で振とうしながら、室温で２時間インキュベート（これらの

条件下で最大の結合が生じた）、吸引し、１ｍＬのアッセイ緩衝液で２回洗浄し、ガンマカウンター中で計数した。結合定数を求めるため、結合したＩｇＧの濃度に対して結合濃度／遊離濃度をプロットした（Scatchard G 1949 The attraction of proteins for small molecules and ions. Annals of the New York Academy of Sciences 51: 660-672）。

【００６７】

サイクリックＡＭＰ産生刺激の解析

５Ｃ９ＩｇＧおよびその他の製剤の、ヒトＴＳＨＲを導入したチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞におけるサイクリックＡＭＰ産生の刺激能を、国際公開第２００４／０５０７０８Ａ２号の記述に従い試験した。細胞あたり約５ｘ１０^{4}または約５ｘ１０^{5}のＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞を、９６ウェルプレート内にウェルあたり３ｘ１０^{4}細胞まき、ウシ胎仔血清を含まないＤＭＥＭ（Invitrogen Ltd、ペーズリー、英国）に適応させた後、試験サンプル（ＴＳＨ、ＩｇＧまたは患者血清）を加え（１ｇ／Ｌのグルコース、２０ｍｍｏｌ／ＬのＨＥＰＥＳ、２２２ｍｍｏｌ／Ｌのシュクロース、１５ｇ／Ｌのウシ血清アルブミン、および０．５ｍｍｏｌ／Ｌの３　イソブチル－１－メチルキサンチン　ｐＨ７．４を含み、ＮａＣｌを含まないハンクス緩衝塩溶液であるサイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液中に希釈して、１００μＬ）、３７℃で１時間インキュベートした。試験溶液の除去後、細胞を溶解し、ライセート中のサイクリックＡＭＰ濃度を以下の２つの方法のうちの１つによりアッセイした：１）GE Healthcare (チャルフォント・セント・ジャイルズ、英国)から入手したBiotrak enzyme immunoassay systemの使用、または２）Assay Designs; Cambridge Bioscience（英国）から入手したDirect Cyclic AMP Correlate-EIA kitsの使用。結果は、細胞ライセート（２００μＬ）中のサイクリックＡＭＰをｐｍｏｌ／ｍＬにより、または細胞ウェルあたりのｆｍｏｌにより表した。

【００６８】

アンタゴニスト（遮断）活性の測定

ＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞において、５Ｃ９ＩｇＧおよびその他の製剤が、ブタ（ｐ）ＴＳＨ、天然ヒト（ｈ）ＴＳＨ、およびリコンビナントヒト（ｒｈ）ＴＳＨ、ＭＡｂＭ２２、および患者血清ＴＲＡｂの刺激活性を阻害する能力を評価した。これは、ＴＳＨ、Ｍ２２、またはＴＲＡｂの刺激効果を５Ｃ９ＩｇＧ（またはその他の試験される製剤）の非存在下および存在下において比較することにより行なわれた。アッセイは、サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液中に希釈した５０μＬの５Ｃ９（またはその他の試験される製剤）を細胞ウェルに加え、続いて５０μＬのＴＳＨまたはＭ２２または患者血清（サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液中に適宜希釈）を加えること以外は上記のように行なわれ、上記の刺激アッセイと同様にインキュベートおよび試験された。

【００６９】

５Ｃ９に加え、その他のＭＡｂおよび遮断性ＴＲＡｂをもつ患者由来の血清がこのアッセイにおいて試験された。

【００７０】

可変領域遺伝子解析

５Ｃ９重鎖および軽鎖の可変領域遺伝子は国際公開第２００４／０５０７０８Ａ２号の記述に従い、ＲＴ－ＰＣＲ（逆転写酵素ＰＣＲ）反応のためのｍＲＮＡを作製するため、５Ｃ９ＩｇＧを分泌する１ｘ１０^{7}のヘテロハイブリドーマ細胞から調整した全ＲＮＡを用いて決定した。ＩｇＧ１ＨＣおよびカッパＬＣに特異的なセンスおよびアンチセンス鎖オリゴヌクレオチドプライマーは、Medical Research CouncilのV-base（http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/）を用いてデザインし、Invitrogen（ペーズリー、ＰＡ４　９ＲＦ、英国）により合成した。ＲＴ反応は５０℃１５分間で行い、それに続いて９４℃１５秒間、５０℃３０秒間、および７２℃３０秒間で４０サイクルのＰＣＲを行なった。ＤＮＡ産物はｐＵＣ１８中にクローニングし、Sanger-Coulson法によりシークエンスした（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）。Ｖ領域の配列は、Ig blast（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/）を用いて、入手できるヒ

トＩｇ遺伝子の配列と比較した。

【００７１】

ヒトＴＳＨＲ配列のアミノ酸変異の、５Ｃ９活性における効果の解析

ＴＳＨＲ配列中に特異的変異を導入するために使用された方法は、特許出願の国際公開第２００６／０１６１２１Ａ号に記載されている。さらに、Ｆｌｐ－Ｉｎシステムを用いたＣＨＯ細胞への変異ＴＳＨＲコンストラクトのトランスフェクションもまた、国際公開第２００６／０１６１２１Ａ号に記載されている。

【００７２】

野生型または変異ＴＳＨＲのいずれかを発現するＦｌｐ－Ｉｎ－ＣＨＯ細胞を９６ウェルプレートにまき、５Ｃ９製剤がＴＳＨ、Ｍ２２、または患者血清ＴＲＡｂの刺激活性を遮断する能力を試験するため上記のように使用した。

【００７３】

ＴＳＨＲ抗体、ＴＳＨおよび関連分子のための５Ｃ９に基づいたアッセイ

２．５５ｍＬの５Ｃ９ＩｇＧを１００ｍｍｏｌ／Ｌのリン酸ナトリウム緩衝液ｐＨ８．５中に透析し、ＩｇＧのビオチンに対する分子比１／１０により、EZ-Link NHS-LC-Biotin（Perbio）と反応させた。試験血清サンプル（７５μＬ）を、ＴＳＨＲをコートしたＥＬＩＳＡプレートウェル（RSR Ltd）中で振とう（１分間に５００振とう）しながら、室温で2時間インキュベートした。試験サンプルを除去および洗浄した後、ビオチン標識５Ｃ９ＩｇＧ（１００μＬ中に２ｎｇ）を加え、インキュベーションを室温で２５分間、振とうなしで継続した。ウェルを空にし、洗浄して１００μＬのストレプトアビジン－ペルオキシダーゼ（１００μＬ中に１０ｎｇ；RSR Ltd）を加え、室温で２０分間、振とうなしでインキュベートした。その後ウェルを3回洗浄し、ペルオキシダーゼの基質であるテトラメチルベンジジン（ＴＭＢ；１００μＬ；RSR Ltd）を加え、暗所において室温で３０分間、振とうなしでインキュベートした。その後反応を停止させるため５０μＬの０．５ｍｏｌ／ＬのＨ２ＳＯ４を加え、ＥＬＩＳＡプレートリーダーを用いて、各プレートウェルの吸光度を４５０ｎｍにて読み取った。５Ｃ９ＩｇＧ－ビオチン結合の阻害は、以下のように算出した。

【数２】

$$100\times\left[1-\frac{\text{４５０ｎｍにおける試験サンプルの吸光度}}{\text{４５０ｎｍにおけるネガティブコントロール血清の吸光度}}\right]$$

【００７４】

結果

５Ｃ９分泌細胞株の単離およびクローニング

２０ｍＬの患者血液から得られたリンパ球（２７ｘ１０^{6}）にＥＢＶを感染させ、４８ウェルプレート内のマウスマクロファージフィーダー層上に、ウェルあたり１ｘ１０^{6}の細胞をまいた。ＥＢＶ感染後１３日目に、プレートウェルの上清の、^{125}Ｉ－ＴＳＨ結合の阻害についてモニターした。陽性ウェルからの細胞を増殖させ、Ｋ６Ｈ６／Ｂ５ハイブリドーマ細胞株と融合し、９６ウェルプレートにまいた。^{125}Ｉ－ＴＳＨ結合の阻害活性をもつ抗体を安定に産生する１クローンを得て、４回再クローニングした。ヘテロ－ハイブリドーマ培養上清から精製され、５Ｃ９と名付けられたモノクローナル抗体は、カッパ軽鎖を有するＩｇＧ１のサブクラスである。

【００７５】

５Ｃ９ＩｇＧのＴＳＨＲへの結合および遮断活性

様々な濃度における５Ｃ９ＩｇＧの、標識ＴＳＨまたは標識Ｍ２２または標識５Ｃ９それ自体のＴＳＨＲへの結合に対する阻害能を表１に示す。表１に示すように、最少量０．００５μｇ／ｍＬの５Ｃ９ＩｇＧによって^{125}Ｉ－ＴＳＨ結合の１２％の阻害が認められ、この阻害は１００μｇ／ｍＬの５Ｃ９による８４％の阻害に至るまで量依存性に増大した。これはドナー血清ＩｇＧによる^{125}Ｉ－ＴＳＨ結合の阻害、すなわち０．０５ｍｇ／

ｍＬにおける１３％の阻害から、１ｍｇ／ｍＬにおける９４％の阻害までの量依存的な増大と比較することができる。ドナー血漿の場合、健常人血液ドナープール血清の１：１６０希釈においては^{125}Ｉ－ＴＳＨ結合の１６％の阻害が認められ、１：１０希釈においては９５％の阻害が認められた。

【００７６】

５Ｃ９ＩｇＧはまた、ＴＳＨＲをコートしたチューブへの^{125}Ｉ－Ｍ２２ＩｇＧの結合に対する効果を有していた（表１）。０．０１μｇ／ｍＬの５Ｃ９ＩｇＧによって、^{125}Ｉ－Ｍ２２ＩｇＧ結合の９％の阻害が認められ、濃度を増大させることにより、１００μｇ／ｍＬにおける８５％に至るまでの阻害の量依存的な増大がもたらされた。ドナー血清ＩｇＧは、９％の阻害を起こす０．０１ｍｇ／ｍＬにおいて有効であり、この効果は１ｍｇ／ｍＬにおける８９％の阻害まで量依存的に増大した。ドナー血清血漿は、１：３２０の希釈において^{125}Ｉ－Ｍ２２ＩｇＧ結合の１３％の阻害を示し、１：１０の希釈において９１％の阻害を示した。

【００７７】

非標識５Ｃ９ＩｇＧは、ＴＳＨＲをコートしたチューブへの^{125}Ｉ－５Ｃ９の結合を量依存的に阻害（０．００５μｇ／ｍＬにおける１１％の阻害から、１００μｇ／ｍＬにおける８８％の阻害まで）（表１－２）することができた。^{125}Ｉ－５Ｃ９の結合はまた、ドナー血清ＩｇＧによっても阻害（０．０５ｍｇ／ｍＬにおける１５％の阻害、および１ｍｇ／ｍＬにおける９１％の阻害）され、同様にドナー血漿の希釈によっても阻害（１：３２０希釈における１０％の阻害、および１：１０希釈における９２％の阻害）された。

【００７８】

ＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞におけるＴＳＨおよびＭ２２を介したサイクリックＡＭＰの刺激に対する、５Ｃ９ＩｇＧの遮断能を表２ａ－ｃに示す。ブタＴＳＨ（３ｎｇ／ｍＬ）は、サイクリックＡＭＰ産生を強力に刺激した（１９，０２０±２１５４ｆｍｏｌ／細胞ウェル；平均±ＳＤ；ｎ＝３）（表２ａ）。０．１μｇ／ｍＬの５Ｃ９ＩｇＧの存在で、ブタＴＳＨの刺激活性は１１８７４±４２１４ｆｍｏｌ／細胞ウェル（平均±ＳＤ；ｎ＝３）まで減少し、かつ１μｇ／ｍＬの５Ｃ９の存在下ではわずかに２，２０８±３２９ｆｍｏｌ／細胞ウェルのサイクリックＡＭＰが産生されたことから、この阻害効果は５Ｃ９濃度に依存していた（表２ａ）。リンパ球ドナー血清もまた、ＣＨＯ－ＴＳＨＲ細胞におけるＴＳＨを介したサイクリックＡＭＰ刺激の強力な阻害効果を有していた。表２ａに示すように、サイクリックＡＭＰ産生は血清非存在下での１９０００ｆｍｏｌ／細胞ウェルに比較して、１：１０希釈のドナー血清（この希釈における全血清ＩｇＧ濃度は１．４３ｍｇ／ｍＬ）存在下では約６０００ｆｍｏｌ／細胞ウェルへ減少する阻害が生じた。この効果は、約０．３７μｇ／ｍＬの精製５Ｃ９ＩｇＧによる効果に一致していた（表２ａに示す、様々な濃度の５Ｃ９ＩｇＧによる効果の希釈曲線から算出した）。このことは、ＴＳＨのサイクリックＡＭＰ産生刺激能を遮断する能力に関して、精製５Ｃ９ＩｇＧはドナー血清ＩｇＧよりも約３９００倍強い活性があることを示している。

【００７９】

５Ｃ９Ｆ（ａｂ’）$_2$および５Ｃ９Ｆａｂのような５Ｃ９の断片もまた、ＴＳＨ刺激の有効な阻害剤であった。特に、１００μｇ／ｍＬにおける５Ｃ９ＩｇＧ、５Ｃ９Ｆ（ａｂ’）$_2$、および５Ｃ９ＦａｂのＴＳＨ刺激阻害活性は同等であった（表２ｂ）。１０μｇ／ｍＬにおける３種の全ての製剤、すなわち５Ｃ９ＩｇＧ、５Ｃ９Ｆ（ａｂ’）$_2$、および５Ｃ９ＦａｂもまたＴＳＨ刺激活性の強力な阻害剤であったが、５Ｃ９ＩｇＧは５Ｃ９Ｆ（ａｂ’）$_2$または５Ｃ９Ｆａｂよりもさらに効果的と考えられた（表２ｂ）。

【００８０】

Ｍ２２Ｆａｂ（３ｎｇ／ｍＬ）はサイクリックＡＭＰの強力な刺激剤である（９，４３２±８２２ｆｍｏｌ／細胞ウェル）（表２ｃ）。５Ｃ９の存在下でのＭ２２Ｆａｂの刺激効果は量依存的に阻害され、０．１μｇ／ｍＬの５Ｃ９ＩｇＧの存在下でのサイクリックＡＭＰ濃度は１，２９８±１３４ｆｍｏｌ／細胞ウェルに減少した。Ｍ２２刺激の完全な阻害は、１００μｇ／ｍＬの５Ｃ９により生じた（表２ｃ）。

【００８１】
スキャッチャード解析は、ＴＳＨＲに結合する^{125}Ｉ－標識５Ｃ９の結合定数は４ｘ１０^{10}Ｌ／ｍｏｌであることを示した。
【００８２】
ＴＳＨＲへの^{125}Ｉ－５Ｃ９ＩｇＧ結合の、血清ＴＲＡｂによる阻害
ＴＳＨＲをコートしたチューブへの^{125}Ｉ－５Ｃ９ＩｇＧの結合に対する血清ＴＲＡｂの阻害能を表３および図１に示す。^{125}Ｉ－ＴＳＨの結合および^{125}Ｉ－Ｍ２２ＩｇＧの結合に対する同じ血清ＴＲＡｂの効果もまた、比較のために示した。
【００８３】
^{125}Ｉ－５Ｃ９ＩｇＧのＴＳＨＲへの結合は、１０名の異なる健常血液ドナー（Ｎ１－Ｎ１０、表３）からの血清によって、明らかには阻害されなかった（阻害範囲は３．４－１８．９％）。^{125}Ｉ－ＴＳＨおよび^{125}Ｉ－Ｍ２２の阻害アッセイ（表３）において、全てがＴＳＨＲ自己抗体陽性であるグレーブス病の患者４０名（Ｇ１－Ｇ４０、表３）からの血清は、ＴＳＨＲをコートしたチューブへの^{125}Ｉ－５Ｃ９の結合に対して健常血液ドナーからの血清よりも程度の大きな阻害を示した（阻害範囲は２２．０－８５．２％）（表３）。ＴＳＨＲに対する^{125}Ｉ－５Ｃ９ＩｇＧ、^{125}Ｉ－ＴＳＨ、または^{125}Ｉ－Ｍ２２ＩｇＧの結合に対する患者血清ＴＲＡｂの阻害能は、ピアソン相関係数ｒ＝０．９５（^{125}Ｉ－５Ｃ９ＩｇＧ対^{125}Ｉ－ＴＳＨ；図１ａ）およびｒ＝０．９５（^{125}Ｉ－５Ｃ９ＩｇＧ対^{125}Ｉ－Ｍ２２ＩｇＧ；図１ｂ）で、同程度であった。図１ｃは、同血清による^{125}Ｉ－ＴＳＨおよび^{125}Ｉ－Ｍ２２ＩｇＧの阻害の比較を示す（ピアソン相関係数ｒ＝０．９９）。
【００８４】
これらの実験は、ＴＳＨＲへの５Ｃ９ＩｇＧ結合が血清ＴＲＡｂによって効果的に阻害されること、および５Ｃ９ＩｇＧ結合における血清ＴＲＡｂの阻害効果は、ＴＳＨまたはＭ２２結合におけるこれらの阻害効果に類似していることを示している。
【００８５】
表４は、ＴＳＨ遮断活性を有する患者血清ＴＲＡｂ（Ｂ１－Ｂ５）および強力な甲状腺刺激活性を有する患者血清ＴＲＡｂ（Ｓ１、Ｓ２、Ｓ４）の様々な希釈による、^{125}Ｉ－５Ｃ９ＩｇＧ結合の阻害を示す。^{125}Ｉ－５Ｃ９ＩｇＧ結合は、血清Ｂ１－Ｂ５により、同様に血清Ｓ１、Ｓ２、およびＳ４により量依存的に阻害された。同遮断性および刺激性血清はまた、^{125}Ｉ－ＴＳＨおよび^{125}Ｉ－Ｍ２２ＩｇＧ結合を量依存的に阻害し、さらに３種の全ての標識リガンドに対する阻害のパーセンテージは血清の同希釈において同程度であった（表４ａおよびｂ）。
【００８６】
これらの結果は、刺激活性および遮断活性の両方を有するＴＳＨＲ自己抗体は、ＴＳＨＲへの５Ｃ９結合を阻害することを示している。
【００８７】
ＴＳＨ結合阻害活性を有するマウスＭＡｂによる、ＴＳＨＲへの^{125}Ｉ－５Ｃ９ＩｇＧ結合の阻害
^{125}Ｉ－ＴＳＨ結合阻害活性をもつ様々なマウスＴＳＨＲＭＡｂの、ＴＳＨＲへの^{125}Ｉ－５Ｃ９結合の阻害能を試験し、^{125}Ｉ－Ｍ２２ＩｇＧ結合における効果と比較した（表５）。表５に示すように、^{125}Ｉ－ＴＳＨおよび^{125}Ｉ－Ｍ２２ＩｇＧ結合に対する阻害能を有する全てのＭＡｂは^{125}Ｉ－５Ｃ９結合もまた阻害したが、幾つかのＭＡｂの場合、^{125}Ｉ－５Ｃ９および^{125}Ｉ－Ｍ２２結合における阻害効果は^{125}Ｉ－ＴＳＨ結合における阻害効果よりも弱かった。
【００８８】
これらの実験は、ＴＳＨＲ上の５Ｃ９に対する結合部位と、ＴＳＨ結合の阻害能を有するマウスＴＳＨＲＭＡｂに対する結合部位の間にかなりの重複があることを示唆している。
【００８９】

ＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、患者血清によるサイクリックＡＭＰの産生刺激に対する５Ｃ９ＩｇＧの効果

表２に示すように、５Ｃ９ＩｇＧはＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞内のサイクリックＡＭＰ濃度に関するＴＳＨまたはＭ２２の刺激を遮断することができた。一連の異なる実験において、患者血清ＴＲＡｂの刺激活性における５Ｃ９ＩｇＧの効果を試験した。その結果を表６ａに示す。血清Ｔ１－Ｔ９およびＴ１１－Ｔ１８はＣＨＯ－ＴＳＨＲ細胞内のサイクリックＡＭＰ産生を刺激し、コントロールＭＡｂＩｇＧ（ヒト甲状腺ペルオキシダーゼに特異的な２Ｇ４）とのインキュベーションはそれらの刺激活性への影響をもたなかった。しかしながら、５Ｃ９ＩｇＧ（２００μｇ／ｍＬを５０μＬ）の存在下では、試験された全ての血清の刺激活性は明らかに減少した（表６ａ）。

【００９０】

６種の異なる血清（Ｔ１、Ｔ６、Ｔ３、Ｔ１９、Ｔ２０、Ｔ２１）の量反応効果を表６ｂ－ｇに示す。これらの実験において、０．１μｇ／ｍＬから１００μｇ／ｍＬの範囲の濃度の５Ｃ９ＩｇＧは血清の刺激活性の量依存的減少を起こし、５Ｃ９ＩｇＧの効果は血清Ｔ３を除く全ての試験された血清において、遮断活性をもつＴＳＨＲに対するマウスモノクローナル抗体９Ｄ３３（国際公開第２００４／０５０７０８Ａ２号に記載）の効果と同程度であった。Ｔ３血清の場合（表６ａおよび６ｄ）、１００μｇ／ｍＬの５Ｃ９ＩｇＧの存在下においてサイクリックＡＭＰ産生の約５０％の阻害が観察されたが、１００μｇ／ｍＬの９Ｄ３３ＩｇＧはほとんど完全な阻害をもたらした。このことは、５Ｃ９および９Ｄ３３によって認識されるエピトープの間に、ある小さな違いがある可能性を示唆した。

【００９１】

ＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞内の基本的（すなわち無刺激の）なサイクリックＡＭＰ産生における５Ｃ９ＩｇＧの効果

ＴＳＨおよびＴＳＨＲ抗体の刺激活性の阻害と同様に、５Ｃ９はこれらの甲状腺刺激剤の非存在下で産生されるサイクリックＡＭＰの量を阻害した。特に表６ｂは、１００μｇ／ｍＬのコントロールモノクローナルＩｇＧ（２Ｇ４）の存在下で産生された１２０７±１２３ｆｍｏｌ／細胞ウェルのサイクリックＡＭＰが、１００μｇ／ｍＬの５Ｃ９ＩｇＧの存在下で３０１±３８ｆｍｏｌ／細胞ウェルに減少したことを示している。９Ｄ３３ＩｇＧの効果は、１００μｇ／ｍＬの９Ｄ３３ＩｇＧの存在下での７２１±１８３ｆｍｏｌ／細胞ウェルの産生より、少なかった。表６ｄ、６ｅ、６ｆおよび６ｇに示す別々の実験において同様の結果が得られた。このことは、５Ｃ９ＩｇＧがＴＳＨＲの基本的、または恒常的活性において著しい効果を有することを示している。

【００９２】

アミノ酸変異を含むＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞内サイクリックＡＭＰの産生刺激における５Ｃ９ＩｇＧの効果

ＣＨＯ－ＴＳＨＲ細胞内でのブタＴＳＨのサイクリックＡＭＰ刺激活性に対する５Ｃ９の遮断能における、ＴＳＨＲの単一アミノ酸変異の効果を表７に示す。特に以下の残基：Ｌｙｓ５８、Ｉｌｅ６０、Ａｒｇ８０、Ｔｙｒ８２、Ｔｈｒ１０４、Ａｒｇ１０９、Ｌｙｓ１２９、Ｐｈｅ１３４、Ａｓｐ１５１、Ｌｙｓ１８３、Ｇｌｎ２３５、Ａｒｇ２５５、Ｔｒｐ２５８、Ｓｅｒ２８１をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞において、サイクリックＡＭＰ産生刺激に対する５Ｃ９の効果を調べた。さらに、ＴＳＨＲの残基：Ａｒｇ８０Ａｓｐ、Ａｓｐ１５１Ａｒｇ、Ｌｙｓ１８３Ａｓｐ、Ａｒｇ２５５Ａｓｐの事例において、電荷の変化による変異（change of charge mutation）の効果を調べた。ここでは従来の表記法に従い、置換されたアミノ酸残基、およびその一次配列ポリペプチド内の位置を置換アミノ酸残基の前に示す。以前の研究は、ＴＳＨＲの電荷の変化による変異（change of charge mutation）であるＡｓｐ１６０ＬｙｓはＴＳＨＲのＴＳＨに対する反応性の喪失の原因となったが、Ｍ２２に対する反応は影響されなかったことを示している（特許出願国際公開第ＷＯ２００６／０１６１２１Ａ号）。従って、５Ｃ９の生物活性におけるＴＳＨＲのＡｓｐ１６０Ｌｙｓ変異の効果は、Ｍ２２をＣＨＯ－ＴＳＨＲ

細胞におけるサイクリックＡＭＰ刺激剤として使用することにより調べられた（表７１）。

【００９３】

研究された全てのＴＳＨＲ変異のうち、３種の変異のみがアンタゴニストとして作用する５Ｃ９の能力に影響することが見出された。Ｌｙｓ１２９のＡｌａへの変異（表７ｈ）は、サイクリックＡＭＰ産生のＴＳＨによる刺激を遮断する５Ｃ９ＩｇＧの能力の完全な喪失をもたらした。

【００９４】

ＴＳＨＲ変異であるＬｙｓ１８３Ａｌａもまた、５Ｃ９ＩｇＧの遮断活性の部分的な減少の原因となった。試験の際、１μｇ／ｍＬにおいてＴＳＨＲのＬｙｓ１８３Ａｌａ変異ではＴＳＨ刺激の２８％の阻害が観察され、これは野生型ＴＳＨＲによる８４％の阻害と比較される（表７ｍ）。１００μｇ／ｍＬの５Ｃ９ＩｇＧにおいても、ＴＳＨＲのＬｙｓ１８３Ａｌａ変異を用いた実験ではＴＳＨ刺激の部分的な阻害（４３％）のみが検出されたが、野生型レセプターを用いた実験においては、同濃度においてＴＳＨ刺激活性の完全な遮断（９３％）が観察された(表７ｍ)。陽性荷電のＬｙｓ１８３を陰性荷電のアスパラギン酸に変異させると、５Ｃ９の生物活性における効果はＬｙｓ１８３Ａｌａ変異によって観察されたそれに類似した(表７ｍ）。このことは、Ｌｙｓ１８３が５Ｃ９の生物活性に重要であることを示唆している。Ａｓｐ１５１Ａｌａ変異の場合、５Ｃ９ＩｇＧ遮断活性のわずかな減少；１μｇ／ｍＬにおいて、野生型による８８％の遮断と比較して４９％の阻害が観察された(表７ｊ)。しかしながら１００μｇ／ｍＬの５Ｃ９ＩｇＧの存在下では、この活性は野生型のＴＳＨＲによるものと同等であった。陰性荷電のＡｓｐ１５１を陽性荷電のアルギニンに変異させると、５Ｃ９ＩｇＧ遮断活性の有意な減少は観察されなかった（表７ｋ）。

【００９５】

５Ｃ９活性におけるＴＳＨＲ変異の効果は、９Ｄ３３活性におけるＴＳＨＲ変異の効果と比較できる。特許出願国際公開第２００６／０１６１２１Ａ号に記載されているように、ＴＳＨＲのＬｙｓ５８、Ａｒｇ８０、Ｔｙｒ８２、Ａｒｇ１０９、Ｌｙｓ１２９およびＰｈｅ１３４の変異は、９Ｄ３３活性における効果を有していた。しかしながらＬｙｓ１２９を除いたこれらの変異のいずれもまた、５Ｃ９活性における効果を有してはいなかった。さらに、特許出願国際公開第２００６／０１６１２１Ａ号に記載されているようなＭ２２活性に影響する変異（Ａｒｇ８０、Ｔｙｒ８２、Ｇｌｕ１０７，Ａｒｇ１０９，Ｌｙｓ１２９，Ｐｈｅ１３０、Ｌｙｓ１８３、Ｔｙｒ１８５、Ａｒｇ２５５およびＴｒｐ２５８）であるＬｙｓ１２９を除いたこれらの変異のいずれも、５Ｃ９活性には影響しなかった。さらに、Ｌｙｓ１８３変異は５Ｃ９活性およびＭ２２活性において部分的効果を有していたが、９Ｄ３３活性における効果は有していなかった。

【００９６】

これらの結果は、甲状腺刺激性ヒト自己抗体Ｍ２２、マウス遮断性抗体９Ｄ３３、およびヒト遮断性自己抗体５Ｃ９との相互作用に重要なＴＳＨＲ残基は異なっていることを示している。従って、５Ｃ９とアンタゴニスト活性をもつその他のＴＳＨＲ抗体（例えば９Ｄ３３）との組み合わせは、患者血清ＴＲＡｂ、その他の刺激剤による刺激活性および／またはＴＳＨＲの恒常的活性を阻害するための特に有効な手段となり得る。

【００９７】

５Ｃ９の可変領域配列

５Ｃ９をコードする遺伝子の配列解析は、ＨＣのＶ領域遺伝子はＶＨ３－５３ファミリー由来、Ｄ遺伝子はＤ２－２ファミリー由来、およびＪ遺伝子はＪＨ４ファミリー由来であることを示した。ＬＣの場合、Ｖ領域遺伝子はＯ１２ファミリー由来、およびＪ領域遺伝子はＪＫ２の生殖系列由来であった。ＨＣのヌクレオチドおよびアミノ酸配列は図２ａおよび２ｂそれぞれに示され、ＬＣのヌクレオチドおよびアミノ酸配列は図３ａおよび３ｂそれぞれに示される。

【００９８】

生殖系列配列と比較して、ＨＣ遺伝子配列には体細胞変異、特にＦＷＲ１には１個のサイレント変異、ＣＤＲ２には２個の置換変異、ＣＤＲ３には１個のサイレント変異および１個の置換変異、およびＦＷＲ４には１個のサイレント変異が存在する。しかしながらＨＣのＶ領域配列は２個の挿入、すなわちＶおよびＤ遺伝子の間の長さ６塩基対の１個、および、ＤおよびＪ遺伝子の間の長さ１５塩基対の１個により特徴付けられる。従って、ＨＣのＣＤＲ１は長さ５アミノ酸、ＣＤＲ２は長さ１６アミノ酸、およびＣＤＲ３は長さ１８アミノ酸となる(図２ｂ）。

【００９９】

ＬＣ配列では、ＦＷＲ１には１個のサイレント変異、ＣＤＲ１には１個の置換変異、ＣＤＲ３には１個の置換変異、および、ＶおよびＪ遺伝子の間に長さ６塩基対の１個の挿入が存在する。ＬＣのＣＤＲ１は１１アミノ酸、ＣＤＲ２は７アミノ酸、およびＣＤＲ３は１０アミノ酸よりなる(図３ｂ）。

【０１００】

ＴＳＨまたはＴＲＡｂ検出のための５Ｃ９に基づくアッセイ

ＴＳＨＲ自己抗体を検出するための、ＴＳＨＲをコートしたプレートウェルへの５Ｃ９ＩｇＧ－ビオチン結合に基づいたＥＬＩＳＡの例を表８に示す。このアッセイにおいて、ＴＳＨ－ビオチン結合の阻害に対して陽性の全てのサンプルは、５Ｃ９ＩｇＧ－ビオチン結合に対してもまた陽性であった。さらに、吸光度シグナル、パーセント阻害、および組立単位／Ｌ値は、ＴＳＨ－ビオチンおよび５Ｃ９－ビオチンアッセイの間で同程度であった(表８）。

【０１０１】

ＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞へのマウス甲状腺刺激性モノクローナル抗体(マウスＴＳＨＲＭＡｂ；ＴＳＭＡｂ）の刺激活性に対する５Ｃ９ＩｇＧの効果

表９に示すように５Ｃ９ＩｇＧは、試験された５種の全てのＴＳＭＡｂ（１，２，４，５および７）によるサイクリックＡＭＰ産生の刺激を遮断することができた。例えばＴＳＭＡｂ１(表９)により刺激されたサイクリックＡＭＰの濃度は１８．９４±７．４ｐｍｏｌ／ｍＬであったが、１００μｇ／ｍＬの５Ｃ９ＩｇＧの存在下ではわずかに１．２４±０．０７ｐｍｏｌ／ｍＬのサイクリックＡＭＰが産生された。これは、１００μｇ／ｍＬのコントロールＭＡｂ２Ｇ４の存在下でのサイクリックＡＭＰの濃度である、１６．５±１．１ｐｍｏｌ／ｍＬと比較することができる(表９)。

【０１０２】

以下の表９、同様に表１０－１５に示すサイクリックＡＭＰ濃度はｐｍｏｌ／ｍＬで表している。すなわち、細胞ウェルあたりのサイクリックＡＭＰの量はｐｍｏｌ／ｍＬ÷５（アッセイされた各ウェルからのサンプル２００μＬを表す）である。

【０１０３】

ＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞への天然ヒトＴＳＨおよびリコンビナントヒトＴＳＨの刺激活性に対する５Ｃ９ＩｇＧの効果

ブタＴＳＨによるサイクリックＡＭＰ刺激を遮断する５Ｃ９ＩｇＧの能力を、表２および表１０に示す。さらに、５Ｃ９ＩｇＧは天然ヒトＴＳＨ（NIBSC reference preparation 81/565 from National Institute for Biological Standards and Control, South Mimms, Potters Bar EN6 3QG UK）およびリコンビナントＴＳＨ（NIBSC reference preparation 94/674）両者のサイクリックＡＭＰ刺激に対する阻害能を示した(表１０）。特に１００ｎｇ／ｍＬのリコンビナントまたは天然ヒトＴＳＨいずれかによるサイクリックＡＭＰ産生刺激は、サイクリックＡＭＰ産生の完全な阻害を得るために０．１－１．０μｇ／ｍＬの５Ｃ９ＩｇＧを要求する。５Ｃ９分離のための血液採集時におけるドナー血清中の循環ＴＳＨ濃度は１６０ｍＵ／Ｌ（約３２ｎｇ／ｍＬ）であり、得られた結果(表２ａおよび表１０）は、この濃度の循環ＴＳＨは血清中の３２－３２０ｎｇ／ｍＬの５Ｃ９ＩｇＧの存在により完全に遮断され得ることを示している。ドナー血清中のＴＳＨＲ自己抗体の濃度は、ＴＳＨＲへの^{125}Ｉ－Ｍ２２結合の阻害（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に記載されているように）を用いることにより１７００ｎｇ／ｍＬ（１２０ｎｇ／ｍｇ）と推定された。これはすなわち、ＴＳＨによる甲状腺刺激の遮断に要求される５Ｃ９の濃度よりも数倍高めである。

【０１０４】

活性化変異であるＳ２８１Ｉ、Ｉ５６８ＴおよびＡ６２３ＩをもつＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞内の基本的（すなわち無刺激の）なサイクリックＡＭＰ活性における５Ｃ９ＩｇＧの効果

５Ｃ９ＩｇＧは、甲状腺活性化剤（すなわちＴＳＨまたはＴＳＨＲ抗体）の非存在下で、活性化変異をもつＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞内で産生されるサイクリックＡＭＰの量を減少させることができた。表１１ａに示すように、活性化変異であるＳ２８１ＩをもつＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞内の基本的なサイクリックＡＭＰ濃度は５Ｃ９の非存在下で９．９０±１．５１ｐｍｏｌ／ｍＬであり、これは０．０１μｇ／ｍＬの５Ｃ９ＩｇＧの存在下で４．１７±０．６０ｐｍｏｌ／ｍＬに減少し、１μｇ／ｍＬの５Ｃ９ＩｇＧの存在下で３．４４±０．６３ｐｍｏｌ／ｍＬに減少した。遮断性マウスＴＳＨＲＭＡｂ９Ｄ３３は、コントロールＭＡｂ２Ｇ４と同程度のわずかな効果を有した（表１１ａ）。

【０１０５】

２１．３９±５．３１ｐｍｏｌ／ｍＬの基本的なサイクリックＡＭＰ濃度を示す、ＴＳＨＲ活性化変異のＩ５６８Ｔによって同様の結果が得られた（表１１ｂ）。これは１μｇ／ｍＬの５Ｃ９ＩｇＧの添加によって５．２９±０．７５ｐｍｏｌ／ｍＬに減少し、２Ｇ４ＩｇＧ、および５Ｃ９ＩｇＧを添加した場合の、２０．５２±０．９５ｐｍｏｌ／ｍＬ、および２１．６５±１．９９ｐｍｏｌ／ｍＬそれぞれと比較される。３６．８９ｐｍｏｌ／ｍＬの基本的なサイクリックＡＭＰ濃度を有する、研究された第３のＴＳＨＲ活性化変異であるＡ６２３Ｉの場合は、１μｇ／ｍＬの５Ｃ９ＩｇＧの添加によりサイクリックＡＭＰ濃度は１６．４３±１．２７ｐｍｏｌ／ｍＬに減少し、これは１μｇ／ｍｌのコントロールＩｇＧである２Ｇ４によるわずかな効果（２８．９６±２．２９ｐｍｏｌ／ｍＬ）または１μｇ／ｍＬの９Ｄ３３ＩｇＧ（４０．０９±７．７３ｐｍｏｌ／ｍＬ）と比較される（表１１ｃ）。

【０１０６】

これらの結果は、５Ｃ９はマウス遮断性ＭＡｂの９Ｄ３３とは異なり、たとえＴＳＨＲ活性化変異がＴＳＨＲの異なる部分に存在していても（すなわち、Ｓ２８１Ｉは細胞外ドメインにあり、Ｉ５６８Ｔは膜貫通ドメインの２番目の細胞外ループにあり、かつＡ６２３Ｉは膜貫通ドメインの３番目の細胞内ループにある）、これらの変異に関連したサイクリックＡＭＰ産生において著しい効果を有することを示している。

【０１０７】

野生型ＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞におけるＴＳＨを介したサイクリックＡＭＰ産生の刺激に対する、５Ｃ９およびマウスＴＳＨＲ遮断性モノクローナル抗体９Ｄ３３およびこれら２種の抗体の混合物の効果の比較

前記の実験および表１２に示すように、低くとも１μｇ／ｍＬの濃度のヒトＴＳＨＲ遮断性ＭＡｂ５Ｃ９およびマウスＴＳＨＲ遮断性ＭＡｂ９Ｄ３３は、ＣＨＯ－ＴＳＨＲ細胞におけるＴＳＨのＴＳＨＲサイクリックＡＭＰ刺激活性に対する遮断能を有する。表１２の実験１－５に示すように、ＴＳＨを介したサイクリックＡＭＰの刺激に対する９Ｄ３３ＩｇＧおよび５Ｃ９ＩｇＧの効果は相加的であった。刺激に２つの異なった濃度のＴＳＨ（３ｎｇ／ｍＬおよび０．３ｎｇ／ｍＬ）を用いた際、同じ相加的効果が観察された（表１２；実験１－３および実験４および５の各実験）。

【０１０８】

野生型ＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞におけるＭ２２を介したサイクリックＡＭＰ産生の刺激に対する、５Ｃ９およびマウスＴＳＨＲ遮断性モノクローナル抗体９Ｄ３３およびこれら２種の抗体の混合物の効果の比較

以前に示したように、５Ｃ９および９Ｄ３３は、ＣＨＯ－ＴＳＨＲ細胞におけるＭ２２

Ｆａｂを介したサイクリックＡＭＰの刺激もまた阻害できる。Ｍ２２を介したサイクリックＡＭＰの刺激に対する９Ｄ３３ＩｇＧおよび５Ｃ９ＩｇＧの効果は相加的であった（表１３、実験１－４）。刺激に２つの異なった濃度のＭ２２Ｆａｂ（３ｎｇ／ｍＬおよび０．３ｎｇ／ｍＬ）を用いた際、同じ相加的効果が観察された（表１３；実験１および２、および実験３および４の各実験）。

【０１０９】

５Ｃ９ＩｇＧおよび９Ｄ３３ＩｇＧの相加的効果は、ＴＳＨおよびＭ２２の両者を介したサイクリックＡＭＰ産生の刺激について同様であった（表１２および１３）。

【０１１０】

野生型ＴＳＨＲを細胞あたり多数発現するＣＨＯ細胞内の基本的（すなわち無刺激の）なサイクリックＡＭＰ活性における５Ｃ９の効果

細胞あたり約５ｘ１０^{5}のレセプターを発現するＣＨＯ細胞株は、以前の実験（例えば表９－１３）で用いた標準的なＣＨＯ細胞株(細胞あたり約５ｘ１０^{4}のＴＳＨＲを発現する)に比較して高濃度の基本的（すなわち無刺激の）サイクリックＡＭＰを示した。すなわち、それぞれの濃度は、約１．０ｐｍｏｌ／ｍＬに比較して４７．１±１１．７ｐｍｏｌ／ｍＬである。野生型ＴＳＨＲの基本的活性における５Ｃ９ＩｇＧおよび９Ｄ３３ＩｇＧの効果を、細胞あたり多数のレセプターを発現する細胞株を用いて評価した。９Ｄ３３ＩｇＧおよびネガティブコントロールの抗ＧＡＤ抗体（５Ｂ３）とのインキュベーションは、基本的サイクリックＡＭＰ活性の０－５．３％の阻害をもたらした(表１４；実験１)。このことは、マウス遮断性ＭＡｂ９Ｄ３３またはコントロールＭＡｂは、野生型ＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における基本的なサイクリックＡＭＰ産生に対して効果をもたないことを示している。しかしながら５Ｃ９ＩｇＧの場合、基本的サイクリックＡＭＰ活性の明らかな阻害が観察された(表１４；実験２）。すなわち、０．１μｇ／ｍＬおよび１０μｇ／ｍＬの濃度はそれぞれ、４５．７％および７４．６％の阻害を起こした。さらに、５Ｃ９Ｆａｂおよび５Ｃ９Ｆ（ａｂ’）もまた、細胞あたり多数のＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における基本的サイクリックＡＭＰ活性の有効な阻害剤であった(表１４、実験３)。例えば、１μｇ／ｍＬおよび１００μｇ／ｍＬの５Ｃ９Ｆａｂはそれぞれ、基本的なサイクリックＡＭＰ産生の３９％および６１％の阻害を示し、これは１００μｇ／ｍＬの５Ｃ９Ｆ（ａｂ’）による４８％の
阻害と比較される(表１４、実験３)。

【０１１１】

アンタゴニスト（すなわち遮断性）活性を有する患者血清ＴＳＨＲ自己抗体の、活性化変異Ｉ５６８Ｔを有するＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞の基本的（すなわち無刺激の）なサイクリックＡＭＰ活性に対する効果

ＴＳＨＲＩ５６８Ｔ細胞によるサイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液存在下での基本的なサイクリックＡＭＰ産生（２０．５±８．７ｐｍｏｌ／ｍＬ）は、試験された健常血液ドナーからの正常プール血清（ＮＰＳ）または異なった３名の個々の健常血液ドナー血清（Ｎ１－Ｎ３）の１／１０および１／５０希釈における添加によって基本的に影響されなかった。ＮＰＳおよびＮ１－Ｎ３血清の存在下での基本的なサイクリックＡＭＰ産生は、サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液存在下での基本的なサイクリックＡＭＰ産生に比較して０－１４％の阻害を示した(表１５)。しかしながら、高濃度の遮断性ＴＲＡｂ（Ｂ２－Ｂ５）を有する４種の異なる血清の存在下では、基本的なサイクリックＡＭＰ産生の２３－８９％の阻害が観察された(表１５)。５Ｃ９ＩｇＧ（１μｇ／ｍＬ）の存在下では、ＴＳＨＲＩ５６８Ｔの基本的なサイクリックＡＭＰ活性の８３％の阻害が観察された。Ｉ５６８Ｔ変異をもつＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞の基本的なサイクリックＡＭＰ産生に対する、２種の遮断性血清（Ｂ３およびＢ４）の量依存性効果もまた表１５に示す。

【０１１２】

これらの結果は、５Ｃ９が、特にＴＳＨＲ活性化変異であるＩ５６８Ｔにおける基本的なサイクリックＡＭＰ産生の阻害に関して、患者遮断ＴＳＨＲ自己抗体のＴＳＨＲ遮断活性特性を有することを示す。

【０１１３】
アンタゴニスト活性を有する患者血清ＴＳＨＲ自己抗体の、活性化変異Ｓ２８１Ｉを有するＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞の基本的（すなわち無刺激の）なサイクリックＡＭＰ活性に対する効果
ＴＳＨＲＳ２８１Ｉ細胞によるサイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液存在下での基本的なサイクリックＡＭＰ産生は１１．２±２．０ｐｍｏｌ／ｍＬであり、健常血液ドナープール血清または個々の健常血液ドナー血清（１／１０または１／５０希釈）とのインキュベーションは効果を示さなかった（表１６）。一方で、高濃度の遮断性ＴＲＡｂ（Ｂ２－Ｂ５）を有する４種の異なる血清の存在下では、基本的なサイクリックＡＭＰ産生の３１－５６％の阻害が観察された（表１６）。ＴＳＨＲＳ２８１Ｉを用いた実験において、１μｇ／ｍＬの５Ｃ９ＩｇＧは基本的なサイクリックＡＭＰ活性を７１％阻害した。
【０１１４】
アンタゴニスト活性を有する患者血清ＴＳＨＲ自己抗体の、活性化変異Ａ６２３Ｉを有するＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞の基本的（すなわち無刺激の）なサイクリックＡＭＰ活性に対する効果
ＴＳＨＲＡ６２３Ｉ細胞の場合、サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液存在下での基本的なサイクリックＡＭＰ産生は４３．５±１１．２ｐｍｏｌ／ｍＬであり、健常血液ドナープール血清または個々の血清とのインキュベーションによって基本的に影響されなかった。（表１７）。高濃度の遮断性ＴＲＡｂ（Ｂ２－Ｂ５）を有する４種の異なる血清とのインキュベーションでは、これらの実験においてサイクリックＡＭＰの－１％から５６％を阻害した（表１７）。このことは、同じ実験における１μｇ／ｍＬの５Ｃ９ＩｇＧによる４９％の阻害と比較することができる。
【０１１５】
アンタゴニスト活性を有する患者血清ＴＳＨＲ自己抗体の、細胞あたり約5×10^5の野生型ＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞の基本的（すなわち無刺激の）なサイクリックＡＭＰ活性に対する効果
細胞あたり比較的多数の野生型ＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞の基本的なサイクリックＡＭＰ産生は、この一連の実験で２８．１±０．７ｐｍｏｌ／ｍＬであった。該細胞を１／１０希釈の健常血液ドナープール血清または個々の血清（Ｎ１－Ｎ３）とインキュベートしたとき、サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液存在下での基本的なサイクリックＡＭＰ濃度は９９％から１４６％の範囲であったが、１／５０希釈においてその範囲は９３％から１３７％であった。遮断性ＴＳＨＲ自己抗体を有する試験された４種の血清のうち、１種の血清（Ｂ２）は基本的なサイクリックＡＭＰ産生において効果を示さなかった（表１８）。２種の血清（Ｂ３およびＢ５）の場合、サイクリックＡＭＰ濃度は、サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液存在下で観察された濃度に比較して増大した（表１８）。血清Ｂ３およびＢ５が刺激活性および遮断活性を有するＴＳＨＲ自己抗体の混合物を含むことは十分にあり得る。一方、血清Ｂ４は１／１０および１／５０希釈において、基本的なサイクリックＡＭＰ産生に対する明らかな阻害効果を有していた。すなわち基本的なサイクリックＡＭＰ濃度は、サイクリックＡＭＰ緩衝液存在下での濃度に比較してそれぞれ３１％および６１％であった（表１８）。このことは、１μｇ／ｍＬの５Ｃ９ＩｇＧ存在下での濃度が、サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液存在下での濃度に比べ３３％であることと比較することができる（表１８）。
【０１１６】
概して５Ｃ９ＩｇＧは、野生型ＴＳＨＲ、または遮断性ＴＳＨＲ自己抗体陽性患者由来の血清により観察された効果に対する活性化変異を有するＴＳＨＲを導入したＣＨＯ細胞における、基本的なサイクリックＡＭＰ産生に対し同様の効果を示す。しかしながら、様々な変異の場合において個々の患者血清による効果は変動する（表１９）。野生型ＴＳＨＲの場合、ある血清は刺激効果を示す。これはおそらく遮断性自己抗体と同様にＴＳＨＲ刺激性自己抗体も存在するためである（表１９）。
【０１１７】

アミノ酸変異を含むＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞におけるサイクリックＡＭＰ産生の刺激に対する５Ｃ９の効果

アミノ酸変異を有するＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞におけるサイクリックＡＭＰ産生の刺激に対する５Ｃ９の効果は、以下の、アラニンへの変異の包含に及ぶ：Ａｓｐ４３、Ｇｌｕ６１、Ｈｉｓ１０５、Ｇｌｕ１０７、Ｐｈｅ１３０、Ｇｌｕ１７８、Ｔｙｒ１８５、Ａｓｐ２０３、Ｔｙｒ２０６、Ｌｙｓ２０９、Ａｓｐ２３２、Ｌｙｓ２５０、Ｇｌｕ２５１、Ｔｈｒ２５７、Ａｒｇ２７４、Ａｓｐ２７６（表２０ａ－ｐ、および表２１に要約）。

【０１１８】

ＴＳＨＲのアミノ酸であるＡｓｐ４３、Ｇｌｕ６１、Ｈｉｓ１０５、Ｇｌｕ１０７、Ｔｙｒ１８５、Ａｓｐ２３２およびＴｈｒ２７５のアラニンへの変異は、ＴＳＨ刺激によるサイクリックＡＭＰ産生に対する５Ｃ９ＩｇＧの阻害能に効果を示さなかった。ＴＳＨ刺激によるサイクリックＡＭＰ産生に対する５Ｃ９の阻害能は、ＴＳＨＲのＰｈｅ１３０、Ｇｌｕ１７８、Ａｓｐ２０３、Ｔｙｒ２０６、Ｌｙｓ２５０、Ｇｌｕ２５１およびＡｓｐ２７６のアラニンへの変異により減少した。Ｌｙｓ２０９ＡｌａおよびＡｓｐ２７４Ａｌａの２種の変異の場合、ＴＳＨを介したサイクリックＡＭＰ産生に対する５Ｃ９ＩｇＧの阻害能は増大した。

【０１１９】

要約すると(表７，２０、および２１)、Ｌｙｓ１２９、Ｐｈｅ１３０、Ａｓｐ１５１、Ｇｌｕ１７８、Ｌｙｓ１８３、Ａｓｐ２０３、Ｔｙｒ２０６、Ｌｙｓ２５０、Ｇｌｕ２５１およびＡｓｐ２７６の１０種のＴＳＨＲ残基全ては、５Ｃ９のＴＳＨによるサイクリックＡＭＰ刺激に対する阻害能を、野生型ＴＳＨＲに比べて減少させた。ＴＳＨＲのＬｙｓ１２９およびＡｓｐ２０３の変異は最大の効果を示し、５Ｃ９活性の完全な阻害の原因となった。

【０１２０】

野生型ＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞におけるＴＳＨを介したサイクリックＡＭＰの産生刺激に対する遮断性血清Ｂ２－Ｂ５の、Ａｓｐ２０３Ａｌａ変異ＴＳＨＲとの比較による効果

野生型ＴＳＨＲにおける１μｇ／ｍＬの５Ｃ９による遮断効果は（ＴＳＨにより誘導されたサイクリックＡＭＰ刺激の９２％の阻害）、Ａｓｐ２０３Ａｌａ変異ＴＳＨＲにおいては４％に減少した(表２２）。

【０１２１】

遮断性血清Ｂ４の活性はＴＳＨＲのＡｓｐ２０３Ａｌａ変異により影響されなかったが、遮断性血清Ｂ２およびＢ３では、ＴＳＨＲのＡｓｐ２０３Ａｌａ変異の場合、野生型ＴＳＨＲと比較してＴＳＨにより誘導されたサイクリックＡＭＰ刺激のパーセント阻害にわずかな減少がみられた。

【０１２２】

一血清Ｂ５の場合、ＴＳＨにより誘導されたサイクリックＡＭＰ刺激のパーセント阻害に顕著な減少が観察された；すなわち、野生型ＴＳＨＲでの６９％の阻害に対して、変異ＴＳＨＲでは３０％の阻害であった。

【０１２３】

５Ｃ９活性に対するＴＳＨＲのＡｓｐ２０３Ａｌａ変異の効果は遮断性血清の活性に対する効果よりも大きかったが、試験された３／４の血清の遮断活性は様々な程度に影響された。このことは、遮断性ＴＳＨＲ自己抗体および５Ｃ９の結合部位は重複しているが、様々な血清と接触する実際のＴＳＨＲアミノ酸には幾らかの違いのあることを示し得る。

【０１２４】

要約および結論

上記の実験は５Ｃ９のような本発明による抗体が、ヒトおよびマウスＴＳＨＲ刺激性抗体、天然ヒトおよび動物ＴＳＨ、およびリコンビナントヒトＴＳＨを含む様々な甲状腺刺激剤の刺激活性を遮断できることを証明する。さらに、２種の異なる遮断性抗体、すなわ

ちヒトＭＡｂ５Ｃ９およびマウスＭＡｂ９Ｄ３３は個別に試験した際、ＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞におけるＴＳＨまたはＭ２２を介したサイクリックＡＭＰ刺激に対する遮断能を有し、混合した際、ＴＳＨまたはＭ２２刺激に対して相加的遮断効果を示すことが証明される。

【０１２５】

５Ｃ９のような本発明による抗体は、ＴＳＨＲの基本的（すなわち無刺激の）なサイクリックＡＭＰ活性に対する新規な効果を有する。これらの効果は、比較的高濃度の基本的なサイクリックＡＭＰを有するＴＳＨＲ導入ＣＨＯ細胞を用いた実験により研究されてきた。すなわち、５Ｃ９のような本発明による抗体の基本的なサイクリックＡＭＰ活性に対する遮断効果が確認されてきた。さらに、遮断（アンタゴニスト）活性をもつＴＳＨＲ自己抗体を有する幾つかの血清は、これらのＴＳＨＲ導入細胞における基本的なサイクリックＡＭＰ活性への遮断能を有することが示されてきた。この実験はまた、５Ｃ９のような本発明による抗体および血清ＴＳＨＲ遮断自己抗体の、活性化ＴＳＨＲ変異に関連した基本的なサイクリックＡＭＰ活性に対する遮断効果を証明する。

【０１２６】

これらの結果は、５Ｃ９が遮断性ＴＳＨＲ自己抗体の特性を示すヒトＭＡｂであること、すなわち甲状腺自己免疫疾患に付随する患者血清ＴＳＨＲ自己抗体の典型であることを強調する。

【０１２７】

記載された実験はまた、本発明による抗体の遮断活性に重要な幾つかのＴＳＨＲアミノ酸の同定も可能にした。

【０１２８】

概してこの結果は、５Ｃ９のような本発明による抗体は、甲状腺自己免疫疾患の患者由来の様々な血清中に見出されたＴＳＨＲ遮断性自己抗体と同様のＴＳＨＲ結合活性、およびＴＳＨＲの機能における同様の生物学的効果を呈することを示す。従って、血清中の遮断性ＴＳＨＲ自己抗体の特性および生物学的活性を有する５Ｃ９のような本発明による抗体は、様々な病態におけるＴＳＨＲの不活性化に適用できる。これらの病態は、ＴＳＨを介したＴＳＨＲの活性化、甲状腺刺激性ＴＳＨＲ自己抗体を介したＴＳＨＲの活性化、基本的な(無刺激の、恒常的な）ＴＳＨＲ活性、および活性化ＴＳＨＲ変異によるＴＳＨＲの活性化を含む。従って、５Ｃ９のような本発明による抗体は、上述のＴＳＨＲの活性化による病態；例えばグレーブス病、グレーブス眼症、ＴＳＨＲの活性化変異による甲状腺機能亢進症、ＴＳＨの異常な濃度(病理的または薬理的）による甲状腺機能亢進症、甲状腺癌、および甲状腺癌転移の管理および制御に適用できる。

【０１２９】

【表１－１】

［表１］

５Ｃ９ＩｇＧ、リンパ球ドナーＩｇＧ、およびリンパ球ドナー血漿による、ＴＳＨＲをコートしたチューブへの^{125}Ｉ－ＴＳＨ、^{125}Ｉ－Ｍ２２ＩｇＧ、または^{125}Ｉ－５Ｃ９ＩｇＧの結合の阻害

サンプル	^{125}I-TSH（阻害率%）	^{125}I-M22 IgG（阻害率%）	^{125}I-5C9（阻害率%）
ドナー血漿（HBDプール希釈）			
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
ドナーIgG（HBDプールIgGで1mg／mLに希釈）			
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

【表１－２】

5C9 IgG （2G4で100μg/mLに希釈）			
100 μg/mL	84	85	88
50 μg/mL	76	81	80
25 μg/mL	67	69	71
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	34
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

ＴＳＨＲをコートしたチューブへの標識ラベルの平均結合％
^{125}Ｉ－ＴＳＨを用いた実験において１４％
^{125}Ｉ－Ｍ２２ＩｇＧを用いた実験において２１％
および、５Ｃ９ＩｇＧを用いた実験において２０％

ＨＢＤプール＝健常人血液ドナープール血清
２Ｇ４＝コントロールのＩｇＧ（ヒト甲状腺ペルオキシダーゼに対するヒトＭＡｂ）
【０１３０】

【表２ａ】

［表２ａ］

ヒトＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞におけるＴＳＨのサイクリックＡＭＰ産生刺激に対する、５Ｃ９ＩｇＧ、またはリンパ球ドナー血清ＩｇＧの効果

サンプル	IgG濃度	サイクリックAMP (fmol/cell well; 平均±SD、n＝3)
pTSH (3 ng/mL) のみ		19020 ±2154
5C9 IgG のみ	1 μg/mL	141 ±5
5C9 IgG + pTSH (3 ng/mL)	1 μg/mL	2208 ±329
5C9 IgG + pTSH (3 ng/mL)	0.5 μg/mL	4754 ±876
5C9 IgG + pTSH (3 ng/mL)	0.1 μg/mL	11874 ±4214
5C9 IgG + pTSH (3 ng/mL)	0.08 μg/mL	14525 ±3690
5C9 IgG + pTSH (3 ng/mL)	0.06 μg/mL	13290[1]
5C9 IgG + pTSH (3 ng/mL)	0.04 μg/mL	13928 ±1572
5C9 IgG + pTSH (3 ng/mL)	0.02 μg/mL	16432 ±9286
5C9 IgG + pTSH (3 ng/mL)	0.01 μg/mL	18969 ±5308
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ		207 ±51
ドナー血清[a] 1/10	1.43 mg/mL[b]	1102 ±46
ドナー血清 1/10 + pTSH (3 ng/mL)	1.43 mg/mL	5931 ±350
ドナー血清 1/20 + pTSH (3 ng/mL)	0.715 mg/mL	16886 ±728
ドナー血清 1/30 + pTSH (3 ng/mL)	0.477 mg/mL	16453 ±3455
ドナー血清 1/40 + pTSH (3 ng/mL)	0.358 mg/mL	17716 ±1753
ドナー血清 1/50 + pTSH (3 ng/mL)	0.286 mg/mL	17928 ±4772
ドナー血清 1/100 + pTSH (3 ng/mL)	0.143 mg/mL	18226 ±2268

[1] １回の決定

[a] ドナー血清は示されたようにサイクリックＡＭＰ検定緩衝液で希釈した

[b] 比濁法により決定された非希釈血清のＩｇＧ濃度は１４．３ｍｇ/ｍＬであった

５Ｃ９ＩｇＧおよびＴＳＨはサイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液で希釈した。

【０１３１】

【表２ｂ－１】

［表２ｂ］

ＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞においてＴＳＨにより誘導されたサイクリックＡＭＰ産生の、５Ｃ９ＩｇＧ、Ｆ（ａｂ'）$_2$、およびＦａｂ断片による阻害

実験１

サンプル	サイクリックAMP (fmol/cell well; 平均±SD、n＝3)
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ	586 ±148
TSH 3 ng/mL のみ	18557 ±363
5C9 Fab 100 μg/mL のみ	235 ±35
5C9 Fab 100 μg/mL + TSH	938 ±93
5C9 Fab 10 μg/mL + TSH	1283 ±239
5C9 F(ab')$_2$ 100 μg/mL のみ	204 ±12
5C9 F(ab')$_2$ 100 μg/mL + TSH	877 ±195
5C9 F(ab')$_2$ 10 μg/mL + TSH	916 ±188
5C9 IgG 100 μg/mL のみ	237 ±54
5C9 IgG 100 μg/mL + TSH	754 ±177
5C9 IgG 10 μg/mL + TSH	247 ±115
2G4 IgG 100 μg/mL + TSH	6082[1]

【表２ｂ－２】
実験２

サンプル	サイクリックAMP (fmol/cell well; 平均±SD、n＝3)
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ	584 ±111
TSH 3 ng/mLのみ	19363 ±5198
2G4 IgG 100 μg/mL のみ	608 ±169
2G4 IgG 100 μg/mL + TSH	18147 ±972
2G4 IgG 10 μg/mL + TSH	18114 ±6544
5C9 $F(ab')_2$ 100 μg/mL のみ	414 ±22
5C9 $F(ab')_2$ 100 μg/mL + TSH	1058 ±223
5C9 $F(ab')_2$ 10 μg/mL + TSH	1333 ±443
5C9 IgG 100 μg/mL のみ	338 ±108
5C9 IgG 100 μg/mL + TSH	1109 ±375
5C9 IgG 10 μg/mL + TSH	723 ±71
5C9 Fab 100 μg/mL のみ	212 ±37
5C9 Fab 100 μg/mL + TSH	867 ±127
5C9 Fab 10 μg/mL + TSH	4131 ±776

[1]２組のサンプルの平均
２Ｇ４＝コントロールのＩｇＧ（ヒト甲状腺ペルオキシダーゼに対するヒトＭＡｂ）抗体およびＴＳＨ標本はサイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液で希釈した。
【０１３２】

【表２ｃ－１】

ヒトＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞におけるＴＳＨ、またはＭ２２ＦａｂによるサイクリックａＭＰ産生刺激に対する、５Ｃ９ＩｇＧおよび９Ｄ３３ＩｇＧの効果

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/cell well; 平均±SD、n＝3)
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ	473 ±21
pTSH 3 ng/mL のみ	12,270 ±980
5C9 IgG 100 μg/mL のみ	426 ±27
5C9 IgG 10 μg/mL のみ	360 ±53
5C9 IgG 1 μg/mL のみ	376 ±18
5C9 IgG 0.1 μg/mL のみ	404 ±42
5C9 IgG 0.01 μg/mL のみ	578 ±65
5C9 IgG 0.001 μg/mL のみ	554 ±47
5C9 IgG 100 μg/mL + pTSH 3 ng/mL	1094 ±70
5C9 IgG 10 μg/mL + pTSH 3 ng/mL	1028 ±47
5C9 IgG 1 μg/mL + pTSH 3 ng/mL	1872 ±168
5C9 IgG 0.1 μg/mL + pTSH 3 ng/mL	3920 ±464
5C9 IgG 0.01 μg/mL + pTSH 3 ng/mL	15,050 ±386
5C9 IgG 0.001 μg/mL + pTSH 3 ng/mL	14,147 ±1,310
9D33 IgG 100 μg/mL のみ	626 ±127
9D33 IgG 100 μg/mL + pTSH 3 ng/mL	2,218 ±5
M22 Fab 3 ng/mL のみ	9,432 ±822
5C9 IgG 100 μg/mL + M22 Fab 3 ng/mL	354 ±56

【表２ｃ－２】

5C9 IgG 10 μg/mL + M22 Fab 3 ng/mL	638[1] ±190
5C9 IgG 1 μg/mL + M22 Fab 3 ng/mL	956 ±169
5C9 IgG 0.1 μg/mL + M22 Fab 3 ng/mL	1,298 ±134
5C9 IgG 0.01 μg/mL + M22 Fab 3 ng/mL	9,978 ±919
5C9 IgG 0.001 μg/mL + M22 Fab 3 ng/mL	11,614 ±393
9D33 IgG 100 μg/mL + M22 Fab 3 ng/mL	1,048 ±10

[1] ２組のサンプルの平均

９Ｄ３３は、ＴＳＨＲが発現するＣＨＯ細胞において、ＴＳＨおよびＴＲＡｂが介在するサイクリックＡＭＰ生産を遮断するマウス抗体である。

抗体およびＴＳＨ標本はサイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液で希釈した。

【０１３３】

【表３－１】

［表３］

^{125}Ｉ－５Ｃ９ＩｇＧ、^{125}Ｉ－ＴＳＨ、および^{125}Ｉ－Ｍ２２ＩｇＧのＴＳＨＲをコートしたチューブへの結合、および患者血清サンプルによる阻害

血清サンプル	^{125}I-5C9 結合阻害(%)	^{125}I-TSH 結合阻害(%)	^{125}I-M22 結合阻害(%)
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

【表３－２】

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

【表３－３】

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＝健常人血液ドナーからの血清
Ｇ１－Ｇ４０＝グレーブス病にかかった経験のある患者からの血清
結果はほぼ一致する二重測定の平均である。

【数３】

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

ここで、Ａ＝テスト血清存在下での結合；Ｂ＝健常人血液ドナーからの血清ＨＢＤプールのプールの存在下での結合。
ＨＢＤプール存在下での^{125}Ｉ－５Ｃ９は２０％の結合率であり、ＨＢＤプール存在下での^{125}Ｉ－ＴＳＨは１２％の結合率であり、ＨＢＤプール存在下での^{125}Ｉ－Ｍ２２は２０％の結合率であった。

【０１３４】

【表４ａ－１】

［表４ａ］

^{125}Ｉ－５Ｃ９ＩｇＧ、^{125}Ｉ－ＴＳＨ、および^{125}Ｉ－Ｍ２２ＩｇＧのＴＳＨＲをコートしたチューブへの結合に対する、遮断活性または刺激活性のいずれかを有する患者血清による阻害の比較

テストサンプル	^{125}I-5C9 結合阻害(%)	^{125}I-TSH 結合阻害(%)	^{125}I-M22 結合阻害(%)
アッセイキャリブレーター			
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
ポジティブコントロール血清	34	35	38.7
遮断性血清			
B1			
1/5	93	95	91.7
1/10	92	94	89.2
1/20	91	91	85.9
1/40	85	80	78.8
1/80	67	55	67.4
1/160	33	33	45.9
1/320	20	17	26.4

【表４ａ－２】

B2			
1/5	92	91	86.6
1/10	85	85	79.5
1/20	NT	73	66.2
1/40	68	51	50.0
1/80	42	34	29.7
1/160	19	22	20.3
1/320	NT	13	7.8
B3			
1/5	89	93	85.5
1/10	82	84	76.3
1/20	62	64	61.7
1/40	37	44	42.5
1/80	14	26	26.2
1/160	NT	12	16.6
1/320	NT	7	8.9
B4			
1/5	93	94	90.3
1/10	93	95	88.5
1/20	92	93	85.1
1/40	89	89	81.1

【表４ａ－３】

1/80	78	76	72.1
1/160	56	54	56.9
1/320	34	37	39.9
B5			
1/5	94	93	90.3
1/10	91	92	87.0
1/20	87	87	82.2
1/40	74	72	71.7
1/80	56	47	54.6
1/160	31	29	36.4
1/320	19	17	21.4
刺激性血清			
S1			
1/5	89	91	84.9
1/10	80	84	75.4
1/20	63	67	62.9
1/40	42	50	46.2
1/80	26	34	31.9
1/160	9	21	16.3
1/320	16	4	10.6

【０１３５】

【表４ｂ－１】

［表４ｂ］

テストサンプル	^{125}I-5C9 結合阻害(%)	^{125}I-TSH 結合阻害(%)	^{125}I-M22 結合阻害(%)
アッセイキャリブレーター			
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
ポジティブコントロール血清	34.2	31.4	38.6
HBDプール	6.2	-0.6	12.5
S2			
ニート	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			

【表４ｂ－２】

ニート	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はアンタゴニスト（遮断）活性を伴う高いレベルのＴＲＡｂを有する患者血清である。
Ｂ３は５Ｃ９に対するリンパ球ドナーからの血清である
Ｓ１、Ｓ２、およびＳ４はアンタゴニスト（遮断）活性を伴う高いレベルのＴＲＡｂを有する患者血清である。
アッセイキャリブレーター４０Ｕ／Ｌ、８Ｕ／Ｌ、２Ｕ／Ｌ、および１Ｕ／Ｌ、は、Ｍ２２　ＩｇＧを健常人血液ドナー血清（ＨＢＤプール）で希釈し、ＮＩＢＳＣ９０／６７２のＵ／Ｌ活性を、標識したＴＳＨがＴＳＨＲでコートしたチューブへ結合することの阻害率を用いて測定したものである。
【数４】

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

ここで、Ａ＝テストサンプル；Ｂ＝ＨＢＤプール
ＮＴ＝テストしない
１／５、１／１０等はＨＢＤプールにおけるテスト血清の希釈率を示し、ニートは希釈無し、を示す。
ＨＢＤプールの存在下、^{125}Ｉで標識したＭ２２ＩｇＧ、５Ｃ９ＩｇＧ、ＴＳＨの、それぞれ約２０％、１７％、１２％がコートしたチューブへ結合した。
【０１３６】

【表５－１】

［表５］

^{125}Ｉ－標識ＴＳＨ、^{125}Ｉ－Ｍ２２ＩｇＧ、および^{125}Ｉ－５Ｃ９ＩｇＧのＴＳＨＲをコートしたチューブへの結合に対する、様々な濃度の抗ＴＳＨＲマウスＭＡｂによる阻害

テストサンプル		^{125}I-TSH 阻害率(%)	^{125}I-M22 IgG 阻害率(%)	^{125}I-5C9 IgG 阻害率(%)
5C9 IgG	100 μg/mL	50	53	65.5
5C9 IgG	10 μg/mL	30	22	42
5C9 IgG	1 μg/mL	21	14	27
5C9 IgG	0.1 μg/mL	8	6	10
5C9 IgG	0.01 μg/mL	2	5	0
7C71 IgG[1]	100 μg/mL	65	68	82
7C71 IgG	10 μg/mL	55	64	65
7C71 IgG	1 μg/mL	47	58	53
7C71 IgG	0.1 μg/mL	28	37	17
7C71 IgG	0.01 μg/mL	8	14	5
10C31 IgG[1]	100 μg/mL	68	69	76
10C31 IgG	10 μg/mL	56	71	62
10C31 IgG	1 μg/mL	52	62	54
10C31 IgG	0.1 μg/mL	39	48	36
10C31 IgG	0.01 μg/mL	15	24	8
2E71 IgG[1]	100 μg/mL	51	63	60
2E71 IgG	10 μg/mL	41	62	52

【表５－２】

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

【表５－３】

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

【表５－４】

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

【表５－５】

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

【表５－６】

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

抗体は健常人血液ドナー血清のプールで希釈した（ＨＢＤプール）。

【数５】

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

ここで、Ａ＝テストサンプル存在下での結合率（％）；Ｂ＝ＨＢＤプール存在下での結合率（％）

[1]甲状腺刺激活性を有するマウスＴＳＨＲ　ＭＡｂ

[2]ＴＳＨおよびＴＲＡｂ両方が仲介するサイクリックＡＭＰ生産の刺激を遮断するマウスＴＳＨＲ　ＭＡｂ

[3]甲状腺ペルオキシダーゼＭＡｂに対するヒトＭＡｂ（ネガティブコントロール）

[4]ＴＳＨ遮断活性を有するマウスＴＳＨＲ　ＭＡｂ（ＴＳＨＲアミノ酸３８１－３８５により形成されるエピトープを認識する）

[5]ＴＳＨ遮断活性を有するマウスＴＳＨＲ　ＭＡｂ（ＴＳＨＲアミノ酸３６－４２により形成されるエピトープを認識する）

[6]ＴＳＨ遮断活性を有するマウスＴＳＨＲ　ＭＡｂ（ＴＳＨＲアミノ酸２４６－２６０により形成されるエピトープを認識する）

[7]マウスＴｇＭＡｂ（ネガティブコントロール）

ＨＢＤプールの存在下、^{125}Ｉで標識したＭ２２ＩｇＧ、５Ｃ９ＩｇＧ、ＴＳＨの、それぞれ約１３％、２４％、１５％がコートしたチューブへ結合する。

【０１３７】

【表６ａ－１】

［表６ａ］

ヒトＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における患者血清中のＴＲＡｂによるサイクリックＡＭＰ産生刺激に対する、５Ｃ９ＩｇＧの効果

実験１ａ

テストサンプル	サイクリックAMP (fmol/cell well; 平均±SD、n=3)
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ	378 ±21
HBDプールのみ	352 ±38
HBDプール + 2G4 IgG	316 ±54
HBDプール + 5C9 IgG	136 ±46
T1 のみ	13734 ±580
T1 + 2G4 IgG	10928 ±740
T1 + 5C9 IgG	142 ±4
T2 のみ	1716 ±185
T2 + 2G4 IgG	1362 ±190
T2 + 5C9 IgG	146 ±4
T3 のみ	11722 ±1280
T3 + 2G4 IgG	11948 ±3200
T3 + 5C9 IgG	5660 ±790
T4 のみ	6388 ±820
T4 + 2G4 IgG	6022 ±710
T4 + 5C9 IgG	188 ±65

【表６ａ－２】

T5 のみ	3084 ±990
T5 + 2G4 IgG	2152 ±240
T5 + 5C9 IgG	152 ±15
T6 のみ	14802 ±1475
T6 + 2G4 IgG	10878 ±675
T6 + 5C9 IgG	232 ±25

【表６ａ－３】

実験１ｂ

テストサンプル	サイクリックAMP （fmol/cell well; 平均±SD、n＝3）
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ	434 ±52
HBDプールのみ	518 ±216
HBDプール + 2G4 IgG	378 ±34
HBDプール + 5C9 IgG	178 ±47
T7 のみ	7388 ±1250
T7 + 2G4 IgG	5696 ±715
T7 + 5C9 IgG	ud
T8 のみ	1736[1]
T8 + 2G4 IgG	1392[1]
T8 + 5C9 IgG	ud
T9 のみ	5052[1]
T9 + 2G4 IgG	5000[1]
T9 + 5C9 IgG	ud

【表６ａ－４】

実験１ｃ

サンプル	サイクリックAMP (fmol/cell well; 平均±SD、n＝3)
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ	366 ±316
HBDプールのみ	646 ±62
HBDプール+ 2G4 IgG	496 ±42
HBDプール + 5C9 IgG	294 ±92
T13 のみ	4030 ±1146
T13 + 2G4 IgG	3330 ±63
T13 + 5C9 IgG	540 ±36
T14 のみ	5490 ±197
T14 + 2G4 IgG	4470 ±1867
T14 + 5C9 IgG	510 ±146
T15 のみ	2130 ±387
T15 + 2G4 IgG	2380 ±320
T15 + 5C9 IgG	ud
T16 のみ	4990 ±155
T16 + 2G4 IgG	5270 ±941
T16 + 5C9 IgG	ud
T17 のみ	4410 ±470
T17 + 2G4 IgG	4460 ±288

【表６ａ－５】

T17 + 5C9 IgG	ud
T18 のみ	910 ±126
T18 + 2G4 IgG	830 ±21
T18 + 5C9 IgG	ud

【表６ａ－６】

実験１ｄ

サンプル	サイクリックAMP (fmol/cell well; 平均±SD、n＝3)
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ	487 ±75
HBDプールのみ	285 ±71
HBDプール+ 2G4 IgG	311 ±68
HBDプール+ 5C9 IgG	108 ±33
T11 のみ	4052 ±233
T11 + 2G4 IgG	4659 ±1260
T11 + 5C9 IgG	154 ±33
T12 のみ	4058 ±721
T12 + 2G4 IgG	5556 ±593
T12 + 5C9 IgG	145 ±24

ｕｄ＝検出されず

[1]＝二重測定

ＨＢＤプールは健常人血液ドナー血清のプールである；これらの実験では、１：１０に希釈したサイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液を使用した。

Ｔ１－Ｔ９およびＴ１１－Ｔ１８はＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞においてサイクリックＡＭＰ産生を刺激する血清である。Ｔ１－Ｔ９およびＴ１１－Ｔ１８はサイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液で１：１０に希釈しテストした。

２Ｇ４は甲状腺ペルオキシダーゼに対するヒトモノクローナル抗体である（ネガティブコントロール）。

２Ｇ４　ＩｇＧおよび５Ｃ９　ＩｇＧは１００μｇ/ｍＬでテストした。

【０１３８】

【表６ｂ－１】

［表６ｂ］

ヒトＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における患者血清中のＴＲＡｂによるサイクリックＡＭＰ産生刺激に対する、５Ｃ９ＩｇＧおよび９Ｄ３３ＩｇＧの量依存的効果

実験２

テストサンプル	サイクリックAMP (fmol/cell well; 平均±SD、n＝3)
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ	707 ±147
HBDプールのみ	503 ±80
T1 のみ	20336 ±1539
100 μg/mL 2G4 IgG (ネガティブコントロール)のみ	1207 ±123
T1 + 100 μg/mL 2G4 IgG	22078 ±2546
T1 + 10 μg/mL 2G4 IgG	18868 ±1806
T1 + 1 μg/mL 2G4 IgG	19025 ±1450
T1 + 0.1 μg/mL 2G4 IgG	16659 ±1031
T1 + 0.01 μg/mL 2G4 IgG	20876 ±1887
T1 + 0.001 μg/mL 2G4 IgG	18134 ±2126
100 μg/mL 9D33 IgG のみ	721 ±183
T1 + 100 μg/mL 9D33 IgG	1061 ±104
T1 + 10 μg/mL 9D33 IgG	1464 ±191
T1 + 1 μg/mL 9D33 IgG	4990 ±1670

【表６ｂ－２】

T1 + 0.1 μg/mL 9D33 IgG	17867 ±2220
T1 + 0.01 μg/mL 9D33 IgG	19943 ±1834
T1 + 0.001 μg/mL 9D33 IgG	21648 ±502
100 μg/mL 5C9 IgG only	301 ±38
T1 + 100 μg/mL 5C9 IgG	724 ±28
T1 + 10 μg/mL 5C9 IgG	1119 ±348
T1 + 1 μg/mL 5C9 IgG	2428 ±594
T1 + 0.1 μg/mL 5C9 IgG	16152 ±3577
T1 + 0.01 μg/mL 5C9 IgG	20314 ±279
T1 + 0.001 μg/mL 5C9 IgG	16868 ±912

Ｔ１は、ＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞におけるサイクリックＡＭＰ産生を刺激する、患者の血清サンプルである；これらの実験ではサイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液で１：１０に希釈したものを用いた。
２Ｇ４は甲状腺ペルオキシダーゼに対するヒトモノクローナル抗体である（ネガティブコントロール）。
９Ｄ３３は、ＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ＴＳＨおよびＴＲＡｂによるサイクリックＡＭＰ産生を遮断するマウス抗体である（表２を参照）。

【０１３９】

【表６ｃ－１】

［表６ｃ］

ヒトＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における患者血清ＴＲＡｂによるサイクリックＡＭＰ産生刺激に対する、５Ｃ９ＩｇＧの量依存的効果

実験３

テストサンプル	サイクリックAMP (fmol/cell well; 平均±SD、n＝3)
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ	757 ±138
HBDプールのみ	512 ±76
T6 のみ	14216 ±3985
100 μg/mL 9D33 IgG のみ	729 ±31
T6 + 100 μg/mL 9D33 IgG	1052 ±702
T6 + 10 μg/mL 9D33 IgG	2256 ±1088
T6 + 1 μg/mL 9D33 IgG	5447 ±313
T6 + 0.1 μg/mL 9D33 IgG	8700 ±665
T6 + 0.01 μg/mL 9D33 IgG	10290 ±495
T6 + 0.001 μg/mL 9D33 IgG	10296[1]
100 μg/mL 5C9 IgG のみ	360 ±38
T6 + 100 μg/mL 5C9 IgG	295 ±30
T6 + 10 μg/mL 5C9 IgG	1027 ±368
T6 + 1 μg/mL 5C9 IgG	2368 ±528
T6 + 0.1 μg/mL 5C9 IgG	9533 ±1679

【表６ｃ－２】

T6 + 0.01 μg/mL 5C9 IgG	13883 ±1718
T6 + 0.001 μg/mL 5C9 IgG	11843 ±1241

[1]一回の測定

説明注釈については表６ａおよび６ｂを参照
【０１４０】
【表６ｄ－１】
［表６ｄ］
ヒトＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における患者血清中のＴＲＡｂによるサイクリックＡＭＰ産生刺激に対する、５Ｃ９ＩｇＧの量依存的効果

サンプル	サイクリックAMP (fmol/cell well; 平均±SD、n＝3)
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ	622 ±79
HBDプールのみ	479 ±53
T3 のみ	14023 ±2487
100 μg/mL 2G4 IgG のみ	745 ±136
T3 + 100 μg/mL 2G4 IgG	12086 ±2613
T3 + 10 μg/mL 2G4 IgG	12862 ±250
T3 + 1 μg/mL 2G4 IgG	12931 ±891
T3 + 0.1 μg/mL 2G4 IgG	13853 ±1589
T3 + 0.01 μg/mL 2G4 IgG	11939 ±131
T3 + 0.001 μg/mL 2G4 IgG	13650 ±1679
100 μg/mL 9D33 IgG only	616 ±111
T3 + 100 μg/mL 9D33 IgG	1597 ±323
T3 + 10 μg/mL 9D33 IgG	4262 ±367
T3 + 1 μg/mL 9D33 IgG	7385 ±554
T3 + 0.1 μg/mL 9D33 IgG	11960 ±1390
T3 + 0.01 μg/mL 9D33 IgG	12178 ±1676

【表６ｄ－２】

T3 + 0.001 μg/mL 9D33 IgG	12159 ±2970
100 μg/mL 5C9 IgG のみ	212 ±40
T3 + 100 μg/mL 5C9 IgG	6136 ±558
T3 + 10 μg/mL 5C9 IgG	7806 ±793
T3 + 1 μg/mL 5C9 IgG	8075 ±610
T3 + 0.1 μg/mL 5C9 IgG	10414 ±1094
T3 + 0.01 μg/mL 5C9 IgG	13743 ±1687
T3 + 0.001 μg/mL 5C9 IgG	11641 ±2168

説明注釈については表６ａおよび６ｂを参照

【０１４１】

【表６ｅ－１】

［表６ｅ］

ヒトＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における患者血清中のＴＲＡｂによるサイクリックＡＭＰ産生刺激に対する、５Ｃ９ＩｇＧの量依存的効果

サンプル	サイクリックAMP (fmol/cell well; 平均±SD、n＝3)
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ	616 ±161
HBDプールのみ	312 ±56
T19 のみ	6014 ±280
100 μg/mL 2G4 IgG のみ	1058 ±75
T19 + 100 μg/mL 2G4 IgG	7142 ±215
T19 + 10 μg/mL 2G4 IgG	6182 ±46
T19 + 1 μg/mL 2G4 IgG	7280 ±1052
T19 + 0.1 μg/mL 2G4 IgG	7275 ±145
T19 + 0.01 μg/mL 2G4 IgG	6820 ±729
T19 + 0.001 μg/mL 2G4 IgG	7620 ±870
100 μg/mL 9D33 IgG のみ	592 ±168
T19 + 100 μg/mL 9D33 IgG	550 ±65
T19 + 10 μg/mL 9D33 IgG	448 ±76
T19 + 1 μg/mL 9D33 IgG	404 ±36
T19 + 0.1 μg/mL 9D33 IgG	2394[1]
T19 + 0.01 μg/mL 9D33 IgG	5765[1]

【表６ｅ－２】

T19 + 0.001 μg/mL 9D33 IgG	7088 ±668
100 μg/mL 5C9 IgG のみ	186[2]
T19 + 100 μg/mL 5C9 IgG	220 ±90
T19 + 10 μg/mL 5C9 IgG	275 ±150
T19 + 1 μg/mL 5C9 IgG	187 ±34
T19 + 0.1 μg/mL 5C9 IgG	375 ±129
T19 + 0.01 μg/mL 5C9 IgG	5747 ±411
T19 + 0.001 μg/mL 5C9 IgG	6467[1]

[1]二重サンプルの平均

[2]１回の測定

説明注釈については表６ａおよび６ｂを参照

【０１４２】

【表６ｆ－１】

［表６ｆ］

ヒトＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における患者血清中のＴＲＡｂによるサイクリックＡＭＰ産生刺激に対する、５Ｃ９ＩｇＧの量依存的効果

サンプル	サイクリックAMP (fmol/cell well; 平均±SD、n＝3)
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ	255 ±40
HBDプールのみ	200 ±82
T20 のみ	4764 ±732
100 μg/mL 2G4 IgG のみ	835 ±94
T20 + 100 μg/mL 2G4 IgG	6684 ±931
T20 + 10 μg/mL 2G4 IgG	4571 ±776
T20 + 1 μg/mL 2G4 IgG	5744 ±727
T20 + 0.1 μg/mL 2G4 IgG	4323 ±849
T20 + 0.01 μg/mL 2G4 IgG	6396 ±1314
T20 + 0.001 μg/mL 2G4 IgG	6789 ±893
100 μg/mL 9D33 IgGのみ	382 ±142
T20 + 100 μg/mL 9D33 IgG	287 ±164
T20 + 10 μg/mL 9D33 IgG	204 ±49
T20 + 1 μg/mL 9D33 IgG	980[1]
T20 + 0.1 μg/mL 9D33 IgG	5362 ±574
T20 + 0.01 μg/mL 9D33 IgG	5389 ±1139

【表６ｆ－２】

T20 + 0.001 μg/mL 9D33 IgG	7514 ±785
100 μg/mL 5C9 IgGのみ	224 ±109
T20 + 100 μg/mL 5C9 IgG	NT
T20 + 10 μg/mL 5C9 IgG	NT
T20 + 1 μg/mL 5C9 IgG	181[1]
T20 + 0.1 μg/mL 5C9 IgG	2184 ±1078
T20 + 0.01 μg/mL 5C9 IgG	6486 ±436
T20 + 0.001 μg/mL 5C9 IgG	4856[1]

[1]二重サンプルの平均
ＮＴ＝テストせず
説明注釈については表６ａおよび６ｂを参照
【０１４３】

【表６ｇ－１】

［表６ｇ］

ヒトＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における患者血清中のＴＲＡｂによるサイクリックＡＭＰ産生刺激に対する、５Ｃ９ＩｇＧの量依存的効果

サンプル	サイクリックAMP (fmol/cell well; 平均±SD、n＝3)
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ	466 ±65
HBDプールのみ	390 ±118
T21 のみ	9781 ±1672
100 μg/mL 2G4 IgG のみ	999 ±55
T21 + 100 μg/mL 2G4 IgG	10848 ±373
T21 + 10 μg/mL 2G4 IgG	10355 ±469
T21 + 1 μg/mL 2G4 IgG	10831 ±140
T21 + 0.1 μg/mL 2G4 IgG	12215 ±793
T21 + 0.01 μg/mL 2G4 IgG	13014 ±855
T21 + 0.001 μg/mL 2G4 IgG	10500 ±162
100 μg/mL 9D33 IgG のみ	534 ±89
T21 + 100 μg/mL 9D33 IgG	442 ±32
T21 + 10 μg/mL 9D33 IgG	605 ±254
T21 + 1 μg/mL 9D33 IgG	1383 ±66
T21 + 0.1 μg/mL 9D33 IgG	8719 ±389
T21 + 0.01 μg/mL 9D33 IgG	10772 ±799

【表６ｇ－２】

T21 ＋0.001 μg/mL 9D33 IgG	10229 ±714
100 μg/mL 5C9 IgG のみ	253 ±25
T21 ＋100 μg/mL 5C9 IgG	210 ±60
T21 ＋10 μg/mL 5C9 IgG	303 ±107
T21 ＋1 μg/mL 5C9 IgG	418 ±65
T21 ＋0.1 μg/mL 5C9 IgG	7483 ±415
T21 ＋0.01 μg/mL 5C9 IgG	10441 ±122
T21 ＋0.001 μg/mL 5C9 IgG	11281 ±911

説明注釈については表６ａおよび６ｂを参照

【０１４４】

【表７ａ】

［表7ａ］
野生型ＴＳＨＲおよびＬｙｓ５８をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、
ＴＳＨにより誘導されたサイクリックＡＭＰ産生。５Ｃ９ＩｇＧの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生 (fmol/細胞　ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝3)		変異／野生型 (%)
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	315 ±39	822 ±52	260
ＴＳＨのみ	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[1]	104
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　のみ	47 ±15	<25	–

[1]二重測定の平均値
ｐＴＳＨ濃度＝３ｎｇ／ｍＬ
全ての希釈液はサイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液
２Ｇ４は甲状腺ペルオキシダーゼに対するヒトモノクローナル抗体である（５Ｃ９に対するネガティブコントロール）
【０１４５】

【表７ｂ】

［表7ｂ］
野生型ＴＳＨＲおよびＩｌｅ６０をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、
ＴＳＨにより誘導されたサイクリックＡＭＰ産生。５Ｃ９ＩｇＧの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３）		変異／野生型（%）
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	470 ±92	837 ±78	114
ＴＳＨのみ	18654[1]	22935 ±2542	123
2G4 10 μg/mL + TSH	17555[1]	22960 ±4312	131
2G4 100 μg/mL + TSH	18654 ±3979	24488 ±4501	131
5C9 0.01 μg/mL + TSH	8018 ±276	18952 ±1811	236
5C9 0.1 μg/mL + TSH	7097 ±613	11609 ±1415	164
5C9 1.0 μg/mL + TSH	1568 ±133	3290 ±64	210
5C9 10 μg/mL + TSH	1772 ±632	1211 ±343	68
5C9 100 μg/mL + TSH	1733 ±132	3134 ±794	181
5C9 100 μg/mL のみ	61 ±8	260 ±43	426

説明注釈については表７ａを参照

【０１４６】

【表７ｃ】

［表7ｃ］
野生型ＴＳＨＲおよびＡｒｇ８０をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ＴＳＨにより誘導されたサイクリックＡＭＰ産生。５Ｃ９ＩｇＧの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３）		変異／野生型（%）
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	775 ±66	1165 ±32	150
ＴＳＨのみ	12467 ±510	12930 ±179	104
2G4 10 μg/mL + TSH	13600 ±1555	14849 ±462	109
2G4 100 μg/mL + TSH	11726 ±177	13539 ±314	115
5C9 0.01 μg/mL + TSH	14410 ±1331	14273 ±1845	99
5C9 0.1 μg/mL + TSH	11256 ±1627	9278 ±837	82
5C9 1.0 μg/mL + TSH	6704 ±791	1358 ±500	20
5C9 10 μg/mL + TSH	2107 ±264	1163 ±415	55
5C9 100 μg/mL + TSH	2234 ±540	518 ±133	23
5C9 100 μg/mL のみ	244 ±92	494 ±163	202

説明注釈については表７ａを参照
【０１４７】

【表７ｄ】

[表7ｄ]
野生型ＴＳＨＲおよびＡｒｇ８０をアスパラギン酸に変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ＴＳＨにより誘導されたサイクリックＡＭＰ産生。５Ｃ９ＩｇＧの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３）		変異／野生型（%）
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	548 ±67	637 ±96	116
ＴＳＨのみ	13598 ±3445	19400 ±1684	143
2G4 10 μg/mL + TSH	14795 ±2776	19430 ±1779	131
2G4 100 μg/mL + TSH	15500 ±897	16003 ±237	103
5C9 0.01 μg/mL + TSH	13082[1]	21021 ±2838	161
5C9 0.1 μg/mL + TSH	6326 ±358	4420 ±182	70
5C9 1.0 μg/mL + TSH	2635 ±326	1912 ±101	73
5C9 10 μg/mL + TSH	1906 ±146	1249 ±329	66
5C9 100 μg/mL + TSH	1613 ±176	1274 ±15	79
5C9 100 μg/ml のみ	300 ±45	523 ±3	174

説明注釈については表７ａを参照
【０１４８】

【表７ｅ】

［表7ｅ］
野生型ＴＳＨＲおよびＴｙｒ８２をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ＴＳＨにより誘導されたサイクリックＡＭＰ産生。５Ｃ９ＩｇＧの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３）		変異／野生型（%）
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	557 ±27	1219 ±49	219
ＴＳＨのみ	12674 ±234	15327 ±2041	121
2G4 10 μg/mL + TSH	13587 ±967	17585[1]	129
2G4 100 μg/mL + TSH	13518 ±894	15395 ±1777	113
5C9 0.01 μg/mL + TSH	13902 ±1970	15737 ±1442	113
5C9 0.1 μg/mL + TSH	6250 ±1143	12692 ±3138	203
5C9 1.0 μg/mL + TSH	1600 ±467	2955 ±732	185
5C9 10 μg/mL + TSH	822 ±99	1646 ±308	200
5C9 100 μg/mL + TSH	978 ±102	1028 ±216	105
5C9 100 μg/mL のみ	289 ±30	1427 ±419	494

説明注釈については表７ａを参照
【０１４９】

【表７ｆ】

［表７ｆ］

野生型ＴＳＨＲおよびＴｈｒ１０４をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ＴＳＨにより誘導されたサイクリックＡＭＰ産生。５Ｃ９ＩｇＧの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３）		変異／野生型（%）
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	590 ±59	640 ±95	108
ＴＳＨのみ	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 のみ	195 ±23	264 ±102	135

説明注釈については表７ａを参照

【０１５０】

【表７ｇ】

［表７ｇ］

野生型ＴＳＨＲおよびＡｒｇ１０９をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ＴＳＨにより誘導されたサイクリックＡＭＰ産生。５Ｃ９ＩｇＧの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３）		変異／野生型（%）
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	381 ±28	675 ±50	177
ＴＳＨのみ	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
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 のみ	228 ±45	335 ±14	147

説明注釈については表７ａを参照

【０１５１】

【表７ｈ】

[表7h]
野生型ＴＳＨＲおよびＬｙｓ１２９をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ＴＳＨにより誘導されたサイクリックＡＭＰ産生。５Ｃ９ＩｇＧの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３）		変異／野生型（%）
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	370 ±97	590 ±17	159
ＴＳＨのみ	15632 ±2362	15502 ±547	99
2G4 10 μg/mL + TSH	11344 ±3278	14787 ±986	130
2G4 100 μg/mL + TSH	12580 ±2397	14148 ±1033	112
5C9 0.01 μg/mL + TSH	10545 ±161	12161 ±1797	115
5C9 0.1 μg/mL + TSH	2714 ±154	13257 ±2414	488
5C9 1.0 μg/mL + TSH	1008 ±229	12837 ±1148	1274
5C9 10 μg/mL + TSH	548 ±26	11175[1]	2039
5C9 100 μg/mL + TSH	491 ±73	15929 ±1228	3244
5C9 100 μg/ml のみ	107 ±18	217 ±36	203

説明注釈については表７ａを参照
【０１５２】

【表７ｉ】

［表7ｉ］
野生型ＴＳＨＲおよびＰｈｅ１３４をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ＴＳＨにより誘導されたサイクリックＡＭＰ産生。５Ｃ９ＩｇＧの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝3）		変異／野生型（%）
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	347 ±88	867 ±129	250
ＴＳＨのみ	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
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 のみ	212 ±6	337 ±60	159

説明注釈については表７ａを参照
【０１５３】

【表７ｊ】

［表7ｊ］
野生型ＴＳＨＲおよびＡｓｐ１５１をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ＴＳＨにより誘導されたサイクリックＡＭＰ産生。５Ｃ９ＩｇＧの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝3）		変異／野生型（%）
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	508 ±341	1236 ±88	243
ＴＳＨのみ	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 μg/mL のみ	176 ±49	395 ±42	224

説明注釈については表７ａを参照
【０１５４】

【表７ｋ】

［表７ｋ］
野生型ＴＳＨＲおよびＡｓｐ１５１をアルギニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ＴＳＨにより誘導されたサイクリックＡＭＰ産生。
５Ｃ９ＩｇＧの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３）		変異／野生型（%）
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	703 ±107	768 ±82	109
ＴＳＨのみ	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
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	1609 ±69	132
5C9 100 μg/mL + TSH	1572 ±515	2330 ±273	148
5C9 100 μg/mL のみ	260 ±156	409 ±88	157

説明注釈については表７ａを参照

【０１５５】

【表７１】

［表７１］

野生型ＴＳＨＲおよびＡｓｐ１６０をリジンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、Ｍ２２により誘導されたサイクリックＡＭＰ産生。５Ｃ９ＩｇＧの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３）		変異／野生型（%）
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	787 ±119	1252 ±274	159
ＴＳＨのみ	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 のみ	429 ±49	458 ±8	107
M22 のみ(反復測定)	16702 ±2170	18892 ±2113	113

Ｍ２２濃度＝３ｎｇ／ｍＬ
説明注釈については表７ａを参照

【０１５６】

【表７ｍ】

［表７ｍ］
野生型ＴＳＨＲおよびＬｙｓ１８３をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ＴＳＨにより誘導されたサイクリックＡＭＰ産生。５Ｃ９ＩｇＧの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３）		変異／野生型（%）
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	642 ±34	1153 ±236	180
ＴＳＨのみ	22385 ±532	20210 ±1366	90
2G4 10 μg/mL + TSH	20148 ±2625	23254 ±3027	115
2G4 100 μg/mL + TSH	19926[1]	22442 ±2489	113
5C9 0.01 μg/mL + TSH	17974[1]	23284 ±2243	130
5C9 0.1 μg/mL + TSH	11499 ±892	24289 ±720	211
5C9 1.0 μg/mL + TSH	3489 ±606	14586 ±155	418
5C9 10 μg/mL + TSH	1234 ±357	7568 ±605	618
5C9 100 μg/mL + TSH	1456 ±838	11448 ±933	786
5C9 100 μg/mL のみ	384 ±19	747 ±230	195

説明注釈については表７ａを参照。

【０１５７】

【表７ｎ】

［表７ｎ］
野生型ＴＳＨＲおよびＬｙｓ１８３をアスパラギン酸に変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ＴＳＨにより誘導されたサイクリックＡＭＰ産生。
５Ｃ９ＩｇＧの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３）		変異／野生型（%）
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	486 ±151	737 ±54	152
ＴＳＨのみ	14730 ±1647	17668 ±597	120
2G4 10 μg/mL + TSH	14234 ±1097	17133 ±2281	120
2G4 100 μg/mL + TSH	14737 ±1905	16071 ±1188	109
5C9 0.01 μg/mL + TSH	12911 ±2357	20614 ±2552	160
5C9 0.1 μg/mL + TSH	8577 ±615	17344 ±2898	202
5C9 1.0 μg/mL + TSH	3424 ±135	12655 ±835	370
5C9 10 μg/mL + TSH	1114 ±112	6587 ±1480	591
5C9 100 μg/mL + TSH	1720 ±119	9007 ±1295	524
5C9 100 μg/mL のみ	<12.5	54 ±8	–

説明注釈については表７ａを参照。

【０１５８】

【表７ｏ】

［表７ｏ］
野生型ＴＳＨＲおよびＧｌｎ２３５をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ＴＳＨにより誘導されたサイクリックＡＭＰ産生。
５Ｃ９ＩｇＧの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３）		変異／野生型（%）
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	478 ±94	713 ±52	149
ＴＳＨのみ	14882 ±944	15844 ±922	106
2G4 10 μg/mL + TSH	17754 ±3150	18900 ±3098	106
2G4 100 μg/mL + TSH	12991[1]	18598 ±2708	143
5C9 0.01 μg/mL + TSH	7181 ±618	17535 ±3692	244
5C9 0.1 μg/mL + TSH	7784 ±1111	7437 ±1183	96
5C9 1.0 μg/mL + TSH	2545 ±471	2416 ±423	95
5C9 10 μg/mL + TSH	532 ±65	1023 ±400	192
5C9 100 μg/mL + TSH	747 ±114	727 ±168	97
5C9 100 μg/mL のみ	119 ±28	256 ±86	215

説明注釈については表７ａを参照。

【０１５９】

【表７ｐ】

［表７ｐ］

野生型ＴＳＨＲおよびＡｒｇ２５５をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ＴＳＨにより誘導されたサイクリックＡＭＰ産生。５Ｃ９ＩｇＧの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３）		変異／野生型（%）
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	538 ±12	797 ±113	148
ＴＳＨのみ	14362 ±3305	15243 ±2093	106
2G4 10 μg/mL + TSH	14444 ±3161	19042 ±1085	132
2G4 100 μg/mL + TSH	16810 ±3461	17710 ±4886	105
5C9 0.01 μg/mL + TSH	6624 ±1236	8124 ±395	123
5C9 0.1 μg/mL + TSH	3788 ±838	4137 ±537	109
5C9 1.0 μg/mL + TSH	966 ±150	1941 ±113	201
5C9 10 μg/mL + TSH	867 ±100	692 ±152	80
5C9 100 μg/mL + TSH	1013 ±247	809 ±248	80
5C9 100 μg/mL のみ	32[1]	248 ±94	775

説明注釈については表７ａを参照。

【０１６０】

【表７ｑ】

［表７ｑ］
野生型ＴＳＨＲおよびＡｒｇ２５５をアスパラギン酸に変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ＴＳＨにより誘導されたサイクリックＡＭＰ産生。
５Ｃ９ＩｇＧの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３）		変異／野生型（%）
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	620 ±33	616[1]	99
ＴＳＨのみ	17531 ±1730	18081 ±2439	103
2G4 10 μg/mL + TSH	19870 ±2766	15519 ±702	78
2G4 100 μg/mL + TSH	18265 ±1999	19638 ±1505	108
5C9 0.01 μg/mL + TSH	17518 ±2407	15654 ±148	89
5C9 0.1 μg/mL + TSH	6604 ±1552	5583 ±655	85
5C9 1.0 μg/mL + TSH	3375 ±227	1932 ±677	57
5C9 10 μg/mL + TSH	1244 ±565	735 ±9	59
5C9 100 μg/mL + TSH	1506 ±151	1414 ±568	94
5C9 100 μg/mL のみ	278 ±125	559 ±97	201

説明注釈については表７ａを参照。
【０１６１】

【表７ｒ】

［表７ｒ］
野生型ＴＳＨＲおよびＴｒｐ２５８をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ＴＳＨにより誘導されたサイクリックＡＭＰ産生。
５Ｃ９ＩｇＧの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３）		変異／野生型（%）
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	354 ±28	382 ±55	108
ＴＳＨのみ	21023 ±2104	7095 ±1086	33
2G4 10 μg/mL + TSH	19564 ±1076	7070 ±148	36
2G4 100 μg/mL + TSH	21591 ±2652	6066 ±336	28
5C9 0.01 μg/mL + TSH	19471 ±1456	6619 ±511	34
5C9 0.1 μg/mL + TSH	10455 ±1968	1944 ±168	19
5C9 1.0 μg/mL + TSH	2616 ±118	1127 ±24	43
5C9 10 μg/mL + TSH	1192 ±253	357 ±11	30
5C9 100 μg/mL + TSH	1316 ±283	484 ±247	37
5C9 100 μg/mL のみ	211 ±35	423 ±109	200

説明注釈については表７ａを参照。
【０１６２】

【表７ｓ】

［表７ｓ］
野生型ＴＳＨＲおよびＳｅｒ２８１をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ＴＳＨにより誘導されたサイクリックＡＭＰ産生。５Ｃ９ＩｇＧの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３）		変異／野生型（%）
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	496 ±72	1094 ±132	221
ＴＳＨのみ	13562 ±3416	26450[1]	195
2G4 10 μg/mL + TSH	16805 ±1139	25086 ±1730	149
2G4 100 μg/mL + TSH	14334 ±860	27672 ±3549	193
5C9 0.01 μg/mL + TSH	13791 ±3221	28966 ±3443	210
5C9 0.1 μg/mL + TSH	9071 ±1696	15560 ±5836	172
5C9 1.0 μg/mL + TSH	3732 ±514	3550 ±725	95
5C9 10 μg/mL + TSH	802 ±215	1551 ±545	193
5C9 100 μg/mL + TSH	1078 ±158	1601 ±720	149
5C9 100 μg onl のみ	201 ±41	785 ±188	391

説明注釈については表７ａを参照。

【０１６３】

【表８】

[表8]

ＴＳＨ－ビオチン結合または５Ｃ９ＩｇＧ－ビオチン結合の阻害に基づくＥＬＩＳＡにより得られた、血清ＴＲＡｂアッセイ結果の比較

	ＴＳＨ-ビオチン定量アッセイ			５Ｃ９　ＩｇＧ-ビオチンアッセイ		
テストサンプル	吸光度 450nm	阻害率%	濃度 （U／L）	吸光度 450nm	阻害率%	濃度 (U/L)
アッセイ ネガティブ コントロール	2.143	0	0	2.421	0	0
アッセイ キャリブレーター						
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
アッセイ ポジティブ コントロール	1.273	41	3.22	1.344	44	3.28
患者血清						
A	2.122	1	0.14	2.209	9	0.44
B	1.081	50	4.24	1.029	58	4.54
C	0.225	90	26.03	0.173	93	18.4
D	2.069	3	0.24	2.27	6	0.31
E	1.789	16	1.12	2.189	10	0.49
F	1.454	32	2.43	1.791	26	1.85
G	1.053	51	4.41	1.123	54	4.12
H	1.242	42	3.37	1.309	46	3.4
I	0.208	90	28.01	0.174	93	18.32
健常人ドナー 血清						
4276	2.182	-2	0	2.451	-1	0
4280	2.292	-7	0	2.621	-8	0
4281	2.138	0	0	2.529	-4	0
4282	2.204	-3	0	2.6	-7	0
4284	2.306	-8	0	2.613	-8	0
4285	2.328	-9	0	2.756	-14	0
4286	2.34	-9	0	2.691	-11	0
4289	2.381	-11	0	2.628	-9	0

アッセイキャリブレーター４０Ｕ／Ｌ、８Ｕ／Ｌ、２Ｕ／Ｌ、および１Ｕ／ＬはＭ２２ＩｇＧを健常人血液ドナー血清（ＨＢＤプール）で希釈したものであり、ＮＩＢＳＣ　９０／６７２のＵ／Ｌ活性により、標識されたＴＳＨのＴＳＨＲをコートしたチューブへの

結合の阻害を測定した。アッセイのネガティブコントロールはＨＢＤプールである。

【０１６４】

【表９】

［表9］

甲状腺刺激性マウスMAｂ（ｍＴＳＭＡｂ）によるＴＳＨＲ刺激における５Ｃ９ＩｇＧの効果

	ＴＳＭＡｂおよび以下のものを添加した後に、野生型ＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞中でのサイクリックＡＭＰ濃度（pmol/mL平均±ＳＤ、ｎ＝３）		
テストサンプル[a]	緩衝液のみ	5C9 IgG 100 μg/mL	2G4 IgG[b] 100 μg/mL
TSMAb 1 1 μg/mL	18.94 ± 7.4	1.24 ± 0.07	16.5 ± 1.1
TSMAb 2 1 μg/mL	9.71 ± 0.96	2.26 ± 0.05	8.96 ± 1.28
TSMAb 4 10 ng/mL	34.5 ± 2.04	2.20 ± 0.20	33.1 ± 1.25
TSMAb 5 100 ng/mL	27.26 ± 2.14	0.85 ± 0.01	22.5 ± 2.4
TSMAb 7 100 ng/mL	9.90 ± 1.52	1.26 ± 0.59	9.07 ± 0.65
緩衝液のみ	3.39 ± 1.35	1.56 ± 1.84	4.32 ± 0.95

[a]サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液による希釈液

[b]２Ｇ４はヒト甲状腺ペルオキシダーゼモノクローナル自己抗体コントロールである。

【０１６５】

【表１０－１】

［表１０］
様々なＴＳＨ製剤によるＴＳＨＲ刺激における５Ｃ９ＩｇＧの効果
実験１

サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液で希釈したテストサンプル	野生型ＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞中でのサイクリックＡＭＰ濃度（pmol/mL平均±ＳＤ、ｎ＝３）
緩衝液のみ	0.37 ± 0.15
天然ヒト TSH 100 ng/mLのみ	36.14 ± 1.83
天然ヒト TSH 100 ng/mLおよび 0.001 μg/mL 5C9 IgG.	36.0 ± 6.1
天然ヒト TSH 100 ng/mL および 0.01 μg/mL 5C9 IgG	18.0 ± 5.4
天然ヒト TSH 100 ng/mL および 0.1 μg/mL 5C9 IgG	0.20 ± 0.06
天然ヒト TSH 100 ng/mLおよび 1.0 μg/mL 5C9 IgG	0.14 ± 0.02
天然ヒト TSH 100 ng/mL および 10 μg/mL 5C9 IgG	0.11 ± 0.04
天然ヒト TSH 100 ng/mLおよび 100 μg/mL 5C9 IgG	0.16 ± 0.03
リコンビナントヒトTSH 100 ng/mL のみ	12.73 ± 4.0
リコンビナントヒトTSH 100 ng/mLおよび 0.001 μg/mL 5C9 IgG.	13.63 ± 1.7
リコンビナントヒトTSH 100 ng/mLおよび 0.01 μg/mL 5C9 IgG	8.13 ± 2.13
リコンビナントヒトTSH 100 ng/mLおよび 0.1 μg/mL 5C9 IgG	0.12 ± 0.06
リコンビナントヒトTSH 100 ng/mLおよび 1.0 μg/mL 5C9 IgG	0.10 ± 0.03
リコンビナントヒトTSH 100 ng/mLおよび 10 μg/mL 5C9 IgG	0.12 ± 0.05
リコンビナントヒトTSH 100 ng/mLおよび 100 μg/mL 5C9 IgG	0.19 ± 0.08

【表１０－２】

実験２

サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液で希釈したテストサンプル	野生型ＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞中でのサイクリックＡＭＰ濃度（pmol/mL平均±ＳＤ、ｎ＝３）
緩衝液のみ	0.18 ± 0.08
天然ヒト TSH 100 ng/mLのみ	40.8 ± 6.92
天然ヒト TSH 100 ng/mLおよび 0.001 μg/mL 5C9 IgG.	37.6 ± 6.35
天然ヒト TSH 100 ng/mLおよび 0.01 μg/mL 5C9 IgG	34.4 ± 2.28
天然ヒト TSH 100 ng/mL および 0.1 μg/mL 5C9 IgG	15.8 ± 1.39
天然ヒト TSH 100 ng/mLおよび 1.0 μg/mL 5C9 IgG	0.13 ± 0.03
天然ヒト TSH 100 ng/mLおよび 10 μg/mL 5C9 IgG	0.18 ± 0.05
天然ヒト TSH 100 ng/mLおよび 100 μg/mL 5C9 IgG	0.21 ± 0.10
リコンビナントヒト TSH 100 ng/mL のみ	16.72 ± 2.90
リコンビナントヒト TSH 100 ng/mlおよび 0.001 μg/mL 5C9 IgG.	20.0 ± 1.73
リコンビナントヒト TSH 100 ng/mLおよび 0.01 μg/mL 5C9 IgG	20.6 ± 1.57
リコンビナントヒト TSH 100 ng/mlおよび 0.1 μg/mL 5C9 IgG	7.39 ± 1.74
リコンビナントヒト TSH 100 ng/mlおよび 1.0 μg/mL 5C9 IgG	0.07 ± 0.01
リコンビナントヒト TSH 100 ng/mlおよび 10 μg/mL 5C9 IgG	0.07 ± 0.01
リコンビナントヒト TSH 100 ng/mlおよび 100 μg/mL 5C9 IgG	0.11 ± 0.03

【表１０－３】

天然ブタ　TSH 0.3 ng/mL のみ	40.2 ± 4.0
天然ブタ　TSH 0.3 ng/mL および 0.001 μg/mL 5C9 IgG.	32.7 ± 4.0
天然ブタ　TSH 0.3 ng/mL および 0.01 μg/mL 5C9 IgG	28.2 ± 2.04
天然ブタ　TSH 0.3 ng/mL および 0.1 μg/mL 5C9 IgG	18.0 ± 1.36
天然ブタTSH 0.3 ng/mL および 1.0 μg/mL 5C9 IgG	2.14 ± 0.85
天然ブタTSH 0.3 ng/mL および 10 μg/mL 5C9 IgG	0.20 ± 0.14
天然ブタTSH 0.3 ng/mL および 100 μg/mL 5C9 IgG	0.18 ± 0.13

【表１０－４】

実験３

サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液で希釈したテストサンプル	野生型ＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞中でのサイクリックＡＭＰ濃度（pmol/mL平均±ＳＤ、ｎ＝３）
緩衝液のみ	2.0 ± 0.8
天然ヒト TSH 100 ng/mLのみ	31.1 ± 2.55
天然ヒト TSH 100 ng/mLおよび 0.001 μg/mL 5C9 IgG.	36.0 ± 3.27
天然ヒト TSH 100 ng/mLおよび 0.01 μg/mL 5C9 IgG	28.4 ± 3.55
天然ヒト TSH 100 ng/mL および 0.1 μg/mL 5C9 IgG	7.22 ± 3.20
天然ヒト TSH 100 ng/mLおよび 1.0 μg/mL 5C9 IgG	0.67 ± 0.46
天然ヒト TSH 100 ng/mLおよび 10 μg/mL 5C9 IgG	0.8 ± 0.45
天然ヒト TSH 100 ng/mLおよび 100 μg/mL 5C9 IgG	1.35 ± 1.0
リコンビナントヒト TSH 100 ng/mL のみ	26.4 ± 3.53
リコンビナントヒト TSH 100 ng/mlおよび 0.001 μg/mL 5C9 IgG.	25.6 ± 2.45
リコンビナントヒト TSH 100 ng/mLおよび 0.01 μg/mL 5C9 IgG	22.9 ± 7.4
リコンビナントヒト TSH 100 ng/mlおよび 0.1 μg/mL 5C9 IgG	1.18 ± 0.49
リコンビナントヒト TSH 100 ng/mlおよび 1.0 μg/mL 5C9 IgG	0.81 ± 0.05
リコンビナントヒト TSH 100 ng/mlおよび 10 μg/mL 5C9 IgG	0.74 ± 0.42
リコンビナントヒト TSH 100 ng/mlおよび 100 μg/mL 5C9 IgG	0.88 ± 0.55

【表１０－５】

天然ブタ　TSH 0.3 ng/mL のみ	35.7 ± 4.82
天然ブタ　TSH 0.3 ng/mL および 0.001 μg/mL 5C9 IgG.	38.2 ± 2.54
天然ブタ　TSH 0.3 ng/mL および 0.01 μg/mL 5C9 IgG	26.6 ± 3.22
天然ブタ　TSH 0.3 ng/mL および 0.1 μg/mL 5C9 IgG	10.1 ± 1.79
天然ブタTSH 0.3 ng/mL および 1.0 μg/mL 5C9 IgG	2.28 ± 0.71
天然ブタTSH 0.3 ng/mL および 10 μg/mL 5C9 IgG	0.68 ± 0.21
天然ブタTSH 0.3 ng/mL および 100 μg/mL 5C9 IgG	1.03 ± 0.63

【０１６６】

【表１１ａ】

［表１１ａ］
活性化変異のＳ２８１Ｉを有するＴＳＨＲの恒常的活性における５Ｃ９ＩｇＧおよび９Ｄ３３ＩｇＧの効果

サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液で希釈したテストサンプル	ＴＳＨＲ S281Iを発現するＣＨＯ細胞中でのサイクリックＡＭＰ濃度（pmol/mL平均±ＳＤ、ｎ＝３）
緩衝液のみ	9.90 ± 1.51
0.001 μg/mL 2G4 IgG[a]	6.83 ± 0.37
0.01 μg/mL 2G4 IgG	7.74 ± 0.78
0.1 μg/mL 2G4 IgG	8.58 ± 1.12
1 μg/mL 2G4 IgG	8.37 ± 1.10
0.001 μg/mL 5C9 IgG	4.31 ± 0.16
0.01 μg/mL 5C9 IgG	4.17 ± 0.60
0.1 μg/mL 5C9 IgG	3.20 ± 0.63
1 μg/mL 5C9 IgG	3.44 ± 0.63
0.001 μg/mL 9D33 IgG	5.97 ± 0.94
0.01 μg/mL 9D33 IgG	9.27 ± 1.4
0.1 μg/mL 9D33 IgG	8.13 ± 0.72
1 μg/mL 9D33 IgG	7.33 ± 1.17

[a]２Ｇ４はヒト甲状腺ペルオキシダーゼモノクローナル抗体コントロールである。

【０１６７】

【表１１ｂ】

［表１１ｂ］

活性化変異のＩ５６８Ｔを有するＴＳＨＲの恒常的活性における５Ｃ９ＩｇＧおよび９Ｄ３３ＩｇＧの効果

サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液で希釈したテストサンプル	ＴＳＨＲ I568Tを発現するＣＨＯ細胞中でのサイクリックＡＭＰ濃度（pmol/mL平均±ＳＤ、ｎ＝３）
緩衝液のみ	21.39 ± 5.31
0.001 μg/mL 2G4 IgG	19.13 ± 2.77
0.01 μg/mL 2G4 IgG	16.67 ± 1.87
0.1 μg/mL 2G4 IgG	19.92 ± 0.91
1 μg/mL 2G4 IgG	20.52 ± 0.95
0.001 μg/mL 5C9 IgG	18.81 ± 1.39
0.01 μg/mL 5C9 IgG	9.24 ± 0.83
0.1 μg/mL 5C9 IgG	6.02 ± 1.93
1 μg/mL 5C9 IgG	5.29 ± 0.75
0.001 μg/mL 9D33 IgG	16.58 ± 0.00
0.01 μg/mL RSR-B2 IgG	17.03 ± 2.36
0.1 μg/mL RSR-B2 IgG	19.96 ± 1.66
1 μg/mL RSR-B2 IgG	21.65 ± 1.99

【０１６８】

【表１１ｃ】

［表１１ｃ］

活性化変異のＡ６２３Ｉを有するＴＳＨＲの恒常的活性における５Ｃ９ＩｇＧおよび９Ｄ３３ＩｇＧの効果

サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液で希釈したテストサンプル	ＴＳＨＲ A623Iを発現するＣＨＯ細胞中でのサイクリックＡＭＰ濃度（pmol/mL平均±ＳＤ、ｎ＝３）
緩衝液のみ	36.89[a]
0.001 μg/mL 2G4 IgG	28.46 ± 2.31
0.01 μg/mL 2G4 IgG	33.44 ± 1.12
0.1 μg/mL 2G4 IgG	30.40 ± 7.93
1 μg/mL 2G4 IgG	28.96 ± 2.29
0.001 μg/mL 5C9 IgG	26.52 ± 1.33
0.01 μg/mL 5C9 IgG	27.03 ± 2.13
0.1 μg/mL 5C9 IgG	19.79 ± 0.48
1 μg/mL 5C9 IgG	16.43 ± 1.27
0.001 μg/mL 9D33 IgG	29.55 ± 3.15
0.01 μg/mL 9D33 IgG	27.64 ± 3.49
0.1 μg/mL 9D33 IgG	31.78 ± 9.18
1 μg/mL 9D33 IgG	40.09 ± 7.73

[a] ２回の測定

【０１６９】

【表１２－１】

［表１２］

野生型ＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、サイクリックＡＭＰ産生のｐＴＳＨ刺激の遮断に対する５Ｃ９プラス９Ｄ３３の効果

実験１

サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液中のテストサンプル	サイクリックＡＭＰ濃度（pmol/mL平均±ＳＤ、ｎ＝３）
緩衝液のみ	1.9 ± 1.0
TSH 3 ng/mL	48.5 ± 14
10 μg/mL 9D33	2.9 ± 1.0
10 μg/mL 5C9	0.45 ± 0.31
10 μg/mL 9D33 + 10 μg/mL 5C9	1.12 ± 0.4
10 μg/mL 9D33 + TSH	23.8 ± 8.7
10 μg/mL 5C9 + TSH	3.7 ± 2.7
10 μg/mL 9D33 + 10 μg/mL 5C9 + TSH	4.9 (n = 2)
1 μg/mL 9D33 + TSH	28.7 ± 1.8
1 μg/mL 5C9 + TSH	13.9 ± 3.1
1 μg/mL 9D33 + 1 μg/mL 5C9 + TSH	12.6 ± 2.5

【表１２－２】

実験２

サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液中のテストサンプル	サイクリックＡＭＰ濃度（pmol/mL平均±ＳＤ、ｎ＝３）
緩衝液のみ	0.72 ± 0.63
TSH 3 ng/mL	34.3 ± 3.1
10 μg/mL 9D33	1.6 ± 1.3
10 μg/mL 5C9	0.4 ± 0.4
10 μg/mL 9D33 + 10 μg/mL 5C9	0.03 (n = 1)
10 μg/mL 9D33 + TSH	9.5 ± 1.7
10 μg/mL 5C9 + TSH	3.1 ± 1.0
10 μg/mL 9D33 + 10 μg/mL 5C9 + TSH	3.3 ± 2.0
1 μg/mL 9D33 + TSH	19.0 ± 3.2
1 μg/mL 5C9 + TSH	6.1 ± 0.6
1 μg/mL 9D33 + 1 μg/mL 5C9 + TSH	5.9 ± 0.6

【表１２－３】

実験３

サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液中のテストサンプル	サイクリックＡＭＰ濃度（pmol/mL平均±ＳＤ、ｎ＝３）
緩衝液のみ	0.99 ± 0.03
TSH 3 ng/mL	51.3 ± 5.0
100 μg/mL 9D33	1.14 ± 0.13
100 μg/mL 5C9	0.50 ± 0.04
100 μg/mL 9D33 + 100 μg/mL 5C9	0.66 ± 0.9
100 μg/mL 9D33 + TSH	10.53 ± 0.84
100 μg/mL 5C9 + TSH	1.4 ± 0.18
100 μg/mL 9D33 + 100 μg/mL 5C9 + TSH	1.3 ± 0.36
10 μg/mL 9D33 + TSH	13.5 ± 2.9
10 μg/mL 5C9 + TSH	1.9 ± 1.1
10 μg/mL 9D33 + 10 μg/mL 5C9 + TSH	1.2 ± 0.1
1 μg/mL 9D33 + TSH	27.8 ± 2.2
1 μg/mL 5C9 + TSH	5.4 ± 1.8
1 μg/mL 9D33 + 1 μg/mL 5C9+ TSH	5.2 ± 0.3
0.1 μg/mL 9D33 + TSH	35.1 ± 2.3
0.1 μg/mL 5C9 + TSH	18.7 ± 3.4
0.1 μg/mL 9D33 + 0.1 μg/mL 5C9 + TSH	14.4 ± 1.0
0.01 μg/mL 9D33 + TSH	47.1 ± 1.9
0.01 μg/mL 5C9 + TSH	33.9 ± 7.8
0.01 μg/mL 9D33 + 0.01 μg/mL 5C9 + TSH	27.8 ± 1.3

【表１２－４】

実験４

サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液中のテストサンプル	サイクリックＡＭＰ濃度（pmol/mL平均±ＳＤ、ｎ＝３）
緩衝液のみ	1.4 ± 0.5
TSH 0.3 ng/mL	46.6 ± 12.9
100 μg/mL 9D33	0.99 ± 0.62
100 μg/mL 5C9	0.15 ± 0.12
100 μg/mL 9D33 + 100 μg/mL 5C9	0.41 ± 0.40
100 μg/mL 9D33 + TSH	3.53 ± 1.1
100 μg/mL 5C9 + TSH	0.29 ± 0.15
100 μg/mL 9D33 + 100 μg/mL 5C9 + TSH	0.63 ± 0.38
10 μg/mL 9D33 + TSH	4.23 ± 0.81
10 μg/mL 5C9 + TSH	0.23 ± 0.08
10 μg/mL 9D33 + 10 μg/mL 5C9 + TSH	0.52 ± 0.15
1 μg/mL 9D33 + TSH	9.01 ± 0.67
1 μg/mL 5C9 + TSH	1.65 ± 0.47
1 μg/mL 9D33 + 1 μg/mL 5C9 + TSH	1.21 ± 0.67
0.1 μg/mL 9D33 + TSH	20.2 ± 2.2
0.1 μg/mL 5C9 + TSH	6.2 ± 1.8
0.1 μg/mL 9D33 + 0.1 μg/mL 5C9 + TSH	7.6 ± 1.3

【表１２－５】

実験５

サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液中のテストサンプル	サイクリックＡＭＰ濃度（pmol/mL平均±ＳＤ、ｎ＝３）
緩衝液のみ	1.83± 0.64
TSH 0.3 ng/mL	17.26 ± 1.5
10 μg/mL 9D33	2.07 ± 0.52
10 μg/mL 5C9	0.38 ± 0.2
10 μg/mL 9D33 + 10 μg/mL 5C9	0.96 ± 0.14
10 μg/mL 9D33 + TSH	3.57 ± 0.58
10 μg/mL 5C9 + TSH	1.17 ± 0.00
10 μg/mL 9D33 + 10 μg/mL 5C9 + TSH	1.58 ± 0.20
5 μg/mL 9D33 + TSH	3.71 ± 0.10
5 μg/mL 5C9 + TSH	1.21 ± 0.36
1 μg/mL 9D33 + TSH	6.38 ± 1.35
1 μg/mL 5C9 + TSH	2.57 ± 0.65
1 μg/mL 9D33 + 1 μg/mL 5C9 + TSH	1.46 ± 0.59
0.1 μg/mL 9D33 + TSH	14.67 ± 4.69
0.1 μg/mL 5C9 + TSH	12.43 ± 1.59
0.1 μg/mL 9D33 + 0.1 μg/mL 5C9 + TSH	9.99 ± 3.78

【０１７０】

【表１３－１】

［表１３］

野生型ＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、サイクリックＡＭＰ産生のＭ２２Ｆａｂを介する刺激の遮断に対する５Ｃ９プラス９Ｄ３３の効果

実験１

サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液中のテストサンプル	サイクリックＡＭＰ濃度（pmol/mL平均±ＳＤ、ｎ＝３）
緩衝液のみ	1.45 ± 0.46
M22 3 ng/mL	49.1 ± 9.8
100 μg/mL 9D33	1.51 ± 0.22
100 μg/mL 5C9	0.35 ± 0.30
100 μg/mL 9D33 + 100 μg/mL 5C9	1.57 ± 0.13
100 μg/mL 9D33 + M22	2.13 ± 0.74
100 μg/mL 5C9 + M22	0.35 ± 0.08
100 μg/mL 9D33 + 100 μg/mL 5C9 + M22	0.70 ± 0.40
10 μg/mL 9D33 + M22	2.5 ± 0.8
10 μg/mL 5C9 + M22	0.36 ± 0.25
10 μg/mL 9D33 + 10 μg/mL 5C9 + M22	0.52 ± 0.12
1 μg/mL 9D33 + M22	5.25 ± 0.55
1 μg/mL 5C9 + M22	0.93 ± 0.07
1 μg/mL 9D33 + 1 μg/mL 5C9 + M22	0.69 ± 0.13
0.1 μg/mL 9D33 + M22	27.6 ± 2.5
0.1 μg/mL 5C9 + M22	6.0 ± 2.6
0.1 μg/mL 9D33 + 0.1 μg/mL 5C9 + M22	13.7 ± 7.5
0.01 μg/mL 9D33 + M22	47.5 ± 4.5
0.01 μg/mL 5C9 + M22	48.1 ± 5.4
0.01 μg/mL 9D33 + 0.01 μg/mL 5C9 + M22	47.5 ± 4.5

【表１３－２】

実験２

サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液中のテストサンプル	サイクリックＡＭＰ濃度（pmol/mL平均±ＳＤ、ｎ＝３）
緩衝液のみ	1.69 ± 0.47
M22 3 ng/mL	68.3 ± 6.3
100 μg/mL 9D33	1.76 ± 0.43
100 μg/mL 5C9	0.69 ± 0.18
100 μg/mL 9D33 + 100 μg/mL 5C9	1.16 ± 0.35
100 μg/mL 9D33 + M22	1.42 ± 1.20
100 μg/mL 5C9 + M22	測定不可
100 μg/mL 9D33 + 100 μg/mL 5C9 + M22	0.14 (n=2)
10 μg/mL 9D33 + M22	0.67 (n=2)
10 μg/mL 5C9 + M22	0.14 (n=1)
10 μg/mL 9D33 + 10 μg/mL 5C9 + M22	2.41 (n=1)
1 μg/mL 9D33 + M22	6.03 ± 1.15
1 μg/mL 5C9 + M22	2.54 (n=1)
1 μg/mL 9D33 + 1 μg/mL 5C9 + M22	1.51 (n=1)
0.1 μg/mL 9D33 + M22	38.7 ± 8.1
0.1 μg/mL 5C9 + M22	4.17 ± 1.7
0.1 μg/mL 9D33 + 0.1 μg/mL 5C9 + M22	5.17 ± 2.85
0.01 μg/mL 9D33 + M22	60.2 ± 8.0
0.01 μg/mL 5C9 + M22	57.3 ± 13.7
0.01 μg/mL 9D33 + 0.01 μg/mL 5C9 + M22	40.4 ± 5.3
0.001 μg/mL 9D33 + M22	79.1 ± 26.3
0.001 μg/mL 5C9 + M22	63.3 ± 19.0
0.001 μg/mL 9D33 + 0.001 μg/mL 5C9 + M22	40.2 ± 8.7

【表１３－３】

実験３

サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液中のテストサンプル	サイクリックＡＭＰ濃度（pmol/mL平均±ＳＤ、ｎ＝３）
緩衝液のみ	0.86 ± 0.12
M22 0.3 ng/mL	21.8 ± 3.23
100 μg/mL 9D33	0.88 ± 0.30
100 μg/mL 5C9	0.58 ± 0.28
100 μg/mL 9D33 + 100 μg/mL 5C9	0.81 ± 0.36
100 μg/mL 9D33 + M22	1.03 ± 0.32
100 μg/mL 5C9 + M22	0.05 (n=2)
100 μg/mL 9D33 + 100 μg/mL 5C9 + M22	0.06 (n=2)
10 μg/mL 9D33 + M22	0.97 ± 0.48
10 μg/mL 5C9 + M22	0.20 (n=2)
10 μg/mL 9D33 + 10 μg/mL 5C9 + M22	0.14 ± 0.08
1 μg/mL 9D33 + M22	0.83 ± 0.21
1 μg/mL 5C9 + M22	0.02 (n=2)
1 μg/mL 9D33 + 1 μg/mL 5C9 + M22	0.13 ± 0.13
0.1 μg/mL 9D33 + M22	5.38 ± 1.71
0.1 μg/mL 5C9 + M22	1.43 ± 1.09
0.1 μg/mL 9D33 + 0.1 μg/mL 5C9 + M22	2.39 ± 1.0
0.01 μg/mL 9D33 + M22	15.2 ± 1.42
0.01 μg/mL 5C9 + M22	13.1 ± 1.34
0.01 μg/mL 9D33 + 0.01 μg/mL 5C9 + M22	12.7 ± 3.4
0.001 μg/mL 9D33 + M22	12.8 ± 1.60
0.001 μg/mL 5C9 + M22	13.3 ± 0.89
0.001 μg/mL 9D33 + 0.001 μg/mL 5C9 + M22	15.8 ± 2.15

【表１３－４】

実験４

サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液中のテストサンプル	サイクリックＡＭＰ濃度（pmol/mL平均±ＳＤ、ｎ＝３）
緩衝液のみ	1.29 ± 0.68
M22 0.3 ng/mL	31.1 ± 9.4
100 μg/mL 9D33	2.38 ± 1.11
100 μg/mL 5C9	0.12 ± 0.09
100 μg/mL 9D33 + 100 μg/mL 5C9	0.81 ± 0.15
100 μg/mL 9D33 + M22	2.00 ± 0.87
100 μg/mL 5C9 + M22	0.22 ± 0.11
100 μg/mL 9D33 + 100 μg/mL 5C9 + M22	0.40 ± 0.18
10 μg/mL 9D33 + M22	1.25 ± 0.09
10 μg/mL 5C9 + M22	0.40 ± 0.17
10 μg/mL 9D33 + 10 μg/mL 5C9+ M22	0.45 ± 0.31
1 μg/mL 9D33 + M22	2.66 ± 0.64
1 μg/mL 5C9 + M22	0.21 ± 0.18
1 μg/mL 9D33 + 1 μg/mL 5C9 + M22	0.14 ± 0.07
0.1 μg/mL 9D33 + M22	27.6 ± 2.5
0.1 μg/mL 5C9 + M22	6.0 ± 2.6
0.1 μg/mL 9D33 + 0.1 μg/mL 5C9+ M22	7.2 ± 3.9
0.01 μg/mL 9D33 + M22	38.9 ± 6.4
0.01 μg/mL 5C9 + M22	31.5 ± 4.0
0.01 μg/mL 9D33 + 0.01 μg/mL 5C9 + M22	20.6 ± 5.3
0.001 μg/mL 9D33 + M22	43.2 ± 7.9
0.001 μg/mL 5C9 + M22	33.1 ± 4.0
0.001 μg/mL 9D33 + 0.001 μg/mL 5C9+ M22	25.3 ± 6.0

【０１７１】

【表１４－１】

［表１４］

野生型ＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞(細胞あたり約５ｘ１０^{5}レセプター）における基本的なサイクリックＡＭＰ産生に対する５Ｃ９ＩｇＧおよび９Ｄ３３ＩｇＧの効果

実験１

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ濃度 pmol/mL （平均±ＳＤ、ｎ＝３）	基本的なサイクリックＡＭＰ産生の阻害率（%）
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	47.1 ± 11.7	0
3 ng/mL TSH	152.0 ± 28.2	-ve
5B3[a] IgG 100 µg/mL	44.5 ± 5.2	5.3
5B3[a] IgG 10 µg/mL	45.4 ± 6.3	3.4
5B3[a] IgG 1 µg/mL	52.0 ± 12.1	-ve
9D33 IgG 100 µg/mL	74.2 ± 7.2	-ve
9D33 IgG 10 µg/mL	56.5 ± 4.0	-ve
9D33 IgG 1 µg/mL	65.8 ± 9.8	-ve
9D33 IgG 0.1 µg/mL	61.7 ± 13.3	-ve
9D33 IgG 0.01 µg/mL	52.0 ± 5.1	-ve
9D33 IgG 0.001 µg/mL	61.6 ± 3.8	-ve

コントロールのＣＨＯ細胞では、ＴＳＨＲが発現されず、サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液の存在下での基礎的なサイクリックＡＭＰ産生は１．０２±０．０６ｐｍｏｌ／ｍＬ（平均±ＳＤ；ｎ＝３）であり、３ｎｇ／ｍＬ　ＴＳＨの存在下では０．７４±０．３２ｐｍｏｌ／ｍＬ（平均±ＳＤ；ｎ＝３）であった。

－ｖｅ＝ネガティブ、すなわちサイクリックＡＭＰ産生の阻害が無い。

[b]５Ｂ３はグルタミン酸デカルボキシラーゼ（ＧＡＤ）ヒトモロクローナル抗体である（５Ｃ９に対するネガティブコントロール）。

【表１４－２】

実験２

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ濃度 pmol/mL （平均±ＳＤ、ｎ＝３）	基本的な サイクリックＡＭＰ産生 の阻害率（%）
サイクリックＡＭＰ アッセイ緩衝液のみ	58.0 ± 15.2	0
3 ng/mL TSH	156.5 ± 22.2	-ve
5B3[a] IgG 100 μg/mL	52.7 ± 7.8	9.1
5B3[a] IgG 10 μg/mL	43.7 ± 10.4	24.7
5B3[a] IgG 1 μg/mL	55.9 ± 12.2	3.7
5C9 IgG 100 μg/mL	26.2 ± 2.7	54.9
5C9 IgG 10 μg/mL	14.7 ± 1.7	74.6
5C9 IgG 1 μg/mL	16.8 ± 4.2	71.0
5C9 IgG 0.1 μg/mL	31.5 ± 8.8	45.7
5C9 IgG 0.01 μg/mL	36.4 ± 4.5	37.2
5C9 IgG 0.001 μg/mL	51.7 ± 9.8	10.8

コントロールのＣＨＯ細胞では、ＴＳＨＲが発現されず、サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液の存在下での基礎的なサイクリックＡＭＰ産生は０．０３ｐｍｏｌ／ｍＬ（ｎ＝２）であり、３ｎｇ／ｍＬ　ＴＳＨの存在下では０．４０±０．０９ｐｍｏｌ／ｍＬ（平均±ＳＤ；ｎ＝３）であった。

－ｖｅ＝ネガティブ、すなわちサイクリックＡＭＰ産生の阻害が無い。

[b]５Ｂ３はグルタミン酸デカルボキシラーゼ（ＧＡＤ）ヒトモロクローナル抗体である（５Ｃ９に対するネガティブコントロール）。

【表１４－３】

実験３

野生型ＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞におけるサイクリックＡＭＰ産生の基礎的な５Ｃ９ＦａｂおよびＦ（ａｂ‘）の効果

サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液中のテストサンプル	サイクリックＡＭＰ濃度 pmol/mL （平均±ＳＤ、ｎ＝３）	基本的なサイクリックＡＭＰ産生の阻害率（%）
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	59.4 ±8.6	0
9D33 IgG 100 μg/mL	67.8 ±1.0	-ve
9D33 IgG 10 μg/mL	79.4 ±9.8	-ve
9D33 IgG 1 μg/mL	71.5 ±8.8	-ve
9D33 IgG 0.1 μg/mL	75.6 ±8.9	-ve
9D33 IgG 0.01 μg/mL	60.5 ±7.5	-ve
9D33 IgG 0.001 μg/mL	52.3 ±6.3	12
5C9 IgG 100 μg/mL	26.2 ±1.8	56
5C9 IgG 10 μg/mL	24.5 ±5.8	59
5C9 IgG 1 μg/mL	22.9 ±2.1	61
5C9 IgG 0.1 μg/mL	59.1 ±2.6	1
5C9 IgG 0.01 μg/mL	64.3 ±8.4	-ve
5C9 IgG 0.001 μg/mL	67.3 ±9.8	-ve

【表１４－４】

5C9 Fab 100 μg/mL	23.3 ±2.3	61
5C9 Fab 10 μg/mL	32.1 ±4.8	46
5C9 Fab 1 μg/mL	36.4 ±1.5	39
5C9 Fab 0.1 μg/mL	52.8 ±1.9	11
5C9 Fab 0.01 μg/mL	61.1 ±2.4	-ve
5C9 Fab 0.001 μg/mL	62.5 ±7.3	-ve
5C9 F(ab') 100 μg/mL	30.9 ±2.6	48
5C9 F(ab') 10 μg/mL	36.5 ±3.4	39
5C9 F(ab') 1 μg/mL	45.9 ±4.5	23
5C9 F(ab') 0.1 μg/mL	48.2 ±3.1	19
5C9 F(ab') 0.01 μg/mL	62.3 ±5.7	-ve
5C9 F(ab') 0.001 μg/mL	57.9 ±9.1	3

コントロールのＣＨＯ細胞では、ＴＳＨＲが発現されず、サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液の存在下での基礎的なサイクリックＡＭＰ産生は１．０３ｐｍｏｌ／ｍＬ（平均±ＳＤ；ｎ＝２）であり、３ｎｇ／ｍＬ　ＴＳＨの存在下では０．０４±０．０９ｐｍｏｌ／ｍＬ（平均±ＳＤ；ｎ＝３）であった。

－ｖｅ＝ネガティブ、すなわち還元サイクリックＡＭＰ産生の阻害が無い。

Ｆ（ａｂ‘）　Ｆ（ａｂ‘）$_2$の還元により準備される；詳細な説明の記載を参照

【０１７２】

【表１５－１】

［表１５］

Ｉ５６８Ｔ活性化変異を有するＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における基本的なサイクリックＡＭＰ濃度に対する、アンタゴニスト活性をもつ患者血清ＴＳＨＲ自己抗体（Ｂ２－Ｂ５）の効果

実験１

サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液中のテストサンプル	サイクリックＡＭＰ濃度 pmol/mL （平均±ＳＤ、ｎ＝３）	基本的なサイクリックＡＭＰ産生の阻害率（%）
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	20.5 ±8.7	0
ＨＢＤプール／１０	19.5 ±3.4	5
ＨＢＤプール／５０	25.7 ±2.8	-ve
N1 /10	20.7 ±5.5	-ve
N1 /50	18.5 ±1.5	10
N2 /10	23.3 ±1.7	-ve
N2 /50	17.6 ±1.8	14
N3 /10	20.3 ±2.4	1
N3 /50	23.6 ±5.9	-ve
B2 /10	5.3 ±1.3	74
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

【表１５－２】

実験２

サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液中のテストサンプル	サイクリックＡＭＰ濃度 pmol/mL （平均±ＳＤ、ｎ＝３）	基本的なサイクリックＡＭＰ産生の阻害率（%）
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	19.7 ±3.7	0
ＨＢＤプール／１０	28.0 ±1.6	-ve
ＨＢＤプール／５０	18.1 ±3.9	8
ＨＢＤプール／１００	18.0 ±1.6	9
ＨＢＤプール／５００	17.8 ±1.3	10
ＨＢＤプール／１０００	20.7 ±2.9	-ve
ＨＢＤプール／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

【表１５－３】

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

－ｖｅ＝ネガティブ、すなわちサイクリックＡＭＰ産生の阻害が無い。
ＨＢＤプール＝健常人血液ドナー血清のプール
Ｎ１－Ｎ３＝個々の健常人血液ドナー
全ての血清はサイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液で希釈された。
【０１７３】

【表１６】

［表１６］

Ｓ２８１Ｉ活性化変異を有するＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における基本的なサイクリックＡＭＰ濃度に対する、アンタゴニスト活性をもつ患者血清ＴＳＨＲ自己抗体（Ｂ２－Ｂ５）の効果

サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液中のテストサンプル	サイクリックＡＭＰ濃度 pmol/mL （平均±ＳＤ、ｎ＝３）	基本的なサイクリックＡＭＰ産生の阻害率（%）
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	11.2 ±2.0	0
ＨＢＤプール／１０	12.1 ±0.6	-8
ＨＢＤプール／５０	10.0 ±2.0	11
N1 /10	8.0 ±1.6	28
N1 /50	10.8 ±3.3	4
N2 /10	8.8 ±1.4	21
N2 /50	8.8 ±2.3	22
N3 /10	10.0 ±0.8	17
N3 /50	9.3 ±1.7	17
B2 /10	7.7 ±039	31
B2 /50	5.7 ±1.3	49
B3 /10	5.4 ±0.5	52
B3 /50	6.6 ±1.1	41
B4 /10	5.4 ±1.1	52
B4 /50	4.9 ±0.7	56
B5 /10	9.1 ±2.5	18
B5 /50	7.6 ±0.8	32

説明注釈については表１５を参照。
１μｇ／ｍＬの５Ｃ９　ＩｇＧは、ＴＳＨＲ　Ｓ２８１Ｉを用いた実験における基本的なサイクリックＡＭＰ活性の阻害の７１％を引き起こした。

【０１７４】

【表１７】

［表１７］

Ａ６２３Ｉ活性化変異を有するＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における基本的なサイクリックＡＭＰ濃度に対する、アンタゴニスト活性をもつ患者血清ＴＳＨＲ自己抗体（Ｂ２－Ｂ５）の効果

テストサンプルおよび血清の希釈	サイクリックＡＭＰ濃度 pmol/mL （平均±ＳＤ、ｎ＝３）	基本的なサイクリックＡＭＰ産生の阻害率（%）
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	43.5 ±11.2	0
ＨＢＤプール／１０	34.7 ±4.5	20
ＨＢＤプール／５０	49.9 ±5.7	-15
N1 /10	32.1 ±2.5	26
N1 /50	43.9 ±12.0	-1
N2 /10	51.1 ±8.4	-17
N2 /50	32.6 ±2.1	26
N3 /10	47.2 ±7.1	-10
N3 /50	57.3 ±16.5	-32
B2 /10	28.8 ±1.1	34
B2 /50	43.9 ±2.7	-1
B3 /10	33.5 ±3.5	23
B3 /50	44.2 ±12.7	-1
B4 /10	27.2 ±6.6	37
B4 /50	23.9 ±1.0	45
B5 /10	19.2 ±6.3	56
B5 /50	40.6 ±10.9	7

説明注釈については表１５を参照。
１μｇ／ｍＬの５Ｃ９　ＩｇＧは、ＴＳＨＲ　Ａ６２３Ｉを用いた実験における基本的なサイクリックＡＭＰ活性の４９％阻害を引き起こした。

【０１７５】

【表１８】

[表18]
野生型ＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞株(細胞あたり約５ｘ１０^{5}レセプター) における基本的なサイクリックＡＭＰ濃度に対する、アンタゴニスト活性をもつ患者血清ＴＳＨＲ自己抗体（Ｂ２－Ｂ５）の効果

テストサンプルおよび血清の希釈	サイクリックＡＭＰ濃度 pmol/mL （平均±ＳＤ、ｎ＝３）	基本的なサイクリックＡＭＰ産生の変化（%）
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	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

【数６】

$$\text{基本的なサイクリックＡＭＰ産生の変化（%）} = \frac{\text{テストサンプル存在下でのサイクリックＡＭＰ産生}}{\text{サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液存在下でのサイクリックＡＭＰ産生}} \times １００$$

１μｇ／ｍＬの５Ｃ９　ＩｇＧの存在下、基本的なサイクリックＡＭＰレベルはサイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液存在下でのレベルに比べ３３％に減少した。

【０１７６】

【表１９】

[表19]
ＴＳＨＲを導入したＣＨＯ細胞における基本的なサイクリックＡＭＰ濃度に対する、
アンタゴニスト活性をもつ患者血清ＴＳＨＲ自己抗体（Ｂ２－Ｂ５）の効果の要約

ＣＨＯ細胞	下記存在下でのサイクリックＡＭＰアッセイ濃度（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ、ｎ＝３）					
	ＨＢＤプール	B2	B3	B4	B5	5C9 IgG
野生型ＴＳＨＲ	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

ＨＢＤプール＝健常人血液ドナー血清のプール。
ＨＢＤプールおよびＢ２～Ｂ５の血清はサイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液中で１：１０に希釈した。
５Ｃ９　ＩｇＧはサイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液中１μｇ／ｍＬの濃度で用いた。
Ｂ２－Ｂ５は、野生型ＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞中での、ＴＳＨおよびＭ２２の両方によるサイクリックＡＭＰ産生刺激を遮断した。

【０１７７】

【表２０ａ】

［表２０ａ］

野生型ＴＳＨＲおよびＡｓｐ４３をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ｐＴＳＨ刺激によるサイクリックＡＭＰ産生に対する５Ｃ９ＩｇＧの効果。

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３）		変異／野生型（%）
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	277 ±109	173 ±81	76
ＴＳＨのみ	13924 ±717	11651 ±465	84
5B3[a] 10 μg/mL + TSH	14263 ±2791	17452 ±2160	122
5B3[a] 100 μg/mL + TSH	18892 ±1222	12685[1]	67
5C9 0.01 μg/mL + TSH	13145[1]	12722 ±695	97
5C9 0.1 μg/mL + TSH	7813 ±505	6726 ±488	86
5C9 1.0 μg/mL + TSH	2021 ±515	471 ±217	23
5C9 10 μg/mL + TSH	306 ±287	119 ±68	39
5C9 100 μg/mL + TSH	84 ±93	31[2]	37
5C9 100 μg/mL　のみ	47 ±23	206 ±107	438

【０１７８】

[1]二重測定の平均

[2]一重測定

ｐＴＳＨ濃度＝３ｎｇ／ｍＬ。

全ての希釈はサイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液で行った。

[a]５Ｂ３はグルタミン酸デカルボキシラーゼ（ＧＡＤ）に対するヒトモノクローナル抗体である（５Ｃ９に対するネガティブコントロール）。

【０１７９】

【表２０ｂ】

［表２０ｂ］

野生型ＴＳＨＲおよびＧｌｕ６１をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ｐＴＳＨ刺激によるサイクリックＡＭＰ産生に対する５Ｃ９ＩｇＧの効果。

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生 (fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３)		変異／野生型 (%)
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	210 ±101	146 ±22	70
ＴＳＨのみ	12818 ±2224	15398 ±982	120
5B3[a] 10 μg/mL + TSH	11522 ±2220	19750 ±2950	171
5B3[a] 100 μg/mL + TSH	14090 ±2394	15680 ±2708	111
5C9 0.01 μg/mL + TSH	13806 ±1188	18050 ±2948	131
5C9 0.1 μg/mL + TSH	2886 ±422	2114 ±592	73
5C9 1.0 μg/mL + TSH	536 ±150	766 ±354	143
5C9 10 μg/mL + TSH	254 ±208	346 ±292	136
5C9 100 μg/mL + TSH	202[1]	328 ±96	162
5C9 100 μg/mL のみ	218 ±46	254 ±48	117

説明注釈については表２０ａを参照。

【０１８０】

【表２０ｃ】

［表２０ｃ］

野生型ＴＳＨＲおよびＨｉｓ１０５をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ｐＴＳＨ刺激によるサイクリックＡＭＰ産生に対する５Ｃ９ＩｇＧの効果。

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３）		変異／野生型（%）
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	245 ±98	590 ±72	241
ＴＳＨのみ	14214 ±2111	17979 ±1735	126
5B3[a] 10 μg/mL + TSH	13214 ±3233	21359 ±1501	162
5B3[a] 100 μg/mL + TSH	17232 ±2641	24044 ±3398	140
5C9 0.01 μg/mL + TSH	16652 ±2252	24168 ±1690	145
5C9 0.1 μg/mL + TSH	3511 ±590	2869 ±1460	82
5C9 1.0 μg/mL + TSH	454 ±11	561 ±393	124
5C9 10 μg/mL + TSH	289 ±84	434 ±392	150
5C9 100 μg/mL + TSH	223[1]	134[1]	60
5C9 100 μg/mL のみ	234 ±50	520 ±198	222

説明注釈については表２０ａを参照。

【０１８１】

【表２０ｄ－１】

［表２０ｄ］

野生型ＴＳＨＲおよびＧｌｕ１０７をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ｐＴＳＨ刺激によるサイクリックＡＭＰ産生に対する５Ｃ９ＩｇＧの効果。

実験１

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３）		変異／野生型（%）
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	326 ±157	1898 ±594	582
ＴＳＨのみ	14838 ±1396	13435 ±2613	91
5B3[a] 10 μg/mL + TSH	14018 ±3049	17074 ±1442	122
5B3[a] 100 μg/mL + TSH	15949 ±1340	16009 ±4606	100
5C9 0.01 μg/mL + TSH	17001 ±5209	15008 ±1053	88
5C9 0.1 μg/mL + TSH	5950[1]	5783 ±3213	97
5C9 1.0 μg/mL + TSH	1058 ±396	394 ±314	37
5C9 10 μg/mL + TSH	496 ±52	449 ±116	91
5C9 100 μg/mL + TSH	193 ±196	203 ±56	105
5C9 100 μg/mL のみ	1266 ±359	462 ±324	36

説明注釈については表２０ａを参照。

【表２０ｄ－２】

実験２

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生 (fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３)		変異／野生型 (%)
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	167 ±148	1824 ±354	1092
ＴＳＨのみ	17569 ±3919	19358 ±2365	110
5B3[a] 10 μg/mL + TSH	11692 ±1161	21255 ±2597	182
5B3[a] 100 μg/mL + TSH	24141 ±1869	22933 ±6554	95
5C9 0.01 μg/mL + TSH	18585 ±5353	21028 ±1432	113
5C9 0.1 μg/mL + TSH	4221 ±1003	1544 ±732	37
5C9 1.0 μg/mL + TSH	738 ±48	28[1]	4
5C9 10 μg/mL + TSH	214 ±343	321 ±514	150
5C9 100 μg/mL + TSH	238[1]	64[2]	27
5C9 100 μg/mL のみ	211 ±75	408 ±138	193

説明注釈については表２０ａを参照。

【０１８２】

【表２０ｅ】

［表２０ｅ］

野生型ＴＳＨＲおよびＰｈｅ１３０をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ｐＴＳＨ刺激によるサイクリックＡＭＰ産生に対する５Ｃ９ＩｇＧの効果。

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３）		変異／野生型（%）
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	345 ±119	410 ±85	119
ＴＳＨのみ	15897 ±1291	16392 ±1318	103
5B3[a] 10 μg/mL + TSH	18414 ±1662	15765 ±1088	86
5B3[a] 100 μg/mL + TSH	19561 ±1078	21673 ±3165	111
5C9 0.01 μg/mL + TSH	15255 ±2166	17414 ±1020	114
5C9 0.1 μg/mL + TSH	2712 ±462	9015 ±1835	332
5C9 1.0 μg/mL + TSH	398 ±378	2235 ±1635	562
5C9 10 μg/mL + TSH	151 ±195	1139 ±146	754
5C9 100 μg/mL + TSH	240 ±199	603 ±141	251
5C9 100 μg/mL のみ	334 ±75	446 ±41	134

説明注釈については表２０ａを参照。

【０１８３】

【表２０ｆ】

［表２０ｆ］

野生型ＴＳＨＲおよびＧｌｕ１７８をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ｐＴＳＨ刺激によるサイクリックＡＭＰ産生に対する５Ｃ９ＩｇＧの効果。

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３)		変異／野生型 (%)
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	183 ±77	366 ±300	200
ＴＳＨのみ	8900 ±1185	7666 ±1659	86
5B3[a] 10 μg/mL + TSH	9160 ±3180	10828 ±1650	118
5B3[a] 100 μg/mL + TSH	12920 ±1300	9428 ±1350	73
5C9 0.01 μg/mL + TSH	12580 ±2700	8166 ±195	65
5C9 0.1 μg/mL + TSH	4354 ±920	7314 ±1830	168
5C9 1.0 μg/mL + TSH	688 ±140	3570 ±850	519
5C9 10 μg/mL + TSH	630 ±140	1904 ±360	302
5C9 100 μg/mL + TSH	712[1]	894 ±120	126
5C9 100 μg/mL のみ	196 ±58	134 ±153	68

説明注釈については表２０ａを参照。

【０１８４】

【表２０ｇ】

［表２０ｇ］

野生型ＴＳＨＲおよびＴｙｒ１８５をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ｐＴＳＨ刺激によるサイクリックＡＭＰ産生に対する５Ｃ９ＩｇＧの効果。

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３)		変異／野生型 (%)
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	139 ±40	163 ±72	117
ＴＳＨのみ	12649 ±1577	8305 ±870	66
5B3[a] 10 μg/mL + TSH	16974 ±205	10088 ±1856	59
5B3[a] 100 μg/mL + TSH	17089 ±2282	10920 ±2111	64
5C9 0.01 μg/mL + TSH	17264 ±4257	9368 ±2069	54
5C9 0.1 μg/mL + TSH	6217 ±2064	4536 ±724	73
5C9 1.0 μg/mL + TSH	1664 ±636	1199 ±1042	72
5C9 10 μg/mL + TSH	481 ±380	301 ±199	63
5C9 100 μg/mL + TSH	275 ±206	UD	
5C9 100 μg/mL のみ	123 ±38	163 ±60	133

ＵＤ＝アッセイ測定限界以下。
説明注釈については表２０ａを参照。
【０１８５】

【表２０ｈ】

［表２０ｈ］

野生型ＴＳＨＲおよびＡｓｐ２０３をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ｐＴＳＨ刺激によるサイクリックＡＭＰ産生に対する５Ｃ９ＩｇＧの効果。

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３）		変異／野生型（%）
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	298 ±164	742 ±122	249
ＴＳＨのみ	11770 ±398	12594 ±400	107
5B3[a] 10 μg/mL + TSH	13266 ±1105	12232 ±1819	92
5B3[a] 100 μg/mL + TSH	14125 ±704	13006 ±2452	92
5C9 0.01 μg/mL + TSH	15454 ±422	14651 ±511	95
5C9 0.1 μg/mL + TSH	4445 ±405	13142 ±1589	296
5C9 1.0 μg/mL + TSH	1352 ±249	14678 ±6312	1086
5C9 10 μg/mL + TSH	807 ±479	12634 ±1036	1566
5C9 100 μg/mL + TSH	367 ±67	12721 ±3187	3446
5C9 100 μg/mL のみ	330 ±46	1368 ±206	415

説明注釈については表２０ａを参照。

【０１８６】

【表２０ｉ】

［表２０ｉ］

野生型ＴＳＨＲおよびＴｙｒ２０６をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ｐＴＳＨ刺激によるサイクリックＡＭＰ産生に対する５Ｃ９ＩｇＧの効果。

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３)		変異／野生型 (%)
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	380 ±166	402 ±96	106
ＴＳＨのみ	15360 ±670	18440 ±1390	120
5B3[a] 10 μg/mL + TSH	15880 ±1150	21000 ±2340	132
5B3[a] 100 μg/mL + TSH	19100 ±3090	19680 ±3200	103
5C9 0.01 μg/mL + TSH	16100 ±2360	18420 ±670	114
5C9 0.1 μg/mL + TSH	6220 ±1500	10820 ±1750	174
5C9 1.0 μg/mL + TSH	1306 ±123	3460 ±360	265
5C9 10 μg/mL + TSH	396 ±158	1564 ±176	395
5C9 100 μg/mL + TSH	292 ±130	506 ±120	173
5C9 100 μg/mL のみ	444 ±98	482 ±286	109

説明注釈については表２０ａを参照。

【０１８７】

【表２０ｊ】

［表２０ｊ］

野生型ＴＳＨＲおよびＬｙｓ２０９をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ｐＴＳＨ刺激によるサイクリックＡＭＰ産生に対する５Ｃ９ＩｇＧの効果。

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３）		変異／野生型（%）
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	316 ±38	288 ±80	91
ＴＳＨのみ	14200 ±1420	9500 ±1620	67
5B3[a] 10 μg/mL + TSH	12280 ±610	11200 ±3000	91
5B3[a] 100 μg/mL + TSH	16000 ±1470	13240 ±1530	83
5C9 0.01 μg/mL + TSH	15440 ±2180	5960 ±950	39
5C9 0.1 μg/mL + TSH	4700 ±339	278 ±40	6
5C9 1.0 μg/mL + TSH	1184 ±59	360 ±146	30
5C9 10 μg/mL + TSH	984 ±117	482 ±100	49
5C9 100 μg/mL + TSH	602 ±240	354 ±184	59
5C9 100 μg/mL のみ	272 ±49	280 ±104	103

説明注釈については表２０ａを参照。

【０１８８】

【表２０ｋ】

［表２０ｋ］

野生型ＴＳＨＲおよびＡｓｐ２３２をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ｐＴＳＨ刺激によるサイクリックＡＭＰ産生に対する５Ｃ９ＩｇＧの効果。

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３）		変異／野生型（%）
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	650 ±87	652 ±300	100
ＴＳＨのみ	15681 ±866	14884 ±1587	95
5B3[a] 10 μg/mL + TSH	15210 ±1697	17800 ±3219	117
5B3[a] 100 μg/mL + TSH	19704 ±1173	17478 ±3150	89
5C9 0.01 μg/mL + TSH	17600 ±1347	15330 ±1593	87
5C9 0.1 μg/mL + TSH	7329 ±860	6556 ±1668	89
5C9 1.0 μg/mL + TSH	1072 ±705	1882 ±653	176
5C9 10 μg/mL + TSH	794 ±406	710 ±596	89
5C9 100 μg/mL + TSH	166 ±95	55 ±51	33
5C9 100 μg/mL のみ	522 ±84	99[1]	19

説明注釈については表２０ａを参照。

【０１８９】

【表２０１】

［表２０１］

野生型ＴＳＨＲおよびＬｙｓ２５０をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ｐＴＳＨ刺激によるサイクリックＡＭＰ産生に対する５Ｃ９ＩｇＧの効果。

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生 (fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３)		変異／野生型 (%)
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	590 ±86	1020 ±104	173
ＴＳＨのみ	13332 ±1177	10933 ±1510	82
5B3[a] 10 μg/mL + TSH	11292 ±1784	13410 ±2930	119
5B3[a] 100 μg/mL + TSH	14236 ±3521	14049 ±3372	99
5C9 0.01 μg/mL + TSH	15191 ±4117	14460 ±2690	95
5C9 0.1 μg/mL + TSH	6295 ±1897	8486 ±2961	135
5C9 1.0 μg/mL + TSH	643 ±207	2567 ±841	399
5C9 10 μg/mL + TSH	286 ±116	862 ±398	301
5C9 100 μg/mL + TSH	158 ±244	96 ±57	61
5C9 100 μg/mL のみ	458 ±94	448 ±280	98

説明注釈については表２０ａを参照。

【０１９０】

【表２０ｍ】

［表２０ｍ］

野生型ＴＳＨＲおよびＧｌｕ２５１をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ｐＴＳＨ刺激によるサイクリックＡＭＰ産生に対する５Ｃ９ＩｇＧの効果。

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３）		変異／野生型（%）
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	380 ±84	960 ±372	253
ＴＳＨのみ	18379 ±987	17492 ±1332	95
5B3[a] 10 μg/mL + TSH	15152 ±4365	19951 ±2362	132
5B3[a] 100 μg/mL + TSH	18169 ±3454	20461 ±1345	113
5C9 0.01 μg/mL + TSH	21197 ±1280	21950 ±936	104
5C9 0.1 μg/mL + TSH	8640 ±2123	15532 ±2571	180
5C9 1.0 μg/mL + TSH	915 ±139	5240 ±332	573
5C9 10 μg/mL + TSH	752 ±127	1881 ±212	250
5C9 100 μg/mL + TSH	496 ±166	1170 ±123	236
5C9 100 μg/mL のみ	460 ±102	406 ±212	88

説明注釈については表２０ａを参照。

【０１９１】

【表２０ｎ】

［表２０ｎ］

野生型ＴＳＨＲおよびＴｈｒ２５７をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ｐＴＳＨ刺激によるサイクリックＡＭＰ産生に対する５Ｃ９ＩｇＧの効果。

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３）		変異／野生型（%）
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	626 ±153	1140 ±153	182
ＴＳＨのみ	16928 ±2079	18563 ±1573	110
5B3[a] 10 μg/mL + TSH	17542 ±1874	23341 ±4203	133
5B3[a] 100 μg/mL + TSH	18948 ±1444	20101 ±2902	106
5C9 0.01 μg/mL + TSH	18722 ±3876	21088 ±1810	113
5C9 0.1 μg/mL + TSH	6143 ±1233	7944 ±1138	129
5C9 1.0 μg/mL + TSH	1396 ±172	1594 ±156	114
5C9 10 μg/mL + TSH	638 ±58	972 ±12	152
5C9 100 μg/mL + TSH	591 ±99	611 ±52	103
5C9 100 μg/ml のみ	566 ±143	637 ±300	111

説明注釈については表２０ａを参照。

【０１９２】

【表２００】

［表２００］

野生型ＴＳＨＲおよびＡｒｇ２７４をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ｐＴＳＨ刺激によるサイクリックＡＭＰ産生に対する５Ｃ９ＩｇＧの効果。

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３)		変異／野生型 (%)
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	124 ±103	86 ±38	69
ＴＳＨのみ	21347 ±1112	11432 ±2511	54
5B3[a] 10 μg/mL + TSH	18654 ±3700	12961 ±2609	69
5B3[a] 100 μg/mL + TSH	26203 ±4753	13138 ±2248	50
5C9 0.01 μg/mL + TSH	16345 ±3974	9557 ±2479	58
5C9 0.1 μg/mL + TSH	4997 ±1392	1320 ±158	26
5C9 1.0 μg/mL + TSH	808 ±510	177 ±120	22
5C9 10 μg/mL + TSH	684 ±182	108[1]	16
5C9 100 μg/mL + TSH	246 ±165	17[2]	7
5C9 100 μg/mL のみ	111 ±26	34 ±43	31

説明注釈については表２０ａを参照。

【０１９３】

【表２０ｐ－１】

［表２０ｐ］

野生型ＴＳＨＲおよびＡｓｐ２７６をアラニンに変異させたＴＳＨＲを発現するＣＨＯ細胞における、ｐＴＳＨ刺激によるサイクリックＡＭＰ産生に対する５Ｃ９ＩｇＧの効果。

実験１

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生 (fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３)		変異／野生型 (%)
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	365 ±166	1454 ±258	398
ＴＳＨのみ	17500 ±727	22416 ±2570	128
5B3[a] 10 μg/mL + TSH	19354 ±1794	25180 ±5609	130
5B3[a] 100 μg/mL + TSH	21671 ±2064	25707 ±4101	119
5C9 0.01 μg/mL + TSH	17236 ±2705	26212 ±2597	152
5C9 0.1 μg/mL + TSH	5594 ±723	16856 ±2110	301
5C9 1.0 μg/mL + TSH	759[1]	4788 ±553	631
5C9 10 μg/mL + TSH	366 ±145	1384 ±602	378
5C9 100 μg/mL + TSH	344 ±566	565 ±176	164
5C9 100 μg/mL のみ	300 ±242	602 ±274	201

説明注釈については表２０ａを参照。

【表２０ｐ－２】

実験２

テストサンプル	サイクリックＡＭＰ産生（fmol/細胞ウェル；平均±ＳＤ，ｎ＝３）		変異／野生型（%）
	野生型ＴＳＨＲ	変異ＴＳＨＲ	
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液のみ	156 ±30	601 ±190	385
ＴＳＨのみ	13852 ±756	14616 ±453	106
5B3[a] 10 μg/mL + TSH	13025 ±3292	17706[1]	136
5B3[a] 100 μg/mL + TSH	14245 ±1024	18041 ±4561	127
5C9 0.01 μg/mL + TSH	14066 ±2291	21213 ±3443	151
5C9 0.1 μg/mL + TSH	4462 ±363	7320 ±1614	164
5C9 1.0 μg/mL + TSH	657 ±257	1513 ±835	230
5C9 10 μg/mL + TSH	541 ±224	1301 ±911	240
5C9 100 μg/mL + TSH	286 ±184	288 ±87	101
5C9 100 μg/mL のみ	208 ±15	314 ±69	151

説明注釈については表２０ａを参照。

【０１９４】

【表２１－１】

［表２１］

ＴＳＨＲを導入したＣＨＯ細胞における、サイクリックＡＭＰ産生に関わるＴＳＨ刺激に対する５Ｃ９ＩｇＧおよび９Ｄ３３ＩｇＧの遮断能におけるＴＳＨＲ変異の効果（野生型に比較した）の要約

ＴＳＨＲ変異	（野生型と比較した）ｐＴＳＨによるサイクリックＡＭＰ産生刺激	５Ｃ９ＩｇＧによる（野生型と比較した）サイクリックＡＭＰ産生のＴＳＨ刺激の遮断	９Ｄ３３ＩｇＧによる（野生型と比較した）サイクリックＡＭＰ産生のＴＳＨ刺激の遮断
野生型	+++++	+++++	+++++
Asp 43 Ala	+++	+++++	+++++
Lys 58 Ala	+++++	+++++	0
Ile 60 Ala	+++++	+++++	+++++
Glu 61 Ala	++++	+++++	+++++
Arg 80 Ala	+++++	+++++	0
Tyr 82 Ala	+++++	+++++	0
Thr 104 Ala	+++++	+++++	NT
His 105 Ala	+++++	+++++	NT
Glu 107 Ala	+++	+++++	+++++
Arg 109 Ala	+++++	+++++	0
Lys 129 Ala	+++++	0	0
Phe 130 Ala	+++++	+++	+++++
Phe 134 Ala	+++++	+++++	++
Asp 151 Ala	+++++	++++	NT
Glu 178 Ala	++++	+++	++++
Lys 183 Ala	+++++	+	+++++
Tyr 185 Ala	++++	+++++	+++++
Asp 203 Ala	++++	0	+++++
Tyr 206 Ala	++++	+++	+++++
Lys 209 Ala	++++	+++++++	+++++
Asp 232 Ala	+++	+++++	+++++
Gln 235 Ala	+++++	+++++	+++++

【表２１－２】

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	+++++	+++++	NT
Lys 183 Asp	+++	+	+++++
Arg 255 Asp	+++++	+++++	+++++++
Asp 160 Lys	0	+++++[a]	NT

使用したｐＴＳＨ濃度＝３ｎｇ／ｍＬ
ＴＳＨＲの比較した効果は野生型とともに観察された活性のパーセンテージで以下のように表される：－＋＋＋＋＋＝野生型活性の１００％；＋＋＋＋＝野生型活性の８０％以上１００％未満；＋＋＋＝野生型活性の６０％以上８０％未満；＋＋＝野生型活性の４０％以上６０％未満；＋＝野生型活性の２０％以上４０％未満、０＝野生型の２０％未満、および野生型と比較して増加した活性：＞１００％は＋＋＋＋＋＋。ＮＴ＝テストせず。
[a]この実験のためのサイクリックＡＭＰ刺激は、ＴＳＨの応答を欠失したＭ２２を用いた（詳しくは明細書を参照）。
【０１９５】

【表２２】

［表２２］

サイクリックＡＭＰ産生に関わるＴＳＨ刺激に対する、アンタゴニスト活性をもつ患者血清ＴＳＨＲ自己抗体（Ｂ２－Ｂ５）の遮断能におけるＴＳＨＲのＡｓｐ２０３Ａｌａ変異の効果

テストしたサンプルおよび希釈血清a	野生型ＴＳＨＲ サイクリックＡＭＰ濃度 fmol/cell well. Mean ± SD; n=3	ＴＳＨで刺激されたサイクリックＡＭＰレベルによる野生型ＴＳＨＲ阻害率（%）	ＴＳＨＲ Ａｓｐ２０３Ａｌａ サイクリックＡＭＰ濃度 fmol/細胞　ウェル 平均±ＳＤ；ｎ＝３	ＴＳＨで刺激されたサイクリックＡＭＰ ＴＳＲＨのレベルによる Ａｓｐ２０３Ａｌａ阻害率（%）
サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液	242 ±130		292 ±89	
TSH[c]	9357 ±1155		7591 ±832	
TSH[c] + 1 μg/mL 5C9	1110 ±811	92	9400[1]	4
ＨＤＰプール／１０	183 ±67		496 ±76	
TSH[c] + HBD	13303 ±1819	0	9756[1]	0
B2 /10	110 ±36		270 ±72	
TSH[c] + B2 /10	454 ±381	97	1963 ±357	80
B3 /10	329[1]		582 ±74	
TSH[c] + B3 /10	3407 ±1341	74	4027 ±278	59
B4 /10	59 ±22		161 ±36	
TSH[c] + B4 /10	278 ±73	98	150 ±41	98
B5 /10	647 ±170		1064 ±228	
TSH[c] + B5 /10	4173 ±515	69	6871 ±618	30

[a]サイクリックＡＭＰアッセイ緩衝液での希釈

[b]ＴＳＨの関与するサイクリックＡＭＰ刺激の阻害率%

【数７】

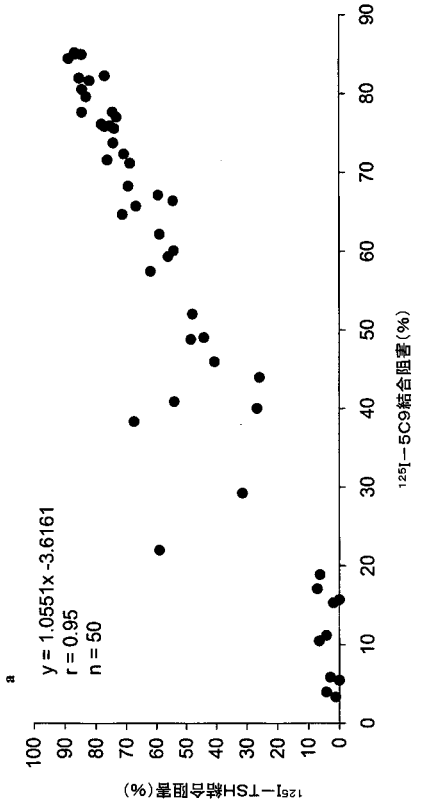
$$100\times\left[1-\frac{\text{テストサンプル／１０およびＴＳＨ（３ｎｇ／ｍＬ）存在下で産生したサイクリックＡＭＰ}}{\text{／１０ＨＢＤおよびＴＳＨ（３ｎｇ／ｍＬ）の存在下で産生したサイクリックＡＭＰ}}\right]$$

[1]二重サンプルの平均

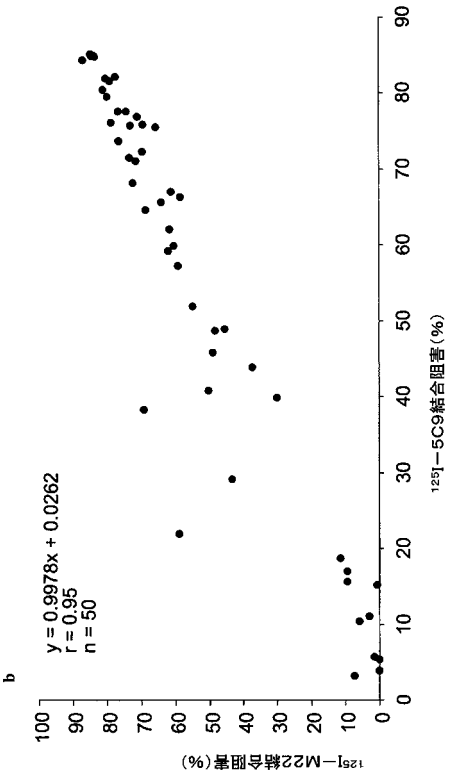
[c]最終濃度３ｎｇ／ｍＬで使用されたｐＴＳＨ

ＨＢＤプール＝健常人ドナー血清のプール

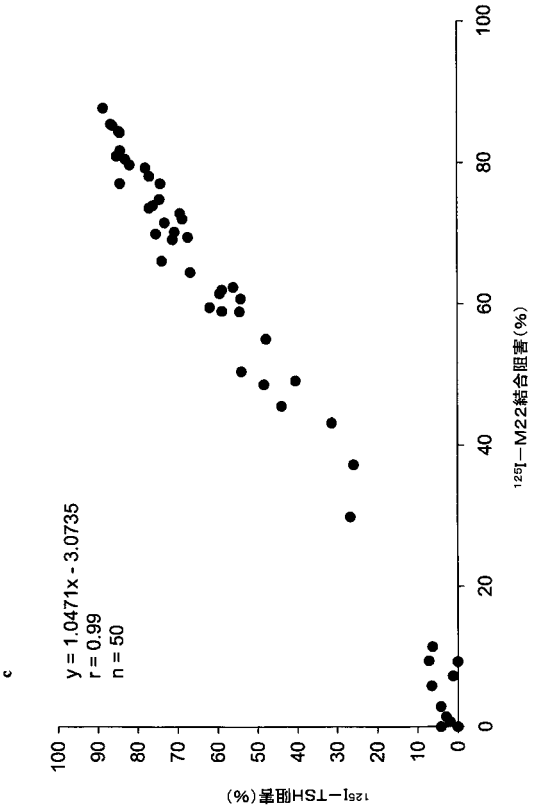
【図１－１】



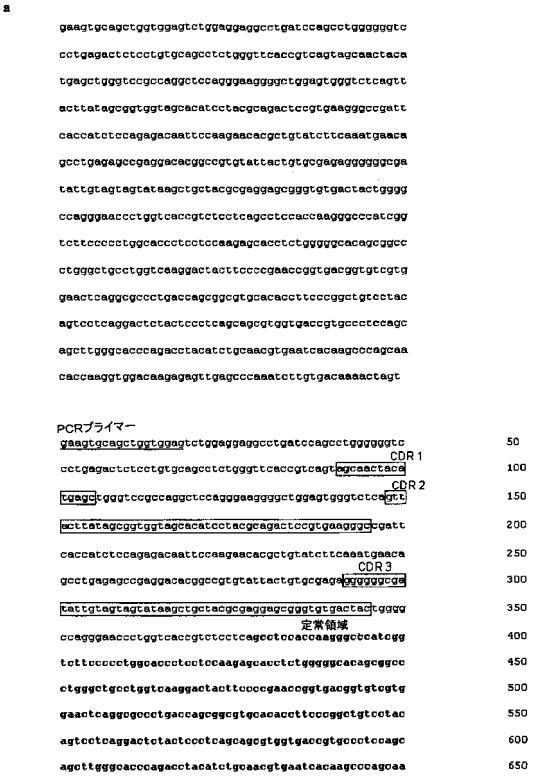
【図１－２】



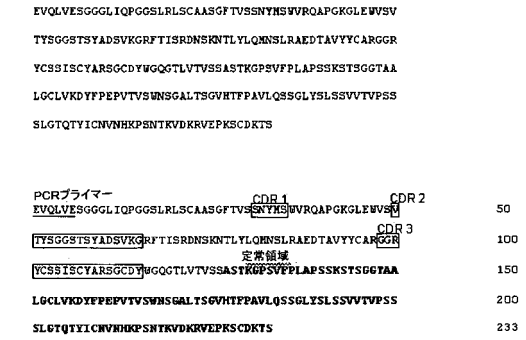
【図１－３】



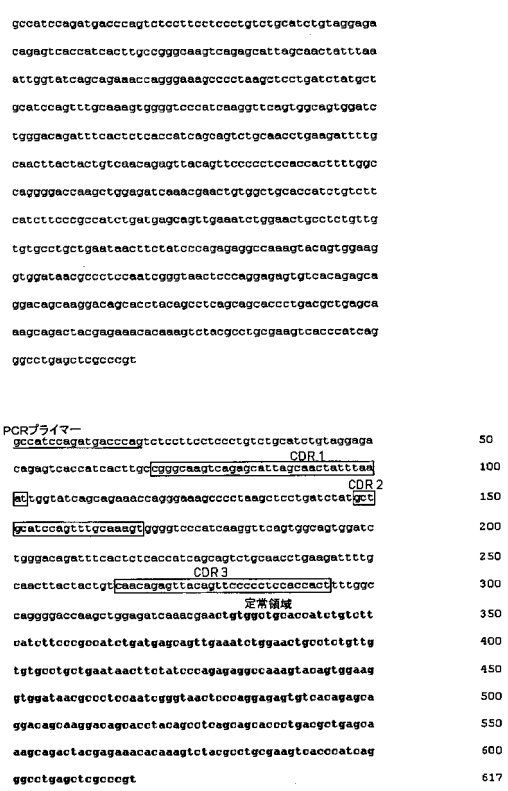
【図２－１】



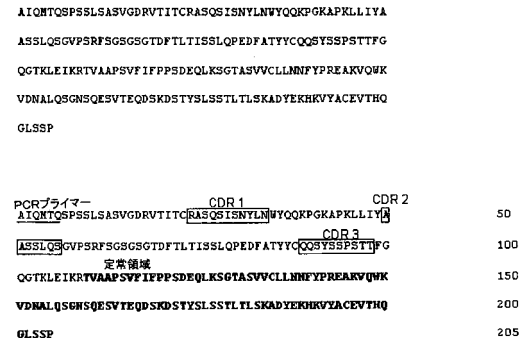
【図２－２】



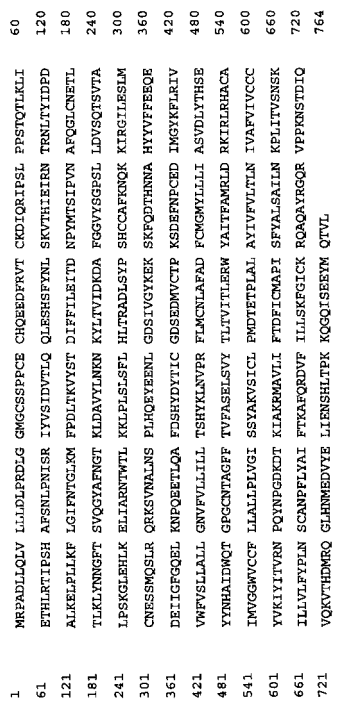
【図３－１】



【図３－２】



【図４】



【配列表】
2010521139000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2008/000518

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 A61K39/395 A61P5/08 C12N15/13 C12N5/24
C12N5/28 G01N33/564

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOHN L D ET AL: "Characterization of monoclonal thyroid-stimulating and thyrotropin binding-inhibiting autoantibodies from a Hashimoto's patient whose children had intrauterine and neonatal thyroid disease." THE JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM DEC 1997, vol. 82, no. 12, December 1997 (1997-12), pages 3998-4009, XP002482177 ISSN: 0021-972X the whole document, especially page 4003, left-hand column, 2nd paragraph - right-hand column, 2nd paragraph -/—	1-63

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 May 2008	11/06/2008

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bayer, Annette

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2008/000518

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/49050 A (BRAHMS DIAGNOSTICA GMBH [DE]; BERGMANN ANDREAS [DE]; STRUCK JOACHIM [D) 24 August 2000 (2000-08-24) page 8, line 20 - page 15, line 36 page 17, line 20 - page 22, line 19 claims 1-9	1-63
X	VALENTE W A ET AL: "Monoclonal antibodies to the thyrotropin receptor: stimulating and blocking antibodies derived from the lymphocytes of patients with Graves disease." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA NOV 1982, vol. 79, no. 21, November 1982 (1982-11), pages 6680-6684, XP002482178 ISSN: 0027-8424 the whole document, especially figures 1-3	1,4,6,7, 9,10, 17-24, 34,35, 52-56
X	YOSHIDA T ET AL: "MONOCLONAL ANTIBODIES TO THE TSH RECEPTOR BIND TO A 56 KDA SUBUNIT OF THE TSH RECEPTOR AND SHOW HETEROGENEOUS BIOACTIVITIES" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (ONLINE), BETHESDA, MD, vol. 263, no. 31, 5 November 1988 (1988-11-05), pages 16341-16347, XP008070247 ISSN: 1083-351X the whole document, especially page 16344, right-hand column, 2nd paragraph	1,3-7,9, 10, 17-19, 21-24, 34,35, 52-55
A	WO 02/08723 A (BRAHMS DIAGNOSTICA GMBH [DE]; COSTAGLIOLA SABINE [BE]; VASSART GILBERT) 31 January 2002 (2002-01-31) the whole document, especially page 14ff "Materialien und Methoden - Ergebnisse" and claims 1-12	52-63
A	SANDERS JANE ET AL: "Effects of TSH receptor mutations on binding and biological activity of monoclonal antibodies and TSH." THYROID : OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN THYROID ASSOCIATION DEC 2006, vol. 16, no. 12, December 2006 (2006-12), pages 1195-1206, XP009100831 ISSN: 1050-7256 the whole document	52-63

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2008/000518

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DAVIES J ET AL: "Affinity improvement of single-antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding" IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL, vol. 2, no. 3, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 169-179, XP004070292 ISSN: 1380-2933 the whole document	
A	HOLT L J ET AL: "Domain antibodies: proteins for therapy" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, 1 November 2003 (2003-11-01), pages 484-490, XP004467495 ISSN: 0167-7799 the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/GB2008/000518

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0049050 A	24-08-2000	AT 286914 T	15-01-2005
		DE 19907094 C1	13-04-2000
		EP 1153039 A2	14-11-2001
WO 0208723 A	31-01-2002	AT 278942 T	15-10-2004
		DE 10035706 A1	07-02-2002
		EP 1301767 A2	16-04-2003
		JP 2004518945 T	24-06-2004

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 35/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 35/00		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｐ 5/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 5/00		
Ａ６１Ｐ 27/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 27/02		
Ａ６１Ｋ 39/395	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ 39/395	Ｈ	
Ｇ０１Ｎ 33/15	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/50	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/53	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｎ	
		Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｅ	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100131392
弁理士 丹羽 武司
(72)発明者 リース，スミス バーナード
イギリス カーディフ ＣＦ１４ ５ＤＵ ラニシェン パーク タイ グラス アールエスアール リミテッド エフアイアールエス ラボラトリーズ
(72)発明者 ファーマニアック，ヤドヴィガ
イギリス カーディフ ＣＦ１４ ５ＤＵ ラニシェン パーク タイ グラス アールエスアール リミテッド エフアイアールエス ラボラトリーズ
(72)発明者 サンダーズ，ジェーン
イギリス カーディフ ＣＦ１４ ５ＤＵ ラニシェン パーク タイ グラス アールエスアール リミテッド エフアイアールエス ラボラトリーズ

Ｆターム(参考) 2G045 CA26 CB01 DA37 DA56 FB03 FB08
4B024 AA01 AA11 BA43 CA02 DA02 DA06 EA04 GA11 HA03
4B064 AG27 CA02 CA10 CA19 CA20 CC24 CE12 DA01 DA13
4B065 AA90X AA90Y AB01 AB04 AC14 BA02 CA25 CA44
4C085 AA14 AA16 BB31 CC02 CC23 DD23 DD62 EE01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA50 DA76 EA28 FA72 FA74
GA26