



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 793**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/72** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**C12N 15/12** (2006.01)

**A61P 5/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05767857 .5**

96 Fecha de presentación : **03.08.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1799715**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.06.2007**

54

Título: **Preparaciones del receptor de tiotropina, sus regiones de unión, interacciones de anticuerpos y hormonas con dichas preparaciones y sus usos.**

30

Prioridad: **13.08.2004 GB 0418181**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**25.10.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**25.10.2011**

73

Titular/es: **RSR Limited  
Avenue Park Pentwyn  
Cardiff CF23 8HE, GB**

72

Inventor/es: **Smith, Bernard Rees;  
Furmaniak, Jadwiga y  
Sanders, Jane**

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 366 793 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Preparaciones del receptor de tirotropina, sus regiones de unión, interacciones de anticuerpos y hormonas con dichas preparaciones y sus usos.

5 La presente invención se refiere a preparaciones del receptor de la hormona estimulante del tiroides (también llamada tirotropina). [Dicho receptor se abrevia en lo sucesivo con las siglas TSHR por la expresión inglesa *Thyroid Stimulating Hormone Receptor*]. En particular la invención se refiere a preparaciones del TSHR mutado, a interacciones de anticuerpos y hormonas con dichas preparaciones, a sus usos, a métodos de proporcionar dichas preparaciones, a regiones epitópicas y a los sitios de unión así identificados por los anticuerpos del TSHR y sus complejos.

10 La tirotropina u hormona estimulante del tiroides (abreviadamente en inglés TSH) es una hormona de la hipófisis (también llamada glándula pituitaria) que desempeña un papel clave en regular la función del tiroides. Su liberación es estimulada por la hormona liberadora de tirotropina (abreviadamente TRH por sus iniciales en inglés) formada en el hipotálamo y controla la formación y liberación de las importantes hormonas tiroideas tiroxina (T4) y triyodotironina (T3). Sobre la base de un mecanismo de retroalimentación, el contenido de hormonas tiroideas del suero controla la liberación de la TSH. La formación de T3 y T4 por las células del tiroides es estimulada por la TSH  
15 mediante un proceso en el cual la TSH liberada por la hipófisis se une al TSHR de la membrana celular del tiroides.

Los autores de la presente invención han descrito recientemente en la solicitud de patente WO 2004/050708A2 un anticuerpo monoclonal humano para el TSHR, que actúa como un potente estimulante del TSHR. El sitio de unión en el TSHR para este anticuerpo monoclonal (hMAb TSHR1) no está descrito en el documento WO 2004/050708A2, pero se ha creído probable que el sitio o cavidad de unión es conformacional e implica regiones discontinuas del receptor que se pliegan conjuntamente. La identificación del sitio de unión, o región epitópica, del TSHR o sus residuos o secuencias de aminoácidos de unión esenciales para un anticuerpo monoclonal o recombinante para el TSHR, tal como hMAb TSHR1, sería de crucial importancia en la comprensión de la estructura del TSHR y la interacción de anticuerpos humanos con dicho sitio de unión, y como tal debe facilitar una determinación mejorada de las poblaciones de auto-anticuerpos y el manejo subsiguiente de la enfermedad tiroidea asociada con una respuesta autoinmune al TSHR.  
20  
25

En la técnica está bien documentado que se pueden formar diversos tipos de auto-anticuerpos contra el TSHR en el curso de la enfermedad asociada con autoinmunidad para el TSHR. Dependiendo del tipo de estos auto-anticuerpos, puede ocurrir la inhibición de la formación y liberación de T3 y T4 debido a la protección del TSHR frente a las moléculas de la TSH, o bien, por otro lado, estas hormonas tiroideas pueden ser liberadas de un modo no controlado debido a que los auto-anticuerpos anti-TSHR mimetizan las acciones de la TSH y estimulan la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas.  
30

La enfermedad tiroidea autoinmune (abreviadamente en lo sucesivo AITD por la expresión inglesa *Autoimmune Thyroid Disease*) es la enfermedad autoinmune más común que afecta a diferentes poblaciones en todo el mundo. Una proporción de pacientes con AITD, principalmente los que padecen la enfermedad de Graves, tienen auto-anticuerpos para el TSHR sustancialmente como los descritos antes. Los auto-anticuerpos se unen al TSHR y usualmente mimetizan las acciones de la TSH, estimulando la glándula tiroides para producir altos niveles de hormonas tiroideas. De estos auto-anticuerpos se ha descrito que tienen actividad estimulante. Los auto-anticuerpos estimulantes también interactúan con los TSHR en los tejidos oculares y causan al menos algunos de los signos de la enfermedad de Graves. En algunos pacientes, los auto-anticuerpos se unen al TSHR pero no estimulan la producción hormonas tiroideas y se describen como poseedores de actividad bloqueante [J. Sanders, Y. Oda, S-A. Roberts, M. Maruyama, J. Furmaniak, B. Rees Smith "*Understanding the thyrotropin receptor function-structure relationship*" *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*. Ed. T. F. Davies 1997 11(3): 451-479. Pub. Baillière Tindall, London].  
35  
40

Las medidas de los auto-anticuerpos del TSHR son importantes en el diagnóstico y manejo de la AITD, particularmente la enfermedad de Graves. Se usan tres tipos usuales de ensayos para medir los auto-anticuerpos del TSHR.  
45

- (a) ensayos de unión competitivos que miden la capacidad de los auto-anticuerpos del TSHR para inhibir la unión de la TSH a preparaciones del TSHR;
- (b) bioensayos que miden la capacidad de los auto-anticuerpos del TSHR para estimular las células que expresan el TSHR en cultivo; y
- 50 (c) inmunoprecipitación de las preparaciones del TSHR con auto-anticuerpos del TSHR.

Las medidas de los auto-anticuerpos para el TSHR usando dichos ensayos están descritas en las referencias siguientes: J. Sanders, Y. Oda, S-A. Roberts, M. Maruyama, J. Furmaniak, B. Rees Smith "*Understanding the thyrotropin receptor function-structure relationship*"; *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*. Ed; T F Davies 1997 11(3): 451-479. Pub. Baillière Tindall, London; y J. Sanders, Y. Oda, S. Roberts, A. Kiddie, T. Richards, J. Bolton, V. McGrath, S. Walters, D. Jaskólski, J. Furmaniak, B. Rees Smith "*The interaction of TSHR auto-antibodies with <sup>125</sup>I-labelled TSHR*", *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999, 84(10):3797-3802.  
55

Sin embargo existen cierto número de limitaciones asociadas con el uso de los ensayos actualmente disponibles

antes descritos para medir los auto-anticuerpos del TSHR. Los ensayos competitivos de tipo (a) que están disponibles en diferentes formatos son generalmente sensibles, fáciles de realizar y adaptables para un uso rutinario. Sin embargo, los ensayos con radio-receptores competitivos conocidos hasta la fecha para detectar auto-anticuerpos del TSHR tienen unos inconvenientes importantes de naturaleza práctica (que pueden ser atribuidos al hecho de que la capacidad de unión de las preparaciones del TSHR generalmente reaccionan muy sensibilmente a cambios en el receptor o en una biomolécula unida por él) y además no permiten se lleven a cabo diagnósticos diferenciales de poblaciones de auto-anticuerpos (por ejemplo la diferenciación de auto-anticuerpos estimulantes o bloqueantes como se ha indicado antes).

En lo que respecta a los bioensayos del tipo mencionado en (b) estos tienden a ser costosos, consumen mucho tiempo en su realización y requieren un personal muy cualificado.

Con respecto a los ensayos de inmunoprecipitación directa del tipo (c), en la práctica hay frecuentemente episodios de sensibilidad asociados a los mismos y de nuevo no ha sido posible hasta la fecha diagnósticos diferenciales de poblaciones de auto-anticuerpos.

Como se apreciará del análisis anterior, sigue existiendo la necesidad en la técnica de proporcionar ensayos mejorados para la detección de auto-anticuerpos del TSHR, y por ejemplo sería ventajoso poder distinguir entre los auto-anticuerpos estimulantes y los bloqueantes asociados con la autoinmunidad para el TSHR. Para este fin, el documento de patente WO 01/27634 describe un método de ensayo para llevar a cabo la determinación del diagnóstico diferencial de auto-anticuerpos del TSHR, con lo cual en teoría pueden ser selectivamente determinados en una muestra los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR y auto-anticuerpos del TSHR no patógenos (ni estimulantes ni bloqueantes). Se emplea un TSHR-quimera en donde las secuencias del TSHR requeridas para la unión de los auto-anticuerpos estimulantes y/o los bloqueantes del TSHR están reemplazadas por secuencias de un receptor diferente de la clase de receptores acoplados a la proteína G. También se describe en el documento el uso de TSHR recombinante de tipo natural solubilizado en la mezcla de reacción, cuando esto se requiera. Puede verse que la quimera A representa el TSHR-quimera en donde los aminoácidos 8-165 del TSHR están reemplazados por los aminoácidos 10-166 del receptor de la lutropina/coriogonadotropina; la quimera B representa el TSHR-quimera en donde los aminoácidos 261-370 del TSHR están reemplazados por los aminoácidos 261-329 del receptor de la lutropina/coriogonadotropina; y la quimera C representa el TSHR-quimera en donde los aminoácidos 8-165 y 261-370 del TSHR están reemplazados por los aminoácidos 10-166 y 261-370 respectivamente del receptor de la lutropina/coriogonadotropina.

El documento de patente WO 01/63296 describe similarmente un método de ensayo para llevar a cabo la determinación del diagnóstico diferencial de los auto-anticuerpos del TSHR, mediante el cual pueden ser de nuevo determinados selectivamente, en teoría, en una muestra los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR y los auto-anticuerpos no patógenos del TSHR. Un agente de unión opcional (tal como un TSHR recombinante de tipo natural) que se une a al menos los auto-anticuerpos que se someten a detección se hace reaccionar con una muestra en presencia de un TSHR-quimera seleccionado, en donde las secuencias de unión al TSHR esenciales para los auto-anticuerpos bloqueantes o estimulantes están reemplazadas por secuencias que no se unen al tipo respectivo de auto-anticuerpo que se somete a detección. Los TSHR-quimeras descritos en el documento WO 01/63296 corresponden a los del documento WO 01/27634 antes comentados.

Las técnicas anteriores descritas en WO 01/27634 y WO 01/63296 están descritas también por Minich *et al.*, en *Journal of Endocrinology & Metabolism*, 89 (1): 352-356.

La base racional para estos estudios descritos por Minich y colegas fue una serie de informes en los que los auto-anticuerpos del TSHR con actividad estimulante del tiroides (es decir, agonistas de la TSH) interactúan con epítomos en el extremo N del TSHR (entre los aminoácidos 25 y 165), mientras que los auto-anticuerpos para el TSHR con actividad antagonista de la TSH interactúan con epítomos que son más C terminales (aminoácidos 261-370). Los estudios con la quimera A en particular indicaron que se unió bien a la TSH marcada con <sup>125</sup>I y las células transfectadas con esta quimera respondieron bien a la TSH.

La unión de la TSH marcada tanto a la quimera A como al TSHR de tipo natural fue inhibida por sueros que contienen auto-anticuerpos del TSHR. Sin embargo los efectos inhibidores de los sueros fueron más fuertes usando un receptor de tipo natural y este fue el caso de los auto-anticuerpos con actividades agonistas del TSH y/o antagonista de la TSH. Este ensayo basado en la inhibición de la unión de la TSH a la quimera parecía mostrar una diferenciación mejorada (comparada con el TSHR de tipo natural) entre auto-anticuerpos del TSHR con actividades agonistas de la TSH y antagonistas de la TSH, pero había un solapamiento considerable. Este solapamiento limita la aplicación clínica. Además, en estudios mucho más tempranos, los ensayos para auto-anticuerpos del TSHR basados en la inhibición de la unión de la TSH marcada al TSHR nativo (es decir, el de tipo natural) han sido modificados para seleccionar los auto-anticuerpos del TSHR con actividad antagonista de la TSH reduciendo la sensibilidad del ensayo (es decir, usando muestras de ensayo diluidas). Esto es eficaz porque los auto-anticuerpos antagonistas de la TSH están generalmente presentes en suero en concentraciones mucho mayores que los auto-anticuerpos agonistas de la TSH.

El documento WO03/018632 describe diversas regiones epitópicas de un receptor de tirotropina (TSH), sus usos y anticuerpos para el mismo. El documento WO00/05345 describe varias composiciones del receptor de la tirotropina

humana y métodos de diagnóstico y terapéuticos de usarlos. El "*The Embro Journal*" Vol 22. No. 11 pp. 2692-2703, 2002, el trabajo "*Glycoprotein hormone receptors: determinants in leucine-rich repetitions responsible for lectin specificity*", describe diversos receptores glicoproteínicos responsables del reconocimiento y unión a hormonas.

5 Con el fin de proporcionar ensayos mejorados para la detección y análisis de auto-anticuerpos del TSHR producidos en respuesta al TSHR, y para aliviar los problemas experimentados usando los métodos de la técnica anterior, la presente invención proporciona ahora un enfoque diferente del de la técnica anterior de Minich y colegas. En particular, los autores de la presente invención hemos mutado un solo aminoácido en el TSHR e investigado los efectos de las mutaciones sobre la unión del TSHR y la estimulación por diversos nuevos ligandos. Estos nuevos ligandos incluyen un auto-anticuerpo monoclonal estimulante del tiroides (hMAb TSHR1), un anticuerpo monoclonal de ratón (9D33) que es un antagonista potente del hMAb TSHR1 (y la TSH) y anticuerpos monoclonales de ratón que son fuertes agonistas de la TSH.

10 En contraste con la técnica anterior, nuestros estudios han conducido sorprendentemente a un sistema que proporciona una distinción mucho más clara entre diversos ligandos del TSHR. En particular, hemos identificado una mutación puntual específica del TSHR que esencialmente suprime la acción de los anticuerpos del TSHR (auto-anticuerpos y anticuerpos monoclonales) con actividades agonistas de la TSH, mientras que los efectos de los anticuerpos del receptor de la TSH (auto-anticuerpos y anticuerpos monoclonales) con actividad antagonista de la TSH son no afectados o aumentados por la misma mutación.

15 La presente invención proporciona por tanto medios nuevos y mejorados de distinguir entre poblaciones de los auto-anticuerpos del TSHR estimulantes y bloqueantes y se proporciona ahora mediante la presente invención una preparación del TSHR mutado que incluye al menos una mutación puntual caracterizada porque al menos el aminoácido Arg situado en una posición correspondiente al aminoácido 255 de un TSHR humano de longitud completa ha sido mutado para obtener un residuo de aminoácido cargado negativamente en dicha preparación del TSHR mutado, con lo cual dicha preparación del TSHR mutado interactúa diferencialmente con los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero de pacientes, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes y la TSH, porque (i) el efecto estimulante de los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero de pacientes que interactúan con la preparación del TSHR mutado está reducido sustancialmente o está suprimido esencialmente, cuando se compara con el efecto estimulante de los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero de pacientes que interactúan con una preparación de TSHR de referencia que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de dicha preparación del TSHR mutado, con la excepción de que dicha mutación de Arg situada en una posición correspondiente al aminoácido 255 del TSHR humano de longitud completa no está presente en dicha preparación del TSHR de referencia; (ii) el efecto estimulante de la TSH cuando interactúa con la preparación del TSHR mutado está esencialmente no afectado, cuando se compara con el efecto estimulante de la TSH que interactúa con dicha preparación del TSHR de referencia, y (iii) el efecto bloqueante de los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes que interactúan con la preparación del TSHR mutado está esencialmente no afectado o aumentado, cuando se compara con el efecto bloqueante de los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes que interactúan con dicha preparación del TSHR de referencia, con lo cual dicha preparación del TSHR mutado es eficaz en la detección diferencial y la identificación de los auto-anticuerpos estimulantes de TSHR de suero de pacientes, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes y la TSH en una muestra de fluido corporal que se somete a detección.

20 En una realización preferida de la presente invención al menos el aminoácido Arg situado en una posición correspondiente al aminoácido 255 de un TSHR humano de longitud completa está mutado puntualmente a un residuo de aminoácido cargado negativamente, preferiblemente Asp. Preferiblemente, por tanto se proporciona una preparación del TSHR mutado que incluye al menos una mutación puntual caracterizada porque al menos el aminoácido Arg en una posición correspondiente al aminoácido 255 de un TSHR humano de longitud completa ha sido mutado a Asp en dicha preparación del TSHR mutado, con lo cual dicha preparación del TSHR mutado interactúa diferencialmente con los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero de pacientes, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes y la TSH, porque (i) el efecto estimulante de los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero de pacientes que interactúan con la preparación del TSHR mutado está reducido sustancialmente o suprimido esencialmente, cuando se compara con el efecto estimulante de los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero de pacientes que interactúan con una preparación de TSHR de referencia que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de dicha preparación del TSHR mutado con la excepción de que dicha mutación de Arg en una posición correspondiente al aminoácido 255 de un TSHR humano de longitud completa no está presente en dicha preparación de TSHR de referencia; (ii) el efecto estimulante de la TSH cuando interactúa con la preparación de TSHR mutado está esencialmente no afectado, cuando se compara con el efecto estimulante de la TSH que interactúa con dicha preparación del TSHR de referencia; y (iii) el efecto bloqueante de los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes que interactúan con la preparación de TSHR mutado está esencialmente no afectado o aumentado, cuando se compara con el efecto bloqueante de los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes que interactúan con dicha preparación del TSHR de referencia, con lo cual dicha preparación de TSHR mutado es eficaz en la detección diferencial y la identificación de los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero de pacientes, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes y la TSH en una muestra del suero del de fluido corporal que se somete a detección.

25 Adecuadamente una preparación de TSHR mutado como es proporcionada por la presente invención puede incluir

un TSHR humano de tipo natural de longitud completa, que ha sido mutado como se ha descrito antes. Alternativamente, la preparación del TSHR mutado puede incluir fragmentos de un TSHR humano de tipo natural de longitud completa mutado como se ha descrito antes y cuyos fragmentos interactúan diferencialmente con los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero del paciente, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes y la TSH de nuevo como se ha descrito antes. Otras mutaciones de aminoácidos pueden estar presentes en una preparación del TSHR mutado como se ha descrito en la presente memoria, y dichas otras mutaciones pueden ser mutaciones puntuales para aumentar más la interacción diferencial de la preparación de TSHR mutado con los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero de pacientes, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes y la TSH, o pueden representar sustituciones, adiciones o deleciones silenciosas que no alteran o alteran sustancialmente la actividad o función biológica de la preparación del TSHR mutado como es proporcionada por la presente invención.

En el caso en el que otras mutaciones representen sustituciones conservadoras de aminoácidos, dichas sustituciones son aquellas que sustituyen un aminoácido dado en la preparación del TSHR mutado por otro aminoácido de características similares. Se consideran sustituciones típicamente conservadoras los reemplazamientos, uno por otro, entre los aminoácidos alifáticos; entre los de residuos con hidroxilo; entre los residuos con grupos ácidos; entre los residuos con grupos amida; entre los residuos básicos; y entre los residuos aromáticos.

El término "fragmento" como se usa en la presente memoria denota, en relación con una preparación del TSHR mutado de acuerdo con la presente invención, una secuencia de aminoácidos que corresponde a parte, pero no a la totalidad, de la secuencia de aminoácidos del TSHR humano de tipo natural y que incluye la mutación de al menos el aminoácido Arg en una posición correspondiente al aminoácido 255 de un TSHR humano de longitud completa a un residuo de aminoácido cargado negativamente como se ha descrito en la presente memoria y cuyo fragmento interactúa diferencialmente con los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero de pacientes, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes y la TSH, y por tanto facilita la detección diferencial y la identificación de los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero de pacientes, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes y la TSH en una muestra del fluido corporal que se somete a detección. Un "fragmento" como es proporcionado en el contexto de una preparación del TSHR mutado de acuerdo con la presente invención puede ser "uno que se mantiene libre", es decir, que no es parte de, o está fusionado a, otros aminoácidos o polipéptidos, o dichos fragmentos pueden estar constituidos dentro de un polipéptido mayor del cual forman una parte o región. Dichos fragmentos pueden, por tanto estar incorporados en un polipéptido de tipo "andamio", en donde se proporcionan aminoácidos adicionales para "retener" los aminoácidos de la preparación del fragmento del TSHR mutado en una conformación, disposición o secuencia que se asemeje o se asemeje sustancialmente a una conformación, disposición o secuencia de aminoácidos como están presentes en un sitio activo de una preparación del TSHR de tipo natural.

La información completa de secuencias para las secuencias de aminoácidos del TSHR humano de tipo natural se puede obtener fácilmente por referencia a publicaciones de la técnica, y/o bases de datos de aminoácidos para las secuencias del receptor, y como tales las secuencias completas de preparaciones mutadas adecuadas y fragmentos mutados basados en las mismas de acuerdo con la presente invención se pueden determinar fácilmente sobre la base de la secuencia de tipo natural conocida junto con el contenido de la presente memoria descriptiva..

Una preparación de TSHR mutado como es proporcionada por la presente invención tiene utilidad en diagnóstico en la detección diferencial y la identificación de los auto-anticuerpos estimulantes de suero de pacientes, los anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes y la TSH, y proporciona por tanto un paso adelante significativo en proporcionar un diagnóstico fiable de la enfermedad autoinmune asociada con una respuesta autoinmune al TSHR, aliviando mucho de los problemas asociados con los métodos de diagnóstico y los kits conocidos hasta ahora en la técnica como se ha indicado antes, y en particular proporciona ventajas sobre, y superiores a, la enseñanza proporcionada por los documentos WO 01/63296 y WO 01/27634.

De acuerdo con la presente invención, por tanto, se proporciona el uso de una preparación de un TSHR mutado sustancialmente como se ha descrito en lo que antecede en la detección diferencial y la identificación de los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero de pacientes, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes y la TSH, en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto (en particular un ser humano) del que se sospecha que padece la enfermedad tiroidea autoinmune, es susceptible a ella, la tiene o se recupera de ella.

También se proporciona por la presente invención el uso de una preparación del TSHR mutado sustancialmente como se ha descrito en lo que antecede en el diagnóstico en un sujeto (en particular un sujeto humano) del que se sospecha que padece la enfermedad tiroidea autoinmune, es susceptible a ella, la tiene o se recupera de ella.

La presente invención, por tanto, proporciona además un kit que comprende una preparación del TSHR mutado sustancialmente como se ha descrito en lo que antecede, junto con medios de detección que facilitan la monitorización de la interacción diferencial de la preparación del TSHR mutado con los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero de pacientes, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes y la TSH presentes en una muestra de fluido corporal que se somete a detección.

Por la presente invención se proporciona además un método de detectar diferencialmente los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero de pacientes, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes y la

5 TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto del que se sospecha que padece la enfermedad tiroidea autoinmune, es susceptible a ella, la tiene o se recupera de ella, cuyo método emplea una preparación del TSHR mutado para interactuar diferencialmente con, y detectar, los auto-anticuerpos estimulantes del THSR de suero de pacientes, los auto-anticuerpos bloqueantes del THSR de suero de pacientes y la TSH en dicha muestra de fluido corporal del sujeto.

10 Por la presente invención se proporciona además un método de diagnosticar el comienzo o la presencia probables de la enfermedad tiroidea autoinmune en un sujeto (en particular un ser humano) del que se sospecha que padece la enfermedad tiroidea autoinmune, es susceptible a ella, la tiene o se recupera de ella, cuyo método emplea una preparación de TSHR mutado sustancialmente como se ha descrito en lo que antecede para interactuar diferencialmente con, y detectar, los auto-anticuerpos estimulantes del THSR de suero de pacientes, los auto-anticuerpos bloqueantes del THSR de suero de pacientes y la TSH en una muestra de fluido corporal del sujeto, de modo que proporcione un diagnóstico del comienzo o la presencia probables de la enfermedad tiroidea autoinmune.

15 Por la presente invención se proporciona además un método de retrasar o impedir el comienzo de la enfermedad tiroidea autoinmune en un sujeto animal (en particular un sujeto humano) sospechoso de padecerla, susceptible a ella o que se está recuperando de dicha enfermedad, el cual método emplea una preparación del TSHR mutado sustancialmente como se ha descrito en lo que antecede para interactuar inicial y diferenciadamente con, y detectar, los anticuerpos estimulantes y/o bloqueantes del THSR indicativos del comienzo o presencia de la enfermedad tiroidea autoinmune en una muestra de fluido corporal obtenida del sujeto, con lo cual se proporciona un diagnóstico del probable comienzo de dicha enfermedad tiroidea autoinmune en el sujeto, y después tratar terapéuticamente al sujeto de modo que se retrase el comienzo y/o se impida la enfermedad tiroidea autoinmune. Por la presente invención se proporciona además un método de tratar la enfermedad tiroidea autoinmune en un sujeto, cuyo método emplea una preparación de TSHR mutado sustancialmente como se ha descrito en lo que antecede para interactuar inicial y diferenciadamente con, y detectar, los auto-anticuerpos estimulantes y/o bloqueantes del THSR producidos en respuesta al TSHR en una muestra del fluido corporal obtenido del sujeto, con lo cual se proporciona un diagnóstico de la enfermedad tiroidea autoinmune en el sujeto, y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico eficaz en el tratamiento de dicha enfermedad tiroidea autoinmune.

20 La cantidad de agente terapéutico administrada dependerá del estado de la enfermedad tiroidea autoinmune específica que se trata, posiblemente la edad del paciente y finalmente será a la discreción del médico que atiende el caso.

25 Por la presente invención se proporciona además, en combinación, un kit sustancialmente como se ha descrito en lo que antecede, junto con una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico eficaz en el tratamiento de la enfermedad tiroidea autoinmune sustancialmente como se ha descrito en lo que antecede.

30 La muestra del tejido corporal que se somete a detección por la presente invención comprenderá típicamente muestras de sangre u otras fracciones de fluidos de la sangre, tales como en particular muestras de suero, o muestras de plasma, pero la muestra en principio será otra muestra biológica, tal como saliva u orina o extractos de tejidos solubilizados o puede ser obtenida mediante una aguja para biopsia.

35 Una preparación de TSHR mutado de acuerdo con la presente invención sustancialmente como se ha descrito en lo que antecede es también adecuada para uso como un agente terapéutico en el tratamiento de la enfermedad tiroidea autoinmune o puede ser usada en la identificación de un agente terapéutico adecuado para el tratamiento de la enfermedad tiroidea autoinmune. Por ejemplo, una preparación del TSHR mutado se puede usar terapéuticamente para interactuar con, y eliminar esencialmente los auto-anticuerpos del THSR estimulantes y/o bloqueantes circulantes en un sujeto (en particular un sujeto humano) del que se sospecha que padece la enfermedad tiroidea autoinmune, es susceptible a ella, la tiene o se recupera de ella

40 Por lo tanto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una preparación de TSHR mutado de acuerdo con la presente invención sustancialmente como se ha descrito en lo que antecede, junto con un vehículo, diluyente o excipiente para la misma farmacéuticamente aceptable, en donde la preparación de TSHR mutado puede interactuar diferencialmente con los auto-anticuerpos estimulantes y/o bloqueantes producidos en respuesta al TSHR.

45 La presente invención proporciona además una preparación de TSHR mutado de acuerdo con la presente invención sustancialmente como se ha descrito en lo que antecede para uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Graves. En particular, una preparación de TSHR mutado como la proporcionada por la presente invención es adecuada para uso en la fabricación un medicamento para el tratamiento de al menos algunos de los signos de los ojos de la enfermedad de Graves.

50 Las composiciones o medicamentos de acuerdo con la presente invención deben contener una cantidad terapéutica o profiláctica de una preparación de TSHR mutado de acuerdo con la presente invención en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo puede ser cualquier sustancia compatible adecuada no tóxica para la administración de una preparación de TSHR mutado al paciente. Como vehículo se puede usar agua estéril, alcohol, grasas, ceras y sólidos inertes. También se pueden incorporar en las composiciones farmacéuticas adyuvantes farmacéuticamente aceptables, agentes tampones, agentes dispersantes y similares. Dichas composiciones pueden contener una sola preparación de TSHR mutado o pueden contener dos o más preparaciones de TSHR mutado de acuerdo con la

presente invención.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención son útiles para administración parenteral. Preferiblemente, las composiciones serán administradas parenteralmente, es decir, subcutáneamente, intramuscularmente o intravenosamente. Por tanto, la invención proporciona composiciones para administración parenteral a un paciente, en donde las composiciones comprenden una solución o dispersión de una preparación de TSHR mutado en un vehículo aceptable, como se ha descrito antes. La concentración de una preparación de TSHR mutado en la composición farmacéutica puede variar ampliamente, es decir desde menos de aproximadamente 0,1% en peso, siendo usualmente al menos aproximadamente 1% en peso hasta tanto como 20% en peso o más. Las composiciones farmacéuticas típicas para inyección intramuscular estarían hechas para contener, por ejemplo, 1 ml de agua tamponada estéril y 1 a 100  $\mu$ g de una preparación purificada de TSHR mutado de la presente invención. Una composición típica para infusión intravenosa podría estar hecha para contener hasta 100 a 500 ml de estéril de Ringer y 100 a 500 mg de una preparación purificada de TSHR mutado de la presente invención. Los métodos actuales para preparar composiciones administrables parenteralmente son bien conocidos en la técnica y están descritos con más detalles en diversas fuentes, incluyendo, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Science*, 15th Edition, Mack Publishing Company. Easton, Pa. (1980).

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un polinucleótido que comprende:

una secuencia de nucleótidos que codifica una preparación de TSHR mutado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

La presente invención proporciona además las secuencias de nucleótidos cebadores Arg 255 Asp F; Arg 255 Asp R; que se identifican en la Tabla 1 y/o una secuencia de nucleótidos que difiere de las mismas en una secuencia de codón de la misma debido a la degeneración del código genético. Se apreciará que aunque se proporcionen secuencias de nucleótidos solamente para los cebadores dados en la Tabla 1, los restantes nucleótidos que codifican preparaciones de TSHR de acuerdo con la presente invención se pueden obtener fácilmente por referencia a publicaciones de la técnica, y/o en las bases de datos de nucleótidos para secuencias del receptor, dado que la secuencia de longitud completa del TSHR humano de tipo natural es conocida en la técnica.

Más específicamente, puede verse con respecto a las técnicas específicas descritas en los Ejemplos que la mutación presente en una secuencia de polinucleótido como es proporcionada por la presente invención, y requerida para efectuar la mutación puntual presente en una preparación de TSHR humano mutado de acuerdo con la presente invención, se consigue mediante el uso del siguiente par de secuencias de cebadores identificadas en la Tabla 1: Arg 255 Asp F: Arg 255 Asp R - para efectuar la mutación de 255 (Arg) a 255 (Asp). Se prefiere además que los cebadores identificados en la Tabla 1 se usen en amplificación por la PCR para obtener la secuencia de nucleótidos mutada requerida y la correspondiente preparación de TSHR humano mutado de acuerdo con la presente invención se obtiene adecuadamente por, o es obtenible por, expresión de un polinucleótido de acuerdo con la presente invención. Una preparación de TSHR mutado de acuerdo con la presente invención sustancialmente como se ha descrito en lo que antecede puede ser expresada en diversos sistemas que generan proteínas recombinantes. Por ejemplo, se puede preferir la expresión en células de mamíferos, tales como células de ovario de hámster chino (abreviadamente CHO por sus iniciales en inglés) y el uso específico de células CHO se describe en los Ejemplos junto con el vector pcDNA5.1/FRT. Alternativamente, una preparación de TSHR mutado de la invención se puede producir sintéticamente por sintetizadores convencionales de péptidos empleando métodos que son bien conocidos en la técnica.

La presente invención proporciona además un proceso de preparar una preparación de TSHR sustancialmente como se ha descrito en lo que antecede, el cual procedimiento comprende:

(i) proporcionar una célula hospedante sustancialmente como se describe en la presente memoria;

(ii) hacer crecer la célula hospedante; y

(iii) recuperar del medio de crecimiento una preparación de TSHR mutado de acuerdo con la presente invención.

La recuperación de una preparación de TSHR mutado de acuerdo con la presente invención puede emplear típicamente técnicas convencionales de aislamiento y purificación, tales como, separaciones cromatográficas o separaciones inmunológicas, conocidas por los expertos ordinarios en la técnica.

Los polinucleótidos de la presente invención pueden estar en la forma de DNA, incluyendo, por ejemplo, cDNA, DNA sintético y DNA genómico apropiadamente obtenidos por clonación o producidos por técnicas sintéticas químicas o una de sus combinaciones. Una realización preferida de la presente invención comprende preferiblemente cDNA o DNA sintético.

Hay variantes de los polinucleótidos descritos en lo que antecede que codifican una preparación de TSHR mutado como el proporcionado por la presente invención. Una variante del polinucleótido puede ser una variante de origen natural, tal como una variante alélica de origen natural o puede ser una variante que no se sabe que se produzca naturalmente. Dichas variantes que no se producen naturalmente pueden ser preparadas por técnicas de mutagéne-

sis.

Entre los variantes de este tipo están las variantes que difieren de los polinucleótidos antes mencionados en sustituciones, deleciones o adiciones de nucleótidos. Las sustituciones, deleciones o adiciones pueden implicar uno o más nucleótidos. Las alteraciones en las regiones codificadoras pueden producir sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras.

Los polinucleótidos variantes son adecuadamente al menos 70% idénticos en su longitud completa a un polinucleótido que codifica una preparación de TSHR mutado como se ha descrito en la presente memoria, y los polinucleótidos que son complementarios con dichos polinucleótidos o se hibridan con ellos. Alternativamente, la mayoría de los polinucleótidos altamente preferidos son los polinucleótidos que comprenden una región que es al menos 80% idéntica en su longitud completa a un polinucleótido que codifica una preparación de TSHR mutado como se ha descrito en la presente memoria y los polinucleótidos que son complementarios a dichos polinucleótidos o se hibridan con ellos. A este respecto los polinucleótidos al menos 90% idénticos en su longitud completa a los mismos son particularmente preferidos, y entre estos son especialmente preferidos los polinucleótidos con al menos 95% de identidad. Además, los polinucleótidos que tienen al menos 97% de identidad son altamente preferidos entre los que tienen al menos 95% de identidad, y entre estos los que tienen al menos 98% de identidad, y al menos 99% de identidad son particular y altamente preferidos, siendo los más preferidos los de al menos 99% de identidad.

Sustancialmente como se ha descrito en lo que antecede estos son polinucleótidos que se hibridan a las secuencias descritas antes en la presente memoria. A este respecto hay polinucleótidos que se hibridan en condiciones rigurosas a los polinucleótidos antes descritos. Como se usa en la presente memoria, la expresión "condiciones rigurosas" significa que la hibridación ocurrirá solamente si hay al menos 95% y preferiblemente al menos 97% de identidad complementaria entre las secuencias.

La presente invención se refiere también a vectores, que comprenden un polinucleótido o polinucleótidos de la presente invención, a células hospedantes que están manipuladas genéticamente con vectores de la invención y a la producción por técnicas recombinantes de una preparación de TSHR mutado como se ha descrito antes en la presente invención.

La presente invención, por tanto, proporciona además un sistema vector biológicamente funcional que lleva un polinucleótido sustancialmente como se ha descrito en lo que antecede y que es capaz de introducir el polinucleótido en el genoma de un organismo hospedante.

Las células hospedantes puede ser manipuladas genéticamente para incorporar polinucleótidos y expresar una preparación de TSHR mutado de la presente invención y la presente invención proporciona además una célula hospedante que está transformada o transfectada con un polinucleótido o uno o más polinucleótidos o un sistema vector, cada uno sustancialmente como se describe en la presente memoria. La secuencia de DNA apropiada puede ser insertada en el vector por cualquiera de una variedad de técnicas usuales bien conocidas y rutinarias.

La presente invención proporciona además un proceso de identificar una preparación de TSHR mutado que puede usarse para la detección diferencial y la identificación de los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero de pacientes, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR en el suero de un paciente y la TSH en una muestra de fluido corporal, comprendiendo dicho proceso identificar las regiones interactuantes potenciales del TSHR y los residuos de aminoácidos presentes en ellas que se identifican además en virtud de su capacidad (incluyendo su diferente capacidad con relación al TSHR de tipo natural) para interactuar con una pareja de unión para el TSHR (tal como los anticuerpos hMAb TSHR1, 9D33 o la TSH), puesto que son los aminoácidos candidatos requeridos para la interacción del TSHR con uno o más de los auto-anticuerpos del TSHR estimulantes de suero de pacientes, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes y la TSH; realizar mutaciones puntuales de dichos aminoácidos candidatos y monitorizar la interacción de la preparación resultante de TSHR mutado con la pareja de unión, de modo que se identifiquen las mutaciones puntuales que dan como resultado la inhibición de la interacción de TSHR resultante mutado con al menos uno de los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero de pacientes, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes y la TSH, en donde se realiza una mutación puntual para la Arg presente en una posición correspondiente al aminoácido número 255 de un TSHR humano de longitud completa, en donde la Arg 255 se somete a una mutación puntual selectivamente para obtener un residuo de aminoácido cargado negativamente, tal que la preparación de TSHR mutado interactúe diferencialmente con los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR y la TSH.

La presente invención se puede usar también para identificar los residuos de aminoácidos que son claves para las regiones epitópicas del TSHR, con lo cual se proporciona un proceso que comprende identificar las regiones de interacción potenciales del TSHR y los residuos de aminoácidos presentes en ellas que se identifican además en virtud de su capacidad (incluyendo diferente capacidad con respecto al TSHR de tipo natural) para interactuar con una pareja de unión para el TSHR (tal como los anticuerpos hMAb TSHR1, 9D33 o la TSH), puesto que son los aminoácidos candidatos requeridos para la interacción del TSHR con uno o más de los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero de pacientes, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes y la TSH; y realizar mutaciones puntuales de dichos aminoácidos candidatos y monitorizar la interacción de la preparación resultante del TSHR mutado con la pareja de unión, de modo que se identifiquen los aminoácidos claves requeridos para la interacción respectiva del TSHR con uno o más de los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR del suero

del paciente, los auto-anticuerpos bloqueantes del THSR suero del paciente y la TSH, en donde se realiza la mutación puntual para la Arg presente en una posición correspondiente al aminoácido número 255 de un TSHR humano de longitud completa, en donde la Arg 255 se somete a mutación puntual selectivamente para obtener un residuo de aminoácido cargado negativamente, tal que la preparación de TSHR mutado interactúe diferencialmente con los auto-anticuerpos estimulantes del THSR, los auto-anticuerpos bloqueantes del THSR y la TSH.

La presente invención puede ser empleada además para identificar los residuos de aminoácidos requeridos para la conformación de dicho TSHR de modo que se facilite su interacción con uno o más de los auto-anticuerpos estimulantes del THSR de suero de pacientes, los auto-anticuerpos bloqueantes del THSR de suero de pacientes y la TSH, con lo cual se proporciona un proceso que comprende identificar las regiones de interacción potenciales del THSR y los residuos de aminoácidos presentes en las mismas que se identifican además en virtud de su capacidad incluyendo diferente capacidad con respecto al TSHR de tipo natural) para interactuar con una pareja de unión para el TSHR (tal como los anticuerpos hMAb TSHRI, 9D33 o la TSH), puesto que son los aminoácidos candidatos requeridos para la conformación de dicho TSHR de modo que se facilite su interacción con dicho uno o más de los auto-anticuerpos estimulantes del THSR de suero de pacientes, los auto-anticuerpos bloqueantes del THSR de suero de pacientes y la TSH; realizar mutaciones puntuales de dichos aminoácidos candidatos y monitorizar la interacción de la preparación resultante del TSHR mutado con la pareja de unión, de modo que se identifiquen los aminoácidos claves requeridos para la conformación de dicho TSHR de modo que se facilite la interacción respectiva del TSHR con uno o más de los auto-anticuerpos estimulantes del THSR de suero de pacientes, los auto-anticuerpos bloqueantes del THSR de suero de pacientes y la TSH, en donde la mutación es la mutación de Arg 255 para dar un residuo de aminoácido cargado negativamente.

En cada uno de los procesos anteriores la interacción de la preparación de TSHR mutado que se monitoriza es preferiblemente la estimulación del TSHR mutado, o el bloqueo de dicha estimulación, monitorizando la producción de AMP cíclico como resultado de la interacción de la pareja de unión con la preparación del TSHR mutado.

Como se describe en la presente memoria, el aminoácido Arg presente en una posición correspondiente al aminoácido número 255 de un TSHR humano de longitud completa ha sido identificado por la presente invención como un aminoácido clave del TSHR humano requerido para la unión del anticuerpo y además que su mutación puede conseguir el diagnóstico diferencial de las poblaciones de anticuerpos estimulantes y bloqueantes.

De acuerdo con la presente invención, por tanto, se proporciona el aminoácido Arg presente en la preparación del TSHR en una posición correspondiente al aminoácido número 255 de un TSHR humano de longitud completa, para uso como sitio de unión para los anticuerpos del TSHR. Además se proporciona por la presente invención el aminoácido Arg presente en una preparación de TSHR en una posición correspondiente al aminoácido número 255 de un TSHR humano de longitud completa, para uso como sitio de unión para los auto-anticuerpos del TSHR o uno o más de sus fragmentos. Además se proporciona por la presente invención el aminoácido Arg presente en una preparación del TSHR en una posición correspondiente al aminoácido número 255 de un TSHR humano de longitud completa, para uso como sitio de unión para una pareja de unión al TSHR que comprende o se deriva de un anticuerpo monoclonal o recombinante humano o uno o más de sus fragmentos. Se proporciona además por la presente invención el uso de un residuo de aminoácido mutado cargado negativamente presente en una preparación del TSHR mutado en una posición correspondiente al aminoácido número 255 de un TSHR humano de longitud completa, para la detección diferencial de uno o más de los auto-anticuerpos estimulantes del THSR de suero de pacientes, los auto-anticuerpos bloqueantes del THSR de suero de pacientes y la TSH, en una muestra de fluido corporal que se somete a detección, y preferiblemente en identificar los auto-anticuerpos estimulantes del THSR ausentes o presentes en la muestra del fluido corporal. Además se proporciona por la presente invención el uso de un residuo aminoácido mutado presente en una preparación de TSHR en una posición correspondiente al aminoácido número 255 de un TSHR humano de longitud completa, para el diagnóstico de la enfermedad tiroidea autoinmune. Más específicamente, se proporciona por la presente invención el uso de Asp presente en una preparación del TSHR mutado en una posición correspondiente al aminoácido número 255 de un TSHR humano de longitud completa, para la detección diferencial de uno o más auto-anticuerpos estimulantes del THSR de suero de pacientes, auto-anticuerpos bloqueantes del THSR de suero de pacientes y la TSH, en una muestra de tejido corporal que se somete a detección, y preferiblemente en identificar los auto-anticuerpos estimulantes del THSR presentes o ausentes en la muestra del fluido corporal. Se proporciona además por la presente invención el uso de Asp presente en una preparación de TSHR mutado en una posición correspondiente al aminoácido número 255 de un TSHR humano de longitud completa, para el diagnóstico de la enfermedad tiroidea autoinmune.

También se proporciona un complejo de unión que comprende: (a) un sitio de unión como el representado por la Arg presente en una posición correspondiente al aminoácido número 255 de un TSHR humano de longitud completa, y (b) una pareja de unión para dicho sitio, la cual pareja de unión preferiblemente comprende o se deriva de un anticuerpo monoclonal o recombinante humano o uno o más de sus fragmentos.

Adecuadamente la pareja de unión comprende o se deriva de un anticuerpo monoclonal humano o uno o más de sus fragmentos, reactivo con el TSHR. Alternativamente, la pareja de unión comprende o se deriva de un anticuerpo recombinante humano o uno o más de sus fragmentos, reactivo con el TSHR. Preferiblemente la pareja de unión comprende un anticuerpo monoclonal o recombinante humano o uno o más de sus fragmentos, reactivo con el TSHR. Preferiblemente, la pareja de unión puede ser caracterizada además por su capacidad para inhibir la unión

de la TSH al TSHR, y/o su capacidad para estimular el TSHR, ambas de cuyas capacidades se han visto comparables a las propiedades inhibitoras y estimulantes respectivas de los auto-anticuerpos del TSHR presente en sueros obtenidos de pacientes con la enfermedad de Graves.

5 Una pareja de unión particularmente preferida de un complejo es el anticuerpo monoclonal humano del TSHR denominado hMAb TSHR1 como se describe en la solicitud de patente PCT WO 2004/050708A2. Como se ha indicado antes en el contexto de la técnica anterior, el sitio de unión del hMAb TSHR1 no ha sido descrito y en vista de la naturaleza compleja del TSHR y también de la naturaleza heterogénea de la respuesta de anticuerpos al mismo, no habría sido posible, sobre la base de la descripción de la técnica anterior, determinar o predecir la región epitópica o sitio de unión para el mismo.

10 Las siguientes explicaciones ilustrativas se proporcionan para facilitar la comprensión de ciertos términos usados en la presente memoria. Las explicaciones se proporcionan a modo de conveniencia y no son limitativas de la invención.

15 PAREJA DE UNIÓN PARA EL TSHR describe una molécula que tiene una actividad de unión específica para el TSHR. Una pareja de unión como se describe en la presente memoria puede ser derivada naturalmente o ser producida total o parcialmente de un modo sintético. Dicha pareja de unión tiene un dominio o región que específicamente se une a, y por tanto es complementaria, de una o más regiones epitópicas del TSHR, y puede incluir anticuerpos estimulantes y/o bloqueantes para el TSHR, que pueden ser auto-anticuerpos, anticuerpos monoclonales o recombinantes u otros ligandos tal como la TSH.

20 SITIO DE UNIÓN significa un sitio, tal como un átomo, grupo funcional o residuo de aminoácido del TSHR, que puede unirse a un anticuerpo del TSHR u otro ligando o a la pareja de unión para el mismo. Dependiendo de la molécula particular en la cavidad, los sitios pueden exhibir interacciones de unión atractivas o repulsivas producidas por la carga, consideraciones estéricas y similares.

25 BLOQUEO DEL TSHR por una pareja de unión denota la capacidad de la pareja de unión de unirse al TSHR y por tanto inhibir, por ejemplo, la producción de AMP cíclico formado como resultado de la de la estimulación del TSHR como se ha descrito en la presente memoria.

ANTICUERPOS BLOQUEANTES DEL TSHR son los que se unen al TSHR y efectúan el bloqueo del TSHR como se ha descrito en la presente memoria.

30 INTERACTUAR DIFERENCIALMENTE o INTERACTUACIÓN DIFERENCIAL, con respecto a una preparación de TSHR mutado como es proporcionado por la presente invención, significa que: (i) el efecto estimulante de los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero de pacientes que interactúan con la preparación de TSHR mutado es sustancialmente reducido o esencialmente suprimido, cuando se compara con el efecto estimulante de los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero de pacientes que interactúan con una preparación de TSHR de referencia que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de la preparación de TSHR mutado con la excepción de que la mutación de Arg en una posición correspondiente al aminoácido 255 de un TSHR humano de longitud completa no está presente en la preparación del TSHR de referencia; (ii) el efecto estimulante de la TSH cuando interactúa con la preparación de TSHR mutado está esencialmente no afectado, cuando se compara con el efecto estimulante de la TSH que interactúa con la preparación de TSHR de referencia; y (iii) el efecto bloqueante de los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes que interactúan con la preparación de TSHR mutado está esencialmente no afectado o aumentado, cuando se compara con el efecto bloqueante de los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes que interactúan con la preparación de TSHR de referencia. Las interacciones antes señaladas (tanto las inhibidas, no cambiadas o aumentadas) son en el contexto de cualquier estimulación del TSHR, o el bloqueo del TSHR. Con respecto a la interacción de unión, o afinidad, de una preparación de TSHR mutado con los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero de pacientes, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes y la TSH, como se describen con detalle en los Ejemplos, esto puede no parecer en ciertos casos que corresponda a los resultados observados con respecto a la estimulación y/o bloqueo de las preparaciones del TSHR mutado como las proporcionadas por la presente invención, pero puede ser debido, por ejemplo, a niveles reducidos de expresión del receptor mutado.

"F" (por la palabra inglesa "*forward*") en el contexto de definiciones de cebadores y su denominación de nota un cebador delantero.

50 CÉLULA HOSPEDANTE es una célula que ha sido transformada o transfectada o es capaz de transformación o transfección por una secuencia de polinucleótido exógena.

IDENTIDAD, como es conocido en la técnica, es la relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótido, como se determina comparando las secuencias.

55 PREPARACIÓN DE TSHR MUTADO denota una preparación de TSHR que incluye una o más mutaciones puntuales caracterizada porque la preparación resultante del TSHR facilita la detección diferencial y la identificación de los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero de pacientes, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes y la TSH en una muestra de fluido que se somete a detección. Específicamente, sin embargo,

una preparación de TSHR mutado como es proporcionada por la presente invención incluye al menos una mutación puntual, caracterizada porque al menos el aminoácido Arg en una posición correspondiente al aminoácido 255 de un TSHR humano de longitud completa ha sido mutado para obtener un residuo de aminoácido diferente aminoácido en la preparación de TSHR mutado.

5 MUTACIÓN PUNTUAL denota el reemplazamiento de un aminoácido o nucleótido por otro aminoácido o nucleótido. Esto abarca dentro del alcance de la presente invención una mutación puntual conseguida por el uso de cebadores de PCR y la expresión subsiguiente de las secuencias mutadas de nucleótidos. También está abarcado dentro del término mutación puntual como se usa en la presente memoria las mutaciones que se pueden conseguir, por técnicas de síntesis conocidas, por ejemplo empleando sintetizadores convencionales de péptidos para efectúa la síntesis de una secuencia de polipéptido deseada en donde la secuencia sintetizada incluirá el reemplazamiento de un aminoácido deseado con otro aminoácido.

"R" (por la palabra inglesa "reverse" en el contexto de las definiciones de cebadores y su denominación denota un cebador inverso.

15 ESTIMULACIÓN DEL TSHR por una pareja de unión como se ha descrito en la presente memoria denota la capacidad de la pareja de unión de unirse al TSHR y por ello efectuar, por ejemplo, la producción de AMP cíclico como resultado de dicha unión al TSHR. Dicha estimulación es análoga a las respuestas observadas en la unión de la TSH o los auto-anticuerpos del TSHR al TSHR y de este modo una pareja de unión como se ha descrito en la presente memoria mimetiza el efecto de la TSH o un auto-anticuerpo para el TSHR, uniéndose al TSHR.

20 ANTICUERPOS ESTIMULANTES DEL TSHR son los que se unen al TSHR y efectúan la estimulación del TSHR como se ha descrito en la presente memoria.

TSH denota tiotropina u hormona estimulante del tiroides.

TSHR denota receptor de tiotropina u hormona estimulante del tiroides, también denominado en la técnica receptor de la TSH.

25 AUTO-ANTICUERPOS PARA (O DE) LA TSHR denota los anticuerpos producidos contra el TSHR en el curso de una enfermedad autoinmune asociada con el TSHR. Dependiendo del tipo de anticuerpos producidos, puede ocurrir bien sea la inhibición de la formación y liberación de T3 y T4 debido a la protección del TSHR de las moléculas de la TSH o bien sea, por otro lado, la T3 y T4 pueden ser liberadas de un modo incontrolado debido a que los anticuerpos producidos mimetizan las acciones de la TSH y estimulan la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas.

30 PREPARACIÓN DE TSHR denota una secuencia de polipéptido que puede corresponder a la longitud completa del TSHR de tipo natural o puede incluir una o más variantes, análogos, derivados o sus fragmentos como se ha descrito en la presente memoria.

La presente invención se ilustrará a continuación por las siguientes Tablas y Ejemplos, que de ningún modo limitan el alcance de la invención.

#### Ejemplos

35 Se seleccionaron y mutaron a alanina diversos aminoácidos (abreviadamente a veces en lo sucesivo "aa") en el dominio extracelular del TSHR. Estos aa incluyeron:

40 Asp43 porque es un residuo cargado (las interacciones carga-carga son conocidas por ser importantes en la interacción del TSHR con los auto-anticuerpos del TSHR y con la TSH (Rees Smith B., McLachlan SM., Furmaniak J., 1988 *Autoantibodies to the thyrotropin receptor*. *Endocr. Rev.* 9: 106-121). Además la Asp43 está localizada en la primera repetición (es decir, las más N terminal) del dominio rico en leucina [(abreviadamente LRD por la expresión inglesa *Leucine rich domain*); aa 36-281) del TSHR. Similarmente Glu61 se eligió por estar cargado y en la 2ª repetición del LRD del TSHR.

45 Glu157 (en la 6ª repetición del LRD del TSHR) se seleccionó sobre la base de estar cargado y su propuesta implicación en la formación de un puente salino con Lys183 del TSHR (Duprez L., Parma J., Costagliola S., Hermans J., Van-Sande J., Dumont JE., Vassart G., 1997 *Constitutive activation of TSHR by spontaneous mutations affecting the N-terminal extracelular domain*. *FEBS Letters* 409: 469-474). Dos aa cargados negativamente, Glu178 y Asp203 se seleccionaron sobre la base de su posición en las repeticiones 7ª y 8ª del LRD, respectivamente.

50 Los aa Asp232 y Arg255 cargados se seleccionaron sobre la base de sus posiciones en las repeticiones 9ª y 10ª del LRD del TSHR respectivamente. También un aa aromático Trp258 en la repetición 10ª del LRD fue mutado a alanina. Además, los aa Asp276 y Ser281 en el C terminal del LRD fueron mutados debido de su propuesta implicación en la activación del TSHR (Corvilain B., Van Sande J., Dumont J. E. y Vassart G., 2001 *Somatic and germline mutations of the TSH receptor and thyroid disease*. *Clin. Endocrinol.* 55:143-158; y Russo D., Arturi F., Chieari E., Filetti S., 1997 *Molecular insights into TSHR abnormality and thyroid disease*. *J. Endocrinol. Invest.* 20: 36-47).

#### MÉTODOS

Introducción de mutaciones de aminoácidos específicos en la secuencia del TSHR humano usando PCR

La secuencia de nucleótidos del TSHR de longitud completa (número de acceso *Swiss prot*: P16473 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=136448>; Número de acceso de nucleótidos *NCBI Entrez* NM\_000369-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=4507700>) se clonó en el vector pcDNA5.1/FRT (Invitrogen) usándolos sitios de restricción BamHI y XhoI siguiendo los métodos de clonación estándares.

Se diseñaron para cada mutación cebadores de PCR específicos "delantero" y "inverso" PCR (Tabla 1) para cambiar la secuencia codificadora de nucleótidos para que codificara la mutación del aminoácido apropiado. Se pusieron a punto dos reacciones separadas de la PCR (PCR 1 y PCR 2).

Reactivos añadidos en las reacciones PCR1: 32,5 µL de H<sub>2</sub>O, 2,5 µL de 20x trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTP) (5 mmol/L), 5 µL de 10x de tampón de DNA-polimerasa Puf (10x tampón Pfu; Promega), 2,5 µL de cebador T7 10 pmol/µL T7 (Tabla 1), 2,5 µL de cebador "inverso" 10 pmol/µL para mutación, 4 µL de DNA molde de pcDNA5.1/FRT TSHR (100ng) y 1 µL DNA-polimerasa Pfu (3 unidades, Promega). Reactivos añadidos en la reacciones PCR2: 34,5 µL de H<sub>2</sub>O, 2,5 µL de 20x dNTP (5 mmol/L conc.), 5 µL de 10x tampón Pfu, 2,5 µL de cebador "delantero" para mutación (Tabla 1) de 10 pmol/µL, 2,5 µL de cebador inverso de la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina (cebador BGHR por la expresión inglesa *Bovine Growth Hormone Reverse*) (Tabla 1) de 10 pmol/µL, 2 µL de DNA molde (100ng) y 1 µL DNA-polimerasa Pfu (3 unidades).

La cantidad de DNA molde usada es dependiente de la longitud de los productos de la PCR que se han de preparar. En el ejemplo mostrado antes, el producto de la PCR 1 es de una longitud de 800 pares de bases y el producto de la PCR 2 es de una longitud de 1600 pares de bases. Los tamaños de los productos de las PCR1 y PCR 2 dependen de la localización del aminoácido que ha de ser mutado dentro de la secuencia del TSHR.

Las reacciones PCR se llevaron a cabo usando el GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) a 94°C durante 5 minutos seguido por 30 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 40°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos (con velocidades de rampa de 50%, 94°C a 40°C y 40°C a 72°C) seguido por 72°C durante 7 minutos tras lo cual la mezcla de reacción se enfrió a 4°C.

Los productos de la PCR1 y la PCR 2 se hicieron correr en geles de agarosa al 1% en tampón TAE (40 mmol/L Tris-HCl, pH 8. EDTA de 0,1 mmol/L, ácido acético glacial al 0,114%) y las bandas se recortaron del gel usando una hoja de escalpelo. Las bandas se limpiaron usando un kit GeneClean II (Anachem Ltd, Luton, LU2 0EB, UK) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de DNA se determinó usando métodos estándares de la técnica. Este DNA se usó para poner a punto la reacción PCR 3 para construir la secuencia del TSHR completa que contenía la mutación. Las reacciones PCR 3 contenían: 2,5 µL de tampón 10x Pfu, 1 µL de 20x dNTP, 200ng de producto de la PCR 1 y 200ng de producto de la PCR 2, 1 µL de DNA-polimerasa de Pfu y agua hasta un volumen final de 25 µL. Esta mezcla de reacción se colocó en el sistema GeneAmp PCR para 7 ciclos de 94°C durante 1,5 minutos, 65°C durante 1,5 minutos y 72°C durante 1,5 minutos. La temperatura se aumentó luego a 94°C, durante 2 minutos y la mezcla de reacción PCR 4 (2,5 µL de 10x tampón Pfu, 1,3 µL de 20x dNTP, 2,5 µL de cebador T7 de 10 pmol/µL, 2,5 µL de cebador BGHR de 10 pmol/L, 1 µL DNA-polimerasa de Pfu y agua hasta 25 µL) se añadió a la mezcla de reacción PCR 3. Esta mezcla se llevó a 30 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 52°C durante 1 minuto y 72°C 2 minutos (con una velocidad de rampa de 50% desde 94°C a 52°C y desde 52°C a 72°C) seguido por 10 minutos a 72°C tras lo cual la mezcla de reacción se enfrió a 4°C.

El producto de la PCR se limpió usando 50 µL de una mezcla fenol/cloroformo 1:1 precipitada con acetato de sodio y etanol y se secó al aire como se describe en la técnica. El DNA se volvió a suspender en 1 x tampón B para digestión por restricción (Roche Diagnostics, Lewes, BN7 1LG, UK) y se cortó con las enzimas de restricción BamHI/XhoI durante 4 horas a 37°C. La banda de la PCR se hizo correr sobre un gel de agarosa al 1% y la banda se recortó y limpió usando un kit GeneClean II. El producto de la PCR se ligó luego en pBluescript (Stratagene) cortado con BamHI/XhoI y las mutaciones se verificaron usando secuenciación de DNA (kit de secuenciación de DNA Sequenase versión 2 de Amersham Biosciences) como se describe en la técnica. El DNA del TSHR mutado se separó luego del pBluescript usando las enzimas de restricción BamHI/XhoI y se clonó en el vector pcDNA 5.1/FRT (Invitrogen) y la secuencia se verificó de nuevo como antes.

Transfección de construcciones de TSHR mutado en células CHO usando el sistema Flp-In

Se usó un matraz confluyente para células Flp-In-CHO (Invitrogen) para sembrar los pocillos de una placa de 24 pocillos a  $1 \times 10^5$  –  $1,5 \times 10^5$  células/pocillo en DMEM (Invitrogen), suero de ternera fetal al 10% (FCS) (Invitrogen), 1x L-Glutamina (Invitrogen) y 1 x aminoácidos no esenciales (AANE) (Invitrogen) sin antibióticos. Las células se incubaron durante una noche a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% y humedad >95%.

El DNA de pcDNA5.1/FRT TSHR (antes descrito) y el DNA de POG44 (Invitrogen) se diluyeron para dar soluciones de 0,01µg/mL y 0,1µg/mL, respectivamente en agua estéril. El DNA de POG44 DNA y el DNA del TSHR se mezclaron a 3 concentraciones diferentes: (1) 9 µL de DNA de POG44, 10 µL de DNA de TSHR y 31 µL de Optimem I (Invitrogen); (2) 8 µL de DNA de POG44, 20 µL de DNA de TSHR y 22 µL de Optimem I; (3) 9,5 µL de DNA POG44, 5 µL de DNA de TSHR y 35,5 µL de Optimem I y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añadieron

50  $\mu$ L de lipofectamina diluida 1:25 (Invitrogen) en Optimem I a cada tubo (1-3 anteriores) y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Cada mezcla de incubación se añadió luego a 1 pocillo (de una placa de 24 pocillos) de células Flp-In-CHO confluentes al 95% y se incubó durante la noche en las condiciones descritas antes. Los medios de cultivo se retiraron y cambiaron por DMEM, FCS al 10%, 1x L-glutamina, 1x AANE y 1x penicilina (100 u/mL)/estreptomocina (100 $\mu$ g/mL) (Invitrogen) y la incubación se continuó durante la noche. Las células se desprendieron del pocillo usando solución 1 x tripsina/ EDTA solución (Invitrogen) y se dividieron en 4 nuevos pocillos y se dejaron crecer en los medios como antes con adición de 600 $\mu$ g/mL de higromicina (Invitrogen).

Las células transfectadas con ambos, el DNA del plásmido POG44 y del TSHR pcDNA5.1/FRT son capaces de insertar el DNA del TSHR en el genoma de las células Flp-In-CHO y conferir resistencia a higromicina a las células de modo que podrán crecer en medios de selección de higromicina. El sistema Flp-In de Invitrogen está diseñado de modo que el TSHR de nuestras construcciones será insertado en el sitio FRT en las células Flp-In-CHO por el POG44. Las células Flp-In-CHO contienen un sitio Flp-In por célula, por tanto los DNA del TSHR se insertarán en el mismo lugar en el genoma en cada experimento y estarán presentes en una copia por célula. Este sistema tiene la ventaja de que no es necesario detectar las colonias de células que tienen los niveles de expresión óptimos (seguido por clonar células para encontrar una línea celular estable). Consecuentemente, las células que expresan TSHR mutado que crecen en medios de selección de higromicina pueden ser expandidas rápidamente y usadas en ensayos diferentes.

#### Análisis de estimulación de la producción de AMP cíclico

La capacidad de hMAb TSHR1 y TSH para estimular la producción de AMP cíclico en células Flp-In-CHO que expresan ambos tipos de TSHR, el de tipo natural y el mutado, se analizó de acuerdo con el documento WO2004/050708A2. Dicho brevemente, las células CHO se sembraron en placas de 96 pocillos (12.500 – 20.000 células por pocillo) y se incubaron durante 48 horas en DMEM (Invitrogen) que contenía al suero de ternera fetal al 10%. El DMEM se retiró luego y se añadieron diluciones de TSH porcina (RSR Ltd; 0,01-3ng/mL) y Fab de hMAb TSHR1 (0,1-10ng/mL) en tampón de ensayo de AMP cíclico (solución salina tamponada de Hank libre de NaCl que contenía 1 g/L de glucosa, 20 mmol/L de HEPES, 222 mmol/L de sacarosa, 15 g/L seroalbúmina bovina (BSA) y 0,5 mmol/L de 3-isobutil-1-metil-xantina, pH 7,4) y se incubó durante 1 hora a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% en aire. Después de la retirada de las soluciones de análisis, las células se lisaron y ensayaron para AMP cíclico usando un sistema de inmunoensayo enzimático Biotrak de Amersham Biosciences. Los experimentos con sueros que contenía anticuerpos del receptor de la TSH con actividad agonista de TSH se llevaron a cabo usando el mismo método, excepto que las muestras de suero se diluyeron 1:10 en tampón de ensayo de AMP cíclico antes del ensayo.

#### Medida de la actividad agonista del TSH

En algunos experimentos, se evaluó la capacidad de los sueros de pacientes y anticuerpos monoclonales de ratón para el TSHR de inhibir la actividad estimulante de la TSH porcina. Esto se llevó a cabo comparando (a) el efecto estimulante de la TSH sola con (b) el efecto estimulante de la TSH en presencia de suero de pacientes o anticuerpo monoclonal de ratón. Dicho brevemente, 50  $\mu$ L de suero de paciente diluido en tampón de ensayo de AMP cíclico o 50  $\mu$ L de anticuerpo monoclonal de ratón se añadieron a pocillos de células seguido por 50  $\mu$ L de tampón o 50  $\mu$ L de TSH (0,6ng/mL - concentración final 0,3ng/mL) y se incubaron para el ensayo de estimulación descrito antes. Después de la retirada de la solución de análisis, las células se lisaron y analizaron en cuanto al AMPc usando un sistema de inmunoensayo enzimático Biotrak.

#### Preparación de preparaciones TSHR de tipo natural y mutado solubilizadas en detergente

Células Flp-In-CHO que expresan el TSHR de tipo natural o el mutado se hicieron crecer hasta confluencia en matraces de 175 cm<sup>2</sup>, las células se lavaron con PBS de Dulbecco (sin iones magnesio ni calcio) (Invitrogen) y se aplicaron por rascado en 10 mL de tampón A enfriado con hielo (NaCl 50 mmol/L, Tris-HCl 10 mmol/L, pH 7,5), que contenía inhibidor de proteasa de Roche Diagnostics (1 comprimido de código del producto 1836145 por 50 mL de solución) y 1 mmol/L de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)). Las células se centrifugaron a 1000xg durante 5 minutos a 4°C, el sedimento se resuspendió en 1 mL de tampón A y se homogeneizó en un homogeneizador de vidrio sobre hielo. Las membranas celulares se sedimentaron a 12.000xg durante 30 minutos a 4°C y se resuspendieron en 6 mL de tampón A más 0,5 g/L de aziduro de sodio y 2,75 g/L de yodoacetamida y se sedimentaron como antes. El sedimento de membranas se resuspendió luego en 1 mL de tampón A enfriado con hielo que contenía Triton X-100 al 1% y 0,5 g/L de aziduro de sodio y se homogeneizó. Las preparaciones de TSHR solubilizadas se centrifugaron a 90.000xg durante 2 horas a 4°C y los líquidos sobrenadantes se conservaron a -70°C en partes alícuotas.

#### Unión de TSH marcada y anticuerpos monoclonales marcados a los TSHR de tipo natural y mutado

En estos experimentos se prepararon, como se ha descrito previamente (documento WO2004/050708A2), TSH porcina (70 unidades por mg de RSR Ltd) y anticuerpos monoclonales (Fab o IgG) tanto no marcados como marcados con <sup>125</sup>I.

Primeramente, se establecieron los perfiles de dilución de cada preparación de TSHR. En estos experimentos, tubos

- de plástico (Maxisorp Star; NUNC) se revistieron durante una noche a 4°C con 200 µL de un anticuerpo monoclonal de ratón para el C terminal del TSHR a 10µg/mL en tampón de revestimiento (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 mmol/L, pH 9,2). Después de lavar y pos-revestir (10 mg/mL de BSA en agua) los tubos se lavaron con tampón de ensayo (Tris-HCl 10 mmol/L pH 7,8, NaCl 50 mmol/L y BSA 1 mg/mL) que contenía Triton X-100 al 0,1%. En la etapa siguiente se añadieron a los tubos 200 µL preparaciones de TSHR de tipo natural o mutado y se incubaron durante una noche a 4°C. Los contenidos de los tubos se retiraron por aspiración, los tubos se lavaron con tampón de ensayo y se añadieron 50 µL de tampón de partida (RSR Ltd), 50 µL de tampón de ensayo y 50 µL de <sup>125</sup>I-TSH o anticuerpo monoclonal marcado con <sup>125</sup>I (10.000 – 15.000 cpm) y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación. Después de aspiración de las soluciones, los tubos se lavaron y se sometieron a recuento en un contador gamma.
- Las diluciones de las preparaciones del TSHR que dan entre 15-40% de unión de TSH o anticuerpo monoclonal marcados se usaron para preparar tubos revestidos de TSHR para análisis. En algunos experimentos los 50 µL de tampón de ensayo fueron sustituidos por soluciones con concentraciones crecientes de TSH (0,4 - 500 unidades/mL) o anticuerpo monoclonal (0,001 – 1,0µg/mL) no marcados. Se calcularon las concentraciones de TSH o anticuerpo monoclonal unido y libre y se usó una gráfica de unido frente a unido/libre (análisis de Scatchard) para calcular la afinidad de unión para el TSHR.

#### Análisis de la estimulación de células CHO que contienen TSHR mutado

- Se determinó la capacidad de la TSH o el hMAb TSHR1 para estimular la producción de AMP cíclico en células CHO transfectadas con TSHR que contenía diversas mutaciones. Los resultados se muestran en detalle en las Tablas 2a-2j, 15a-15x, y 27a-27h y se resumen en las Tablas 3, 16 y 28. La mayoría de las mutaciones causaron algo de reducción en la respuesta a tanto la TSH como el hMAb TSHR1. Sin embargo, hubo claras diferencias entre los efectos de las mutaciones en la respuesta a la hormona y al anticuerpo en los casos de Arg80 a Ala, Arg80 a Asp, Tyr82 a Ala, Glu107 a Ala, Arg109 a Ala, Arg109 a Asp, Lys129 a Ala, Lys129 a Asp, Phe130 a Ala, Lys183 a Ala, Lys183 a Asp, Tyr185 a Ala, Asp232 a Ala, Arg255 a Ala, Trp258 a Ala y las dobles mutaciones Arg255 a Ala y Trp258 a Ala; Trp258 a Ala y Lys183 a Ala; Trp258 a Ala y Tyr185 a Ala. La mutación de cualquiera de estos aminoácidos causó una reducción marcada en la respuesta al hMAb TSHR1, mientras se mantuvo esencialmente la respuesta a la TSH.

- Los efectos de mutar Asp232, Arg255 y Trp258 se investigaron en algún detalle. En el caso de Asp232 la glutamina cercana (Glu235) fue mutada a Ala. Sin embargo, esta mutación tuvo poco efecto (con respecto al tipo natural) sobre la estimulación por la TSH o el hMAb TSHR1 (Tabla 4a). Similarmente, la mutación de treonina 257 adyacente a Trp258 tuvo poco efecto sobre la estimulación de la hormona o anticuerpo (Tabla 4b). Sin embargo, las mutaciones dobles de Arg255 a Ala y Trp258 a Ala; Trp258 a Ala y Lys183 a Ala; Trp258 a Ala y Tyr185 a Ala tuvieron poco o ningún efecto sobre la estimulación por la TSH pero la estimulación por hMAb TSHR1 fue esencialmente suprimida (Tablas 4c, 27g y 27h respectivamente). Además, la mutación de Arg255 (aa positivamente cargado) al ácido aspártico negativamente cargado (en lugar del neutro Ala) también suprimió esencialmente la respuesta al hMAb TSHR1, pero tuvo poco o ningún efecto sobre la estimulación por la TSH (Tabla 4d). Estos resultados se resumen en las Tablas 5 y 28.

- También se estudió el efecto de mutar Arg255 a Asp sobre la capacidad de sueros que contienen auto-anticuerpos del TSHR del 14 pacientes diferentes con la enfermedad de Graves y los resultados se muestran en la Tabla 6. Como puede verse en la Tabla, las células CHO que expresan este mutante tuvieron respuesta más reducida (con respecto al tipo natural) a todos los 14 sueros. En contraste, las mutaciones de Arg80 a Ala, Arg80 a Asp, Glu107 a Ala, Arg109 a Ala, Arg109 a Asp, Lys129 a Ala, Lys183 a Ala y Lys183 a Asp afectaron algo a los sueros, pero no redujeron la respuesta a todos los sueros estimulantes analizados (Tablas 19a-19h y resumido en la Tabla 20). Sólo Arg 255 a Asp y la doble mutación Trp258 a Ala y Arg255 a Ala fueron capaces de reducir la respuesta de todos los sueros ensayados (Tablas 6, 19i y resumido en Tabla 20).

- La Tabla 7 muestra la estimulación de la producción de AMP cíclico por diferentes dosis de hMAb TSHR1 IgG y el plasma donante (obtenido de la misma muestra de sangre usada para aislar linfocitos para la preparación del híbrido hMAb TSHR1) en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Arg255 mutado a Asp. Los efectos de tanto la IgG como el plasma sobre el TSHR mutado fueron más reducidos con respecto al tipo natural y los efectos de respuesta a la dosis dieron similares. Los efectos de diversos anticuerpos monoclonales de ratón con actividad estimulante del tiroides (los mTSMAB preparados como en el documento WO 03/018632A2) también se analizaron en términos de su capacidad para estimular la producción de AMP cíclico en células CHO transfectadas con TSHR de tipo natural y los TSHR con Arg255 mutado a Asp (Tabla 8), Arg80 a Asp, Glu107 a Ala, Arg109 a Ala, Arg109 a Asp, Lys129 a Ala, Lys183 a Ala, Lys183 a Asp (Tablas 21a-g). Como puede verse en la Tabla 8 y las Tablas 21a-g y resumido en la Tabla 22 el efecto estimulante de los mTSMAB fue esencialmente suprimido por las mutaciones. También se investigó la capacidad del suero de 4 pacientes con actividad antagonista de la TSH, para influenciar la estimulación por la TSH de la producción de AMP cíclico, en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Arg255 mutado a Asp. Todos los 4 sueros actuaron como potentes antagonistas de la TSH en células CHO que expresaban TSHR de tipo natural y mutado (Tabla 9).

- Además, los estudios de dosis-respuesta indicaron que el efecto antagonista de la TSH era más fuerte a las dosis más bajas (mayor dilución) de suero de pacientes en las células que expresaban el receptor mutado (Tabla 10).

Además, la mutación Glu107 a Ala mostró un efecto antagonista aumentado similar con sueros de pacientes (Tablas 23a y 24), mientras que otras 2 mutaciones, Arg109 a Ala y Lys183 a Ala no tuvieron efecto (Tablas 23b&c y 24) (resumen en la Tabla 24). También se investigaron las acciones de un anticuerpo monoclonal de ratón frente al TSHR con fuertes actividades antagonistas de la TSH (y antagonista de hMAb TSHR1) (9D33, descritas en el documento WO2004/05078A2) (Tablas 11, 13a-j, 17a-v y resumen en las Tablas 14 y 18). Como puede verse en la Tabla 11, 9D33 fue capaz de bloquear la estimulación por la TSH de células CHO que expresan TSHR de tipo natural o TSHR con Arg255 mutado a Asp. Además, el efecto antagonista de 9D33 fue más fuerte a dosis más bajas en células que expresan el receptor mutado (Tabla 11). Otras dos mutaciones Asp160 a Ala y Arg274 a Ala mostraron efecto antagonista aumentado con 9D33 comparado con el TSHR de tipo natural (Tablas 17n y 17v), mientras que Lys58 a Ala, Arg80 a Ala, Arg80 a Asp, Tyr82 a Ala, Glu107 a Arg, Arg109 a Ala, Arg109 a Asp, Lys129 a Ala, Lys129 a Asp, Phe134 a Ala y Lys250 a Ala mostraron reducción en la capacidad de 9D33 de bloquear la estimulación de la TSH en células CHO que expresan estos TSHR mutados (Tabla 17 y resumen en la Tabla 18). Sin embargo, 19 de cada 32 mutaciones diferentes estudiadas no tuvieron efecto sobre la capacidad de 9D33 de bloquear la estimulación por la TSH de la producción de AMP cíclico (Tablas 13, 14, 17 y 18).

#### 15 Análisis de la unión a TSHR mutado

Los efectos de mutar diversos aa de TSHR a alanina, arginina o ácido aspártico sobre la unión de la TSH, hMAb TSHR1 y el MAb 9D33 se muestran en las Tablas 12, 25, 29 y se resumen en la Tabla 26.

Las mutaciones de Asp43 a Ala, Glu61 a Ala, Asp203 a Ala, Gln235 a Ala, Glu251 a Ala, Asp276 a Ala y Ser281 a Ala tuvieron poco o ningún efecto sobre la unión de la TSH, el hMAb TSHR1 o el 9D33. Sin embargo, las mutaciones de Glu107 a Arg, Arg109 a Asp, Lys129 a Asp, Lys183 a Asp y Asp232 a Ala o Arg dieron como resultado que la unión de la TSH, el hMAb TSHR1 y el 9D33 MAb llegaran a ser no detectables. La mutación de Tyr206 a Ala tuvo una unión no detectable a la TSH y 9D33, mientras que el hMAb TSHR1 no se analizó. Las mutaciones de Glu157 a Ala, Asp160 a Ala, Lys209 a Ala, Thr257 a Ala y Trp258 a Ala impidieron la unión detectable a la TSH, pero tuvo poco o ningún efecto sobre la unión del hMAb TSHR1 y el MAb 9D33. Las mutaciones de Lys58 a Ala, Ile60 a Ala y Tyr82 a Ala mostraron una unión no detectable al MAb 9D33, mientras que la unión al hMAb TSHR1 y la TSH fue similar a la de al tipo natural. Las mutaciones de Arg80 a Ala y Arg80 a Asp dieron como resultado la unión no detectable del MAb 9D33 y hMAb TSHR1, mientras que la TSH todavía permanecía unida en el pocillo. Las mutaciones de Glu107 a Ala y Phe134 a Ala dieron como resultado una menor afinidad de unión para hMAb TSHR1 y el MAb 9D33, mientras que la TSH permanecía todavía en el pocillo. La mutación de Arg109 a Ala mostró una ligera reducción en la unión de la TSH, mientras que la unión del hMAb TSHR1 permanecía inalterada y la unión del MAb 9D33 fue no detectable. Las menores afinidades de unión para tanto TSH como hMAb TSHR1 se observaron cuando el Glu178 fue mutado a Ala, mientras que la unión del MAb 9D33 fue no afectada. En el caso de Lys129 a Ala, la TSH todavía permanecía en el pocillo, mientras que la afinidad para el hMAb TSHR1 fue marcadamente reducida y la unión del MAb 9D33 fue no detectable. Las mutaciones de Phe130 a Ala, Tyr185 a Ala y Arg255 a Ala dieron como resultado una marcada reducción en la unión del hMAb TSHR1 y una reducción en la unión del MAb 9D33, mientras que la TSH todavía permanecía en el pocillo. En el caso de Arg255 a Asp, la unión de TSH fue no detectable y la afinidad de unión del hMAb TSHR1 fue marcadamente reducida, mientras que la unión del MAb 9D33 fue no afectada. En el caso de Lys250 a Ala, Arg274 a Ala y Tyr279 a Ala, la unión de la TSH fue no detectable, mientras que las afinidades de unión del hMAb TSHR1 y 9D33 fueron reducidas. La mutación Lys183 a Ala aumentó la afinidades de unión de la TSH (no se analizaron el hMAb TSHR1 y el MAb 9D33) (Tabla 25) como lo hizo la doble mutación Tyr185 a Ala y Lys183 a Ala (no se analizó la unión del hMAb TSHR1, mientras que la del MAb 9D33 fue reducida) (Tabla 29).

La doble mutación Arg255 a Ala y Trp258 a Ala mostró unión no detectable de la TSH, una afinidad ligeramente reducida para hMAb TSHR1, mientras que el MAb 9D33 todavía estaba unido en el pocillo (Tabla 25). Las mutaciones Asp232 a Arg y Arg255 a Asp; Asp232 a Ala y Trp258 a Ala; Asp232 a Ala, Arg255 a Ala y Trp258 a Ala; Trp258 a Ala y Lys183 a Ala; Arg255 a Ala y Lys183 a Ala; Trp258 a Ala, Lys183 a Ala y Tyr185 a Ala; Arg255 a Ala, Trp258 a Ala, Tyr185 a Ala y Lys183 a Ala todas mostraron unión no detectable a TSH, hMAb TSHR1 y MAb 9D33 (Tabla 29). La doble mutación Asp232 a Ala y Arg255 a Ala tampoco mostraron unión a la TSH o el MAb 9D33 y la afinidad para el hMAb TSHR1 no se analizó (Tabla 29). En el caso de doble mutación Glu 157 a Ala y Asp203 a Ala, la unión de la TSH fue no detectable, la unión al hMAb TSHR1 fue similar al de tipo natural mientras que la unión del MAb 9D33 fue reducida (Tabla 29). Las mutaciones de Glu178 a Ala y Asp203 a Ala; Trp258 a Ala y Tyr185 a Ala; Arg255 a Ala y Tyr185 a Ala; Arg255 a Ala, Trp258 a Ala y Tyr185 a Ala dieron unión de la TSH no detectable, unión del hMAb TSHR1 marcadamente reducida y unión del MAb 9D33 ligeramente reducida (Tabla 29). En el caso de Arg255 a Ala, Lys183 a Ala y Tyr185 a Ala, ambas uniones del TSH y el hMAb TSHR1 fueron no detectables mientras que la unión del MAb 9D33 fue reducida (Tabla 29).

#### CONCLUSIONES / INTERPRETACIÓN

1) Se observaron los efectos de mutar aa individuales seleccionados del TSHR en términos de estimulación de la producción de AMP cíclico por diversos ligandos.

Para nuestra sorpresa, la mutación de algunos aa tenía una mayor influencia sobre la unión y/o la estimulación del hMAb TSHR1 que sobre la unión y/o estimulación de la TSH. Esta diferencia entre el efecto de la

hormona y el anticuerpo fue más evidente en el caso de la mutación de los aa Arg80 a Ala, Arg80 a Asp, Tyr82 a Ala, Glu107 a Ala, Arg109 a Ala, Arg109 a Asp, Lys129 a Ala, Lys129 a Asp, Phe130 a Ala, Lys183 a Ala, Lys183 a Asp, Tyr185 a Ala, Asp232 a Ala, Arg255 a Ala y Trp258 a Ala. Además la doble mutación Arg255 a Ala y Trp258 a Ala tuvo un efecto más fuerte que la mutación Arg255 a Ala solo o Trp258 a Ala solo.

Además, la mutación de Arg255 a Asp opuestamente cargado suprimió esencialmente los efectos estimulantes del hMAb TSHR1, mientras que la estimulación por TSH fue esencialmente no afectada. También los auto-anticuerpos del receptor de la TSH en 14 pacientes diferentes con enfermedad de Graves tuvieron su efecto estimulante esencialmente suprimido por la mutación Arg255 a Asp al igual que 6 anticuerpos monoclonales estimulantes del tiroides de ratón.

En contraste a la mutación de Arg255 a Asp, las mutaciones de otros aa del TSHR incluyendo Arg80 a Ala, Arg80 a Asp, Glu107 a Ala, Arg109 a Ala, Arg109 a Asp, Lys129 a Ala, Lys183 a Ala, Lys183 a Asp y la doble mutación de Arg255 a Ala y Trp258 a Ala redujeron o suprimieron el efecto estimulante del hMAb TSHR1, pero no en todos los auto-anticuerpos del TSHR de suero de pacientes analizados.

2) Consecuentemente, y sorprendentemente la mutación del aa Arg255 del TSHR fue la única encontrada que permitió una distinción clara entre las acciones estimulantes de la TSH y los auto-anticuerpos del TSHR del suero de los pacientes (incluyendo el hMAb TSHR1).

3) Los sueros de pacientes con actividad antagonista de la TSH son eficaces en bloquear la estimulación de la TSH de células CHO que expresan el TSHR mutado (mutación del Arg255 a Asp). También, un anticuerpo monoclonal de ratón con potente actividad antagonista de TSH (9D33) es un antagonista de la TSH eficaz en células CHO que expresan el receptor de tipo natural o mutado (Arg255 a Asp).

También encontramos que la mutación del aa Arg109 a Ala impidió la capacidad de 9D33 de inhibir la estimulación de la TSH, pero esta mutación no tuvo efecto sobre la capacidad de un auto-anticuerpo del TSHR de suero (auto-anticuerpo antagonista de la TSH) de bloquear la estimulación de la TSH.

4) Consecuentemente la mutación de Arg255 del TSHR a Asp suprime esencialmente la capacidad de los auto-anticuerpos del TSHR de tipo agonista de la TSH (incluyendo el hMAb TSHR1) de interactuar con el receptor. En contraste, los auto-anticuerpos del TSHR de tipo antagonista de la TSH (y la TSH) son capaces de reaccionar bien con el receptor mutado. La mutación de Arg255 del TSHR a Asp se puede usar, por tanto, para distinguir entre auto-anticuerpos del TSHR con actividades agonistas y antagonistas de la TSH.

5) El análisis de la unión de la TSH marcada y hMAb TSHR1 marcado a preparaciones del TSHR de tipo natural y mutado indicó que la mutación Arg255 a Ala redujo la afinidad del receptor para el hMAb TSHR1, pero tuvo poco efecto sobre la unión de la TSH. Esto es consistente con el efecto de la mutación en la estimulación de la producción de AMP cíclico.

En el caso de la mutación Asp232 a Ala, no fue detectable la unión de la hormona o el anticuerpo, debido probablemente a los reducidos niveles de expresión del receptor de la TSH mutado. La unión de la TSH también fue no detectable cuando Trp258 fue mutado a Ala, mientras que la unión del hMAb TSHR1 solamente se redujo aproximadamente 3 veces.

En las tablas AMP cíclico se abrevia a veces a AMPc y DT significa desviación típica.

Tabla 1

Nombre del cebador	Secuencia (5' - 3')
Asp232 Ala F	accaagcttgctggc <sup>a</sup> cggtgtctcaaaccagtgt
Asp232 Ala R	acactggtttgagacacgg <sup>t</sup> ccagcaagcttggt
Arg255 Ala F	aggaactgatagca <sup>ag</sup> gcaaacacctggactctta
Arg255 Ala R	taagagtccaggtg <sup>ct</sup> ttgctgctatcagttcct
Asp203 Ala F	atgggacaaagctggc <sup>a</sup> tgctg <sup>t</sup> ttacctaaca
Asp203 Ala R	tgtttaggtaaacagcag <sup>t</sup> ccagctttgtcccat
Glu178 Ala F	agggactatgcaatg <sup>a</sup> caaccttgacactgaagc
Glu178 Ala R	gcttcagtg <sup>t</sup> tcaagg <sup>t</sup> tg <sup>t</sup> cattgcatagtcct
Glu157 Ala F	attctttatacttg <sup>a</sup> caattacagacaaccctta
Glu157 Ala R	taagggttg <sup>t</sup> ctgt <sup>t</sup> aat <sup>t</sup> gcaagtataaagaat
Asp43 Ala F	agtcacctgcaagg <sup>a</sup> ctattcaacgcacccccag
Asp43 Ala R	ctggggatgcg <sup>t</sup> tgaat <sup>t</sup> agccttgcaggtgact
Glu61 Ala F	tctgaagcttattg <sup>a</sup> cgactcacctgagaactat
Glu61 Ala R	atagttctcaggtgag <sup>t</sup> tgcaataagcttcaga
Ser281 Ala F	acctttcttaccag <sup>ag</sup> ccactgctgtgccttta
Ser281 Ala R	taaaggcacagcag <sup>ct</sup> tgg <sup>t</sup> ctgggtaagaaaggt
Asp276 Ala F	ctcacacgggctg <sup>a</sup> ccctttcttacc <sup>a</sup> agccac
Asp276 Ala R	gtggcttgggtaagaaagg <sup>t</sup> gcagcccgtgtgag
Trp258 Ala F	agcaagaaacacc <sup>tg</sup> ggactcttaagaaacttccact
Trp258 Ala R	agtggaagtttcttaagag <sup>ca</sup> tg <sup>t</sup> gggtgttcttgct

BGH R	tagaaggcacagtcgagg
T7	taatacgactcactataggg
Arg255 Asp F	aggaactgatagca <b>aga</b> <b>gac</b> aaacacctggactctta
Arg255 Asp R	taagagtccaggtgt <b>tct</b> <b>gct</b> tgctatcagttcct
Arg255 Ala/ Trp258 Ala F	aggaactgatagca <b>ag</b> aaacacc <b>tg</b> <b>gac</b> gactcttaagaaact
Arg255 Ala/ Trp258 Ala R	agtttcttaagagtc <b>ca</b> gggtgtt <b>ct</b> <b>gct</b> tgctatcagttcct

F =cebador "delantero".  
R = cebador "trasero".

BGH R = cebador trasero de la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina  
T7 = promotor de RNA-polimerasa del bacteriófago T7.

5

La secuencia en negritas representa el codón mutado. La secuencia situada encima de las bases en negritas muestra la secuencia original del THSR.

Tabla 2a

<b>Mutación de Asp43 del TSHR a Ala</b>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio <math>\pm</math> DT*; n = 3)</b>		
<u>Experimento 1</u>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1636 $\pm$ 204	1940 $\pm$ 48	119
0,3	2550 $\pm$ 196	2772 $\pm$ 98	109
1	11362 $\pm$ 1120	12660 $\pm$ 3610	111
3	14498 $\pm$ 1400	13308 $\pm$ 1030	92
10	24914 $\pm$ 4330	17962 $\pm$ 1360	72
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	902 $\pm$ 168	894 $\pm$ 104	99
0,03	1454 $\pm$ 82	1532 $\pm$ 326	105
0,1	4210 $\pm$ 240	3996 $\pm$ 612	95
0,3	9158 $\pm$ 1440	8986 $\pm$ 560	98
1	20136 $\pm$ 1380	11864 $\pm$ 1200	59
3	24812 <sup>a</sup>	13496 $\pm$ 920	54
Tampón de ensayo de AMP cíclico	616 $\pm$ 30	680 $\pm$ 100	
<u>Experimento 2</u>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1564 $\pm$ 390	1648 $\pm$ 120	105
0,3	3594 $\pm$ 426	3416 $\pm$ 522	95
1	10750 $\pm$ 200	6940 $\pm$ 530	65
3	17850 $\pm$ 940	16630 $\pm$ 1820	93
10	24850 $\pm$ 3050	20064 $\pm$ 1040	81
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1000 $\pm$ 98	742 $\pm$ 60	74
0,03	1380 $\pm$ 326	1164 $\pm$ 282	83
0,1	2920 $\pm$ 498	2136 $\pm$ 142	73
0,3	10700 $\pm$ 960	6650 $\pm$ 1040	62
1	17200 $\pm$ 4010	13980 $\pm$ 330	81
3	27864 $\pm$ 350	14260 $\pm$ 1460	51
Tampón de ensayo de AMP cíclico	720 $\pm$ 22	670 $\pm$ 16	
En todos los experimentos se usó el Fab del hMAb TSHR1			
<sup>a</sup> valor medio del duplicado			

Tabla 2b

<u>Mutación de Glu61 del TSHR a Ala</u>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células (valor medio; n = 2)</b>		
<u>Experimento 1</u>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1648	998	61
0,3	3678	3204	87
1	19912	16020	80
3	25336	22304	88
10	28292	23370	83
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	740	482	65
0,03	824	612	74
0,1	2324	1688	73
0,3	4320	3392	79
1	24168	12914	53
3	23332	15842	68
Tampón de ensayo de AMP cíclico	578	366	
<u>Experimento 2</u>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>	1808	1312	73
0,1	3926	2738	70
0,3	11452	6400	56
1	20400	20962	103
3	20114	26718	133
10			
<b>TSH (ng/mL)</b>	992	722	73
0,01	1796	960	53
0,03	3316	2452	74
0,1	10440	5296	51
0,3	15826	13840	87
1	17582	19448	111
3	794	680	
Tampón de ensayo de AMP cíclico			
En todos los experimentos se usó el Fab del hMAb TSHR1			

Tabla 2c

Mutación de Glu157 del TSHR a Ala			
	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células (valor medio $\pm$ DT; n = 3 o valor medio; n = 2)		
Experimento 1	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	Tipo mutado/natural (%)
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1682	1216	72
0,3	4150	1284	31
1	13668	6264	46
3	17390	8366	48
10	25920	13156	51
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	548	800	146
0,03	760	820	107
0,1	2560	1190	46
0,3	5124	2668	52
1	19034	3288	17
3	22720	12830	56
Tampón de ensayo de AMP cíclico	582	710	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1584 $\pm$ 66	1490 $\pm$ 12	94
0,3	3568 $\pm$ 174	2584 $\pm$ 250	72
1	14560 $\pm$ 1680	7260 $\pm$ 990	50
3	16560 $\pm$ 2210	15350 $\pm$ 3370	93
10	20900 $\pm$ 3930	14910 $\pm$ 1120	71
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1410 $\pm$ 270	1330 $\pm$ 206	94
0,03	1592 $\pm$ 28	1308 $\pm$ 216	82
0,1	3788 $\pm$ 534	1842 $\pm$ 54	49
0,3	10500 $\pm$ 170	2500 $\pm$ 1730	24
1	16730 $\pm$ 1650	7100 $\pm$ 740	42
3	32000	11380 $\pm$ 300	36
Tampón de ensayo de AMP cíclico	774 $\pm$ 58	1124 $\pm$ 42	
<b>Experimento 3</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1040	1260	121
0,3	1644	2000	122
1	12588	10924	87
3	15736	14816	94
10	21950	26304	120
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	708	1026	145
0,03	914	1486	163
0,1	2458	2008	82
0,3	5916	2444	41
1	17014	8382	49
3	20002	15158	76
Tampón de ensayo de AMP cíclico	608	988	
En todos los experimentos se usó el Fab del hMAb TSHR1			

Tabla 2d

<b>Mutación de Glu178 del TSHR a Ala</b>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio; n = 2)</b>		
<u>Experimento 1</u>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1210	1346	111
0,3	2710	2012	74
1	9190	4528	49
3	13790	9524	69
10	24166	12492	52
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	970	828	85
0,03	1416	1148	81
0,1	2218	1464	66
0,3	4564	3188	70
1	12524	9918	79
3	18440	13722	74
Tampón de ensayo de AMP cíclico	540	910	
<u>Experimento 2</u>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1354	1028	76
0,3	3372	1424	42
1	8820	3822	43
3	15524	8070	52
10	19540	12040	62
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	826	648	78
0,03	1042	810	78
0,1	2446	1182	48
0,3	5626	3018	54
1	13900	8050	58
3	19330	9080	47
Tampón de ensayo de AMP cíclico	804	672	
En todos los experimentos se usó el Fab del hMAb TSHR1			

Tabla 2e

Mutación de Asp203 del TSHR a Ala			
	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células (valor medio $\pm$ DT; n = 3 o valor medio; n = 2)		
Experimento 1	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	Tipo mutado/natural (%)
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1202 $\pm$ 222	968 $\pm$ 58	81
0,3	2508 $\pm$ 1198	1512 $\pm$ 162	60
1	8052 $\pm$ 1290	4824 $\pm$ 520	60
3	13696 $\pm$ 4150	8204 $\pm$ 310	60
10	16974 $\pm$ 1920	9680 $\pm$ 3420	57
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	796 $\pm$ 34	668 $\pm$ 96	84
0,03	1028 $\pm$ 72	984 $\pm$ 124	96
0,1	2216 $\pm$ 610	1248 $\pm$ 82	56
0,3	nd	5700 $\pm$ 380	nd
1	14976 $\pm$ 1990	8258 $\pm$ 116	55
3	18592 $\pm$ 1740	11406 $\pm$ 4130	61
Tampón de ensayo de AMP cíclico	804 $\pm$ 48	614 $\pm$ 36	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1666	1712	103
0,3	2978	2642	89
1	nd	nd	nd
3	13592	11414	74
10	14798	21486	123
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1146	660	58
0,03	1566	1360	87
0,1	2048	2232	109
0,3	5236	3112	59
1	16252	8790	54
3	16092	16328	101
Tampón de ensayo de AMP cíclico	610	560	
En todos los experimentos se usó el Fab del hMAb TSHR1 nd = no determinado			

Tabla 2f

Mutación de Asp232 del TSHR a Ala			
	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3 o valor medio; n = 2)		
Experimento 1	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	Tipo mutado/natural (%)
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1776	720	41
0,3	4086	1442	35
1	10000	3560	36
3	18030	8120	45
10	11250	11210	100
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	730	632	87
0,03	978	798	82
0,1	2436	1998	92
0,3	5600	5600	100
1	10170	7400	73
3	12800	9384	73
Tampón de ensayo de AMP cíclico	368	586	
Experimento 2			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1006 $\pm$ 156	804 $\pm$ 384	80
0,3	2236 $\pm$ 94	968 $\pm$ 24	43
1	11138 $\pm$ 1080	3894 $\pm$ 320	35
3	12188 $\pm$ 860	5984 $\pm$ 690	49
10	16212 $\pm$ 570	9476 $\pm$ 650	58
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	850 $\pm$ 54	606 $\pm$ 34	71
0,03	908 $\pm$ 148	956 $\pm$ 152	105
0,1	2026 $\pm$ 202	1652 $\pm$ 256	82
0,3	4488 $\pm$ 2060	3632 $\pm$ 384	81
1	12034 $\pm$ 860	7280 $\pm$ 1070	60
3	16886 $\pm$ 1400	12216 $\pm$ 1460	72
Tampón de ensayo de AMP cíclico	538 $\pm$ 40	560 $\pm$ 24	
En los experimentos se usó el Fab del hMAb TSHR1			

Tabla 2g

Mutación de Arg255 del TSHR a Ala			
	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3 o valor medio; n = 2)		
Experimento 1	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	Tipo mutado/natural (%)
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1644 $\pm$ 156	706 $\pm$ 108	43
0,3	3370 $\pm$ 256	808 $\pm$ 44	24
1	16964 $\pm$ 1380	4172 $\pm$ 660	25
3	18078 $\pm$ 1210	8500 $\pm$ 880	47
10	17820 $\pm$ 1150	11208 $\pm$ 670	63
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	950 $\pm$ 86	826 $\pm$ 50	87
0,03	1444 $\pm$ 90	1416 $\pm$ 86	98
0,1	nd	3784 $\pm$ 1410	nd
0,3	8624 $\pm$ 360	8920 $\pm$ 460	103
1	16014 $\pm$ 1220	12164 $\pm$ 1060	76
3	16244 $\pm$ 1570	13128 $\pm$ 1170	81
Tampón de ensayo de AMP cíclico	830 $\pm$ 140	718 $\pm$ 48	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1454	400	28
0,3	3126	534	17
1	6400	2278	36
3	11412	2606	23
10	16878	9584	57
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	450	404	90
0,03	778	610	78
0,1	1710	1566	92
0,3	4690	4680	100
1	10082	7180	71
3	14830	11938	80
Tampón de ensayo de AMP cíclico	496	290	
En todos los experimentos se usó el Fab del hMAb TSHR1 nd = no determinado			

Tabla 2h

<u>Mutación de Trp258 del TSHR a Ala</u>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio; n = 2)</b>		
<u>Experimento 1</u>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	2040	1464	72
0,3	4908	4198	86
1	nd	5964	nd
3	17958	11242	63
10	29824	14208	48
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1354	952	70
0,03	1464	1646	112
0,1	2954	3592	122
0,3	12154	10398	86
1	17270	14774	86
3	13142	17270	131
Tampón de ensayo de AMP cíclico	526	390	
<u>Experimento 2</u>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	2404	1206	50
0,3	5902	2518	43
1	nd	nd	nd
3	32000	9550	30
10	32000	17782	56
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1026	514	50
0,03	2000	1416	71
0,1	nd	nd	nd
0,3	10716	12022	112
1	16596	13804	83
3	26302	18620	71
Tampón de ensayo de AMP cíclico	698	1158	
En todos los experimentos se usó el Fab del hMAb TSHR1			
nd = no determinado			

Tabla 2i

<u>Mutación de Asp276 del TSHR a Ala</u>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio; n = 2)</b>		
<u>Experimento 1</u>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1490	1530	103
0,3	3056	3208	105
1	nd	nd	nd
3	12136	19610	162
10	21740	24030	111
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1184	1282	108
0,03	1470	1550	105
0,1	3188	3748	118
0,3	9466	9180	97
1	12796	15670	122
3	13820	23070	167
Tampón de ensayo de AMP cíclico	866	960	
<u>Experimento 2</u>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1346	2130	158
0,3	4120	nd	nd
1	nd	nd	nd
3	14216	15236	107
10	18230	21320	117
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	866	1236	143
0,03	934	1594	171
0,1	2124	2160	102
0,3	5400	6000	111
1	9880	16640	168
3	16846	20480	122
Tampón de ensayo de AMP cíclico	894	1132	
En todos los experimentos se usó el Fab del hMAb TSHR1			
nd = no determinado			

Tabla 2j

Mutación de Ser281 del TSHR a Ala			
	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio; n = 2)		
Experimento 1	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	Tipo mutado/natural (%)
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1080	936	87
0,3	3236	2490	77
1	nd	4722	nd
3	15556	10416	67
10	27712	17190	62
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	402	828	206
0,03	708	1152	163
0,1	2068	1464	71
0,3	5200	3188	61
1	18548	9918	53
3	24136	13722	57
Tampón de ensayo de AMP cíclico	550	356	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1500	1400	93
0,3	4706	4486	95
1	nd	nd	nd
3	17110	11418	67
10	23010	16384	71
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	402	566	141
0,03	708	1028	145
0,1	2068	1824	88
0,3	5200	6250	120
1	18548	10032	54
3	24136	14130	59
Tampón de ensayo de AMP cíclico	582	696	
En todos los experimentos se usó el Fab del hMAb TSHR1 nd = no determinado			

Tabla 3. Resumen de los efectos de la mutación (con relación al tipo natural) sobre la estimulación de células CHO que contienen TSHR mutado

Mutación del aa	Estimulación de la TSH	Estimulación del Fab del hMAb TSHR1
Asp43 a Ala	Algo de reducción	Algo de reducción
Glu61 a Ala	Algo de reducción	Algo de reducción
Glu 157 a Ala	Reducción marcada de algunas dosis de la TSH	Reducción marcada de algunas dosis de la TSH
Glu178 a Ala	Algo de reducción	Algo de reducción
Asp203 a Ala	Algo de reducción	Algo de reducción
Asp232 a Ala	Algo de reducción	Reducción marcada
Arg255 a Ala	Algo de reducción	Reducción marcada
Trp258 a Ala	Poco efecto	Reducción marcada
Asp276 a Ala	Poco efecto	Poco efecto
Ser281 a Ala	Algo de reducción	Algo de reducción

Tabla 4a

Mutación de Gln235 del TSHR a Ala			
	AMP cíclico producido (fmol/ pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT (n = 3))		
Experimento 1	TSHR tipo natural	TSHR mutado	Tipo mutado/natural (%)
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	770 $\pm$ 6174	764 $\pm$ 108	99
0,3	3020 $\pm$ 398	2434 $\pm$ 140	81
1	5904 $\pm$ 650	6356 $\pm$ 970	108
3	10538 $\pm$ 2380	13320 $\pm$ 2080	126
10	17314 $\pm$ 1980	13486 $\pm$ 2290	78
Tampón de ensayo de AMP cíclico	252 $\pm$ 58	234 $\pm$ 24	
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	422 $\pm$ 28	482 $\pm$ 34	114
0,03	816 $\pm$ 138	810 $\pm$ 116	99
0,1	1412 $\pm$ 86	1488 $\pm$ 264	105
0,3	4756 $\pm$ 280	4358 $\pm$ 690	92
1	9722 $\pm$ 2330	12656 $\pm$ 160	130
3	12826 $\pm$ 5000	14266 $\pm$ 2730	111
Tampón de ensayo de AMP cíclico	252 $\pm$ 58	234 $\pm$ 24	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1958 $\pm$ 40	1722 $\pm$ 172	88
0,3	3374 $\pm$ 244	3378 $\pm$ 556	100
1	11144 $\pm$ 1850	11128 $\pm$ 350	100
3	15536 $\pm$ 820	18374 $\pm$ 3140	118
10	17830 $\pm$ 1560	17616 $\pm$ 1750	99
Tampón de ensayo de AMP cíclico	518 $\pm$ 264	374 $\pm$ 70	
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1074 $\pm$ 272	1054 $\pm$ 222	98
0,03	2062 $\pm$ 310	1878 $\pm$ 298	91
0,1	4192 $\pm$ 992	2912 $\pm$ 254	69
0,3	1260 $\pm$ 740	10458 $\pm$ 1240	93
1	14364 $\pm$ 720	18170 $\pm$ 1680	126
3	18175 $\pm$ 1220	20128 $\pm$ 3240	111
Tampón de ensayo de AMP cíclico	518 $\pm$ 264	374 $\pm$ 70	

En todos los experimentos se usó el Fab del hMAb TSHR1Fab

Tabla 4b

Mutación de Thr257 del TSHR a Ala			
	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		
Experimento 1	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	Tipo mutado/natural (%)
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1080 $\pm$ 26	972 $\pm$ 24	90
0,3	2438 $\pm$ 382	1796 $\pm$ 366	74
1	16096 $\pm$ 4100	12862 $\pm$ 4960	80
3	16788 $\pm$ 3320	11692 $\pm$ 1250	70
10	23688 $\pm$ 3800	19994 $\pm$ 3380	84
Tampón de ensayo de AMP cíclico	550 $\pm$ 58	402 $\pm$ 132	
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	680 $\pm$ 54	716 $\pm$ 216	105
0,03	996 $\pm$ 96	1142 $\pm$ 98	115
0,1	1752 $\pm$ 226	3188 $\pm$ 364	182
0,3	6962 $\pm$ 1320	6284 $\pm$ 100	90
1	12316 $\pm$ 4250	12486 $\pm$ 3100	101
3	18212 $\pm$ 3670	16674 $\pm$ 1650	92
Tampón de ensayo de AMP cíclico	550 $\pm$ 58	402 $\pm$ 132	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1532 $\pm$ 580	998 $\pm$ 80	65
0,3	3656 $\pm$ 744	2718 $\pm$ 286	74
1	8516 $\pm$ 2600	5694 $\pm$ 310	67
3	23294 $\pm$ 6540	21948 $\pm$ 740	94
10	30580 $\pm$ 400	27366 $\pm$ 2330	89
Tampón de ensayo de AMP cíclico	690 $\pm$ 50	584 $\pm$ 66	
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	864 $\pm$ 62	776 $\pm$ 34	90
0,03	1244 $\pm$ 550	1084 $\pm$ 1,2	87
0,1	2882 $\pm$ 584	3390 $\pm$ 294	118
0,3	8584 $\pm$ 2260	6996 $\pm$ 680	82
1	19548 $\pm$ 5380	25080 $\pm$ 3710	128
3	30344	31488 $\pm$ 430	104
Tampón de ensayo de AMP cíclico	690 $\pm$ 50	584 $\pm$ 66	
En todos los experimentos se uso el Fab del hMAb TSHR1			

Tabla 4c

Mutación de Arg255 del TSHR a Ala y Trp258 a Ala			
	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		
Experimento 1	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	Tipo mutado/natural (%)
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1718 $\pm$ 92	1502 $\pm$ 78	87
0,3	3116 $\pm$ 204	122 $\pm$ 428	52
1	15540 $\pm$ 2370	2708 $\pm$ 340	17
3	14408 $\pm$ 1960	1958 $\pm$ 280	14
10	18652 $\pm$ 2170	5506 $\pm$ 130	30
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1968 $\pm$ 136	1786 $\pm$ 66	91
0,03	2754 $\pm$ 318	2628 $\pm$ 144	95
0,1	4246 $\pm$ 196	4488 $\pm$ 742	106
0,3	12026 $\pm$ 870	12608 $\pm$ 1570	105
1	18016 $\pm$ 3270	16362 $\pm$ 700	91
3	18256 $\pm$ 990	19162 $\pm$ 1230	105
Tampón de ensayo de AMP cíclico	1014 $\pm$ 220	1386 $\pm$ 460	
Experimento 2			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1778 $\pm$ 24	646 $\pm$ 48	36
0,3	3282 $\pm$ 622	676 $\pm$ 14	21
1	7054 $\pm$ 2380	720 $\pm$ 270	10
3	15036 $\pm$ 700	1876 $\pm$ 240	12
10	18292 $\pm$ 2130	3330 $\pm$ 620	18
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	910 $\pm$ 146	796 $\pm$ 60	87
0,03	1998 $\pm$ 252	1558 $\pm$ 80	78
0,1	5492 $\pm$ 402	4066 $\pm$ 644	74
0,3	8304 $\pm$ 1280	7238 $\pm$ 850	87
1	16858 $\pm$ 1210	13718 $\pm$ 1250	81
3	17088 $\pm$ 2130	18132 $\pm$ 2870	106
Tampón de ensayo de AMP cíclico	666 $\pm$ 88	662 $\pm$ 78	
En todos los experimentos se uso el Fab del hMAb TSHR1			

Tabla 4d

Mutación de Arg255 del TSHR a Asp			
	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		
Experimento 1	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	Tipo mutado/natural (%)
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1124 $\pm$ 48	488 $\pm$ 60	43
0,3	2578 $\pm$ 152	478 $\pm$ 50	19
1	8950 $\pm$ 680	370 $\pm$ 150	4
3	14870 $\pm$ 2520	620 $\pm$ 110	4
10	13750 $\pm$ 1620	1440 $\pm$ 20	10
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1110 $\pm$ 166	776 $\pm$ 94	70
0,03	1360 $\pm$ 210	1206 $\pm$ 54	89
0,1	3246 $\pm$ 594	2806 $\pm$ 586	86
0,3	8880 $\pm$ 800	8340 $\pm$ 350	94
1	10030 $\pm$ 2040	12400 $\pm$ 390	124
3	12260 $\pm$ 140	9980 $\pm$ 510	81
Tampón de ensayo de AMP cíclico	270 $\pm$ 84	170 $\pm$ 40	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1088 $\pm$ 88	374 $\pm$ 18	34
0,3	2250 $\pm$ 240	360 $\pm$ 30	16
1	5904 $\pm$ 620	154 $\pm$ 8	3
3	10604 $\pm$ 420	190 $\pm$ 4	2
10	17010	150 $\pm$ 20	1
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	516 $\pm$ 58	590 $\pm$ 148	114
0,03	1048 $\pm$ 320	908 $\pm$ 54	87
0,1	3788 $\pm$ 644	2382 $\pm$ 858	63
0,3	6906 $\pm$ 1090	9278 $\pm$ 1310	134
1	18284 $\pm$ 3660	9910 $\pm$ 1100	54
3	17370	16000	92
Tampón de ensayo de AMP cíclico	670 $\pm$ 548	424 $\pm$ 54	

Tabla 5. Resumen del efecto de las mutaciones (con relación al tipo natural) en la estimulación de células CHO que contienen TSHR mutado

Mutación de aa	Estimulación de la TSH	Estimulación de Fab del hMAb TSHR1
Gln235 a Ala	Poco efecto	Poco efecto
Thr237 a Ala	Poco efecto	Poco efecto
Arg255 a Asp	Poco efecto	<u>Esencialmente suprimida</u>
Arg255 a Ala y Trp258 a Ala	Poco efecto	<u>Esencialmente suprimida</u>

Tabla 6. Estimulación la producción de AMP cíclico por 14 sueros de pacientes con enfermedad de Graves (G1-G14) en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Arg255 mutado a Asp

	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) valor medio ± DT (n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>Experimento 1</b>			
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	520 ± 350	650 ± 4	125
Mezcla de HBD	570 ± 360	420 ± 360	74
G1	11490 ± 1030	3840 ± 400	33
G2	9250 ± 950	1420 ± 630	15
G3	4590 ± 910	950 ± 240	21
G4	7340 ± 370	750 ± 570	10
G5	8480 ± 800	1390 ± 200	16
G6	3820 ± 480	1140 ± 200	30
G7	7880 ± 580	1680 ± 210	21
G8	9310 ± 650	2530 ± 380	27
TSH (3ng/mL)	10180 ± 640	12000 ± 1960	118
<b>Fab de hMAb TSHR1 (10ng/mL)</b>	12060 ± 1130	1860 ± 190	15
<b>Experimento 2</b>			
Tampón de ensayo de AMP cíclico	150 ± 20	340 ± 330	227
HBD	150 <sup>a</sup>	150 ± 10	100
G9	12250 ± 1590	1470 ± 150	12
G10	5880 ± 160	560 ± 350	10
G11	1790 ± 230	340 6300	19
G12	3290 ± 360	140 <sup>a</sup>	4
G13	8580 ± 730	2160 ± 140	25
G14	2750 ± 20	700 ± 80	25
TSH (3ng/mL)	21130 <sup>a</sup>	20580 ± 2520	97
<b>Fab de hMAb TSHR1 (10ng/mL)</b>	19240 ± 2550	1510 ± 310	8
<sup>a</sup> valor medio del duplicado			
HBD = mezcla de sueros sanguíneos de donantes sanos			

Tabla 7. Estimulación de la producción de AMP cíclico por diferentes dosis de hMAb TSHR1 IgG y el plasma de donantes<sup>a</sup> en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Arg255 mutado a Asp.

Dilución o concentración <sup>b</sup> de la muestra	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
HBD/10	580 $\pm$ 180	270 <sup>c</sup>	47
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	790 $\pm$ 180	450 $\pm$ 160	57
TSH (3ng/mL)	19010 $\pm$ 2360	16120 $\pm$ 1230	85
hMAb TSHR1 IgG			
1ng/mL	4860 $\pm$ 720	940 $\pm$ 70	19
10ng/mL	16230 $\pm$ 230	3160 $\pm$ 380	19
100ng/mL	15410 $\pm$ 1400	5700 $\pm$ 360	37
1 $\mu$ g/mL	16340 $\pm$ 3690	5030 $\pm$ 780	31
Dilución del plasma del donante			
2000x	2400 $\pm$ 130	820 $\pm$ 120	34
1000x	4180 $\pm$ 980	970 $\pm$ 240	23
200x	11020 $\pm$ 900	1790 $\pm$ 240	16
100x	14860 $\pm$ 1560	2550 $\pm$ 530	17
20x	15750 $\pm$ 1480	3160 $\pm$ 500	20

<sup>a</sup>El plasma del donante se obtuvo de la misma muestra de sangre usada para aislar linfocitos para la preparación del hibridoma del hMAb TSHR1  
<sup>b</sup>Muestras diluidas en tampón de ensayo de AMP cíclico.  
<sup>c</sup>Valor medio del duplicado.  
HBD = mezcla de sueros sanguíneos de donantes sanos.

Tabla 8. Estimulación de la producción de AMP cíclico por 6 diferentes anticuerpos monoclonales estimulantes del tiroides de ratón (mTSMABs) en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y con TSHR con Arg255 mutado a Asp

Muestra de ensayo <sup>a</sup>	AMP producido (fmol/ pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	502 $\pm$ 76	456 $\pm$ 30	91
hMAb TSHR1 (10ng/mL)	18220 $\pm$ 1210	1160 $\pm$ 150	6
2G2 (1 $\mu$ g/mL)	524 $\pm$ 22	540 $\pm$ 20	103
TSMAB 1 (1 $\mu$ g/mL)	4810 $\pm$ 1250	1740 $\pm$ 170	36
TSMAB 2 (1 $\mu$ g/mL)	3440 $\pm$ 420	860 $\pm$ 90	25
TSMAB C (10ng/mL)	9960 $\pm$ 1130	1490 $\pm$ 150	15
TSMAB D (1 $\mu$ g/mL)	10850 $\pm$ 1340	1520 $\pm$ 170	14
TSMAB E (1 $\mu$ g/mL)	2490 $\pm$ 160	640 $\pm$ 10	26
TSMAB F (100ng/mL)	16200 $\pm$ 2680	2670 $\pm$ 110	16

<sup>a</sup>Muestras para análisis en tampón de AMP cíclico.  
2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para tiroglobulina (control negativo).

Tabla 9. Producción de AMP cíclico inducida por la TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Arg255 mutado a Asp. Efecto de 4 sueros (B1-B4) con actividad antagonista de la TSH.

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
<b>Muestra de ensayo<sup>a</sup></b>	<b>AMP producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		<b>Tipo mutado/natural</b>
	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
Tampón de ensayo de AMP cíclico	936 ± 336	636 ± 86	68
TSH <sup>b</sup>	9550 ± 740	9580 ± 840	100
HBD	610 ± 84	514 ± 34	84
HBD + TSH <sup>b</sup>	8510 ± 590	5070 ± 720	60
B1	390 ± 92	496 ± 90	127
B1 + TSH <sup>b</sup>	740 ± 590	520 ± 150	70
B2	408 ± 30	408 ± 172	100
B2 + TSH <sup>b</sup>	240 ± 20	440 ± 140	183
B3	504 ± 20	522 ± 96	104
B3 + TSH <sup>b</sup>	320 ± 60	550 ± 310	172
B4	414 ± 326	474 ± 12	114
B4 + TSH <sup>b</sup>	1180 ± 430	690 ± 340	58
<b>B. Resultados de la inhibición en %</b>			
<b>Suero con actividad antagonista de la TSH</b>	<b>% inhibición de la estimulación de la TSH<sup>c</sup></b>		
	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
B1	91	90	
B2	97	91	
B3	96	89	
B4	86	86	

HBD = Mezcla de sueros sanguíneos de donantes sanos.  
<sup>a</sup>Muestras para análisis en tampón de AMP cíclico; todos los sueros se analizaron a una dilución final de 10.  
<sup>b</sup>Concentración final de la TSH = 0,3 ng/mL.  
<sup>c</sup>

$$\% \text{ de Inhibición} = 100 * \left[ 1 - \frac{\text{AMPc en presencia de TSH más suero B1, B2, B3 o B4}}{\text{AMPc en presencia de TSH más HBD}} \right]$$

Tabla 10. Producción de AMP cíclico inducida por la TSH en células CHO que expresan el TSHR de tipo natural y TSHR con Arg255 mutado a Asp. Efecto de diferentes diluciones del suero B3 (Tabla 9) con actividad antagonista de la TSH

<b>A. Niveles del AMP cíclico</b>			
Dilución de la muestra de ensayo <sup>a</sup>	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
B3 1000x	718 ± 68	462 ± 80	64
B3 1000x + TSH <sup>c</sup>	11650 ± 710	3710 ± 570	32
B3 100x	626 ± 50	228 ± 24	36
B3 100x + TSH <sup>c</sup>	7590 ± 480	180 ± 20	2
B3 10x	358 ± 46	190 ± 20	53
B3 10x + TSH <sup>c</sup>	230 ± 98	310 ± 230	135
HBD 1000x	718 <sup>b</sup>	410 ± 22	57
HBD 1000x + TSH <sup>c</sup>	12210 ± 820	12594 ± 496	103
HBD 100x	768 ± 144	440 ± 62	57
HBD 100x + TSH <sup>c</sup>	9970 ± 800	10960 ± 750	110
HBD 10x	626 ± 106	346 ± 66	55
HBD 10x + TSH <sup>c</sup>	8130 ± 980	6920 ± 360	85
<b>B. Resultados de la inhibición en %</b>			
Dilución del suero con actividad antagonista de la TSH	% de inhibición de estimulación de la TSH <sup>d</sup>		
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
B3 1000x	5	70	
B3 100x	24	98	
B3 10x	97	96	

HBD = Mezcla de sueros sanguíneos de donantes sanos.  
<sup>a</sup>Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico.  
<sup>b</sup>Valor medio del duplicado.  
<sup>c</sup>Concentración de la TSH final = 0,3 ng/mL.  
<sup>d</sup>

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{AMPc en presencia de suero B3 + TSH}}{\text{AMPc en presencia de HBD + TSH}} \right]$$

en donde las diluciones de la muestra para análisis y la HBD son la misma

Tabla 11. Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Arg255 mutado a Asp. Efecto de diferentes diluciones de un anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
<b>Muestra de ensayo</b>	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n =3)</b>		<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	1208 ± 20	776 ± 344	64
TSH <sup>b</sup>	15410 ± 1450	12410 ± 3030	81
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	10890 ± 1130	10770 ± 1040	99
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	11580 ± 720	11540 ± 260	100
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	11710 ± 1890	10450 ± 1140	89
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	12960 <sup>c</sup>	11780 ± 750	91
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	11730 ± 220	11760 ± 940	100
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	9960 ± 520	5250 ± 610	53
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	7530 ± 1150	1160 ± 140	15
9D33 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	2560 ± 1470	700 ± 220	27
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	1180 ± 70	490 ± 80	42
9D33 100µg	1178 ± 60	558 ± 216	47
<b>B. Resultados de la inhibición en %</b>			
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>% de inhibición de estimulación de la TSH<sup>d</sup></b>		
2G2 1µg/mL	29	13	
2G2 10µg/mL	25	7	
2G2 100µg/mL	24	16	
9D33 0,001µg/mL	16	5	
9D33 0,01µg/mL	24	5	
9D33 0,1µg/mL	35	58	
9D33 1µg/mL	51	91	
9D33 10µg/mL	83	94	
9D33 100µg/mL	92	96	
<sup>a</sup> Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico.			
<sup>b</sup> Concentración de la TSH final = 0,3ng/mL.			
<sup>c</sup> Valor medio del duplicado			
<sup>d</sup>			
$\% \text{ de inhibición} = 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis más TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}} \right]$			
2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para tiroglobulina (control negativo para 9D33)			

Tabla 12 Análisis de Scatchard y unión de la TSH y del Fab de hMAb TSHR1 al receptor del TSH de tipo natural (no mutado) y preparaciones del receptor de la TSH mutado.

Preparación del receptor	Afinidad para la TSH	Afinidad para Fab de hMAb TSHR1
Tipo natural	$4,2 \pm 1,0 \times 10^9$ L/mol	$2,9 \pm 0,6 \times 10^{10}$ L/mol
Asp43 mutado a Ala	$3,1 \times 10^9$ L/mol	$3,0 \times 10^{10}$ L/mol
Glu61 mutado a Ala	$2,7 \times 10^9$ L/mol	$2,9 \times 10^{10}$ L/mol
Glu157 mutado a Ala	Unión a TSH no detectable	$1,9 \times 10^{10}$ L/mol
Glu178 mutado a Ala	$0,9 \times 10^9$ L/mol	$0,6 \times 10^{10}$ L/mol
Asp203 mutado a Ala	$1,9 \times 10^9$ L/mol	$1,6 \times 10^{10}$ L/mol
Asp232 mutado a Ala	Unión a TSH no detectable	Unión al Fab de hMAb TSHR1 Fab no detectable
Arg255 mutado a Ala	$1,9 \times 10^9$ L/mol	$0,5 \times 10^{10}$ L/mol
Trp258 mutado a Ala	Unión a TSH no detectable	$1,0 \times 10^{10}$ L/mol
Asp276 mutado a Ala	$3,4 \times 10^9$ L/mol	$1,6 \times 10^{10}$ L/mol
Ser281 mutado a Ala	$3,4 \times 10^9$ L/mol	$2,3 \times 10^{10}$ L/mol

Tabla 13a Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Asp43 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de un anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH

A. Niveles de AMP cíclico			
Muestra para análisis <sup>a</sup>	AMP producido ((fmol/pocillo de células) (valor medio n = 3)		Tipo mutado /natural(%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
Solamente tampón ensayo de AMP cíclico	84 ± 13	128 ± 20	152
TSH	7142 ± 389	6858 ± 2398	96
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	6631 ± 226	6854 <sup>c</sup>	103
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	7928 ± 1448	7876 ± 343	99
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	6011 ± 642	7572 ± 196	126
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	5670 ± 1727	5989 ± 366	106
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	6809 ± 411	6160 <sup>c</sup>	90
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	4958 ± 1852	5462 ± 467	110
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	1636 ± 226	1851 ± 314	113
9D33 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	1388 ± 416	1175 ± 116	85
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	681 ± 258	863 ± 192	127
9D33 100µg	1097 ± 362	107 ± 16	10
B. Resultados de inhibición en %			
Concentración de anticuerpos	% de inhibición de estimulación de la TSH <sup>d</sup>		
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
2G2 1µg/mL	7	0	
2G2 10µg/mL	-11	-15	
2G2 100µg/mL	16	-10	
9D33 0,001µg/mL	21	13	
9D33 0,01µg/mL	5	10	
9D33 0,1µg/mL	31	20	
9D33 1µg/mL	77	73	
9D33 10µg/mL	81	83	
9D33 100µg/mL	90	87	

<sup>a</sup>Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico.  
<sup>b</sup>Concentración final de la TSH = 0,5 ng/mL.  
<sup>c</sup>Valor medio del duplicado  
<sup>d</sup>

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis + TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}} \right]$$

2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para tiroglobulina (control negativo para 9D33)

Tabla 13b Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Glu61 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de un anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		
<b>Muestra para análisis<sup>a</sup></b>	<b>THSR de tipo natural</b>	<b>THSR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	154 ± 16	113 ± 35	86
TSH	15616 ± 3992	12824 ± 651	82
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	10613 ± 1188	15077 ± 2841	142
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	9163 <sup>c</sup>	12327 <sup>c</sup>	135
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	12967 <sup>c</sup>	14982 ± 908	116
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	11478 ± 1868	14708 ± 1441	128
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	12543 <sup>c</sup>	16118 ± 2133	129
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	13098 ± 253	7695 ± 3489	59
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	13249 ± 162	3960 ± 232	122
9D33 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	1819 ± 609	2800 ± 201	154
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	625 ± 27	1679 ± 546	269
9D33 100µg	87 ± 43	nd	nd
<b>B. Resultados de la inhibición en %</b>			
	<b>% de inhibición de estimulación de la TSH<sup>d</sup></b>		
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>THSR de tipo natural</b>	<b>THSR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	32	-18	
2G2 10µg/mL	41	4	
2G2 100µg/mL	17	-17	
9D33 0,001µg/mL	26	-15	
9D33 0,01µg/mL	20	-26	
9D33 0,1µg/mL	16	40	
9D33 1µg/mL	79	69	
9D33 10µg/mL	88	78	
9D33 100µg/mL	96	87	

<sup>a</sup>Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico.  
<sup>b</sup>Concentración final de la TSH = 0,5 ng/mL.  
<sup>c</sup>Valor medio del duplicado  
<sup>d</sup>

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis + TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}} \right]$$

2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para tiroglobulina (control negativo para 9D33)  
 nd = no determinado

Tabla 13c Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Glu178 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de un anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		
<b>Muestra para análisis<sup>a</sup></b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	122 ± 25	ud	nd
TSH	6162 ± 458	4613 <sup>c</sup>	75
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	5070 ± 271	5825 <sup>c</sup>	115
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	4493 <sup>c</sup>	nd	nd
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	4468 ± 1019	4083 ± 1170	91
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	2784 ± 625	4062 ± 637	146
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	3255 ± 124	4476 ± 1383	138
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	3439 ± 147	1886 ± 396	55
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	754 ± 372	540 ± 303	72
9D33 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	774 ± 372	519 ± 135	67
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	654 ± 115	395 ± 241	60
9D33 100µg	83 ± 42	34 ± 7	41
<b>B. Resultados de la inhibición en %</b>			
	<b>% de inhibición de estimulación de la TSH<sup>d</sup></b>		
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	18	-26	
2G2 10µg/mL	27	nd	
2G2 100µg/mL	27	11	
9D33 0,001µg/mL	55	12	
9D33 0,01µg/mL	53	3	
9D33 0,1µg/mL	44	59	
9D33 1µg/mL	88	88	
9D33 10µg/mL	87	89	
9D33 100µg/mL	89	91	

<sup>a</sup>Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico.  
<sup>b</sup>Concentración final de la TSH = 0,3 ng/mL.  
<sup>c</sup>Valor medio del duplicado  
<sup>d</sup>

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis + TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}} \right]$$

2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para tiroglobulina (control negativo para 9D33)  
ud = no detectable  
nd = no determinado

Tabla 13d Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Asp203 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de un anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		
<b>Muestra para análisis<sup>a</sup></b>	<b>THSR de tipo natural</b>	<b>THSR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	140 ± 11	134 <sup>c</sup>	96
TSH	6227 ± 1211	6167 ± 923	99
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	4307 ± 553	6428 <sup>c</sup>	149
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	5579 ± 1128	4708 ± 908	84
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	6920 ± 1455	5204 ± 787	75
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	4916 ± 405	5093 ± 581	104
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	4600 ± 394	5671 ± 1164	123
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	3814 ± 342	2905 ± 295	76
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	760 ± 315	1322 ± 125	174
9D33 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	466 <sup>c</sup>	498 ± 97	107
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	171 <sup>c</sup>	275 ± 27	161
9D33 100µg	159 ± 22	151 ± 23	95
<b>B. Resultados de la inhibición en %</b>			
	<b>% de inhibición de estimulación de la TSH<sup>d</sup></b>		
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>THSR de tipo natural</b>	<b>THSR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	31	-4	
2G2 10µg/mL	10	24	
2G2 100µg/mL	-11	16	
9D33 0,001µg/mL	21	17	
9D33 0,01µg/mL	26	8	
9D33 0,1µg/mL	39	53	
9D33 1µg/mL	88	79	
9D33 10µg/mL	93	92	
9D33 100µg/mL	97	96	

<sup>a</sup>Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico.  
<sup>b</sup>Concentración final de la TSH = 0,3 ng/mL.  
<sup>c</sup>Valor medio del duplicado  
<sup>d</sup>

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis + TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}} \right]$$

2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para tiroglobulina (control negativo para 9D33)

Tabla 13e Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Gln235 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de un anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		
<b>Muestra para análisis<sup>a</sup></b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	524 <sup>c</sup>	141 <sup>c</sup>	27
TSH	12503 ± 1060	11847 ± 689	95
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	12569 ± 1992	13130 <sup>c</sup>	104
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	14948 ± 1044	11648 ± 723	78
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	12514 ± 2316	11909 ± 533	95
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	10756 ± 1623	12067 <sup>c</sup>	112
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	13418 ± 1640	14843 ± 2529	111
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	11906 ± 1805	11792 ± 898	99
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	10325 ± 816	10567 ± 685	102
9D33 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	8185 <sup>c</sup>	4368 <sup>c</sup>	53
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	6127 ± 166	2171 <sup>c</sup>	35
9D33 100µg	156 ± 8	499 +37	320
<b>B. Resultados de la inhibición en %</b>			
	<b>% de inhibición de estimulación de la TSH<sup>d</sup></b>		
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	-1	-11	
2G2 10µg/mL	-20	2	
2G2 100µg/mL	0	-1	
9D33 0,001µg/mL	14	-2	
9D33 0,01µg/mL	-7	-25	
9D33 0,1µg/mL	5	0	
9D33 1µg/mL	17	11	
9D33 10µg/mL	35	63	
9D33 100µg/mL	51	82	
<sup>a</sup> Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico.			
<sup>b</sup> Concentración final de la TSH = 0,3 ng/mL.			
<sup>c</sup> Valor medio del duplicado			
<sup>d</sup>			
<b>% de inhibición = 100 × [ 1 - <math>\frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis + TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}}</math> ]</b>			
2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para tiroglobulina (control negativo para 9D33)			

Tabla 13f Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Arg255 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de un anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH.

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		
<b>Muestra para análisis<sup>a</sup></b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	197 ± 34	325 ± 47	165
TSH	6871 ± 970	10822 ± 1435	158
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	6407 ± 1141	11502 ± 2692	180
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	5803 ± 154	8806 <sup>c</sup>	152
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	8283 ± 1485	12027 ± 463	145
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	7451 ± 1473	12018 ± 2501	161
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	6528 ± 2277	11961 ± 1453	183
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	3019 ± 528	6107 ± 753	202
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	1765 ± 145	2858 ± 268	162
9D33 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	1369 ± 146	1873 ± 247	137
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	768 ± 158	1662 ± 177	216
9D33 100µg	223 ± 19	402 ± 57	180
<b>B. Resultados de la inhibición en %</b>			
	<b>% de inhibición de estimulación de la TSH<sup>d</sup></b>		
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	7	-6	
2G2 10µg/mL	16	19	
2G2 100µg/mL	-21	-11	
9D33 0,001µg/mL	-8	-11	
9D33 0,01µg/mL	5	-11	
9D33 0,1µg/mL	56	44	
9D33 1µg/mL	74	74	
9D33 10µg/mL	80	83	
9D33 100µg/mL	89	85	
<sup>a</sup> Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico.			
<sup>b</sup> Concentración final de la TSH = 0,3 ng/mL.			
<sup>c</sup> Valor medio del duplicado			
<sup>d</sup>			
<b>% de inhibición = 100 × [ 1 - <math>\frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis + TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}}</math> ]</b>			
2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para tiroglobulina (control negativo para 9D33)			

Tabla 13g Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Thr257 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de un anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		
<b>Muestra para análisis<sup>a</sup></b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	365 ± 40	410 ± 82	112
TSH	4491 <sup>c</sup>	4179 ± 281	93
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	3900 ± 124	3723 ± 344	95
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	4478 ± 153	3549 ± 199	79
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	4038 ± 549	4191 ± 686	104
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	4400 ± 672	3655 ± 244	83
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	3301 ± 114	3796 ± 372	115
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	2804 ± 474	2225 ± 45	79
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	1256 ± 227	1486 ± 3217	118
9D33 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	536 <sup>c</sup>	598 <sup>c</sup>	112
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	435 ± 19	523 ± 53	120
9D33 100µg	356 ± 11	457 <sup>c</sup>	128
<b>B. Resultados de la inhibición en %</b>			
	<b>% de inhibición de estimulación de la TSH<sup>d</sup></b>		
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	13	11	
2G2 10µg/mL	0	15	
2G2 100µg/mL	10	0	
9D33 0,001µg/mL	2	13	
9D33 0,01µg/mL	26	9	
9D33 0,1µg/mL	38	47	
9D33 1µg/mL	72	64	
9D33 10µg/mL	88	86	
9D33 100µg/mL	90	87	
<sup>a</sup> Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico.			
<sup>b</sup> Concentración final de la TSH = 0,3 ng/mL.			
<sup>c</sup> Valor medio del duplicado			
<sup>d</sup>			
<b>% de inhibición = 100 × [ 1 - <math>\frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis + TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}}</math> ]</b>			
2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para tiroglobulina (control negativo para 9D33)			

Tabla 13h Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Trp258 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de un anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
<b>Muestra para análisis<sup>a</sup></b>	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	119 ± 13	154 ± 41	129
TSH	8836 ± 2375	8958 ± 703	101
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	7339 ± 1966	6244 ± 1452	85
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	5250 ± 626	7015 ± 758	134
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	7991 ± 3095	6842 ± 771	111
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	9371 ± 1878	7449 <sup>c</sup>	79
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	7411 ± 1694	6123 ± 685	83
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	6379 ± 226	3435 ± 359	54
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	1893 ± 1164	1990 ± 197	105
9D33 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	1342 ± 451	1150 ± 84	86
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	689 ± 118	601 ± 17	87
9D33 100µg	179 ± 11	117 ± 25	65
<b>B. Resultados de la inhibición en %</b>			
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>% de inhibición de estimulación de la TSH<sup>d</sup></b>		
	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	17	30	
2G2 10µg/mL	41	22	
2G2 100µg/mL	10	1	
9D33 0,001µg/mL	-6	17	
9D33 0,01µg/mL	16	32	
9D33 0,1µg/mL	28	62	
9D33 1µg/mL	79	78	
9D33 10µg/mL	85	87	
9D33 100µg/mL	92	93	

<sup>a</sup>Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico.  
<sup>b</sup>Concentración final de la TSH = 0,3 ng/mL.  
<sup>c</sup>Valor medio del duplicado  
<sup>d</sup>

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis + TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}} \right]$$

2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para tiroglobulina (control negativo para 9D33)

Tabla 13i Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Ser281 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de un anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH.

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		
<b>Muestra para análisis<sup>a</sup></b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	94 ± 4	173 ± 58	184
TSH	4846 ± 620	9761 ± 189	201
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	4887 ± 1492	7017 <sup>c</sup>	144
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	5206 <sup>c</sup>	6929 ± 1601	133
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	5128 ± 1801	13529 ± 2725	264
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	6502 ± 2731	5846 ± 613	90
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	4502 ± 716	7709 ± 1418	171
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	4745 ± 290	41 19 ± 1045	87
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	1994 ± 361	1973 ± 45	99
9D33 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	1184 ± 136	1143 ± 322	97
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	1332 ± 469	1066 ± 319	80
9D33 100µg	186 ± 15	172 ± 24	92
<b>B. Resultados de la inhibición en %</b>			
	<b>% de inhibición de estimulación de la TSH<sup>d</sup></b>		
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	-1	28	
2G2 10µg/mL	-7	29	
2G2 100µg/mL	-6	-39	
9D33 0,001µg/mL	-34	40	
9D33 0,01µg/mL	7	21	
9D33 0,1µg/mL	2	58	
9D33 1µg/mL	59	80	
9D33 10µg/mL	76	88	
9D33 100µg/mL	73	89	
<sup>a</sup> Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico. <sup>b</sup> Concentración final de la TSH = 0,3 ng/mL. <sup>c</sup> Valor medio del duplicado <sup>d</sup> $\% \text{ de inhibición} = 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis + TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}} \right]$			
2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para tiroglobulina (control negativo para 9D33)			

Tabla 13j Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Arg255 mutado a Ala y Trp 258 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de un anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH.

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		
<b>Muestra para análisis<sup>a</sup></b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	876 ± 26	536 ± 108	61
TSH	11487 ± 683	6935 ± 796	60
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	9762 ± 684	7202 ± 334	74
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	9374 ± 1023	6369 ± 33	68
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	12285 ± 1718	6513 ± 254	53
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	8773 ± 1226	6741 ± 381	77
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	10499 ± 1934	5660 ± 157	54
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	7500 ± 336	1647 ± 197	22
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	3468 ± 548	643 ± 80	19
9D33 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	1243 ± 57	497 ± 132	40
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	1063 ± 163	189 ± 24	18
9D33 100µg	695 ± 33	386 ± 28	56
<b>B. Resultados de la inhibición en %</b>			
	<b>% de inhibición de estimulación de la TSH<sup>d</sup></b>		
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	15	-4	
2G2 10µg/mL	18	8	
2G2 100µg/mL	-7	6	
9D33 0,001µg/mL	24	3	
9D33 0,01µg/mL	9	18	
9D33 0,1µg/mL	35	76	
9D33 1µg/mL	70	91	
9D33 10µg/mL	89	93	
9D33 100µg/mL	91	97	

<sup>a</sup>Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico.  
<sup>b</sup>Concentración final de la TSH = 0,3 ng/mL.  
<sup>c</sup>Valor medio del duplicado  
<sup>d</sup>

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis + TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}} \right]$$

2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para tiroglobulina (control negativo para 9D33)

Tabla 14 Resumen de los efectos de la mutación (respecto al tipo natural) sobre la inhibición de la producción del AMP cíclico mediada por la TSH por el anticuerpo monoclonal de ratón 9D33

Mutación del aminoácido	Inhibición de AMP cíclico mediado por TSH Estimulación por 9D33
Asp43 a Ala	Sin efecto
Glu61 a Ala	Sin efecto
Glu178 a Ala	Sin efecto
Asp203 a Ala	Sin efecto
Gln235 a Ala	Sin efecto
Arg255 a Ala	Sin efecto
Arg255 a Asp	<b>Efecto aumentado</b>
Thr257 a Ala	Sin efecto
Trp258 a Ala	Sin efecto
Ser281 a Ala	Sin efecto
Arg255 a Ala y Trp258 a Ala	Sin efecto

Tabla 15a Efecto de la mutación de Lys58 de TSHR a Ala en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH

Experimento 1	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1410 ± 124	997 ± 132	71
0,3	1718 ± 381	1962 ± 135	114
1	3067 ± 270	8960 ± 1501	292
3	13569 ± 3730	6003 ± 242	44
10	16312 ± 1559	17808 ± 4348	109
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1410 ± 124	1621 ± 162	115
0,03	2881 ± 684	3020 ± 443	105
0,1	nd	nd	nd
0,3	17623 ± 493	19584 ± 1889	111
1	15629 ± 427	26367 ± 1861	169
3	16621 ± 1196	20053 ± 3738	121
Tampón de ensayo de AMP cíclico	377 ± 229	356 ± 122	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1206 ± 70	777 ± 75	64
0,3	2571 ± 130	1298 ± 121	50
1	6754 ± 1140	2948 ± 169	44
3	11485 ± 1262	7373 ± 197	64
10	12204 ± 1056	13538 ± 1409	111
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	675 ± 34	783 ± 57	116
0,03	1207 ± 251	1441 ± 175	119
0,1	3350 ± 326	3637 ± 245	109
0,3	9564 ± 785	8522 ± 335	89
1	12149 ± 73	14785 ± 1379	122
3	13701 ± 652	18020 ± 1527	132
Tampón de ensayo de AMP cíclico	429 ± 31	569 ± 23	
nd = no determinado			
En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR1			

Tabla 15b Efecto de la mutación de Ile60 de TSHR a Ala en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH

Experimento 1	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1432 $\pm$ 83	1574 $\pm$ 284	110
0,3	3834 $\pm$ 101	3060 $\pm$ 648	80
1	9355 $\pm$ 1170	6368 $\pm$ 673	68
3	17404 $\pm$ 2551	11276 $\pm$ 798	65
10	21898 $\pm$ 1209	22384 $\pm$ 3337	102
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1106 $\pm$ 127	966 $\pm$ 72	87
0,03	1678 $\pm$ 37	1624 $\pm$ 166	97
0,1	5942 <sup>a</sup>	4550 $\pm$ 538	77
0,3	12023 $\pm$ 2060	9552 $\pm$ 846	79
1	18051 $\pm$ 1955	22768 $\pm$ 5454	126
3	24292 $\pm$ 1961	26734 $\pm$ 511	110
Tampón de ensayo de AMP cíclico	654 $\pm$ 19	857 $\pm$ 76	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1537 $\pm$ 223	1434 $\pm$ 115	93
0,3	3684 $\pm$ 149	2812 $\pm$ 192	76
1	9685 $\pm$ 723	7287 $\pm$ 833	81
3	17373 $\pm$ 656	12398 $\pm$ 775	71
10	20390 <sup>a</sup>	18968 $\pm$ 286	93
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1104 $\pm$ 142	1191 $\pm$ 73	108
0,03	1699 $\pm$ 80	2014 $\pm$ 338	119
0,1	4731 $\pm$ 167	4642 $\pm$ 328	98
0,3	12871 $\pm$ 1429	11634 $\pm$ 434	90
1	17341 $\pm$ 592	17668 $\pm$ 1213	102
3	22282 $\pm$ 1483	20934 $\pm$ 554	94
Tampón de ensayo de AMP cíclico	834 $\pm$ 97	879 $\pm$ 54	
<sup>a</sup> Valor medio del duplicado			
En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR1			

Tabla 15c Efecto de la mutación de Arg80 de TSHR a Ala en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH

	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>Experimento 1</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1758 $\pm$ 502	719 $\pm$ 78	41
0,3	4283 $\pm$ 192	745 $\pm$ 55	17
1	11225 $\pm$ 673	465 $\pm$ 57	4
3	20033 $\pm$ 3422	443 $\pm$ 29	2
10	22299 $\pm$ 1244	1026 $\pm$ 350	5
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1019 $\pm$ 238	1612 $\pm$ 720	158
0,03	2350 $\pm$ 1100	3372 $\pm$ 721	143
0,1	5650 $\pm$ 304	5902 <sup>a</sup>	104
0,3	12387 $\pm$ 3782	17557 $\pm$ 4187	142
1	20052 $\pm$ 2829	20003 $\pm$ 2029	100
3	28631 $\pm$ 1464	17696 $\pm$ 3212	62
Tampón de ensayo de AMP cíclico	683 $\pm$ 19	676 $\pm$ 66	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	2311 $\pm$ 631	1159 $\pm$ 214	50
0,3	4772 $\pm$ 930	1352 $\pm$ 404	28
1	11729 $\pm$ 1421	1701 $\pm$ 19	15
3	19197 $\pm$ 6100	1714 $\pm$ 189	9
10	19820 $\pm$ 1443	1676 $\pm$ 293	8
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1069 $\pm$ 227	1375 $\pm$ 136	129
0,03	2810 $\pm$ 539	3133 $\pm$ 292	111
0,1	nd	5894 <sup>a</sup>	nd
0,3	14592 $\pm$ 1531	13199 $\pm$ 2744	90
1	23710 $\pm$ 1972	19145 $\pm$ 1820	81
3	26019 $\pm$ 4795	21095 $\pm$ 3355	81
Tampón de ensayo de AMP cíclico	594 $\pm$ 38	1194 $\pm$ 231	
<sup>a</sup> Valor medio del duplicado nd = no determinado En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR1			

Tabla 15d Efecto de la mutación de Arg80 de TSHR a Asp en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH

Experimento 1	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1153 $\pm$ 19	940 $\pm$ 157	82
0,3	1933 $\pm$ 194	923 $\pm$ 19	48
1	5567 $\pm$ 1067	895 $\pm$ 66	16
3	11325 $\pm$ 1045	1031 $\pm$ 87	9
10	18903 $\pm$ 3034	863 $\pm$ 127	5
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1015 $\pm$ 71	1015 $\pm$ 163	100
0,03	1620 $\pm$ 309	1379 $\pm$ 58	85
0,1	3470 $\pm$ 271	2301 $\pm$ 96	66
0,3	8692 $\pm$ 455	7790 $\pm$ 203	90
1	17173 $\pm$ 1433	9859 $\pm$ 744	57
3	19360 $\pm$ 1243	14095 $\pm$ 426	73
Tampón de ensayo de AMP cíclico	671 $\pm$ 69	1098 $\pm$ 66	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	728 $\pm$ 54	1029 $\pm$ 122	141
0,3	1435 $\pm$ 135	807 $\pm$ 70	56
1	6506 $\pm$ 317	855 $\pm$ 344	13
3	9982 $\pm$ 1363	1089 $\pm$ 225	11
10	24283 $\pm$ 6165	649 $\pm$ 346	3
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	815 $\pm$ 69	1015 $\pm$ 126	125
0,03	1088 $\pm$ 116	1962 $\pm$ 137	180
0,1	3291 $\pm$ 424	4496 $\pm$ 47	137
0,3	6511 $\pm$ 785	11286 $\pm$ 2733	173
1	13663 $\pm$ 1309	13474 $\pm$ 981	99
3	20084 $\pm$ 4514	15230 $\pm$ 3881	76
Tampón de ensayo de AMP cíclico	905 $\pm$ 258	785 $\pm$ 113	
En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR1			

Tabla 15e Efecto de la mutación de Tyr82 de TSHR a Ala en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen TSHR porhMab TSHR1 y TSH

Experimento 1	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>hMab TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1307 $\pm$ 198	1316 $\pm$ 177	100
0,3	2717 $\pm$ 99	1611 $\pm$ 225	59
1	7883 $\pm$ 576	2993 $\pm$ 741	38
3	11500 $\pm$ 1811	6786 $\pm$ 228	59
10	15890 $\pm$ 3356	10749 $\pm$ 1312	68
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	658 $\pm$ 164	1764 $\pm$ 110	268
0,03	1335 $\pm$ 162	2070 <sup>a</sup>	155
0,1	3567 $\pm$ 428	3932 $\pm$ 553	110
0,3	8610 <sup>a</sup>	8104 $\pm$ 723	94
1	13021 <sup>a</sup>	13821 $\pm$ 1198	106
3	18076 $\pm$ 5118	15070 $\pm$ 2214	83
Tampón de ensayo de AMP cíclico	432 $\pm$ 53	914 $\pm$ 87	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMab TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1393 $\pm$ 27	1075 $\pm$ 85	77
0,3	3709 $\pm$ 434	1511 $\pm$ 140	41
1	7756 $\pm$ 918	3507 $\pm$ 455	42
3	13197 $\pm$ 2052	6528 $\pm$ 202	49
10	18635 $\pm$ 1877	9085 <sup>a</sup>	49
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	861 $\pm$ 83	1047 $\pm$ 74	122
0,03	1390 $\pm$ 181	1535 $\pm$ 234	110
0,1	3846 $\pm$ 303	3790 $\pm$ 288	99
0,3	7900 $\pm$ 820	6400 $\pm$ 278	81
1	12747 $\pm$ 1290	9605 $\pm$ 642	75
3	15892 $\pm$ 125	16516 <sup>a</sup>	104
Tampón de ensayo de AMP cíclico	682 $\pm$ 97	697 $\pm$ 12	
nd = no determinado			
En todos los experimentos se usó Fab de hMab TSHR1			

Tabla 15f Efecto de la mutación de Glu107 de TSHR a Ala en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH

Experimento 1	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1814 $\pm$ 152	1135 $\pm$ 53	63
0,3	4032 $\pm$ 258	1096 $\pm$ 28	27
1	9770 $\pm$ 1020	985 $\pm$ 90	10
3	17529 $\pm$ 1597	1136 $\pm$ 65	6
10	22348 $\pm$ 3565	1760 $\pm$ 175	8
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1161 $\pm$ 153	1160 $\pm$ 68	100
0,03	2010 $\pm$ 197	1469 $\pm$ 111	73
0,1	4433 $\pm$ 794	1906 $\pm$ 138	43
0,3	10299 <sup>a</sup>	3717 $\pm$ 283	36
1	18214 $\pm$ 1154	8438 $\pm$ 300	46
3	18540 $\pm$ 1065	14885 $\pm$ 2525	80
Tampón de ensayo de AMP cíclico	784 $\pm$ 38	1117 $\pm$ 57	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1417 $\pm$ 215	1331 $\pm$ 95	94
0,3	3190 $\pm$ 264	1259 $\pm$ 39	39
1	7438 $\pm$ 656	1053 $\pm$ 79	14
3	11470 $\pm$ 6099	1215 <sup>a</sup>	11
10	19199 $\pm$ 1545	1793 $\pm$ 280	9
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1129 $\pm$ 64	1302 $\pm$ 118	115
0,03	1482 $\pm$ 246	1465 <sup>a</sup>	99
0,1	3788 $\pm$ 432	1996 <sup>a</sup>	53
0,3	8384 $\pm$ 643	4290 $\pm$ 120	51
1	12459 <sup>a</sup>	7910 $\pm$ 64	63
3	15288 $\pm$ 691	12050 <sup>a</sup>	79
Tampón de ensayo de AMP cíclico	416 $\pm$ 78	1057 $\pm$ 53	
<sup>a</sup> Valor medio del duplicado			
En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR1			

Tabla 15g Efecto de la mutación de Glu107 de TSHR a Arg en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH

Experimento 1	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	500 $\pm$ 28	468 $\pm$ 129	94
0,3	1118 $\pm$ 133	350 $\pm$ 13	31
1	5204 $\pm$ 225	ud	ud
3	5424 $\pm$ 566	ud	ud
10	9834 $\pm$ 709	ud	ud
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	376 $\pm$ 13	488 $\pm$ 2	130
0,03	608 $\pm$ 122	488 $\pm$ 65	80
0,1	1960 $\pm$ 109	496 $\pm$ 100	25
0,3	3516 $\pm$ 154	440 $\pm$ 183	13
1	7114 $\pm$ 67	1020 $\pm$ 340	14
3	8384 $\pm$ 666	2176 $\pm$ 244	26
Tampón de ensayo de AMP cíclico	404 $\pm$ 54	412 $\pm$ 23	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	682 $\pm$ 141	612 $\pm$ 69	90
0,3	1578 $\pm$ 294	650 $\pm$ 27	41
1	4592 $\pm$ 38	366 $\pm$ 71	8
3	6706 $\pm$ 420	430 $\pm$ 48	6
10	8858 $\pm$ 503	404 $\pm$ 26	5
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	712 $\pm$ 62	662 $\pm$ 92	93
0,03	1072 $\pm$ 120	670 $\pm$ 55	63
0,1	3680 $\pm$ 178	732 $\pm$ 115	20
0,3	6874 $\pm$ 79	572 $\pm$ 12	8
1	7652 $\pm$ 379	2038 $\pm$ 340	27
3	9250 $\pm$ 2392	3922 $\pm$ 650	42
Tampón de ensayo de AMP cíclico	410 $\pm$ 121	586 $\pm$ 24	
ud = no detectable			
En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR1			

Tabla 15h Efecto de la mutación de Arg109 de TSHR a Ala en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMab TSHR1 y la TSH

	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>Experimento 1</b>			
<b>hMab TSHR1 (ng/mL)</b>	2160 $\pm$ 121	1287 $\pm$ 154	60
0,1	5494 $\pm$ 360	1704 $\pm$ 136	31
0,3	14680 $\pm$ 475	3291 $\pm$ 230	22
1	20089 $\pm$ 1269	7588 $\pm$ 451	38
3	25202 $\pm$ 1926	17348 <sup>a</sup>	69
10			
<b>TSH (ng/mL)</b>	1436 $\pm$ 152	1486 $\pm$ 183	103
0,01	2355 $\pm$ 85	1886 $\pm$ 22	80
0,03	nd	4588 $\pm$ 395	nd
0,1	13613 $\pm$ 712	8503 $\pm$ 292	62
0,3	20552 $\pm$ 921	19037 $\pm$ 1144	93
1	24503 $\pm$ 1410	20440 $\pm$ 299	83
3	1070 $\pm$ 141	902 $\pm$ 141	
Tampón de ensayo de AMP cíclico			
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMab TSHR1 (ng/mL)</b>	2090 <sup>a</sup>	1122 $\pm$ 169	54
0,1	3104 $\pm$ 544	1529 $\pm$ 65	49
0,3	8081 $\pm$ 834	4013 $\pm$ 733	50
1	17745 $\pm$ 1891	5641 $\pm$ 475	32
3	23838 $\pm$ 3352	11764 $\pm$ 385	49
10			
<b>TSH (ng/mL)</b>	1037 <sup>a</sup>	1632 $\pm$ 121	112
0,01	1709 $\pm$ 389	2063 $\pm$ 317	121
0,03	2634 <sup>a</sup>	3970 $\pm$ 165	151
0,1	9355 $\pm$ 1215	10053 $\pm$ 1175	107
0,3	17724 $\pm$ 1701	12994 $\pm$ 2273	73
1	24335 $\pm$ 4993	20831 <sup>a</sup>	86
3	739 $\pm$ 49	843 $\pm$ 85	
Tampón de ensayo de AMP cíclico			
<sup>a</sup> Valor medio del duplicado nd = no determinado En todos los experimentos se usó Fab de hMab TSHR1			

Tabla 15i Efecto de la mutación de Arg109 de TSHR a Asp en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH

Experimento 1	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1372 $\pm$ 71	481 $\pm$ 32	35
0,3	2649 $\pm$ 369	512 $\pm$ 71	19
1	6840 $\pm$ 108	606 $\pm$ 41	9
3	12527 $\pm$ 1189	888 $\pm$ 68	7
10	17301 $\pm$ 1894	4140 $\pm$ 1000	24
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	993 $\pm$ 120	756 $\pm$ 174	76
0,03	1433 $\pm$ 74	1034 $\pm$ 171	72
0,1	2742 $\pm$ 32	1740 $\pm$ 114	63
0,3	8283 $\pm$ 48	4818 $\pm$ 252	59
1	15571 $\pm$ 1346	11540 $\pm$ 379	74
3	20509 $\pm$ 2613	14110 $\pm$ 1 048	69
Tampón de ensayo de AMP cíclico	654 $\pm$ 72	481 $\pm$ 2	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1 192 $\pm$ 136	388 $\pm$ 19	33
0,3	2890 $\pm$ 205	431 $\pm$ 95	15
1	7784 $\pm$ 989	510 $\pm$ 56	7
3	14298 $\pm$ 2299	989 $\pm$ 95	7
10	20908 $\pm$ 696	2922 $\pm$ 196	14
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	967 $\pm$ 108	487 $\pm$ 50	50
0,03	1084 $\pm$ 32	711 $\pm$ 77	66
0,1	4432 $\pm$ 558	1148 $\pm$ 101	26
0,3	6555 $\pm$ 763	3211 $\pm$ 103	49
1	17706 $\pm$ 1115	7377 $\pm$ 813	42
3	21807 $\pm$ 2198	13421 $\pm$ 966	62
Tampón de ensayo de AMP cíclico	570 $\pm$ 14	420 $\pm$ 79	

En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR1

Tabla 15j Efecto de la mutación de Lys129 de TSHR a Ala en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH

Experimento 1	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1536 ± 125	1320 ± 213	86
0,3	4391 ± 441	1270 ± 267	29
1	10466 ± 1641	2398 ± 427	23
3	16666 ± 476	4050 ± 125	24
10	23264 ± 1103	10349 ± 944	44
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	868 ± 138	1761 ± 184	203
0,03	1561 ± 349	2482 ± 294	159
0,1	4548 ± 269	4236 ± 548	93
0,3	8505 ± 119	11128 ± 1340	131
1	17249 ± 430	11396 ± 1457	66
3	17007 <sup>a</sup>	16021 ± 4948	94
Tampón de ensayo de AMP cíclico	1099 ± 8	1217 ± 80	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1631 ± 75	1475 ± 76	90
0,3	3811 ± 556	1768 ± 233	46
1	9073 ± 850	1821 ± 143	20
3	15292 ± 1346	5892 ± 650	39
10	20878 ± 2859	10467 <sup>a</sup>	50
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1682 ± 59	1715 ± 273	102
0,03	2042 ± 116	2889 ± 393	141
0,1	5969 ± 369	5326 <sup>a</sup>	89
0,3	12989 ± 613	9891 ± 347	76
1	20148 ± 3038	15817 <sup>a</sup>	79
3	23202 ± 1348	20875 ± 1639	90
Tampón de ensayo de AMP cíclico	1168 ± 47	970 ± 257	

<sup>a</sup>Valor medio del duplicado  
En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR1

Tabla 15k Efecto de la mutación de Lys 129 de TSHR a Asp en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH

	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>Experimento 1</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>	865 $\pm$ 26	367 $\pm$ 120	42
0,1	1553 $\pm$ 361	402 $\pm$ 64	26
0,3	5074 <sup>a</sup>	284 <sup>a</sup>	6
1	7400 $\pm$ 718	275 $\pm$ 76	4
3	9642 $\pm$ 210	412 $\pm$ 131	4
10			
<b>TSH (ng/mL)</b>	755 $\pm$ 116	514 $\pm$ 112	68
0,01	1034 $\pm$ 115	982 $\pm$ 44	95
0,03	3829 $\pm$ 514	2292 $\pm$ 294	60
0,1	4967 <sup>a</sup>	4805 $\pm$ 170	97
0,3	9675 $\pm$ 1581	6491 $\pm$ 607	67
1	9847 $\pm$ 725	6092 $\pm$ 160	61
3	536 <sup>a</sup>	244 $\pm$ 20	
Tampón de ensayo de AMP cíclico			
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>	2539 <sup>a</sup>	484 $\pm$ 96	19
0,1	4054 $\pm$ 540	508 $\pm$ 104	13
0,3	12154 $\pm$ 2505	438 $\pm$ 113	4
1	12618 <sup>a</sup>	423 <sup>a</sup>	3
3	18702 $\pm$ 804	511 $\pm$ 216	3
10			
<b>TSH (ng/mL)</b>	1236 $\pm$ 139	692 $\pm$ 122	56
0,01	4588 $\pm$ 952	2448 $\pm$ 410	53
0,03	5620 $\pm$ 610	4735 $\pm$ 757	84
0,1	15580 $\pm$ 2946	12130 $\pm$ 1978	78
0,3	22808 <sup>a</sup>	16915 $\pm$ 852	74
1	23480 $\pm$ 1160	18031 $\pm$ 3157	77
3	679 $\pm$ 48	243 $\pm$ 31	
Tampón de ensayo de AMP cíclico			
<sup>a</sup> Valor medio del duplicado			
En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR1			

Tabla 15l Efecto de la mutación de Phe130 de TSHR a Ala en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH

	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>Experimento 1</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	2990 $\pm$ 1000	1613 $\pm$ 706	54
0,3	6015 $\pm$ 512	2126 $\pm$ 163	35
1	16504 $\pm$ 2978	3905 $\pm$ 265	24
3	19850 $\pm$ 1256	7947 $\pm$ 841	40
10	21517 $\pm$ 1037	17480 $\pm$ 2580	81
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1614 $\pm$ 336	3371 $\pm$ 1847	209
0,03	2590 $\pm$ 672	4668 $\pm$ 47	180
0,1	nd	6373 <sup>a</sup>	nd
0,3	14754 $\pm$ 1095	19325 $\pm$ 4162	131
1	19712 $\pm$ 2403	26459 $\pm$ 319	134
3	24515 $\pm$ 1525	21361 $\pm$ 805	87
Tampón de ensayo de AMP cíclico	704 $\pm$ 64	998 $\pm$ 123	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1820 $\pm$ 165	776 $\pm$ 83	43
0,3	3536 $\pm$ 433	899 $\pm$ 21	25
1	9107 $\pm$ 1296	1438 $\pm$ 274	16
3	10390 $\pm$ 870	3832 $\pm$ 701	37
10	11042 $\pm$ 688	6864 $\pm$ 636	62
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	694 $\pm$ 43	700 $\pm$ 54	101
0,03	1470 $\pm$ 395	1616 $\pm$ 48	110
0,1	2663 $\pm$ 155	2863 $\pm$ 400	108
0,3	8206 $\pm$ 678	4904 $\pm$ 625	60
1	8888 $\pm$ 1514	9401 $\pm$ 1058	106
3	11261 $\pm$ 937	9735 $\pm$ 739	86
Tampón de ensayo de AMP cíclico	620 $\pm$ 63	522 $\pm$ 68	
<sup>a</sup> Valor medio del duplicado nd = no determinado En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR1			

Tabla 15m Efecto de la mutación de Phe134 de TSHR a Ala en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH

Experimento 1	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	2205 $\pm$ 404	1284 $\pm$ 130	58
0,3	5369 $\pm$ 753	2149 $\pm$ 559	40
1	16037 $\pm$ 697	8482 $\pm$ 353	53
3	22039 $\pm$ 1469	12127 $\pm$ 1947	55
10	20117 $\pm$ 1880	24649 $\pm$ 1133	123
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1 189 $\pm$ 278	776 $\pm$ 70	65
0,03	2004 $\pm$ 570	1232 $\pm$ 52	61
0,1	5366 $\pm$ 665	2622 $\pm$ 267	49
0,3	11790 $\pm$ 1622	7654 $\pm$ 675	65
1	16489 $\pm$ 2900	12049 $\pm$ 1239	73
3	24168 $\pm$ 1405	18525 $\pm$ 602	77
Tampón de ensayo de AMP cíclico	999 $\pm$ 33	714 $\pm$ 142	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	2089 $\pm$ 201	1404 $\pm$ 67	67
0,3	4016 $\pm$ 338	2460 $\pm$ 191	61
1	9400 $\pm$ 853	6484 $\pm$ 304	69
3	12799 $\pm$ 450	11263 $\pm$ 1128	88
10	14729 $\pm$ 2011	14146 $\pm$ 1380	96
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1108 $\pm$ 43	1022 $\pm$ 72	92
0,03	1511 $\pm$ 34	1475 $\pm$ 92	98
0,1	4111 $\pm$ 316	2660 $\pm$ 338	65
0,3	8747 $\pm$ 646	7108 $\pm$ 673	81
1	10290 $\pm$ 108	12726 $\pm$ 761	124
3	12027 $\pm$ 996	14785 $\pm$ 2611	123
Tampón de ensayo de AMP cíclico	584 $\pm$ 168	317 $\pm$ 19	
En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR1			

Tabla 15n Efecto de la mutación de Asp160 de TSHR a Ala en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH

Experimento 1	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1328 $\pm$ 186	814 $\pm$ 98	61
0,3	3123 $\pm$ 117	1658 $\pm$ 180	53
1	8120 $\pm$ 1331	3850 $\pm$ 213	47
3	12867 $\pm$ 1041	7536 $\pm$ 839	59
10	19292 $\pm$ 2362	11234 $\pm$ 1575	58
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1100 $\pm$ 27	770 $\pm$ 48	70
0,03	2136 $\pm$ 566	901 $\pm$ 95	42
0,1	nd	2012 $\pm$ 439	nd
0,3	11668 $\pm$ 2382	4149 $\pm$ 927	36
1	18079 $\pm$ 206	8590 $\pm$ 1072	48
3	16979 $\pm$ 868	11805 $\pm$ 1364	70
Tampón de ensayo de AMP cíclico	742 $\pm$ 66	546 $\pm$ 56	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1430 $\pm$ 532	578 $\pm$ 238	40
0,3	2906 $\pm$ 471	1465 $\pm$ 392	50
1	10703 $\pm$ 1591	3239 $\pm$ 699	30
3	10749 $\pm$ 662	6772 $\pm$ 2578	63
10	23355 <sup>a</sup>	10965 $\pm$ 2713	47
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1054 $\pm$ 28	789 $\pm$ 164	75
0,03	2241 $\pm$ 232	804 $\pm$ 125	36
0,1	5517 $\pm$ 755	1419 $\pm$ 395	26
0,3	14042 $\pm$ 1192	2731 $\pm$ 1041	19
1	13411 $\pm$ 3331	7500 $\pm$ 531	56
3	22093 $\pm$ 2324	10942 $\pm$ 3387	50
Tampón de ensayo de AMP cíclico	988 $\pm$ 69	672 $\pm$ 180	
<sup>a</sup> Valor medio del duplicado. nd = no determinado. En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR.			

Tabla 15o. Efecto de la mutación de Lys183 de TSHR a Ala en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH

Experimento 1	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1461 ± 50	766 ± 78	52
0,3	2482 ± 141	1006 ± 24	41
1	7550 ± 616	1163 ± 175	15
3	9020 ± 703	1875 ± 350	21
10	10168 ± 1016	4658 ± 518	46
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	910 ± 110	921 ± 121	101
0,03	1289 ± 184	1293 ± 124	100
0,1	3302 ± 482	2132 ± 269	65
0,3	6584 ± 630	6661 ± 293	101
1	8834 ± 878	10049 ± 996	114
3	9296 ± 1282	10131 ± 1244	109
Tampón de ensayo de AMP cíclico	530 ± 185	1020 ± 39	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1370 ± 113	1379 ± 177	101
0,3	2542 ± 236	1478 ± 290	58
1	6654 ± 690	806 ± 160	12
3	10310 ± 1621	2907 ± 267	28
10	14617 ± 3147	5071 ± 388	35
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	699 ± 168	1 144 ± 139	163
0,03	1471 ± 144	2193 ± 76	149
0,1	3134 ± 388	4292 ± 917	137
0,3	5976 ± 693	7846 ± 475	131
1	8083 ± 1246	18003 ± 4157	222
3	8896 ± 565	17403 ± 1656	196
Tampón de ensayo de AMP cíclico	659 ± 105	1010 ± 108	
<b>Experimento 3</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1123 ± 187	799 ± 17	71
0,3	2037 ± 537	914 ± 49	45
1	6313 ± 115	1697 ± 357	27
3	7121 ± 904	2997 ± 195	42
10	8543 ± 1196	4838 ± 957	57
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	964 ± 62	846 ± 14	88
0,03	1069 ± 139	1359 ± 87	127
0,1	2903 ± 332	3061 ± 1253	105
0,3	6579 ± 584	5867 ± 763	89
1	7556 ± 566	9442 ± 629	125
3	8963 ± 288	10414 ± 2070	116
Tampón de ensayo de AMP cíclico	610 ± 22	804 ± 103	

En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR.

Tabla 15p Efecto de la mutación de Lys183 de TSHR a Asp en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH

Experimento 1	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			

ES 2 366 793 T3

0,1	1201 ± 198	882 ± 175	73
0,3	3025 ± 387	756 ± 74	25
1	9184 ± 1712	1070 ± 74	12
3	11693 ± 254	1596 ± 561	14
10	13439 ± 1799	2665 ± 318	20
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	838 ± 45	1332 ± 75	159
0,03	1387 ± 318	2531 ± 425	182
0,1	3993 ± 712	4037 ± 370	101
0,3	9320 ± 80	12166 ± 821	131
1	12667 ± 1548	21066 ± 2286	166
3	15764 ± 1934	22044 ± 1567	140
Tampón de ensayo de AMP cíclico	441 ± 41	837 ± 95	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1227 ± 154	668 ± 39	54
0,3	2518 ± 118	594 ± 38	24
1	8013 ± 646	809 ± 22	10
3	12474 ± 540	1097 ± 59	9
10	14960 ± 989	1822 ± 116	12
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	693 ± 33	1063 ± 219	153
0,03	1531 ± 101	1711 ± 125	112
0,1	3619 ± 171	3278 ± 7	91
0,3	10721 ± 729	10204 ± 685	95
1	13599 ± 380	13881 ± 1383	102
3	17172 ± 1329	15261 ± 1578	89
Tampón de ensayo de AMP cíclico	509 ± 51	710 ± 51	
En todos los experimentos se usó Fab de hMab TSHR1			

Tabla 15q Efecto de la mutación de Tyr185 de TSHR a Ala en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH

Experimento 1	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1560 $\pm$ 238	938 $\pm$ 68	60
0,3	3654 $\pm$ 516	1178 $\pm$ 178	32
1	9506 $\pm$ 1399	1540 $\pm$ 537	16
3	13540 $\pm$ 3538	2974 $\pm$ 240	22
10	16190 $\pm$ 2880	4654 $\pm$ 390	29
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1134 $\pm$ 36	1148 $\pm$ 124	101
0,03	1344 $\pm$ 46	1492 $\pm$ 72	111
0,1	2218 $\pm$ 256	2586 $\pm$ 544	117
0,3	4980 $\pm$ 464	5260 $\pm$ 506	106
1	10620 $\pm$ 1080	8976 $\pm$ 526	85
3	16054 $\pm$ 1372	9619 $\pm$ 1098	60
Tampón de ensayo de AMP cíclico	930 $\pm$ 152	896 $\pm$ 120	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1754 $\pm$ 418	620 $\pm$ 82	35
0,3	2914 $\pm$ 210	620 $\pm$ 32	21
1	8630 $\pm$ 650	1030 $\pm$ 266	12
3	20120 <sup>a</sup>	1690 $\pm$ 108	8
10	18380 $\pm$ 436	3360 $\pm$ 380	18
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	760 $\pm$ 22	840 $\pm$ 70	111
0,03	1174 $\pm$ 230	1150 $\pm$ 86	98
0,1	1994 $\pm$ 26	2476 $\pm$ 395	124
0,3	4980 $\pm$ 979	3770 $\pm$ 216	76
1	10460 $\pm$ 1392	6260 $\pm$ 792	60
3	16230 $\pm$ 1754	9060 $\pm$ 2086	56
Tampón de ensayo de AMP cíclico	694 $\pm$ 1	586 $\pm$ 56	

<sup>a</sup>Valor medio del duplicado.  
En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR1.

Tabla 15r Efecto de la mutación de Tyr206 de TSHR a Ala en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH

Experimento 1	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	2730 $\pm$ 626	1362 $\pm$ 632	50
0,3	4960 $\pm$ 300	3366 $\pm$ 320	68
1	11744 $\pm$ 1142	5307 $\pm$ 1033	45
3	14787 $\pm$ 2786	14223 $\pm$ 1327	96
10	19505 $\pm$ 1949	19885 $\pm$ 3161	
<b>TSH (ng/mL)</b>			1102
0,01	920 $\pm$ 816	822 $\pm$ 624	89
0,03	2360 $\pm$ 232	2092 $\pm$ 198	89
0,1	4276 $\pm$ 1166	4612 $\pm$ 754	108
0,3	14415 <sup>a</sup>	6570 $\pm$ 2268	46
1	13467 $\pm$ 2475	20320 $\pm$ 4656	151
3	17150 $\pm$ 3474	20753 $\pm$ 5641	121
Tampón de ensayo de AMP cíclico	670 $\pm$ 46	730 $\pm$ 112	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1815 $\pm$ 256	1410 $\pm$ 264	78
0,3	3059 $\pm$ 388	2594 $\pm$ 71	85
1	10159 $\pm$ 2795	6218 $\pm$ 480	61
3	16264 $\pm$ 1688	12698 $\pm$ 705	78
10	18386 $\pm$ 170	18523 $\pm$ 3130	101
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1138 $\pm$ 139	979 $\pm$ 22	86
0,03	1588 $\pm$ 262	1523 $\pm$ 225	96
0,1	2438 $\pm$ 364	2804 $\pm$ 211	115
0,3	7787 $\pm$ 1111	7931 $\pm$ 414	102
1	12685 $\pm$ 1379	15817 $\pm$ 320	125
3	17173 $\pm$ 512	20529 $\pm$ 6651	120
Tampón de ensayo de AMP cíclico	763 $\pm$ 122	758 $\pm$ 65	

<sup>a</sup>Valor medio del duplicado.  
En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR1.

Tabla 15s Efecto de la mutación de Lys209 de TSHR a Ala en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH

Experimento 1	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	2078 $\pm$ 431	745 $\pm$ 9	36
0,3	5275 $\pm$ 941	1504 $\pm$ 235	29
1	10842 $\pm$ 505	3057 $\pm$ 158	28
3	17487 $\pm$ 2798	7931 $\pm$ 2983	45
10	23304 $\pm$ 1886	12495 $\pm$ 689	54
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1605 $\pm$ 609	780 $\pm$ 80	49
0,03	2711 $\pm$ 343	1641 $\pm$ 375	61
0,1	5653 <sup>a</sup>	2798 $\pm$ 373	49
0,3	15819 $\pm$ 2569	7423 $\pm$ 2337	47
1	22465 $\pm$ 3295	15616 $\pm$ 336	70
3	24344 $\pm$ 6711	16125 $\pm$ 1656	66
Tampón de ensayo de AMP cíclico	735 $\pm$ 69	592 $\pm$ 14	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1485 $\pm$ 77	1169 $\pm$ 88	79
0,3	3934 $\pm$ 295	1390 $\pm$ 333	35
1	8271 $\pm$ 419	4929 $\pm$ 144	60
3	15762 $\pm$ 1879	7564 $\pm$ 528	48
10	25020 $\pm$ 2040	16556 $\pm$ 2821	66
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1481 $\pm$ 286	1106 $\pm$ 230	75
0,03	2373 $\pm$ 519	1507 $\pm$ 160	64
0,1	6160 <sup>a</sup>	2781 $\pm$ 632	45
0,3	12743 $\pm$ 2376	6478 $\pm$ 883	51
1	19059 $\pm$ 1638	14596 $\pm$ 2090	77
3	18790 $\pm$ 2563	16519 $\pm$ 1386	88
Tampón de ensayo de AMP cíclico	911 $\pm$ 164	989 $\pm$ 87	

<sup>a</sup>Valor medio del duplicado.  
En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR1.

Tabla 15t Efecto de la mutación de Asp232 de TSHR a Arg en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH

Experimento 1	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	872 $\pm$ 87	376 $\pm$ 33	43
0,3	1807 $\pm$ 541	345 $\pm$ 57	19
1	6117 $\pm$ 1041	336 $\pm$ 168	5
3	12613 $\pm$ 887	482 $\pm$ 112	4
10	17622 $\pm$ 2689	365 $\pm$ 176	2
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	565 $\pm$ 37	499 $\pm$ 36	88
0,03	730 $\pm$ 205	415 $\pm$ 83	42
0,1	1718 $\pm$ 238	401 $\pm$ 87	23
0,3	5104 $\pm$ 985	482 $\pm$ 68	9
1	9314 $\pm$ 805	247 $\pm$ 60	3
3	15288 $\pm$ 4763	337 $\pm$ 19	2
Tampón de ensayo de AMP cíclico	296 $\pm$ 96	326 $\pm$ 42	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	579 $\pm$ 70	310 $\pm$ 38	54
0,3	1860 $\pm$ 720	260 $\pm$ 15	14
1	6492 $\pm$ 3623	202 $\pm$ 19	3
3	19766 $\pm$ 8102	191 $\pm$ 38	1
10	23054 $\pm$ 6165	185 $\pm$ 49	1
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	528 $\pm$ 53	407 $\pm$ 56	77
0,03	536 $\pm$ 104	314 $\pm$ 27	59
0,1	3114 $\pm$ 586	292 $\pm$ 29	9
0,3	3318 $\pm$ 676	598 $\pm$ 706	18
1	15396 $\pm$ 4345	220 $\pm$ 3	1
3	18431 $\pm$ 4386	174 $\pm$ 16	1
Tampón de ensayo de AMP cíclico	364 $\pm$ 20	364 $\pm$ 10	
En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR1			

Tabla 15u Efecto de la mutación de Lys250 de TSHR a Ala en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH.

Experimento 1	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	nd	nd	nd
0,3	3513 ± 322	4225 ± 118	120
1	10885 ± 74	9440 ± 601	87
3	15718 ± 1932	15433 ± 841	98
10	21864 ± 441	18373 ± 860	84
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1168 ± 206	1677 ± 259	144
0,03	1830 ± 144	2466 ± 430	135
0,1	4133 ± 300	4506 ± 348	109
0,3	9269 ± 1709	11416 ± 747	123
1	18165 ± 2560	16101 ± 794	89
3	24491 ± 903	18142 ± 1121	74
Tampón de ensayo de AMP cíclico	873 ± 101	1143 ± 47	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1599 ± 213	1756 ± 288	110
0,3	3312 ± 554	3370 ± 398	102
1	9469 ± 2932	7817 ± 924	83
3	15451 ± 1813	10944 ± 1432	71
10	23359 ± 998	16126 ± 1202	69
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1543 ± 276	1242 ± 152	80
0,03	2150 ± 252	2129 ± 176	99
0,1	nd	4235 ± 542	nd
0,3	14628 ± 2493	11155 ± 1593	76
1	18693 ± 1137	15395 ± 1097	82
3	18628 ± 1570	18313 ± 677	98
Tampón de ensayo de AMP cíclico	1000 ± 82	899 ± 138	

nd = no determinado.  
En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR.

Tabla 15v Efecto de la mutación de Glu251 de TSHR a Ala sobre la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH.

	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>Experimento 1</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1468 $\pm$ 150	1806 $\pm$ 113	123
0,3	2988 $\pm$ 150	2496 $\pm$ 368	84
1	8626 $\pm$ 473	6874 $\pm$ 146	80
3	13768 $\pm$ 1791	10810 $\pm$ 210	79
10	18100 $\pm$ 1361	12512 $\pm$ 297	69
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1204 $\pm$ 57	1324 $\pm$ 63	110
0,03	1496 $\pm$ 111	1764 $\pm$ 134	118
0,1	3344 $\pm$ 617	2570 $\pm$ 273	77
0,3	9270 $\pm$ 962	6872 $\pm$ 457	74
1	15644 $\pm$ 2238	11232 $\pm$ 1478	72
3	18494 $\pm$ 1815	11560 $\pm$ 2771	63
Tampón de ensayo de AMP cíclico	998 $\pm$ 94	1200 $\pm$ 105	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	990 $\pm$ 116	1332 $\pm$ 214	135
0,3	2186 $\pm$ 237	3034 $\pm$ 205	139
1	6726 $\pm$ 147	4690 $\pm$ 375	70
3	11466 $\pm$ 403	11476 $\pm$ 726	100
10	19820 $\pm$ 2013	16780 $\pm$ 1825	85
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	820 $\pm$ 133	1552 $\pm$ 322	186
0,03	1610 $\pm$ 150	2476 $\pm$ 321	187
0,1	3912 $\pm$ 298	4922 $\pm$ 750	126
0,3	10490 $\pm$ 1393	8630 $\pm$ 1595	82
1	12960 $\pm$ 2792	14110 $\pm$ 757	109
3	16684 $\pm$ 958	18476 $\pm$ 1985	111
Tampón de ensayo de AMP cíclico	660 $\pm$ 29	864 $\pm$ 106	
En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR,			

Tabla 15w Efecto de la mutación de Arg 274 de TSHR a Ala sobre la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH.

Experimento 1	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1390 $\pm$ 607	686 $\pm$ 63	49
0,3	2850 $\pm$ 170	1310 $\pm$ 284	46
1	7313 $\pm$ 587	3295 $\pm$ 25	45
3	13913 $\pm$ 3769	8454 $\pm$ 2347	<b>61</b>
10	14998 $\pm$ 1828	14567 $\pm$ 1722	97
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	666 $\pm$ 56	552 $\pm$ 30	83
0,03	712 $\pm$ 25	664 $\pm$ 28	93
0,1	2184 $\pm$ 104	1216 $\pm$ 340	56
0,3	3976 $\pm$ 254	2664 $\pm$ 14	67
1	11032 $\pm$ 1183	6310 $\pm$ 394	57
3	13956 $\pm$ 1306	9688 $\pm$ 1557	69
Tampón de ensayo de AMP cíclico	590 $\pm$ 30	553 $\pm$ 24	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1380 $\pm$ 2 76	996 $\pm$ 56	72
0,3	2858 $\pm$ 18	1510 $\pm$ 252	53
1	9024 $\pm$ 1360	4654 $\pm$ 1369	52
3	12920 $\pm$ 959	8230 $\pm$ 1371	64
10	15570 $\pm$ 454	12430 $\pm$ 2176	80
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	702 + 152	1022 $\pm$ 370	146
0,03	854 $\pm$ 98	976 $\pm$ 72	114
0,1	1412 $\pm$ 106	1578 $\pm$ 382	112
0,3	3364 $\pm$ 122	3960 $\pm$ 587	118
1	9936 $\pm$ 1003	8954 $\pm$ 1158	90
3	12894 $\pm$ 1009	11234 $\pm$ 856	87
Tampón de ensayo de AMP cíclico	618 $\pm$ 51	608 $\pm$ 80	

En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR,

Tabla 15x Efecto de la mutación de Tyr279 de TSHR a Ala sobre la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH.

	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>Experimento 1</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1590 ± 124	656 ± 100	41
0,3	2760 ± 24	682 ± 188	7
1	8506 ± 419	996 ± 150	12
3	15260 ± 2326	680 ± 25	4
10	17580 ± 2606	784 ± 145	4
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	864 ± 24	1068 ± 124	124
0,03	1258 ± 80	926 ± 32	74
0,1	2410 ± 244	750 ± 250	31
0,3	5034 ± 178	1064 ± 220	21
1	13896 ± 1193	1236 ± 281	9
3	15820 ± 784	1424 ± 218	9
Tampón de ensayo de AMP cíclico	730 ± 16	750 ± 24	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1390 ± 136	686 ± 82	49
0,3	3116 ± 552	623 ± 114	20
1	6123 ± 514	410 ± 59	7
3	13878 ± 2820	500 ± 83	4
10	14995 ± 1266	674 ± 149	4
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	830 ± 32	684 ± 22	82
0,03	1164 ± 374	688 ± 118	59
0,1	1960 ± 126	766 ± 106	39
0,3	3780 ± 567	695 ± 162	18
1	8691 ± 662	810 ± 227	9
3	12673 ± 742	1217 ± 170	10
Tampón de ensayo de AMP cíclico	676 ± 44	578 ± 26	

En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR,

Tabla 16 Resumen de los efectos de la mutación (con respect al tipo natural) sobre la estimulación de células CHO que contienen TSHR mutado

<b>Mutación del aa</b>	<b>Estimulación de la TSH</b>	<b>Estimulación del Fab del hMAb TSHRI1</b>
Lys58 a Ala	Sin efecto	Sin efecto
Ile60 a Ala	Sin efecto	Sin efecto
Arg80 a Ala	Sin efecto	<u>Reducción marcada</u>
Arg80 a Asp	Sin efecto	<u>Reducción marcada</u>
Tyr82 a Ala	Sin efecto	Algo de reducción
Glu 107 a Ala	Algo de reducción	<u>Reducción marcada</u>
Glu107 a Arg	<u>Reducción marcada</u>	<u>Reducción marcada</u>
Arg109 a Ala	Sin efecto	<u>Reducción marcada</u>
Arg109 a Asp	Algo de reducción	<u>Reducción marcada</u>
Lys129 a Ala	Sin efecto	<u>Reducción marcada</u>
Lys129 a Asp	Sin efecto	<u>Reducción marcada</u>
Phe130 a Ala	Sin efecto	<u>Reducción marcada</u>
Phe134 a Ala	Sin efecto	Sin efecto
Asp160 a Ala	Algo de reducción	<u>Algo de reducción</u>
Lys183 a Ala	Sin efecto	<u>Reducción marcada</u>
Lys183 a Asp	Sin efecto	<u>Reducción marcada</u>
Tyr185 a Ala	Sin efecto	<u>Reducción marcada</u>
Tyr206 a Ala	Sin efecto	Sin efecto
Lys209 a Ala	Algo de reducción	Algo de reducción
Asp232 a Arg	<u>Reducción marcada</u>	<u>Reducción marcada</u>
Lys250 a Ala	Sin efecto	Sin efecto
Glu251 a Ala	Sin efecto	Sin efecto
Arg274 a Ala	Sin efecto	Sin efecto
Tyr279 a Ala	<u>Reducción marcada</u>	<u>Reducción marcada</u>

Tabla 17a Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Lys58 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH.

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		
<b>Muestra para análisis<sup>a</sup></b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	545 ± 200	640 ± 34	117
TSH	21110 ± 1582	17775 ± 1851	84
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	19943 <sup>c</sup>	22426 ± 3322	112
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	24474 ± 1746	17626 ± 3253	72
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	21471 ± 1436	17478 ± 679	81
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	18865 ± 2836	23464 ± 2827	124
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	21648 ± 2909	16053 <sup>c</sup>	74
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	27181 <sup>c</sup>	22621 ± 610	83
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	13290 ± 2829	20233 ± 2223	152
9D33 10µg /mL + TSH <sup>b</sup>	7942 ± 2403	20192 ± 3977	254
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	2447 ± 1679	23258 ± 4341	950
9D33 100µg	832 ± 89	1204 ± 366	145
<b>B. Resultados de la inhibición en %</b>			
	<b>% de inhibición de la estimulación de TSH<sup>d</sup></b>		
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	6	-26	
2G2 10µg/mL	-16	1	
2G2 100µg/mL	-2	2	
9D33 0,001µg/mL	11	-32	
9D33 0,01µg/mL	-3	10	
9D33 0,1µg/mL	-29	-27	
9D33 1µg/mL	37	-14	
9D33 10µg/mL	62	-14	
9D33 100µg/mL	88	-31	
<sup>a</sup> Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico			
<sup>b</sup> Concentración final de la TSH = 1,5 ng/mL			
<sup>c</sup> Valor medio del duplicado			
<sup>d</sup>			
<b>% de inhibición = 100 × [ 1 - <math>\frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis más TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}}</math> ]</b>			
2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para la tiroglobulina (control negativo para 9D33)			

Tabla 17b Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Ile60 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH.

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		
<b>Muestra para análisis<sup>a</sup></b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	557 ± 105	889 ± 208	160
TSH	16781 ± 1025	14407 ± 3748	86
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	12022 ± 2220	16669 ± 2167	139
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	12439 ± 2453	15501 ± 1141	125
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	13056 ± 1630	15106 ± 931	116
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	13587 ± 1777	18962 ± 4050	140
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	12993 ± 2404	18797 <sup>c</sup>	145
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	11196 ± 1798	14519 ± 3400	130
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	6601 ± 712	12120 <sup>c</sup>	184
9D33 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	4500 ± 678	7217 ± 512	160
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	1627 ± 166	4886 ± 382	300
9D33 100µg	849 ± 207	1174 ± 312	138
<b>B. Resultados de la inhibición en%</b>			
	<b>% de inhibición de la estimulación de TSH<sup>d</sup></b>		
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	28	-16	
2G2 10µg/mL	26	-8	
2G2 100µg/mL	22	-5	
9D33 0,001µg/mL	19	-32	
9D33 0,01µg/mL	23	-30	
9D33 0,1µg/mL	33	0	
9D33 1µg/mL	61	16	
9D33 10µg/mL	73	50	
9D33 100µg/mL	90	66	
<sup>a</sup> Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico			
<sup>b</sup> Concentración final de la TSH = 1,5 ng/mL			
<sup>c</sup> Valor medio del duplicado			
<sup>d</sup>			
<b>% de inhibición = 100 × [ 1 - <math>\frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis más TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}}</math> ]</b>			
2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para la tiroglobulina (control negativo para 9D33)			

Tabla 17c Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Arg80 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
<b>Muestra para análisis<sup>a</sup></b>	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	714 ± 43	1088 ± 92	152
TSH	18979 <sup>c</sup>	19704 ± 2677	104
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	20640 ± 581	20980 <sup>c</sup>	102
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	18496 ± 343	19799 ± 1419	107
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	19699 ± 1947	23450 ± 923	119
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	19575 ± 4282	25960 ± 1357	133
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	23162 ± 1504	18751 ± 865	81
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	17648 ± 2178	23899 ± 300	135
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	9905 ± 1476	20875 ± 800	211
9D33 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	5145 ± 495	20797 ± 3441	404
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	2241 ± 281	21076 ± 2980	904
9D33 100µg	965 ± 86	1571 ± 205	163
<b>B. Resultados de la inhibición en%</b>			
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>% de inhibición de la estimulación de TSH<sup>d</sup></b>		
	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	-9	-6	
2G2 10µg/mL	3	0	
2G2 100µg/mL	-4	-19	
9D33 0,001µg/mL	-3	-32	
9D33 0,01µg/mL	-22	5	
9D33 0,1µg/mL	7	-21	
9D33 1µg/mL	49	-6	
9D33 10µg/mL	73	-6	
9D33 100µg/mL	88	-7	
<sup>a</sup> Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico			
<sup>b</sup> Concentración final de la TSH = 1,5 ng/mL			
<sup>c</sup> Valor medio del duplicado			
<sup>d</sup>			
<b>% de inhibición = 100 × [ 1 - <math>\frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis más TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}}</math> ]</b>			
2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para la tiroglobulina (control negativo para 9D33)			

Tabla 17d Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Arg80 mutado a Asp. Efecto de diferentes diluciones de anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		
<b>Muestra para análisis<sup>a</sup></b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	659 ± 58	514 ± 40	78
TSH	20019 ± 1871	17217 ± 2685	86
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	16429 ± 308	17022 ± 1123	104
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	18361 ± 1176	15857 ± 2364	86
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	16916 ± 814	16942 ± 1683	100
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	15724 ± 1763	20521 ± 3779	131
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	15737 ± 1060	19300 ± 1479	123
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	16788 ± 1341	16258 ± 3120	97
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	8613 ± 674	21217 ± 2058	246
9D33 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	3517 ± 798	17035 ± 1707	484
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	1869 ± 200	18217 ± 1061	975
9D33 100µg	950 ± 504	675 ± 80	71
<b>B. Resultados de la inhibición en%</b>			
	<b>% de inhibición de la estimulación de TSH<sup>c</sup></b>		
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	18	1	
2G2 10µg/mL	8	8	
2G2 100µg/mL	16	2	
9D33 0,001µg/mL	21	-19	
9D33 0,01µg/mL	21	-12	
9D33 0,1µg/mL	16	6	
9D33 1µg/mL	57	-23	
9D33 10µg/mL	82	1	
9D33 100µg/mL	95	6	

<sup>a</sup>Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico  
<sup>b</sup>Concentración final de la TSH = 1,5 ng/mL  
<sup>c</sup>

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis más TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}} \right]$$

2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para la tiroglobulina (control negativo para 9D33)

Tabla 17e Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Tyr82 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		
<b>Muestra para análisis<sup>a</sup></b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	599 ± 71	548 ± 25	91
TSH	8350 ± 1303	6602 ± 96	79
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	7358 ± 1153	5446 ± 265	74
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	9821 ± 1749	5906 ± 335	60
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	7962 ± 1218	5771 ± 19	72
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	6393 ± 1036	8064 ± 1472	126
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	9482 ± 1536	7608 ± 875	80
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	8910 ± 526	6485 ± 146	73
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	4009 ± 447	7291 ± 591	181
9D33 10µg /mL + TSH <sup>b</sup>	3395 ± 238	7648 ± 1386	225
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	2869 ± 254	5951 ± 1035	207
9D33 100µg	596 ± 33	679 ± 48	114
<b>B. Resultados de la inhibición en%</b>			
	<b>% de inhibición de la estimulación de TSH<sup>c</sup></b>		
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	12	18	
2G2 10µg/mL	-18	11	
2G2 100µg/mL	5	13	
9D33 0,001µg/mL	23	-22	
9D33 0,01µg/mL	-14	-15	
9D33 0,1µg/mL	-7	2	
9D33 1µg/mL	52	-10	
9D33 10µg/mL	59	-16	
9D33 100µg/mL	66	10	

<sup>a</sup>Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico  
<sup>b</sup>Concentración final de la TSH = 1,5 ng/mL  
<sup>c</sup>

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis más TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}} \right]$$

2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para la tiroglobulina (control negativo para 9D33)

Tabla 17f Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Glu107 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH

<b>C. Niveles de AMP cíclico</b>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio <math>\pm</math> DT; n = 3)</b>		
<b>Muestra para análisis<sup>a</sup></b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	893 $\pm$ 103	1215 $\pm$ 93	136
TSH	18593 $\pm$ 2469	14789 $\pm$ 3005	80
2G2 1 $\mu$ g/mL + TSH <sup>b</sup>	17253 $\pm$ 1508	13057 $\pm$ 1259	76
2G2 10 $\mu$ g/mL + TSH <sup>b</sup>	18423 $\pm$ 4503	9495 $\pm$ 1017	52
2G2 100 $\mu$ g/mL + TSH <sup>b</sup>	18952 $\pm$ 3984	13210 $\pm$ 2663	70
9D33 0,001 $\mu$ g/mL + TSH <sup>b</sup>	17646 $\pm$ 1558	9589 $\pm$ 516	54
9D33 0,01 $\mu$ g/mL + TSH <sup>b</sup>	20021 $\pm$ 949	11194 $\pm$ 147	56
9D33 0,1 $\mu$ g/mL + TSH <sup>b</sup>	16937 $\pm$ 2431	7651 $\pm$ 1178	45
9D33 1 $\mu$ g/mL + TSH <sup>b</sup>	11655 $\pm$ 4674	5613 $\pm$ 1549	48
9D33 10 $\mu$ g/mL + TSH <sup>b</sup>	5903 $\pm$ 1022	2386 $\pm$ 1294	40
9D33 100 $\mu$ g/mL + TSH <sup>b</sup>	3493 $\pm$ 395	2536 $\pm$ 388	73
9D33 100 $\mu$ g	996 $\pm$ 108	963 $\pm$ 192	97
<b>D. Resultados de la inhibición en%</b>			
	<b>% de inhibición de la estimulación de TSH<sup>c</sup></b>		
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1 $\mu$ g/mL	7	12	
2G2 10 $\mu$ g/mL	1	36	
2G2 100 $\mu$ g/mL	-2	11	
9D33 0,001 $\mu$ g/mL	5	35	
9D33 0,01 $\mu$ g/mL	-8	24	
9D33 0,1 $\mu$ g/mL	9	48	
9D33 1 $\mu$ g/mL	37	62	
9D33 10 $\mu$ g/mL	68	84	
9D33 100 $\mu$ g/mL	81	83	

<sup>a</sup>Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico  
<sup>b</sup>Concentración final de la TSH = 1,5 ng/mL  
<sup>c</sup>

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis más TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}} \right]$$

2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para la tiroglobulina (control negativo para 9D33)

Tabla 17g Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Glu107 mutado a Arg. Efecto de diferentes diluciones de anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH.

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
<b>Muestra para análisis<sup>a</sup></b>	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	1126 ± 74	1263 ± 73	112
TSH	21406 ± 932	5857 ± 571	27
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	21490 ± 2227	5357 ± 756	25
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	18305 ± 2116	5502 ± 431	30
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	20965 ± 3258	4655 ± 243	22
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	23207 ± 5032	4504 ± 471	19
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	20373 ± 2048	5297 ± 1069	26
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	16380 ± 566	5577 ± 192	34
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	16364 ± 2028	5285 ± 885	32
9D33 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	8126 ± 407	5774 ± 866	71
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	3587 <sup>c</sup>	5290 ± 619	147
9D33 100µg	973 <sup>c</sup>	720 ± 105	74
<b>B. Resultados de la inhibición en%</b>			
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>% de inhibición de la estimulación de TSH<sup>d</sup></b>		
	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	0	9	
2G2 10µg/mL	14		
2G2 100µg/mL	2	21	
9D33 0,001µg/mL	-8	23	
9D33 0,01µg/mL	5	10	
9D33 0,1µg/mL	23	5	
9D33 1µg/mL	24	10	
9D33 10µg/mL	62	1	
9D33 100µg/mL	83	10	

<sup>a</sup>Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico  
<sup>b</sup>Concentración final de la TSH = 1,5 ng/mL  
<sup>c</sup>Valor medio del duplicado  
<sup>d</sup>

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis más TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}} \right]$$

2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para la tiroglobulina (control negativo para 9D33)

Tabla 17h Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Arg109 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		
<b>Muestra para análisis<sup>a</sup></b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	734 ± 285	1214 ± 66	165
TSH	15683 ± 3332	16060 ± 3546	102
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	16962 ± 3784	15661 ± 1152	92
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	16231 <sup>c</sup>	12589 ± 1450	78
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	16675 ± 3301	16387 ± 1142	98
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	16646 ± 2135	15716 ± 283	94
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	18722 ± 1091	14075 ± 905	75
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	13435 ± 333	13803 ± 1416	103
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	8004 ± 2106	14551 ± 2498	182
9D33 10µg /mL + TSH <sup>b</sup>	4718 ± 867	11169 ± 488	237
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	1991 ± 494	9554 ± 830	480
9D33 100µg	1155 ± 73	1148 ± 19	99
<b>B. Resultados de la inhibición en%</b>			
	<b>% de inhibición de la estimulación de TSH<sup>d</sup></b>		
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	-8	2	
2G2 10µg/mL	-3	22	
2G2 100µg/mL	-6	-2	
9D33 0,001µg/mL	-6	2	
9D33 0,01µg/mL	-19	12	
9D33 0,1µg/mL	14	14	
9D33 1µg/mL	49	9	
9D33 10µg/mL	70	30	
9D33 100µg/mL	87	59	
<sup>a</sup> Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico			
<sup>b</sup> Concentración final de la TSH = 1,5 ng/mL			
<sup>c</sup> Valor medio del duplicado			
<sup>d</sup>			
<b>% de inhibición = 100 × [ 1 - <math>\frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis más TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}}</math> ]</b>			
2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para la tiroglobulina (control negativo para 9D33)			

Tabla 17i Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Agr109 mutado a Asp. Efecto de diferentes diluciones de anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		
<b>Muestra para análisis<sup>a</sup></b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	656 ± 50	312 ± 151	48
TSH	16975 <sup>c</sup>	12341 ± 1724	73
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	13540 ± 1490	11663 ± 980	86
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	12805 ± 785	10932 ± 1779	85
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	13629 ± 689	12795 ± 2243	94
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	14034 ± 1530	14046 ± 2244	100
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	12506 ± 1906	10787 ± 1468	86
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	10790 ± 1948	14003 ± 89	130
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	7392 ± 661	15087 ± 2096	204
9D33 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	3293 ± 457	11271 ± 1633	342
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	2062 ± 439	10178 ± 1136	494
9D33 100µg	564 ± 66	367 ± 45	65
<b>B. Resultados de la inhibición en%</b>			
	<b>% de inhibición de la estimulación de TSH<sup>d</sup></b>		
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	20	5	
2G2 10µg/mL	25	11	
2G2 100µg/mL	20	4	
9D33 0,001µg/mL	17	-14	
9D33 0,01µg/mL	26	13	
9D33 0,1µg/mL	36	-13	
9D33 1µg/mL	56	-22	
9D33 10µg/mL	81	9	
9D33 100µg/mL	88	18	

<sup>a</sup>Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico  
<sup>b</sup>Concentración final de la TSH = 1,5 ng/mL  
<sup>c</sup>Valor medio del duplicado  
<sup>d</sup>

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis más TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}} \right]$$

2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para la tiroglobulina (control negativo para 9D33)

Tabla 17] Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Lys129 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		
<b>Muestra para análisis<sup>a</sup></b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	748 ± 106	710 ± 70	95
TSH	21197 ± 1858	11364 ± 1348	54
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	20669 ± 1577	13312 ± 424	64
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	21235 ± 2707	11279 ± 1786	53
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	20993 ± 1117	14886 ± 2848	71
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	20299 ± 2578	12194 ± 1369	60
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	21147 ± 908	12452 ± 1342	59
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	19098 ± 1944	12812 ± 1016	67
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	10880 ± 1530	14217 ± 959	131
9D33 10µg /mL + TSH <sup>b</sup>	6851 ± 1132	12058 ± 80	176
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	3170 ± 713	10607 ± 754	335
9D33 100µg	1029 ± 120	1140 ± 58	111
<b>B. Resultados de la inhibición en%</b>			
	<b>% de inhibición de la estimulación de TSH<sup>c</sup></b>		
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	2	-17	
2G2 10µg/mL	0	0	
2G2 100µg/mL	1	-31	
9D33 0,001µg/mL	4	-7	
9D33 0,01µg/mL	0	-10	
9D33 0,1µg/mL	10	-13	
9D33 1µg/mL	49	-25	
9D33 10µg/mL	68	-6	
9D33 100µg/mL	95	7	

<sup>a</sup>Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico  
<sup>b</sup>Concentración final de la TSH = 1,5 ng/mL  
<sup>c</sup>

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis más TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}} \right]$$

2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para la tiroglobulina (control negativo para 9D33)

Tabla 17k Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Lys129 mutado a Asp. Efecto de diferentes diluciones de anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		
<b>Muestra para análisis<sup>a</sup></b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	412 <sup>c</sup>	401 ± 16	97
TSH	12783 ± 422	4914 ± 292	38
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	12434 ± 264	5191 <sup>c</sup>	42
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	11974 ± 467	4830 ± 119	40
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	12042 ± 1466	4168 ± 45	35
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	10568 ± 844	5012 ± 134	47
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	11833 ± 1266	8035 <sup>c</sup>	68
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	9392 ± 1300	4905 ± 805	52
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	5031 ± 397	6339 ± 823	126
9D33 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	2515 ± 278	4567 ± 505	182
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	776 <sup>c</sup>	3346 ± 419	431
9D33 100µg	509 ± 46	473 ± 102	93
<b>B. Resultados de la inhibición en%</b>			
	<b>% de inhibición de la estimulación de TSH<sup>d</sup></b>		
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	3	-6	
2G2 10µg/mL	6	2	
2G2 100µg/mL	6	15	
9D33 0,001µg/mL	17	-2	
9D33 0,01µg/mL	7	-64	
9D33 0,1µg/mL	27	0	
9D33 1µg/mL	61	-29	
9D33 10µg/mL	80	7	
9D33 100µg/mL	94	32	
<sup>a</sup> Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico			
<sup>b</sup> Concentración final de la TSH = 1,5 ng/mL			
<sup>c</sup> Valor medio del duplicado			
<sup>d</sup>			
<b>% de inhibición = 100 × [ 1 - <math>\frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis más TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}}</math> ]</b>			
2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para la tiroglobulina (control negativo para 9D33)			

Tabla 171 Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Phe130 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		
<b><sup>a</sup>Muestra para análisis</b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	1019 ± 65	915 ± 83	90
TSH	18088 ± 2962	11466 ± 995	63
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	15207 ± 1297	12415 ± 570	82
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	16741 ± 1303	11439 ± 440	68
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	19281 ± 3245	12223 ± 895	63
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	14911 ± 417	10584 ± 1719	71
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	15722 ± 693	11744 ± 281	75
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	14409 ± 810	9104 ± 407	63
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	10277 ± 629	5212 ± 251	51
9D33 10µg /mL + TSH <sup>b</sup>	7116 ± 438	3071 ± 421	43
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	3953 ± 523	1572 ± 150	40
9D33 100µg	1110 ± 43	890 ± 78	80
<b>B. Resultados de la inhibición en%</b>			
	<b>% de inhibición de la estimulación de TSH<sup>c</sup></b>		
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	16	-8	
2G2 10µg/mL	7	0	
2G2 100µg/mL	-7	-7	
9D33 0,001µg/mL	18	8	
9D33 0,01µg/mL	13	-2	
9D33 0,1µg/mL	20	21	
9D33 1µg/mL	43	55	
9D33 10µg/mL	61	73	
9D33 100µg/mL	78	86	
<sup>a</sup> Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico			
<sup>b</sup> Concentración final de la TSH = 1,5 ng/mL			
<sup>c</sup>			
<b>% de inhibición = 100 × [ 1 - <math>\frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis más TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}}</math> ]</b>			
2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para la tiroglobulina (control negativo para 9D33)			

Tabla 17m Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Phe134 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
<b>Muestra para análisis<sup>a</sup></b>	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	1045 ± 98	740 ± 160	71
TSH	19796 ± 1401	20249 ± 425	102
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	20013 ± 2808	19662 ± 1329	98
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	19219 ± 3257	19001 ± 657	99
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	20722 ± 1156	20770 ± 594	100
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	20420 ± 2123	22086 ± 351	108
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	18407 ± 1250	21142 ± 1984	115
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	18571 ± 1082	21620 ± 1118	116
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	13342 ± 433	21312 ± 1471	160
9D33 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	9106 ± 1056	16724 ± 1503	184
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	4341 ± 1186	11788 ± 760	272
9D33 100µg	1193 ± 108	1149 ± 112	96
<b>B. Resultados de la inhibición en%</b>			
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>% de inhibición de la estimulación de TSH<sup>d</sup></b>		
	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	-1	3	
2G2 10µg/mL	3	6	
2G2 100µg/mL	-5	-3	
9D33 0,001µg/mL	-3	-9	
9D33 0,01µg/mL	7	-4	
9D33 0,1µg/mL	6	-7	
9D33 1µg/mL	33	-5	
9D33 10µg/mL	54	17	
9D33 100µg/mL	78	42	

<sup>a</sup>Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico  
<sup>b</sup>Concentración final de la TSH = 1,5 ng/mL  
<sup>c</sup>Valor medio del duplicado  
<sup>d</sup>

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis más TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}} \right]$$

2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para la tiroglobulina (control negativo para 9D33)

Tabla 17n Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Asp160 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH.

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
<b>Muestra para análisis<sup>a</sup></b>	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	521 ± 32	483 ± 60	93
TSH	16267 ± 1932	12291 ± 1040	76
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	15536 ± 1852	13116 ± 693	84
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	14976 ± 1066	10613 ± 759	71
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	15211 ± 1303	12054 ± 447	79
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	12507 ± 1070	14316 ± 554	114
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	14146 ± 50	11125 ± 1618	79
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	13139 ± 526	1312 ± 116	10
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	10290 <sup>c</sup>	985 ± 285	10
9D33 10µg /mL + TSH <sup>b</sup>	3445 ± 491	796 ± 135	23
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	2211 ± 125	752 ± 82	34
9D33 100µg	498 ± 3	539 ± 53	108
<b>B. Resultados de la inhibición en%</b>			
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>% de inhibición de la estimulación de TSH<sup>d</sup></b>		
	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	4	-7	
2G2 10µg/mL	8	14	
2G2 100µg/mL	6	2	
9D33 0,001µg/mL	23	-16	
9D33 0,01µg/mL	13	9	
9D33 0,1µg/mL	19	89	
9D33 1µg/mL	63	92	
9D33 10µg/mL	79	94	
9D33 100µg/mL	86	94	
<sup>a</sup> Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico <sup>b</sup> Concentración final de la TSH = 1,5 ng/mL <sup>c</sup> Valor medio del duplicado <sup>d</sup> $\% \text{ de inhibición} = 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis más TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}} \right]$			
2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para la tiroglobulina (control negativo para 9D33)			

Tabla 17o Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Lys183 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
<b>Muestra para análisis<sup>a</sup></b>	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	371 ± 17	264 ± 29	71
TSH	13792 ± 1706	12173 ± 3906	88
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	9996 ± 1289	14200 ± 5323	142
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	12279 ± 2013	10616 ± 2142	86
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	10520 ± 1450	12789 ± 902	122
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	10372 <sup>c</sup>	13874 ± 1472	134
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	12431 ± 2262	17223 ± 6145	139
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	9470 ± 865	14012 ± 1217	148
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	2920 ± 597	10713 ± 3015	367
9D33 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	2828 ± 744	3857 ± 316	136
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	2210 ± 391	3220 ± 261	146
9D33 100µg	260 ± 76	320 ± 12	123
<b>B. Resultados de la inhibición en%</b>			
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>% de inhibición de la estimulación de TSH<sup>d</sup></b>		
	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	28	-17	
2G2 10µg/mL	11	13	
2G2 100µg/mL	24	-5	
9D33 0,001µg/mL	25	-14	
9D33 0,01µg/mL	10	-42	
9D33 0,1µg/mL	31	-15	
9D33 1µg/mL	79	12	
9D33 10µg/mL	79	68	
9D33 100µg/mL	84	74	
<sup>a</sup> Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico			
<sup>b</sup> Concentración final de la TSH = 0,3 ng/mL			
<sup>c</sup> Valor medio del duplicado			
<sup>d</sup>			
<b>% de inhibición = 100 × [ 1 - <math>\frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis más TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}}</math> ]</b>			
2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para la tiroglobulina (control negativo para 9D33)			

Tabla 17p Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Lys183 mutado a Asp. Efecto de diferentes diluciones de anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		
<sup>a</sup> Muestra para análisis	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	346 ± 47	405 ± 38	117
TSH	8666 ± 185	5131 ± 788	59
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	8025 ± 514	3993 ± 499	50
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	9382 ± 722	4641 ± 1139	49
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	6810 ± 871	4838 ± 543	71
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	6931 ± 631	4903 ± 880	70
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	7419 ± 989	3778 ± 300	51
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	6250 ± 208	4025 ± 1208	64
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	3686 ± 390	2757 ± 297	75
9D33 10µg /mL + TSH <sup>b</sup>	2197 ± 141	1818 ± 233	83
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	1293 ± 113	1294 ± 177	100
9D33 100µg	437 ± 30	294 ± 46	67
<b>B. Resultados de la inhibición en%</b>			
	<b>% de inhibición de la estimulación de TSH<sup>c</sup></b>		
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	7	22	
2G2 10µg/mL	-8	10	
2G2 100µg/mL	21	6	
9D33 0,001µg/mL	20	4	
9D33 0,01µg/mL	14	26	
9D33 0,1µg/mL	28	22	
9D33 1µg/mL	57	46	
9D33 10µg/mL	75	65	
9D33 100µg/mL	85	75	
<sup>a</sup> Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico			
<sup>b</sup> Concentración final de la TSH = 1,5 ng/mL			
<sup>c</sup>			
<b>% de inhibición = 100 × [ 1 - <math>\frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis más TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}}</math> ]</b>			
2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para la tiroglobulina (control negativo para 9D33)			

Tabla 17g Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Tyr185 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		
<b>Muestra para análisis<sup>a</sup></b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico <sup>c</sup>		118 ± 60	358
TSH	8951 ± 1717	4807 ± 518	54
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	9852 ± 2211	4219 ± 193	43
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	10415 ± 1974	5199 ± 1202	50
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	10829 ± 2611	5153 ± 1552	48
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	11064 ± 2932	5476 ± 216	49
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	9945 ± 366	5437 ± 632	55
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	10451 ± 299	3132 ± 251	30
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	2849 ± 627	1717 ± 219	60
9D33 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	1955 ± 582	1038 ± 27	53
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	1263 ± 204	614 ± 329	49
9D33 100µg	103 ± 106	178 ± 18	173
<b>B. Resultados de la inhibición en%</b>			
	<b>% de inhibición de la estimulación de TSH<sup>d</sup></b>		
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	-10	12	
2G2 10µg/mL	-16	-8	
2G2 100µg/mL	-20	-7	
9D33 0,001µg/mL	-24	-14	
9D33 0,01µg/mL	-11	-13	
9D33 0,1µg/mL	-17	35	
9D33 1µg/mL	68	64	
9D33 10µg/mL	78	78	
9D33 100µg/mL	86	87	

<sup>a</sup>Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico  
<sup>b</sup>Concentración final de la TSH = 1,5 ng/mL  
<sup>c</sup>Valor medio del duplicado  
<sup>d</sup>

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis más TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}} \right]$$

2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para la tiroglobulina (control negativo para 9D33)

Tabla 17r Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Tyr206 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		
<b>Muestra para análisis<sup>a</sup></b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	125 ± 13	127 ± 39	102
TSH	7714 ± 372	6022 ± 922	78
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	9832 ± 2099	7272 ± 732	74
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	6648 ± 859	6423 ± 781	97
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	9666 ± 1599	6251 ± 289	65
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	7654 ± 1675	6523 ± 485	85
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	7699 ± 770	7540 ± 1313	98
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	8113 ± 222	3392 ± 190	42
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	2495 ± 581	1439 ± 466	58
9D33 10µg /mL + TSH <sup>b</sup>	2487 ± 396	776 ± 128	31
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	920 ± 210	832 ± 207	90
9D33 100µg	117 ± 31	132 ± 10	113
<b>B. Resultados de la inhibición en%</b>			
	<b>% de inhibición de la estimulación de TSH<sup>c</sup></b>		
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	-27	-21	
2G2 10µg/mL	14	-7	
2G2 100µg/mL	-25	-4	
9D33 0,001µg/mL	1	-8	
9D33 0,01µg/mL	0	-25	
9D33 0,1µg/mL	-5	44	
9D33 1µg/mL	68	76	
9D33 10µg/mL	68	87	
9D33 100µg/mL	88	86	
<sup>a</sup> Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico			
<sup>b</sup> Concentración final de la TSH = 1,5 ng/mL			
<sup>c</sup>			
<b>% de inhibición = 100 × [ 1 - <math>\frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis más TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}}</math> ]</b>			
2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para la tiroglobulina (control negativo para 9D33)			

Tabla 17s Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Lys209 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		
<b><sup>a</sup>Muestra para análisis</b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	638 ± 46	173 ± 26	27
TSH	14724 ± 601	5685 ± 1592	39
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	15078 ± 2313	10707 ± 2563	71
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	16435 ± 427	11223 ± 2495	68
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	17412 <sup>c</sup>	7649 ± 1735	44
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	13867 <sup>c</sup>	8335 ± 691	60
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	19164 ± 1515	7447 ± 3118	39
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	18410 <sup>c</sup>	5547 ± 2107	30
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	7982 ± 1605	1292 ± 512	16
9D33 10µg /mL + TSH <sup>b</sup>	3503 ± 1401	772 ± 89	22
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	964 ± 474	710 ± 148	74
9D33 100µg	529 ± 22	860 ± 212	163
<b>B. Resultados de la inhibición en%</b>			
	<b>% de inhibición de la estimulación de TSH<sup>d</sup></b>		
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	2	-88	
2G2 10µg/mL	-12	-97	
2G2 100µg/mL	-18	-35	
9D33 0,001µg/mL	6	-47	
9D33 0,01µg/mL	-30	-31	
9D33 0,1µg/mL	-25	2	
9D33 1µg/mL	54	77	
9D33 10µg/mL	76	86	
9D33 100µg/mL	93	88	
<sup>a</sup> Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico			
<sup>b</sup> Concentración final de la TSH = 1,5 ng/mL			
<sup>c</sup> Valor medio del duplicado			
<sup>d</sup>			
<b>% de inhibición = 100 × [ 1 - <math>\frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis más TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}}</math> ]</b>			
2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para la tiroglobulina (control negativo para 9D33)			

Tabla 17t Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Lys250 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		
<b>Muestra para análisis<sup>a</sup></b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	1068 ± 164	1491 ± 182	140
TSH	22245 <sup>c</sup>	15844 ± 2736	71
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	19749 ± 2395	21309 ± 1640	108
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	17609 ± 981	13048 ± 1718	74
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	22060 ± 2265	17966 ± 1997	81
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	21265 ± 375	19697 ± 2129	93
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	21435 ± 3957	24374 ± 4050	114
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	16626 ± 1019	20358 ± 2627	122
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	10260 ± 1863	17657 ± 2149	172
9D33 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	7115 ± 1337	9725 ± 1349	137
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	2012 <sup>c</sup>	6387 ± 916	317
9D33 100µg	1349 ± 122	1714 ± 144	127
<b>B. Resultados de la inhibición en%</b>			
	<b>% de inhibición de la estimulación de TSH<sup>d</sup></b>		
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	11	-34	
2G2 10µg/mL	21	18	
2G2 100µg/mL	1	-13	
9D33 0,001µg/mL	4	-24	
9D33 0,01µg/mL	4	-54	
9D33 0,1µg/mL	25	-28	
9D33 1µg/mL	54	-11	
9D33 10µg/mL	68	39	
9D33 100µg/mL	91	60	
<sup>a</sup> Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico			
<sup>b</sup> Concentración final de la TSH = 1,5 ng/mL			
<sup>c</sup> Valor medio del duplicado			
<sup>d</sup>			
<b>% de inhibición = 100 × [ 1 - <math>\frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis más TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}}</math> ]</b>			
2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para la tiroglobulina (control negativo para 9D33)			

Tabla 17u Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Glu251 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
<b>Muestra para análisis<sup>a</sup></b>	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	636 ± 116	779 ± 119	122
TSH	23009 ± 3972	11398 ± 2719	50
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	17299 ± 1029	18350 <sup>c</sup>	106
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	18521 ± 472	11028 ± 839	60
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	17147 <sup>c</sup>	6999 ± 631	41
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	19901 <sup>c</sup>	12930 ± 1264	65
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	15319 ± 2933	17445 ± 1677	114
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	18030 ± 4806	8723 ± 1100	48
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	7108 ± 1592	4776 ± 933	67
9D33 10µg /mL + TSH <sup>b</sup>	4059 ± 704	2300 ± 680	57
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	1809 ± 1090	1546 ± 614	85
9D33 100µg	718 ± 122	954 ± 49	133
<b>B. Resultados de la inhibición en%</b>			
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>% de inhibición de la estimulación de TSH<sup>d</sup></b>		
	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	25	-61	
2G2 10µg/mL	20	-3	
2G2 100µg/mL	25	39	
9D33 0,001µg/mL	14	-13	
9D33 0,01µg/mL	33	-53	
9D33 0,1µg/mL	22	23	
9D33 1µg/mL	69	58	
9D33 10µg/mL	82	80	
9D33 100µg/mL	92	86	
<sup>a</sup> Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico			
<sup>b</sup> Concentración final de la TSH = 1,5 ng/mL			
<sup>c</sup> Valor medio del duplicado			
<sup>d</sup>			
<b>% de inhibición = 100 × [ 1 - <math>\frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis más TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}}</math> ]</b>			
2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para la tiroglobulina (control negativo para 9D33)			

Tabla 17v Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Arg274 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de anticuerpo monoclonal para el receptor de la TSH (9D33) con actividad antagonista de la TSH

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		
<b>Muestra para análisis<sup>a</sup></b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	<b>Tipo mutado/natural (%)</b>
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	621 ± 37	157 <sup>c</sup>	25
TSH	5355 ± 1126	3335 <sup>c</sup>	62
2G2 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	4032 <sup>c</sup>	4830 <sup>c</sup>	120
2G2 10µg/mL + TSH <sup>b</sup>	4399 ± 504	3099 ± 407	70
2G2 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	4247 <sup>c</sup>	3292 ± 271	78
9D33 0,001µg/mL + TSH <sup>b</sup>	3663 ± 310	4012 ± 591	110
9D33 0,01µg/mL + TSH <sup>b</sup>	3881 ± 459	4330 ± 631	112
9D33 0,1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	4788 ± 1443	721 ± 111	15
9D33 1µg/mL + TSH <sup>b</sup>	741 ± 104	169 ± 3	23
9D33 10µg /mL + TSH <sup>b</sup>	885 <sup>c</sup>	145 <sup>c</sup>	16
9D33 100µg/mL + TSH <sup>b</sup>	645 ± 53	131 <sup>c</sup>	20
9D33 100µg	637 <sup>c</sup>	710 ± 23	111
<b>B. Resultados de la inhibición en%</b>			
	<b>% de inhibición de la estimulación de TSH<sup>d</sup></b>		
<b>Concentración de anticuerpos</b>	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
2G2 1µg/mL	25	-45	
2G2 10µg/mL	18	7	
2G2 100µg/mL	21	1	
9D33 0,001µg/mL	32	-20	
9D33 0,01µg/mL	28	-30	
9D33 0,1µg/mL	11	78	
9D33 1µg/mL	86	95	
9D33 10µg/mL	83	96	
9D33 100µg/mL	88	96	
<sup>a</sup> Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico			
<sup>b</sup> Concentración final de la TSH = 1,5 ng/mL			
<sup>c</sup> Valor medio del duplicado			
<sup>d</sup>			
<b>% de inhibición = 100 × [ 1 - <math>\frac{\text{AMPc en presencia de muestra para análisis más TSH}}{\text{AMPc en presencia de tampón de ensayo de AMPc + TSH}}</math> ]</b>			
2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para la tiroglobulina (control negativo para 9D33)			

Tabla 18 Resumen de los efectos de la mutación (con respecto al tipo natural) sobre la inhibición de la estimulación del AMP cíclico mediada por TSH por el anticuerpo monoclonal de ratón 9D33

Mutación del aa	Inhibición de la estimulación del AMP cíclico mediada por la TSH por 9D33
Lys58 a Ala	Reducción marcada
Ile60 a Ala	Sin efecto
Arg80 a Ala	Reducción marcada
Arg80 a Asp	Reducción marcada
Tyr82 a Ala	Reducción marcada
Glu107 a Ala	Sin efecto
Glu107 a Arg	Reducción marcada
Arg109 a Ala	Reducción marcada
Arg109 a Asp	Reducción marcada
Lys129 a Ala	Reducción marcada
Lys129 a Asp	Reducción marcada
Phe130 a Ala	Sin efecto
Phe134 a Ala	Reducción marcada
Asp160 a Ala	<b>Efecto mejorado</b>
Lys183 a Ala	Sin efecto
Lys183 a Asp	Sin efecto
Tyr185 a Ala	Sin efecto
Tyr206 a Ala	Sin efecto
Lys209 a Ala	Sin efecto
Lys250 a Ala	Algo de reducción
Glu251 a Ala	Sin efecto
Arg255 a Asp	<b>Efecto mejorado</b>
Arg274 a Ala	<b>Efecto mejorado</b>

Tabla 19a Estimulación de la producción de AMP cíclico por 8 sueros de pacientes con enfermedad de Graves en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Arg80 mutado a Ala

Muestra para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	720 $\pm$ 122	1003 $\pm$ 85	139
Mezcla de HBD	787 $\pm$ 125	848 $\pm$ 153	108
G1	14546 $\pm$ 1913	10329 $\pm$ 1326	71
G9	9192 <sup>a</sup>	633 $\pm$ 36	7
G15	10180 $\pm$ 1530	5538 $\pm$ 958	54
G17	6592 $\pm$ 291	6897 $\pm$ 77	105
G19	9042 $\pm$ 1407	6907 $\pm$ 621	76
G20	11821 $\pm$ 1569	1895 $\pm$ 702	16
G21	11951 $\pm$ 1402	11911 $\pm$ 2267	100
G22	10877 $\pm$ 752	12125 $\pm$ 2063	111
TSH (3ng/mL)	12439 $\pm$ 1630	18231 $\pm$ 1357	147
Fab de hMAb TSHR1 (10ng/mL)	15900 $\pm$ 1903	965 $\pm$ 164	6

<sup>a</sup>Valor medio del duplicado

HBD = mezcla de suero sanguíneo de donantes sanos

G1-G23 = suero de pacientes con la enfermedad de Graves

Tabla 19b Estimulación de la producción de AMP cíclico por 8 sueros de pacientes con enfermedad de Graves en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Arg 80 mutado a Asp

Muestra para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	645 ± 99	1208 ± 141	187
Mezcla de HBD	496 ± 78	1150 ± 206	232
G1	23914 ± 3837	9108 ± 130	38
G9	14026 ± 2339	434 <sup>a</sup>	3
G15	9131 <sup>a</sup>	2592 ± 1027	28
G17	6311 ± 545	7947 ± 733	126
G19	10232 ± 1812	8840 ± 135	86
G20	7893 ± 359	1670 ± 275	21
G21	11033 ± 1326	12006 ± 1256	109
G22	14261 ± 686	15182 ± 2888	106
TSH (3ng/mL)	26172 ± 3344	18825 ± 1323	72
Fab de hMAb TSHR1(10ng/mL)	22054 ± 1743	830 ± 44	4

<sup>a</sup>Valor medio del duplicado  
HBD = mezcla de suero sanguíneo de donantes sanos  
G1-G23 = suero de pacientes con la enfermedad de Graves

Tabla 19c Estimulación de la producción de AMP cíclico por 8 sueros de pacientes con enfermedad de Graves en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Glu107 mutado a Ala

Muestra para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	467 ± 55	1044 ± 120	224
Mezcla de HBD	349 ± 31	563 ± 16	161
G1	24022 ± 2266	11449 ± 1745	48
G2	10291 ± 2092	9515 ± 1660	92
G3	1750 ± 89	945 ± 68	54
G4	5654 ± 902	630 ± 105	11
G5	1997 ± 429	841 ± 90	42
G6	8862 ± 648	2741 ± 502	31
G7	8524 ± 1333	563 ± 9	7
G10	1072 ± 78	862 ± 57	80
TSH (3ng/mL)	21689 ± 4541	14393 ± 3517	66
Fab de hMAb TSHR1 (10ng/mL)	20193 <sup>a</sup>	1269 ± 214	6

<sup>a</sup>Valor medio del duplicado  
HBD = mezcla de suero sanguíneo de donantes sanos  
G1-G23 = suero de pacientes con la enfermedad de Graves

Tabla 19d Estimulación de la producción de AMP cíclico por 8 sueros de pacientes con enfermedad de Graves en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Arg109 mutado a Ala

Muestra para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	1109 ± 216	837 ± 166	75
Mezcla de HBD	469 ± 68	538 ± 156	115
G1	20487 ± 2394	18398 ± 2682	90
G11	1541 ± 40	471 ± 116	31
G15	12402 ± 671	6619 <sup>a</sup>	53
G16	2382 ± 166	508 <sup>a</sup>	21
G17	8351 ± 142	240 <sup>a</sup>	3
G18	2160 <sup>a</sup>	271 ± 33	13
G19	11235 ± 1167	7134 ± 458	63
G20	10485 ± 1872	5486 ± 231	52
TSH (3ng/mL)	22177 ± 3724	18545 ± 1365	84
Fab de hMAb TSHR1 (10ng/mL)	18509 ± 1980	8835 <sup>a</sup>	48

<sup>a</sup>Valor medio del duplicado  
HBD = mezcla de suero sanguíneo de donantes sanos  
G1-G23 = suero de pacientes con la enfermedad de Graves

Tabla 19e Estimulación de la producción de AMP cíclico por 8 sueros de pacientes con enfermedad de Graves en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Arg109 mutado a Asp

Muestra para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	1164 ± 135	156 ± 17	13
Mezcla de HBD	684 ± 9	142 <sup>a</sup>	21
G1	13261 ± 1829	12183 ± 440	92
G9	10959 ± 1289	3985 ± 714	36
G15	10163 ± 1093	2895 ± 372	28
G17	8802 ± 1300	ud	nd
G19	9120 ± 1226	7588 ± 261	83
G20	9028 ± 0	774 ± 170	9
G21	11249 ± 665	2711 ± 47	24
G22	10929 ± 605	592 ± 159	5
TSH (3ng/mL)	13087 ± 1240	12308 ± 500	94
Fab de hMAb TSHR1 (10ng/mL)	12318 ± 513	29701 <sup>a</sup>	24

<sup>a</sup>Valor medio del duplicado  
HBD = mezcla de suero sanguíneo de donantes sanos  
G1-G23 = suero de pacientes con la enfermedad de Graves  
ud = no detectable  
nd = no determinado

Tabla 19f Estimulación de la producción de AMP cíclico por 8 sueros de pacientes con enfermedad de Graves en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Lys129 mutado a Ala

Muestra para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	733 ± 130	774 ± 116	106
Mezcla de HBD	555 ± 82	676 ± 63	122
G1	14504 ± 1914	12217 ± 1309	84
G9	11371 ± 1268	6705 ± 490	59
G15	8331 ± 413	5896 ± 841	71
G17	6769 ± 1311	3642 ± 534	54
G19	6232 <sup>a</sup>	5588 ± 433	90
G20	6974 ± 416	4561 <sup>a</sup>	65
G21	9638 ± 923	6384 ± 717	66
G22	11167 ± 849	8579 ± 1015	77
TSH (3ng/mL)	12021 ± 597	10747 ± 1097	89
Fab de hMAb TSHR1 (10ng/mL)	15281 ± 2616	5457 ± 294	36

<sup>a</sup>Valor medio del duplicado  
HBD = mezcla de suero sanguíneo de donantes sanos  
G1-G23 = suero de pacientes con la enfermedad de Graves

Tabla 19g Estimulación de la producción de AMP cíclico por 8 sueros de pacientes con enfermedad de Graves en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Lys183 mutado a Ala

Muestra para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<u>Experimento 1</u>			
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	564 <sup>a</sup>	501 ± 30	89
Mezcla de HBD	388 ± 7	423 ± 83	109
G1	20190 <sup>a</sup>	13292 ± 1339	66
G2	11793 ± 1112	4213 ± 350	36
G3	3406 ± 149	2699 ± 46	79
G4	3465 ± 102	2473 ± 302	71
G5	3850 ± 297	4540 <sup>a</sup>	118
G6	2702 ± 76	2148 ± 262	79
G7	3666 ± 72	11567 ± 604	316
G10	3682 ± 136	9445 <sup>a</sup>	257
TSH (3ng/mL)	15633 ± 1329	15528 ± 2057	99
Fab de hMAb TSHR1 (10ng/mL)	12921 ± 1927	2685-1166	21
<u>Experimento 2</u>			
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	609 ± 103	824 ± 115	135
Mezcla de HBD	767 <sup>a</sup>	847 ± 82	110
G7	8582 ± 919	21820 ± 3119	254
G10	6900 ± 1020	11315 ± 582	164
TSH (3ng/mL)	6652 ± 507	10158 <sup>a</sup>	153

<sup>a</sup>Valor medio del duplicado  
HBD = mezcla de suero sanguíneo de donantes sanos  
G1-G23 = suero de pacientes con la enfermedad de Graves

Tabla 19h Estimulación de la producción de AMP cíclico por 8 sueros de pacientes con enfermedad de Graves en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Lys183 mutado a Asp

Muestra para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	1177 ± 84	1060 ± 129	90
Mezcla de HBD	1083 ± 90	818 ± 87	76
G1	23805 ± 711	16885 ± 3813	71
G2	15218 ± 742	5498 ± 463	36
G3	6751 ± 299	2222 <sup>a</sup>	33
G4	8658 <sup>a</sup>	1891 ± 383	21
G5	9597 ± 880	5432 ± 502	57
G6	6452 ± 251	6751 ± 295	105
G7	9408 ± 1016	8245 ± 1419	88
G10	10221 ± 634	5346 ± 794	52
TSH (3ng/mL)	20683 ± 1193	20430 ± 1646	99
Fab de hMAb TSHR1 (10ng/mL)	21674 ± 6631	2088 ± 332	11

<sup>a</sup>Valor medio del duplicado  
HBD = mezcla de suero sanguíneo de donantes sanos  
G1-G23 = suero de pacientes con la enfermedad de Graves

Tabla 19i Estimulación de la producción de AMP cíclico por 8 sueros de pacientes con enfermedad de Graves en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Arg255 mutado a Ala y Trp258 a Ala

Muestra para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	971 ± 158	852 ± 39	88
Mezcla de HBD	195 ± 15	192 ± 11	98
G1	23823 ± 3713	10040 <sup>a</sup>	42
G15	16707 <sup>a</sup>	988 ± 184	6
G16	5936 <sup>a</sup>	284 ± 56	5
G18	4188 ± 249	539 ± 54	13
G19	9319 ± 2112	1166 ± 187	13
G21	18524 <sup>a</sup>	1131 ± 90	6
G22	20146 ± 599	10350 <sup>a</sup>	51
G23	3135 ± 965	614 ± 112	20
TSH (3ng/mL)	22914 ± 3567	21673 ± 2216	95
Fab de hMAb TSHR1 (10ng/mL)	22605 ± 2137	1228 ± 48	5

<sup>a</sup>Valor medio del duplicado  
HBD = mezcla de suero sanguíneo de donantes sanos  
G1-G23 = suero de pacientes con la enfermedad de Graves

Tabla 20 Resumen del efecto de la mutación (con respecto al tipo natural) sobre la estimulación de la producción de AMP por sueros (n = 8) de pacientes con la enfermedad de Graves

Mutación del aa	Reducción marcada	Reducción	Efecto pequeño	Sin efecto	Efecto aumentado
Arg80 a Ala	2/8	1/8	2/8	3/8	0/8
Arg80 a Asp	3/8	1/8	1/8	3/8	0/8
Glu107 a Ala	2/8	4/8	1/8	1/8	0/8
Arg109 a Ala	3/8	3/8	1/8	1/8	0/8
Arg109 a Asp	5/8	1/8	1/8	1/8	0/8
Lys129 a Ala	0/8	2/8	5/8	1/8	0/8
Lys183 a Ala	0/8	1/8	4/8	1/8	2/8
Lys183 a Asp	1/8	4/8	2/8	1/8	0/8
Arg255 a Asp	8/8	0/8	0/8	0/8	0/8
Arg255 a Ala y Trp258 a Ala	6/8	2/8	0/8	0/8	0/8

Se muestra para cada mutación el número de sueros afectados de 8 sueros analizados.

Tabla 21a Estimulación de la producción de AMP cíclico por 6 diferentes anticuerpos monoclonales de ratón estimulantes del tiroides (mTSMAbs) en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Arg80 mutado a Asp.

Muestra para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	484 $\pm$ 74	880 $\pm$ 142	182
hMAb TSHR1 (10ng/mL)	15218 $\pm$ 1052	1284 $\pm$ 469	8
2G2 (1 $\mu$ g/mL)	726 $\pm$ 164	946 $\pm$ 207	130
TSMAb 1 (1 $\mu$ g/mL)	4862 $\pm$ 510	1480 $\pm$ 160	30
TSMAb 2 (1 $\mu$ g/mL)	3390 $\pm$ 459	945 $\pm$ 200	28
TSMAb C (10ng/mL)	5261 $\pm$ 472	1532 $\pm$ 320	29
TSMAb D (1 $\mu$ g/mL)	6714 $\pm$ 398	1255 $\pm$ 316	19
TSMAb E (1 $\mu$ g/mL)	6861 $\pm$ 1025	1083 $\pm$ 199	16
TSMAb F (100ng/mL)	11271 $\pm$ 1753	1424 $\pm$ 279	13

2G2 es un anticuerpo monoclonal para tiroglobulina (control negativo)

Tabla 21b Estimulación de la producción de AMP cíclico por 6 diferentes anticuerpos monoclonales de ratón estimulantes del tiroides (mTSMABs) en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Glu107 mutado a Ala

Muestra para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	470 $\pm$ 85	1130 $\pm$ 119	240
hMAb TSHR1 (10ng/mL)	19175 <sup>a</sup>	1238 $\pm$ 15	6
2G2 (1 $\mu$ g/mL)	632 $\pm$ 214	1057 $\pm$ 129	167
TSMAB 1 (1 $\mu$ g/mL)	5986 $\pm$ 374	1049 $\pm$ 170	18
TSMAB 2 (1 $\mu$ g/mL)	4214 $\pm$ 448	1106 $\pm$ 105	26
TSMAB C (10ng/mL)	7181 $\pm$ 678	1267 $\pm$ 140	18
TSMAB D (1 $\mu$ g/mL)	10157 <sup>a</sup>	1149 $\pm$ 120	11
TSMAB E (1 $\mu$ g/mL)	7425 <sup>a</sup>	1224 $\pm$ 50	16
TSMAB F (100ng/mL)	13203 $\pm$ 891	1158 $\pm$ 137	9
<sup>a</sup> Valor medio del duplicado 2G2 es un anticuerpo monoclonal para tiroglobulina (control negativo)			

Tabla 21c Estimulación de la producción de AMP cíclico por 6 diferentes anticuerpos monoclonales de ratón estimulantes del tiroides (mTSMABs) en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Arg109 mutado a Ala

Muestra para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	727 $\pm$ 41	1036 $\pm$ 190	143
hMAb TSHR1 (10ng/mL)	18093 $\pm$ 2166	9972 $\pm$ 697	55
2G2 (1 $\mu$ g/mL)	935 <sup>a</sup>	718 $\pm$ 161	77
TSMAB 1 (1 $\mu$ g/mL)	5622 $\pm$ 381	526 <sup>a</sup>	9
TSMAB 2 (1 $\mu$ g/mL)	4325 $\pm$ 731	444 $\pm$ 86	10
TSMAB C (10ng/mL)	5807 $\pm$ 708	3706 $\pm$ 207	64
TSMAB D (1 $\mu$ g/mL)	8462 $\pm$ 1673	3047 $\pm$ 395	36
TSMAB E (1 $\mu$ g/mL)	6729 $\pm$ 813	3246 $\pm$ 612	48
TSMAB F (100ng/mL)	13964 $\pm$ 1780	6727 $\pm$ 791	48
<sup>a</sup> Valor medio del duplicado 2G2 es un anticuerpo monoclonal para tiroglobulina (control negativo)			

Tabla 21d Estimulación de la producción de AMP cíclico por 6 diferentes anticuerpos monoclonales de ratón estimulantes del tiroides (mTSMABs) en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Arg109 mutado a Asp

Muestra para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	630 $\pm$ 22	413 $\pm$ 1	66
hMAb TSHR1 (10ng/mL)	17787 $\pm$ 1359	3733 $\pm$ 395	21
2G2 (1 $\mu$ g/mL)	645 $\pm$ 103	359 $\pm$ 113	56
TSMAB 1 (1 $\mu$ g/mL)	4489 $\pm$ 576	491 $\pm$ 36	11
TSMAB 2 (1 $\mu$ g/mL)	4102 $\pm$ 413	278 <sup>a</sup>	7
TSMAB C (10ng/mL)	7440 $\pm$ 548	709 <sup>a</sup>	10
TSMAB D (1 $\mu$ g/mL)	9305 $\pm$ 1019	591 $\pm$ 30	6
TSMAB E (1 $\mu$ g/mL)	8387 $\pm$ 720	530 $\pm$ 52	6
TSMAB F (100ng/mL)	12292 $\pm$ 1280	473 <sup>a</sup>	4
<sup>a</sup> Valor medio del duplicado 2G2 es un anticuerpo monoclonal para tiroglobulina (control negativo)			

Tabla 21e Estimulación de la producción de AMP cíclico por 6 diferentes anticuerpos monoclonales de ratón estimulantes del tiroides (mTSMABs) en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Lys129 mutado a Ala

Muestra para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	1196 $\pm$ 28	1002 $\pm$ 154	84
hMAb TSHR1 (10ng/mL)	28890 $\pm$ 2504	10900 $\pm$ 818	38
2G2 (1 $\mu$ g/mL)	1396 $\pm$ 146	331 <sup>a</sup>	24
TSMAB 1 (1 $\mu$ g/mL)	6220 $\pm$ 850	4700 $\pm$ 840	76
TSMAB 2 (1 $\mu$ g/mL)	5706 $\pm$ 792	3394 $\pm$ 560	59
TSMAB C (10ng/mL)	10288 <sup>a</sup>	540 $\pm$ 186	5
TSMAB D (1 $\mu$ g/mL)	13806 $\pm$ 716	816 $\pm$ 26	6
TSMAB E (1 $\mu$ g/mL)	8746 $\pm$ 968	656 $\pm$ 82	8
TSMAB F (100ng/mL)	20126 $\pm$ 1972	2264 <sup>a</sup>	11
<sup>a</sup> Valor medio del duplicado 2G2 es un anticuerpo monoclonal para tiroglobulina (control negativo)			

Tabla 21f Estimulación de la producción de AMP cíclico por 6 diferentes anticuerpos monoclonales de ratón estimulantes del tiroides (mTSMABs) en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Lys183 mutado a Ala

Muestra para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	717 $\pm$ 98	601 $\pm$ 83	84
hMAb TSHR1 (10ng/mL)	25794 $\pm$ 1025	3182 $\pm$ 771	12
2G2 (1 $\mu$ g/mL)	784 $\pm$ 77	796 $\pm$ 104	102
TSMAB 1 (1 $\mu$ g/mL)	4213 <sup>a</sup>	881 $\pm$ 188	21
TSMAB 2 (1 $\mu$ g/mL)	3455 $\pm$ 435	524 <sup>a</sup>	15
TSMAB C (10ng/mL)	7935 <sup>a</sup>	655 <sup>a</sup>	8
TSMAB D (1 $\mu$ g/mL)	9919 $\pm$ 983	556 $\pm$ 89	6
TSMAB E (1 $\mu$ g/mL)	8487 $\pm$ 1541	703 $\pm$ 20	8
TSMAB F (100ng/mL)	15068 $\pm$ 1503	797 $\pm$ 131	5
<sup>a</sup> Valor medio del duplicado 2G2 es un anticuerpo monoclonal para tiroglobulina (control negativo)			

Tabla 21g Estimulación de la producción de AMP cíclico por 6 diferentes anticuerpos monoclonales de ratón estimulantes del tiroides (mTSMABs) en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Lys183 mutado a Asp

Muestra para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
Solamente tampón de ensayo de AMP cíclico	909 $\pm$ 51	1005 $\pm$ 136	111
hMAb TSHR1 (10ng/mL)	25297 <sup>a</sup>	1755 $\pm$ 83	7
2G2 (1 $\mu$ g/mL)	1296 $\pm$ 126	1256 $\pm$ 134	97
TSMAB 1 (1 $\mu$ g/mL)	8228 $\pm$ 1348	653 $\pm$ 174	8
TSMAB 2 (1 $\mu$ g/mL)	8026 $\pm$ 1398	370 <sup>a</sup>	5
TSMAB C (10ng/mL)	10381 $\pm$ 70	540 $\pm$ 144	5
TSMAB D (1 $\mu$ g/mL)	16466 $\pm$ 5817	1350 $\pm$ 98	8
TSMAB E (1 $\mu$ g/mL)	10765 $\pm$ 1543	325 $\pm$ 13	8
TSMAB F (100ng/mL)	17634 $\pm$ 1701	390 $\pm$ 34	2
<sup>a</sup> Valor medio del duplicado 2G2 es un anticuerpo monoclonal para tiroglobulina (control negativo)			

Tabla 22 Resumen del efecto de la mutación (con respecto al tipo natural) sobre la estimulación de la producción de AMP por anticuerpos monoclonales de ratón estimulantes del tiroides

Mutación del aa	Reducción marcada	Reducción	Efecto pequeño	Sin efecto
Arg80 a Asp	6/6	0/6	0/6	0/6
Glu107 a Ala	6/6	0/6	0/6	0/6
Arg109 a Ala	2/6	3/6	1/6	0/6
Arg109 a Asp	6/6	0/6	0/6	0/6
Lys129 a Ala	4/6	2/6	0/6	0/6
Lys 183 a Ala	6/6	0/6	0/6	0/6
Lys 183 a Asp	6/6	0/6	0/6	0/6
Arg255 a Asp	6/6	0/6	0/6	0/6

Se muestra el número de anticuerpos monoclonales afectados de 6 anticuerpos monoclonales analizados para cada mutación.

Tabla 23a Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Glu107 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de B3 (Tabla 9) con actividad antagonista de la TSH

A. Niveles de AMP cíclico			
Dilución de la muestra de ensayo <sup>a</sup>	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
B3 1000x	1041 ± 143	1073 ± 251	103
B3 1000x + TSH <sup>b</sup>	15561 ± 1630	10918 ± 601	70
B3 100x	567 <sup>c</sup>	214 ± 24	38
B3 100x + TSH <sup>b</sup>	10246 ± 469	478 <sup>c</sup>	5
B3 10x	161 ± 3	168 ± 33	104
B3 10x + TSH <sup>b</sup>	165 <sup>c</sup>	156 ± 26	95
HBD 1000x	877 ± 154	1518 ± 195	173
HBD 1000x + TSH <sup>b</sup>	18086 ± 1390	11896 ± 1044	66
HBD 100x	931 ± 73	1001 ± 244	108
HBD 100x + TSH <sup>b</sup>	18850 ± 1541	11777 ± 759	62
HBD 10x	563 ± 302	515 ± 308	91
HBD 10x + TSH <sup>b</sup>	20456 ± 1912	10284 ± 146	50
B. Resultados de la inhibición en%			
Suero con actividad antagonista de la TSH	% de inhibición de la estimulación de la TSH <sup>d</sup>		
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
B3 1000x	14	8	
B3 100x	46	96	
B3 10x	99	98	

HBD = Mezcla de suero sanguíneo de donantes sanos  
<sup>a</sup>Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico  
<sup>b</sup>Concentración final de la TSH = 1,5 ng/mL  
<sup>c</sup>Valor medio del duplicado  
<sup>d</sup>

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{AMPc en presencia de suero B3 + TSH}}{\text{AMPc en presencia de HBD + TSH}} \right]$$

donde las diluciones de la muestra para análisis y de la HBD son la misma.

Tabla 23b Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Arg109 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de B3 (Tabla 9) con actividad antagonista de la TSH

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
Dilución de la muestra de ensayo <sup>a</sup>	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
B3 1000x	510 ± 100	1224 <sup>c</sup>	240
B3 1000x + TSH <sup>b</sup>	20938 <sup>c</sup>	12248 ± 824	58
B3 100x	425 <sup>c</sup>	378 ± 55	89
B3 100x + TSH <sup>b</sup>	20790 <sup>c</sup>	10358 ± 1447	50
B3 10x	226 ± 18	269 ± 16	119
B3 10x + TSH <sup>b</sup>	349 ± 64	294 ± 46	84
HBD 1000x	419 <sup>c</sup>	473 <sup>c</sup>	113
HBD 1000x + TSH <sup>b</sup>	21126 ± 884	14225 ± 2494	67
HBD 100x	462 <sup>c</sup>	478 <sup>c</sup>	103
HBD 100x + TSH <sup>b</sup>	22146 ± 919	11051 <sup>c</sup>	50
HBD 10x	378 ± 14	302 <sup>c</sup>	80
HBD 10x + TSH <sup>b</sup>	22973 ± 514	14197 ± 1977	62
<b>B. Resultados de la inhibición en%</b>			
Suero con actividad antagonista de la TSH	% de inhibición de la estimulación de la TSH <sup>d</sup>		
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
B3 1000x	1	14	
B3 100x	6	6	
B3 10x	98	98	

HBD = Mezcla de suero sanguíneo de donantes sanos  
<sup>a</sup>Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico  
<sup>b</sup>Concentración final de la TSH = 1,5 ng/mL  
<sup>c</sup>Valor medio del duplicado  
<sup>d</sup>

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{AMPc en presencia de suero B3 + TSH}}{\text{AMPc en presencia de HBD + TSH}} \right]$$

donde las diluciones de la muestra para análisis y de la HBD son la misma.

Tabla 23c Producción de AMP cíclico inducida por TSH en células CHO que expresan TSHR de tipo natural y TSHR con Lys183 mutado a Ala. Efecto de diferentes diluciones de B3 (Tabla 9) con actividad antagonista de la TSH

<b>A. Niveles de AMP cíclico</b>			
<b>Dilución de la muestra de ensayo<sup>a</sup></b>	<b>AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio ± DT; n = 3)</b>		<b>Tipo mutado/natural</b>
	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
B3 1000x	535 ± 52	549 ± 31	103
B3 1000x + TSH <sup>b</sup>	12400 ± 790	14656 ± 2399	118
B3 100x	389 ± 36	267 ± 12	69
B3 100x + TSH <sup>b</sup>	3420 ± 159	2929 ± 310	86
B3 10x	149 ± 6	150 <sup>c</sup>	101
B3 10x + TSH <sup>b</sup>	157 ± 21	170 <sup>c</sup>	108
HBD 1000x	569 <sup>c</sup>	648 ± 65	114
HBD 1000x + TSH <sup>b</sup>	12762 ± 150	13589 ± 2282	106
HBD 100x	548 ± 16	404 ± 237	74
HBD 100x + TSH <sup>b</sup>	13803 ± 747	13112 ± 1442	95
HBD 10x	396 ± 102	368 <sup>c</sup>	93
HBD 10x + TSH <sup>b</sup>	11959 ± 940	14161 ± 1648	118
<b>B. Resultados de la inhibición en%</b>			
<b>Suero con actividad antagonista de la TSH</b>	<b>% de inhibición de la estimulación de la TSH<sup>d</sup></b>		
	<b>TSHR de tipo natural</b>	<b>TSHR mutado</b>	
B3 1000x	3	-8	
B3 100x	75	78	
B3 10x	99	99	

HBD = Mezcla de suero sanguíneo de donantes sanos  
<sup>a</sup>Muestras para análisis en tampón de ensayo de AMP cíclico  
<sup>b</sup>Concentración final de la TSH = 1,5 ng/mL  
<sup>c</sup>Valor medio del duplicado  
<sup>d</sup>

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{AMPc en presencia de suero B3 + TSH}}{\text{AMPc en presencia de HBD + TSH}} \right]$$

donde las diluciones de la muestra para análisis y de la HBD son la misma.

Tabla 24 Resumen del efecto de la mutación (con respecto al tipo natural) sobre la inhibición de la estimulación del AMP cíclico mediada por la TSH por el suero B3 (Tabla 9) con actividad antagonista de la TSH

<b>Mutación del aa</b>	<b>Inhibición de la estimulación de la producción de AMP cíclico mediada por la TSH por el suero B3 con actividad antagonista de la TSH</b>
Glu107 a Ala	<b>Efecto mejorado</b>
Arg109 a Ala	Sin efecto
Lys183 a Ala	Sin efecto
Arg255 a Asp	<b>Efecto mejorado</b>

Tabla 25 Análisis de Scatchard de unión de TSH, Fab de hMAb TSHR1 y MAb 9D33 a preparaciones del receptor de TSH de tipo natural (no mutado) y mutado.

Preparación del receptor	Afinidad para la TSH	Afinidad para Fab de hMAb TSHR1	Afinidad para MAb 9D33
Tipo natural	$6,0 \pm 0,9 \times 10^9$ L/mol	$3,4 \pm 1,0 \times 10^{10}$ L/mol	$1,8 \pm 0,7 \times 10^{10}$ L/mol
Asp43 a Ala	$3,4 \times 10^9$ L/mol	$2,7 \times 10^{10}$ L/mol	$1,4 \times 10^{10}$ L/mol
Lys58 a Ala	$5,9 \times 10^9$ L/mol	$1,6 \times 10^{10}$ L/mol	Unión del MAb 9D33 no detectable
Ile60 a Ala	$5,1 \times 10^9$ L/mol	$4,4 \times 10^{10}$ L/mol	Unión del MAb 9D33 no detectable
Glu61 a Ala	$2,4 \times 10^9$ L/mol	$3,4 \times 10^9$ L/mol	$0,9 \times 10^{10}$ L/mol
Arg80 a Ala	$4,2 \times 10^9$ L/mol	Unión del Fab de hMAb TSHR1 no detectable	Unión del MAb 9D33 no detectable
Arg80 a Asp	$2,8 \times 10^9$ L/mol	Unión del Fab de hMAb TSHR1 no detectable	Unión del MAb 9D33 no detectable
Tyr82 a Ala	$4,0 \times 10^9$ L/mol	$1,8 \times 10^{10}$ L/mol	Unión del MAb 9D33 no detectable
Glu107 a Ala	$3,7 \times 10^9$ L/mol	$0,1 \times 10^{10}$ L/mol	$0,6 \times 10^{10}$ L/mol
Glu107 a Arg	Unión a TSH no detectable	Unión del Fab de hMAb TSHR1 no detectable	Unión del MAb 9D33 no detectable
Arg109 a Ala	$1,1 \times 10^9$ L/mol	$2,3 \times 10^{10}$ L/mol	Unión del MAb 9D33 no detectable
Arg109 a Asp	Unión a TSH no detectable	Unión del Fab de hMAb TSHR1 no detectable	Unión del MAb 9D33 no detectable
Lys129 a Ala	$2,2 \times 10^9$ L/mol	$0,3 \times 10^{10}$ L/mol	Unión del MAb 9D33 no detectable
Lys129 a Asp	Unión a TSH no detectable	Unión del Fab de hMAb TSHR1 no detectable	Unión del MAb 9D33 no detectable
Phe130 a Ala	$2,4 \times 10^9$ L/mol	$0,3 \times 10^{10}$ L/mol	$0,9 \times 10^{10}$ L/mol
Phe134 a Ala	$2,1 \times 10^9$ L/mol	$0,9 \times 10^{10}$ L/mol	$0,5 \times 10^{10}$ L/mol
Glu 157 a Ala	Unión a TSH no detectable	$2,2 \times 10^{10}$ L/mol	$1,3 \times 10^{10}$ L/mol
Asp160 a Ala	Unión a TSH no detectable	$1,8 \times 10^{10}$ L/mol	$1,0 \times 10^{10}$ L/mol
Glu178 a Ala	$1,0 \times 10^9$ L/mol	$0,5 \times 10^{10}$ L/mol	$1,3 \times 10^{10}$ L/mol
Lys 183 a Ala	$16 \times 10^9$ L/mol	nt	nt
Lys183 a Asp	Unión a TSH no detectable	Unión del Fab de hMAb TSHR1 no detectable	Unión del MAb 9D33 no detectable
Tyr185 a Ala	$3,4 \times 10^9$ L/mol	$0,4 \times 10^{10}$ L/mol	$0,9 \times 10^{10}$ L/mol
Asp203 a Ala	$2,2 \times 10^9$ L/mol	$1,9 \times 10^{10}$ L/mol	$1,4 \times 10^{10}$ L/mol
Tyr206 a Ala	Unión a TSH no detectable	nt	Unión del MAb 9D33 no detectable
Lys209 a Ala	Unión a TSH no detectable	$1,3 \times 10^{10}$ L/mol	$0,8 \times 10^{10}$ L/mol
Asp232 a Ala	Unión a TSH no detectable	Unión del Fab de hMAb TSHR1 no detectable	Unión del MAb 9D33 no detectable
Asp232 a Arg	Unión a TSH no detectable	Unión del Fab de hMAb TSHR1 no detectable	Unión del MAb 9D33 no detectable
Gln235 a Ala	$4,9 \times 10^{10}$ L/mol	$2,5 \times 10^{10}$ L/mol	$1,1 \times 10^{10}$ L/mol
Lys250 a Ala	Unión a TSH no detectable	$0,9 \times 10^{10}$ L/mol	$0,6 \times 10^{10}$ L/mol
Glu251 a Ala	$2,0 \times 10^9$ L/mol	$1,9 \times 10^{10}$ L/mol	$0,8 \times 10^{10}$ L/mol
Arg255 a Ala	$2,3 \times 10^9$ L/mol	$0,7 \times 10^{10}$ L/mol	$0,8 \times 10^{10}$ L/mol
Arg255 a Asp	Unión a TSH no detectable	$0,3 \times 10^{10}$ L/mol	$1,3 \times 10^{10}$ L/mol
Thr257 a Ala	Unión a TSH no detectable	$1,8 \times 10^{10}$ L/mol	$0,7 \times 10^{10}$ L/mol
Trp258 a Ala	Unión a TSH no detectable	$1,4 \times 10^{10}$ L/mol	$1,2 \times 10^{10}$ L/mol
Arg274 a Ala	Unión a TSH no detectable	$0,8 \times 10^{10}$ L/mol	$0,5 \times 10^{10}$ L/mol
Asp276 a Ala	$5,5 \times 10^9$ L/mol	$1,6 \times 10^{10}$ L/mol	$1,3 \times 10^{10}$ L/mol
Tyr279 a Ala	Unión a TSH no detectable	$0,7 \times 10^{10}$ L/mol	$0,6 \times 10^{10}$ L/mol
Ser281 a Ala	$3,4 \times 10^9$ L/mol	$2,3 \times 10^{10}$ L/mol	$0,9 \times 10^{10}$ L/mol
Arg255 a Ala y Trp258 a Ala	Unión a TSH no detectable	$1,0 \times 10^{10}$ L/mol	$1,1 \times 10^{10}$ L/mol

nt = no analizado

Tabla 26. Afinidad de unión de Fab de hMAb TSHR1 y TSH para el receptor de la TSH que contiene mutaciones del aminoácidos que mostraron diferencias entre el efecto de la estimulación de la producción de AMP cíclico por hormona y anticuerpo

Mutación del aa	Afinidad para la TSH	Afinidad para Fab de hMAb TSHR1
Arg80 a Ala	Inalterada	Unión no detectable
Arg80 a Asp	Inalterada	Unión no detectable
Tyr82 a Ala	Inalterada	Inalterada
Glu107 a Ala	Inalterada	<u>Marcadamente reducida</u>
Arg109 a Ala	Reducida	Inalterada
Arg109 a Asp	Unión no detectable	Unión no detectable
Lys129 a Ala	Inalterada	<u>Marcadamente reducida</u>
Lys129 a Asp	Unión no detectable	Unión no detectable
Phe130 a Ala	Inalterada	<u>Marcadamente reducida</u>
Lys183 a Ala	Aumentada	not tested
Lys183 a Asp	Unión no detectable	Unión no detectable
Tyr185 a Ala	Inalterada	<u>Marcadamente reducida</u>
Asp232 a Ala	Unión no detectable	Unión no detectable
Arg255 a Ala	Inalterada	<u>Marcadamente reducida</u>
Arg255 a Asp	Unión no detectable	<u>Marcadamente reducida</u>
Trp258 a Ala	Unión no detectable	Ligeramente reducida
Arg255 a Ala y Trp258 a Ala	Unión no detectable	Ligeramente reducida

Tabla 27a Efecto de la doble mutación de Glu157 a Ala y Asp203 a Ala de TSHR sobre la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH

	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>Experimento 1</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1737 $\pm$ 112	1136 $\pm$ 109	65
0,3	5032 $\pm$ 458	1686 $\pm$ 419	34
1	9528 $\pm$ 1680	2499 $\pm$ 1359	26
3	14622 $\pm$ 2685	6831 $\pm$ 65	47
10	20515 $\pm$ 3415	9527 $\pm$ 1081	46
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	953 $\pm$ 166	1037 $\pm$ 56	109
0,03	836 $\pm$ 447	1128 $\pm$ 57	135
0,1	2083 $\pm$ 337	1114 $\pm$ 113	53
0,3	13295 $\pm$ 5822	1197 $\pm$ 112	9
1	22327 $\pm$ 1531	4622 $\pm$ 245	21
3	20802 $\pm$ 6167	7710 $\pm$ 329	37
Tampón de ensayo de AMP cíclico	1108 $\pm$ 206	1029 $\pm$ 67	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	2278 $\pm$ 607	2489 $\pm$ 91	109
0,3	4233 $\pm$ 270	2856 $\pm$ 227	63
1	13534 $\pm$ 999	5506 $\pm$ 1111	41
3	20909 $\pm$ 500	13767 $\pm$ 1284	66
10	23297 $\pm$ 3180	19498 $\pm$ 1786	84
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1071 $\pm$ 531	1769 $\pm$ 426	165
0,03	2110 $\pm$ 36	2291 $\pm$ 230	109
0,1	4574 $\pm$ 181	2306 $\pm$ 339	50
0,3	12723 $\pm$ 362	2342 $\pm$ 342	18
1	22463 $\pm$ 916	6969 $\pm$ 1339	31
3	24331 $\pm$ 834	13458 $\pm$ 745	55
Tampón de ensayo de AMP cíclico	877 $\pm$ 118	2467 $\pm$ 251	
En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR1			

Tabla 27b Efecto de la doble mutación de Glu178 a Ala y Asp203 a Ala de TSHR sobre la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH,

	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>Experimento 1</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1845 $\pm$ 349	2199 $\pm$ 25	119
0,3	2995 $\pm$ 74	2388 $\pm$ 474	80
1	10614 $\pm$ 386	7005 $\pm$ 975	66
3	14298 $\pm$ 3757	13707 $\pm$ 903	96
10	17794 $\pm$ 1486	14808 $\pm$ 1165	83
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1682 $\pm$ 329	2574 $\pm$ 408	153
0,03	1913 $\pm$ 132	3206 $\pm$ 86	168
0,1	3881 $\pm$ 90	3702 $\pm$ 114	95
0,3	11501 $\pm$ 1064	10892 $\pm$ 616	95
1	17275 $\pm$ 970	16664 $\pm$ 1429	96
3	19963 $\pm$ 2506	20605 $\pm$ 1452	103
Tampón de ensayo de AMP cíclico	895 $\pm$ 30	1531 $\pm$ 114	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1326 $\pm$ 139	815 $\pm$ 51	61
0,3	2244 <sup>a</sup>	1195 $\pm$ 57	53
1	6558 $\pm$ 1708	1965 $\pm$ 89	30
3	14499 $\pm$ 3232	5238 $\pm$ 636	36
10	19735 $\pm$ 1460	10913 $\pm$ 826	55
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	949 $\pm$ 64	637 $\pm$ 93	67
0,03	1343 $\pm$ 240	1106 $\pm$ 98	82
0,1	4351 $\pm$ 928	1367 $\pm$ 120	31
0,3	9438 $\pm$ 1460	2540 $\pm$ 232	27
1	18296 $\pm$ 2078	7852 $\pm$ 1106	43
3	20253 $\pm$ 735	13321 $\pm$ 3239	66
Tampón de ensayo de AMP cíclico	613 $\pm$ 45	500 $\pm$ 55	
<sup>a</sup> Valor medio del duplicado			
En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR1			

Tabla 27c Efecto de la doble mutación de Asp232 a Ala y Arg 255 a Ala de TSHR sobre la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH,

	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>Experimento 1</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1653 $\pm$ 187	609 $\pm$ 20	37
0,3	2956 $\pm$ 209	623 $\pm$ 42	21
0,3	9782 $\pm$ 1779	1153 $\pm$ 516	12
1	13850 $\pm$ 1496	1341 $\pm$ 424	10
3	14827 $\pm$ 1864	2713 $\pm$ 289	18
10			
<b>TSH (ng/mL)</b>	1031 $\pm$ 94	604 $\pm$ 39	59
0,01	2142 $\pm$ 256	779 $\pm$ 72	36
0,03	4658 $\pm$ 332	1581 $\pm$ 139	34
0,1	9352 $\pm$ 995	3877 $\pm$ 1 16	41
0,3	16490 $\pm$ 2070	5499 $\pm$ 486	33
1	14656 $\pm$ 501	5532 $\pm$ 1145	38
3	671 $\pm$ 36	608 $\pm$ 20	
Tampón de ensayo de AMP cíclico			
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1166 $\pm$ 68	849 $\pm$ 33	73
0,3	2407 $\pm$ 359	967 $\pm$ 70	40
1	6155 $\pm$ 2046	1227 $\pm$ 129	20
3	13626 $\pm$ 2714	1315 $\pm$ 128	10
10	14114 $\pm$ 3164	2830 $\pm$ 386	20
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1373 $\pm$ 284	1254 $\pm$ 39	91
0,03	2761 $\pm$ 611	1445 $\pm$ 123	52
0,1	nd	2793 $\pm$ 528	nd
0,3	10839 $\pm$ 1399	5434 $\pm$ 543	50
1	18337 $\pm$ 2139	6879 $\pm$ 748	38
3	16581 $\pm$ 5023	6697 $\pm$ 367	40
Tampón de ensayo de AMP cíclico	747 $\pm$ 160	749 $\pm$ 148	
En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR1 nd = no determinado			

Tabla 27d Efecto de la doble mutación de Asp222 a Arg y Arg235 a Asp de TSHR sobre la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH.

	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>Experimento 1</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>	1411 $\pm$ 110	1098 $\pm$ 86	78
0,1	5592 <sup>a</sup>	1036 $\pm$ 91	19
0,3	8555 <sup>a</sup>	2660 $\pm$ 164	31
1	16325 <sup>a</sup>	2976 $\pm$ 246	18
3	20490 <sup>a</sup>	196 $\pm$ 83	10
10			
<b>TSH (ng/mL)</b>	1456 $\pm$ 63	1018 $\pm$ 106	70
0,01	1755 $\pm$ 173	1079 $\pm$ 17	61
0,03	5811 $\pm$ 153	1087 $\pm$ 95	19
0,1	10213 $\pm$ 897	2613 <sup>a</sup>	26
0,3	20782 $\pm$ 3649	2703 <sup>a</sup>	13
1	25952 $\pm$ 435	2743 <sup>a</sup>	11
3			
Tampón de ensayo de AMP cíclico	1233 $\pm$ 208	1095 $\pm$ 71	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1649 $\pm$ 194	968 $\pm$ 72	59
0,3	2786 $\pm$ 320	1051 $\pm$ 60	30
1	8364 $\pm$ 344	949 $\pm$ 305	11
3	13271 $\pm$ 1940	794 $\pm$ 316	6
10	17431 $\pm$ 3371	399 $\pm$ 83	2
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1185 $\pm$ 49	1219 $\pm$ 246	103
0,03	1745 $\pm$ 269	1463 $\pm$ 98	84
0,1	2938 $\pm$ 462	1571 $\pm$ 173	53
0,3	8603 $\pm$ 1998	1274 $\pm$ 300	15
1	19137 $\pm$ 1060	1291 $\pm$ 243	7
3	19796 $\pm$ 947	832 $\pm$ 330	4
Tampón de ensayo de AMP cíclico	1032 $\pm$ 76	836 $\pm$ 179	
<sup>a</sup> Valor medio del duplicado			
En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR1			

Tabla 27e Efecto de la doble mutación de Asp232 a Ala y Trp258 a Ala de TSHR sobre la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH.

	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>Experimento 1</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1371 $\pm$ 89	387 $\pm$ 51	28
0,3	2655 $\pm$ 312	299 $\pm$ 173	11
1	9988 $\pm$ 2996	161 <sup>a</sup>	2
3	12979 $\pm$ 2336	178 $\pm$ 28	1
10	11756 $\pm$ 1444	161 <sup>a</sup>	1
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	904 $\pm$ 85	400 $\pm$ 81	44
0,03	1555 $\pm$ 196	391 $\pm$ 50	25
0,1	3714 $\pm$ 1022	203 $\pm$ 185	5
0,3	9529 <sup>a</sup>	238 $\pm$ 127	2
1	11451 $\pm$ 782	163 $\pm$ 32	1
3	11743 $\pm$ 761	158 $\pm$ 25	1
Tampón de ensayo de AMP cíclico	739 $\pm$ 94	293 $\pm$ 155	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1735 $\pm$ 359	880 $\pm$ 62	51
0,3	3378 $\pm$ 590	664 $\pm$ 153	20
1	8934 $\pm$ 3094	529 $\pm$ 132	6
3	8362 $\pm$ 1905	746 $\pm$ 144	9
10	18753 $\pm$ 1985	683 $\pm$ 84	4
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	nd	888 $\pm$ 52	nd
0,03	1726 $\pm$ 322	950 $\pm$ 68	55
0,1	nd	973 $\pm$ 211	nd
0,3	17281 $\pm$ 542	749 $\pm$ 24	4
1	14866 $\pm$ 2236	657 $\pm$ 134	4
3	22039 $\pm$ 4147	610 $\pm$ 59	3
Tampón de ensayo de AMP cíclico	755 $\pm$ 305	647 $\pm$ 203	
<sup>a</sup> Valor medio de Iduplicado En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR1 nd = no determinado			

Tabla 27f Efecto de la triple mutación de Asp232 a Ala, Arg255 a Ala y Trp258 a Ala de TSHR sobre la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH.

	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		
Experimento 1	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	Tipo mutado/natural (%)
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	2232 $\pm$ 344	757 $\pm$ 111	34
0,3	4812 $\pm$ 202	825 $\pm$ 97	17
1	12703 $\pm$ 1110	610 $\pm$ 38	5
3	20706 $\pm$ 7441	545 $\pm$ 221	3
10	25117 $\pm$ 2140	721 $\pm$ 280	3
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1850 $\pm$ 307	1282 $\pm$ 278	69
0,03	2715 $\pm$ 486	1177 $\pm$ 341	43
0,1	5609 $\pm$ 757	1327 $\pm$ 31	24
0,3	14284 $\pm$ 1250	771 $\pm$ 320	5
1	21333 $\pm$ 2573	1822 $\pm$ 280	9
3	26438 $\pm$ 4181	1156 $\pm$ 501	4
Tampón de ensayo de AMP cíclico	997 $\pm$ 249	752 $\pm$ 95	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1305 $\pm$ 30	389 $\pm$ 81	30
0,3	3818 $\pm$ 743	328 T33	9
1	8506 $\pm$ 1163	309 $\pm$ 56	4
3	18696 $\pm$ 553	ud	nd
10	27645 $\pm$ 1765	ud	nd
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1234 $\pm$ 104	423 $\pm$ 138	34
0,03	1621 $\pm$ 145	439 $\pm$ 201	27
0,1	5228 $\pm$ 415	809 $\pm$ 257	15
0,3	15209 $\pm$ 2728	ud	nd
1	20651 $\pm$ 720	364 $\pm$ 110	2
3	25628 $\pm$ 256	422 $\pm$ 47	2
Tampón de ensayo de AMP cíclico	1346 $\pm$ 29	374 $\pm$ 126	
En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR1, ud = no detectable nd = no determinado			

Tabla 27g Efecto de la doble mutación de Trp258 a Ala y Lys258 a Ala de TSHR sobre la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH.

Experimento 1	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1718 $\pm$ 13	622 $\pm$ 49	36
0,3	5342 <sup>a</sup>	792 $\pm$ 100	15
1	9732 $\pm$ 1608	995 $\pm$ 223	10
3	16827 $\pm$ 1629	1335 $\pm$ 174	8
10	20111 $\pm$ 1948	3233 $\pm$ 1444	16
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	1436 <sup>a</sup>	1304 $\pm$ 105	91
0,03	1640 $\pm$ 168	2394 $\pm$ 891	146
0,1	4569 $\pm$ 866	5146 $\pm$ 407	113
0,3	12178 $\pm$ 887	10690 $\pm$ 1722	88
1	18346 $\pm$ 4068	13288 $\pm$ 2771	72
3	21378 $\pm$ 1576	19801 $\pm$ 2390	93
Tampón de ensayo de AMP cíclico	548 $\pm$ 62	625 $\pm$ 57	114
<sup>a</sup> Valor medio del duplicado			
En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR1			

Tabla 27h Efecto de la doble mutación de Trp258 a Ala y Tyr185 a Ala de TSHR sobre la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que contienen el TSHR por hMAb TSHR1 y la TSH.

Experimento 1	AMP cíclico producido (fmol/pocillo de células) (valor medio $\pm$ DT; n = 3)		Tipo mutado/natural (%)
	TSHR de tipo natural	TSHR mutado	
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	2376 $\pm$ 212	1130 $\pm$ 235	48
0,3	1982 $\pm$ 366	1117 $\pm$ 168	56
1	5949 $\pm$ 822	2012 $\pm$ 289	34
3	11555 $\pm$ 2562	3347 $\pm$ 546	29
10	14591 $\pm$ 3475	5184 $\pm$ 558	35
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	793 $\pm$ 87	1096 $\pm$ 221	138
0,03	1184 $\pm$ 307	2202 $\pm$ 916	186
0,1	1761 $\pm$ 122	nd	nd
0,3	6254 $\pm$ 381	nd	nd
1	10869 $\pm$ 1184	17880 $\pm$ 2456	165
3	14479 $\pm$ 246	20189 $\pm$ 2735	139
Tampón de ensayo de AMP cíclico	625 $\pm$ 72	668 $\pm$ 39	
<b>Experimento 2</b>			
<b>hMAb TSHR1 (ng/mL)</b>			
0,1	1133 $\pm$ 113	890 $\pm$ 75	79
0,3	3122 $\pm$ 134	941 $\pm$ 31	30
1	8972 $\pm$ 700	1477 $\pm$ 82	16
3	14236 $\pm$ 940	2406 $\pm$ 337	14
10	16292 $\pm$ 1113	4418 $\pm$ 1000	27
<b>TSH (ng/mL)</b>			
0,01	814 $\pm$ 147	873 $\pm$ 43	107
0,03	885 $\pm$ 142	1409 $\pm$ 177	159
0,1	2754 $\pm$ 435	2339 $\pm$ 116	85
0,3	6713 $\pm$ 647	4650 $\pm$ 871	69
1	13019 $\pm$ 1190	13522 $\pm$ 1159	104
3	17402 $\pm$ 768	20202 $\pm$ 1233	116
Tampón de ensayo de AMP cíclico	550 $\pm$ 16	846 $\pm$ 65	
En todos los experimentos se usó Fab de hMAb TSHR1 nd = no determinado			

Tabla 28 Resumen de los efectos de la mutación (respecto al tipo natural) sobre la estimulación de células CHO que contienen TSHR mutado

Mutación del aa	Estimulación del TSH	Estimulación del Fab del hMAb TSHR1
Glu157 a Ala y Asp203 a Ala	Reducción marcada	Algo de reducción
Glu178 a Ala y Asp203 a Ala	Sin efecto	Sin efecto
Asp232 a Ala y Arg255 a Ala	Reducción marcada	Reducción marcada
Asp232 a Arg y Arg255 a Asp	Reducción marcada	Reducción marcada
Asp232 a Ala y Trp258 a Ala	Reducción marcada	Reducción marcada
Asp232 a Ala, Arg255 a Ala y Trp258 a Ala	Reducción marcada	Reducción marcada
Trp258 a Ala y Lys183 a Ala	Sin efecto	Reducción marcada
Trp258 a Ala y Tyr185 a Ala	Sin efecto	Reducción marcada

Tabla 29. Análisis de Scatchard de TSH, unión de Fab de hMAb TSHR1 y MAb 9D33 a preparaciones del receptor de TSH de tipo natural (no mutado) y mutado.

Preparación del receptor	Afinidad para la TSH	Afinidad para Fab de hMAb TSHR1	Afinidad para el MAb 9D33
Tipo natural	$6,0 \pm 0,9 \times 10^9$ L/mol	$3,4 \pm 1,0 \times 10^{10}$ L/mol	$1,8 \pm 0,7 \times 10^{10}$ L/mol
Asp232 a Ala y Arg255 a Ala	Unión a TSH no detectable	nt	Unión del MAb 9D33 no detectable
Asp232 a Arg y Arg255 a Asp	Unión a TSH no detectable	Unión de Fab de hMAb TSHR1 no detectable	Unión del MAb 9D33 no detectable
Asp232 a Ala y Trp258 a Ala	Unión a TSH no detectable	Unión de Fab de hMAb TSHR1 no detectable	Unión del MAb 9D33 no detectable
Asp232 a Ala, Arg255 a Ala y Trp258 a Ala	Unión a TSH no detectable	Unión de Fab de hMAb TSHR1 no detectable	Unión del MAb 9D33 no detectable
Glu157 a Ala y Asp203 a Ala	Unión a TSH no detectable	$1,5 \times 10^{10}$ L/mol	$0,6 \times 10^{10}$ L/mol
Glu178 a Ala y Asp203 a Ala	Unión a TSH no detectable	$0,2 \times 10^{10}$ L/mol	$0,8 \times 10^{10}$ L/mol
Tyr185 a Ala y Lys183 a Ala	$13,9 \times 10^9$ L/mol	nt	$0,6 \times 10^{10}$ L/mol
Trp258 a Ala y Lys183 a Ala	Unión a TSH no detectable	Unión de Fab de hMAb TSHR1 no detectable	Unión del MAb 9D33 no detectable
Trp258 a Ala y Tyr185 a Ala	Unión a TSH no detectable	$0,2 \times 10^{10}$ L/mol	$0,9 \times 10^{10}$ L/mol
Arg255 a Ala y Lys183 a Ala	Unión a TSH no detectable	Unión de Fab de hMAb TSHR1 no detectable	Unión del MAb 9D33 no detectable
Arg255 a Ala y Tyr185 a Ala	Unión a TSH no detectable	$0,1 \times 10^{10}$ L/mol	$0,9 \times 10^{10}$ L/mol
Arg255 a Ala, Lys183 a Ala y Tyr185 a Ala	Unión a TSH no detectable	Unión de Fab de hMAb TSHR1 no detectable	$0,3 \times 10^{10}$ L/mol
Trp258 a Ala, Lys183 a Ala y Tyr185 a Ala	Unión a TSH no detectable	Unión de Fab de hMAb TSHR1 no detectable	Unión del MAb 9D33 no detectable
Arg255 a Ala, Trp258 a Ala y Tyr258 a Ala	Unión a TSH no detectable	$0,1 \times 10^{10}$ L/mol	$0,8 \times 10^{10}$ L/mol
Arg255 a Ala, Trp258 a Ala, Tyr185 a Ala y Lys183 a Ala	Unión a TSH no detectable	Unión de Fab de hMAb TSHR1 no detectable	Unión del MAb 9D33 no detectable

nt = no analizado

## REIVINDICACIONES

1. Una preparación del receptor de la hormona estimulante del tiroides (TSHR) mutado, que incluye al menos una mutación puntual, **caracterizada porque** al menos el aminoácido Arg situado en una posición correspondiente al aminoácido 255 de un TSHR humano de longitud completa ha sido mutado a un residuo de aminoácido cargado negativamente en dicha preparación del TSHR mutado, con lo cual dicha preparación de TSHR mutado interactúa diferencialmente con los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero de pacientes, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes y la TSH, **porque** (i) el efecto estimulante de los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero de pacientes que interactúan con la preparación de TSHR mutado se reduce o suprime, cuando se compara con el efecto estimulante de los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero de pacientes que interactúan con una preparación del TSHR de referencia que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de dicha preparación del TSHR mutado con la excepción de que dicha mutación de Arg situada en una posición correspondiente al aminoácido 255 del TSHR humano de longitud completa no está presente en dicha preparación del TSHR de referencia; (ii) el efecto estimulante de la TSH cuando interactúa con la preparación de TSHR mutado no es afectado, cuando se compara con el efecto estimulante de la TSH que interactúa con dicha preparación del TSHR de referencia, y (iii) el efecto bloqueante de los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes que interactúan con la preparación del TSHR mutado no es afectado o es aumentado, cuando se compara con el efecto bloqueante de los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes que interactúan con dicha preparación del TSHR de referencia, con lo cual dicha preparación del TSHR mutado es eficaz en la detección diferencial y la identificación de los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero de pacientes, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes y la TSH en una muestra de fluido corporal que se somete a detección.
2. Una preparación del TSHR mutado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde al menos el aminoácido Arg situado en una posición correspondiente al aminoácido 255 del TSHR humano de longitud completa está mutado puntualmente a Asp.
3. A preparación de TSHR mutado de acuerdo con la reivindicación 1, que incluye al menos una mutación puntual, **caracterizada porque** al menos el aminoácido Arg situado en una posición correspondiente al aminoácido 255 de un TSHR humano de longitud completa ha sido mutado a Asp en dicha preparación de TSHR mutado, con lo cual dicha preparación de TSHR mutado interactúa diferencialmente con los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero de pacientes, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes y la TSH, **porque** (i) el efecto estimulante de los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero de pacientes que interactúan con la preparación de TSHR mutado se reduce o suprime, cuando se compara con el efecto estimulante de los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero de pacientes que interactúan con una preparación del TSHR de referencia que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de dicha preparación del TSHR mutado con la excepción de que dicha mutación de Arg situada en una posición correspondiente al aminoácido 255 del TSHR humano de longitud completa no está presente en dicha preparación del TSHR de referencia; (ii) el efecto estimulante de la TSH cuando interactúa con dicha preparación del TSHR de referencia, y (iii) el efecto bloqueante de los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes que interactúan con la preparación del TSHR mutado no es no afectado o es aumentado, cuando se compara con el efecto bloqueante de los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes que interactúan con dicha preparación del TSHR de referencia, con lo cual dicha preparación del TSHR mutado es eficaz en la detección diferencial y la identificación de los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR de suero de pacientes, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR de suero de pacientes y la TSH en una muestra de fluido corporal que se somete a detección.
4. Una preparación de TSHR mutado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es un TSHR humano de longitud completa mutado.
5. Una preparación de TSHR mutado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es un fragmento mutado de un TSHR humano.
6. Una preparación de TSHR mutado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que incluye más mutaciones de aminoácidos que representan sustituciones, adiciones o deleciones que no alteran la actividad del receptor de la TSH de la preparación de TSHR mutado.
7. Uso de una preparación de TSHR mutado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la detección diferencial e identificación de los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR y la TSH, en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto del que se sospecha que padece la enfermedad tiroidea autoinmune, es susceptible a ella, la tiene o se recupera de ella y/o en el diagnóstico de un sujeto del que se sospecha que padece la enfermedad tiroidea autoinmune, es susceptible a ella, la tiene o se recupera de ella.
8. Un kit que comprende una preparación de TSHR mutado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, junto con medios de detección que facilitan la monitorización de la interacción diferencial de la preparación de TSHR mutado con los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR y la

TSH, presentes en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto que se sospecha padece la enfermedad tiroidea autoinmune, es susceptible a ella, la tiene o se recupera de ella.

9. En combinación, un kit de acuerdo con la reivindicación 8, junto con una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico eficaz en el tratamiento de la enfermedad tiroidea autoinmune.

5 10. Un método de detectar diferencialmente los auto-anticuerpos estimulantes para el TSHR, los auto-anticuerpos bloqueantes para el TSHR y la TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto del que se sospecha que padece la enfermedad tiroidea autoinmune, es susceptible a ella, la tiene o se recupera de ella, el cual método emplea una preparación de TSHR mutado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para interactuar diferencialmente y detectar los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR  
10 y la TSH producidos en respuesta al TSHR contenido en dicha muestra del fluido corporal del sujeto.

11. Una composición farmacéutica que comprende una preparación de TSHR mutado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, junto con un vehículo, diluyente o excipiente para el mismo farmacéuticamente aceptable.

12. Una preparación de TSHR mutado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en terapia.

13. Una preparación de TSHR mutado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Graves.  
15

14. Una preparación de TSHR mutado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de signos en los ojos de la enfermedad de Graves.

15. Un polinucleótido que comprende:

20 una secuencia de nucleótidos que codifica una preparación de TSHR mutado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

16. Secuencias de nucleótidos cebadores Arg 255 Asp F; Arg 255 Asp R identificadas en la Tabla 1; o una secuencia de nucleótidos que difiere de las mismas en secuencia de codones debido a la degeneración del código genético, en donde la secuencia del cebador mutante Arg 255 AspF es aggaactgatagcagacaacacctggactctta, y la secuencia del cebador mutante Arg 255 AspR es taagagtccagggtgtctgctatcagttcct.

25 17. Un sistema vector biológicamente funcional que lleva un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 15 y que es capaz de introducir el polinucleótido en el genoma de un organismo hospedante.

18. Una célula hospedante que está transformada o transfectada con un polinucleótido o uno o más polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 15 o un sistema vector de acuerdo con la reivindicación 17.

30 19. Un proceso de preparar una preparación de TSHR mutado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo dicho proceso:

- (i) proporcionar una célula hospedante de acuerdo con la reivindicación 18;
- (ii) dejar crecer la célula hospedante; y
- (iii) recuperar del medio de crecimiento una preparación de TSHR mutado de acuerdo con la presente invención

35 20. Un proceso de identificar una preparación de TSHR mutado que se puede usar para la detección diferencial y la identificación de los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR y auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR y la TSH en una muestra de fluido corporal, comprendiendo dicho proceso identificar potenciales regiones de interacción del TSHR y residuos de aminoácidos presentes en las mismas que se identifican además en virtud de su capacidad de interactuar con una pareja de unión para el TSHR, puesto que son los aminoácidos candidatos requeridos para la interacción del TSHR con uno o más de los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR y la TSH; producir mutaciones puntuales de dichos aminoácidos candidatos y monitorizar la interacción de la preparación resultante del TSHR mutado con la pareja de unión, de modo que se identifiquen las mutaciones puntuales que dan como resultado la inhibición de la interacción del TSHR mutado resultante con al menos uno de los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR y la TSH, en donde se produce una mutación puntual para la Arg presente en una posición correspondiente al aminoácido número 255 de un TSHR humano de longitud completa, en donde la Arg 255 se somete a una mutación puntual selectivamente para obtener un residuo de aminoácido cargado negativamente tal que la preparación de TSHR mutado interactúa diferencialmente con los auto-anticuerpos estimulantes de los TSHR, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR y la TSH.  
40  
45

50 21. Un proceso de identificar los residuos de aminoácidos requeridos para la interacción del TSHR con uno o más de los auto-anticuerpos estimulantes del TSHR, los auto-anticuerpos bloqueantes del TSHR y la TSH, cuyo proceso comprende identificar potenciales regiones de interacción del TSHR y residuos de aminoácidos presentes en las

5 mismas que además son identificadas en virtud de su capacidad de interactuar con una pareja de unión para el TSHR, puesto que son los aminoácidos candidatos requeridos para la interacción del TSHR con uno o más de los auto-anticuerpos estimulantes del THSR, los auto-anticuerpos bloqueantes del THSR y la TSH; y producir mutaciones puntuales de dichos aminoácidos candidatos y monitorizar la interacción de la preparación resultante del TSHR mutado con la pareja de unión, de modo que se identifique los aminoácidos claves requeridos para la interacción respectiva del TSHR con uno o más de los auto-anticuerpos estimulantes del THSR, los auto-anticuerpos bloqueantes del THSR y la TSH, en donde se produce una mutación puntual para la Arg presente en una posición correspondiente al aminoácido número 255 de un TSHR humano de longitud completa, en donde el Arg 255 se somete a una mutación puntual selectivamente a un residuo de aminoácido cargado negativamente de tal modo que la preparación del TSHR mutado interactúe diferencialmente con los auto-anticuerpos estimulantes del THSR, los auto-anticuerpos bloqueantes del THSR y la TSH.

15 22. Un proceso de identificar los residuos de aminoácidos requeridos para la conformación del TSHR de modo que se facilite su interacción con uno o más de los auto-anticuerpos estimulantes del THSR, los auto-anticuerpos bloqueantes del THSR y la TSH, que comprende identificar potenciales regiones de interacción del TSHR y los residuos de aminoácido presentes en las mismas que se identifican adicionalmente en virtud de su capacidad de interactuar con una pareja de unión para el TSHR, puesto que son los aminoácidos candidatos requeridos para la conformación de dicho TSHR de modo que se facilite su interacción con dicho uno o más de los auto-anticuerpos estimulantes del THSR, los auto-anticuerpos bloqueantes del THSR y la TSH; producir mutaciones puntuales de dichos aminoácidos candidatos y monitorizar la interacción de la preparación de TSHR mutado resultante con la pareja de unión, de modo que se identifiquen los aminoácidos claves requeridos para la conformación de dicho TSHR, de modo que se facilite la interacción respectiva del TSHR con uno o más de los auto-anticuerpos estimulantes del THSR, los auto-anticuerpos bloqueantes del THSR y la TSH, en donde se produce una mutación puntual para la Arg presente en una posición correspondiente al aminoácido número 255 de un TSHR de longitud completa, en donde la Arg 255 se somete a mutación puntualmente a un residuo de aminoácido cargado negativamente de tal modo que la preparación del TSHR mutado interactúa diferencialmente con los auto-anticuerpos estimulantes del THSR, los auto-anticuerpos bloqueantes del THSR y la TSH.

25 23. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 20 a 22, en donde al menos la Arg presente en una posición correspondiente al aminoácido número 255 de un TSHR humano de longitud completa se somete a una mutación puntual selectivamente a un residuo de aminoácido cargado negativamente.

30 24. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 23, en donde dicho residuo de aminoácido cargado negativamente es Asp.

25 25. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24, en donde la interacción de la preparación del TSHR mutado que se monitoriza es la estimulación del TSHR mutado o el bloqueo de dicha estimulación.

35 26. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 25, que comprende monitorizar la producción de AMP cíclico como resultado de la interacción de la pareja de unión con la preparación del TSHR mutado.

40 27. Uso en una preparación del TSHR mutado de un residuo de aminoácido que es diferente de la arginina en una posición correspondiente al aminoácido número 255 de un TSHR humano de longitud completa, en donde la Arg 255 está mutado puntual y selectivamente a un residuo de aminoácido cargado negativamente tal que la preparación del TSHR mutado interactúa diferencialmente con los auto-anticuerpos estimulantes del THSR, los auto-anticuerpos bloqueantes del THSR y la TSH, para la detección diferencial de uno o más de los auto-anticuerpos estimulantes del THSR de suero de pacientes, los auto-anticuerpos bloqueantes del THSR de suero de pacientes y la TSH, en una muestra de fluido corporal que se somete a detección.

45 28. Uso en una preparación del TSHR mutado de un residuo de aminoácido que es diferente de la arginina en una posición correspondiente al aminoácido número 255 de un TSHR humano de longitud completa, en donde la Arg 255 está mutado puntual y selectivamente a un residuo de aminoácido cargado negativamente tal que la preparación del TSHR mutado interactúa diferencialmente con los auto-anticuerpos estimulantes del THSR, los auto-anticuerpos bloqueantes del THSR y la TSH, en identificar los auto-anticuerpos estimulantes del THSR que está ausentes de, o presentes en, la muestra del fluido corporal.

50 29. Uso en una preparación del TSHR mutado de un residuo de aminoácido que es diferente de la arginina en una posición correspondiente al aminoácido número 255 de un TSHR humano de longitud completa, en donde la Arg 255 está mutado puntual y selectivamente a un residuo de aminoácido cargado negativamente tal que la preparación del TSHR mutado interactúa diferencialmente con los auto-anticuerpos estimulantes del THSR, los auto-anticuerpos bloqueantes del THSR y la TSH, en el diagnóstico de una enfermedad autoinmune asociada con el TSHR sometiendo a detección una muestra de fluido corporal.

55 30. Uso de acuerdo con la reivindicación 27, 28 o 29, en donde el residuo de aminoácido de la posición 255 de un TSHR humano de longitud completa es Asp.