

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 244**

51 Int. Cl.:

A61K 39/09 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03778537 .5**

96 Fecha de presentación: **28.11.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1565493**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.08.2005**

54 Título: **ANTICUERPO PARA EL RECEPTOR DE TIROTROPINA Y USOS DEL MISMO.**

30 Prioridad:
29.11.2002 GB 0227964
29.01.2003 GB 0302140
27.06.2003 GB 0315147

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.12.2011

73 Titular/es:
RSR LIMITED
Avenue Park
Pentwyn Cardiff CF23 8HE, GB

72 Inventor/es:
SANDERS, Jane;
FURMANIAK, Jadwiga y
SMITH, Bernard Rees

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

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).

ES 2 371 244 T3

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo para el receptor de tiotropina y usos del mismo

La presente invención se refiere a copartícipes de unión (tales como anticuerpos monoclonales o recombinantes) para el receptor de tiotropina (receptor de TSH o TSHR) y a usos de las mismas.

5 La tiotropina u hormona estimulante del tiroides (TSH) es una hormona pituitaria que desempeña un papel clave en la regulación de la función del tiroides. Su liberación está estimulada por la hormona TRH formada en el hipotálamo y la TSH controla la formación y liberación de las importantes hormonas tiroideas tiroxina (T4) y triyodotironina (T3). Basándose en un mecanismo de realimentación, el contenido de hormona tiroidea del suero controla la liberación de TSH. La formación de T3 y T4 por las células tiroideas se estimula por la TSH mediante un procedimiento en que la
10 TSH liberada por la pituitaria se une al receptor de TSH de la membrana celular tiroidea.

En la enfermedad de Graves (un trastorno autoinmunitario común), se forman anticuerpos de receptor de TSH (TRAb) y estos autoanticuerpos se unen al receptor de TSH de tal modo que imitan las acciones de la TSH, estimulando la glándula tiroidea a producir altos niveles de hormonas tiroideas. Se describe que estos autoanticuerpos tienen actividad estimulante. En algunos pacientes, los autoanticuerpos se unen al receptor de TSH
15 pero no estimulan la producción de hormona tiroidea, y se describe que tienen actividad bloqueante (J Sanders, Y Oda, S-A Roberts, M Maruyama, J Furmaniak, B Rees Smith; "Understanding the thyrotrophin receptor function-structure relationship" "Balliere's Clinical Endocrinology and Metabolism"; Ed TF Davies 1997; 11(3): 451-479; pub Balliere Tindall, Londres).

Las medidas de anticuerpos de receptor de TSH son importantes en el diagnóstico y gestión de la enfermedad de Graves y otros trastornos tiroideos. Actualmente, se usan tres tipos de ensayo para medir los anticuerpos de receptor de TSH:

- (a) ensayos de unión competitiva que miden la capacidad de los anticuerpos de receptor de TSH de inhibir la unión de TSH a preparaciones de receptor de TSH;
- (b) bioensayos que miden la capacidad de los anticuerpos de receptor de TSH de estimular células que expresan el receptor de TSH en cultivo; y
25
- (c) inmunoprecipitación de preparaciones de receptor de TSH con anticuerpos de receptor de TSH.

La medida de los anticuerpos de receptor de TSH usando dichos ensayos se describe en las referencias:

J Sanders, Y Oda, S-A Roberts, M Maruyama, J Furmaniak, B Rees Smith; "Understanding the thyrotrophin receptor function-structure relationship" "Balliere's Clinical Endocrinology and Metabolism"; Ed. TF Davies 1997; 11(3): 451-479; pub Balliere Tindall, Londres.
30

J Sanders, Y Oda, S Roberts, A Kiddie, T Richards, J Bolton, V McGrath, S Walters, D Jaskoski, J Furmaniak, B Rees Smith; "The interaction of TSH receptor autoantibodies with ¹²⁵I-labelled TSH receptor"; Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1999; 84(10): 3797-3802.

Se ha reconocido durante muchos años que los anticuerpos monoclonales humanos del receptor de TSH derivados de linfocitos de pacientes serían reactivos valiosos para comprender la patogénesis de la enfermedad de Graves y para desarrollar nuevos métodos de medida de anticuerpos de receptor de TSH, por ejemplo, como sustitutos de TSH en ensayos de unión competitiva. También, como los anticuerpos de receptor de TSH de suero de paciente son habitualmente potentes estimulantes tiroideos (agonistas de TSH), estimular los anticuerpos monoclonales humanos de receptor de TSH sería valioso para aplicaciones *in vivo* cuando el tejido que contiene el receptor de TSH (por ejemplo, tejido tiroideo o tejido de cáncer de tiroides) requiera estimulación. Además, como algunos anticuerpos de receptor de TSH de suero de pacientes son potentes antagonistas de TSH (anticuerpos bloqueantes), los anticuerpos monoclonales humanos de receptor de TSH que son antagonistas de TSH serían valiosos para aplicaciones *in vivo* cuando la actividad del tejido que contiene el receptor de TSH (por ejemplo, tejido tiroideo o tejido de cáncer de tiroides) requiera inactivación o volverse insensible a TSH, anticuerpos de receptor de TSH u
45 otros estimulantes.

Se ha reconocido también que una de las ventajas principales de los anticuerpos monoclonales humanos de receptor de TSH frente a la TSH en dichas aplicaciones *in vitro* y/o *in vivo* sería la facilidad relativa con que pueden manipularse dichos anticuerpos. Por ejemplo, la manipulación de la región de unión a receptor de TSH de los anticuerpos monoclonales para cambiar sus características, tales como afinidad y características biológicas que incluyen su grado de actividades agonista o antagonista de TSH. También los anticuerpos monoclonales tendrán una semivida mucho más larga que la TSH *in vivo*, y esto puede tener ventajas considerables en ciertas aplicaciones *in vivo*. Además, la semivida de los anticuerpos puede manipularse fácilmente, por ejemplo, los fragmentos Fab de anticuerpo tienen una semivida mucho más corta que la IgG intacta. Estas propiedades generales de los anticuerpos de receptor de TSH se describen en publicaciones tales como B Rees Smith, S M McLachlan, J Furmaniak;
50 "Autoantibodies to the thyrotropin receptor"; Endocrine Reviews 1988; 9: 106-121; B Rees Smith, K J Dorrington, D S

Munro; "The thyroid stimulating properties of long-acting thyroid stimulator γ G-globulin subunits"; Biochimica et Biophysica Acta 1969; 192: 277-285; K J Dorrington, D S Munro; "The long acting thyroid stimulator"; Clinical Pharmacology and Therapeutics 1966; 7: 788-806.

Una ventaja adicional más de los anticuerpos monoclonales humanos de receptor de TSH podría ser su uso para identificar y proporcionar nuevos tipos de sitios de unión de anticuerpo de receptor de TSH. Por ejemplo, mediante la generación de anticuerpos de las regiones de los anticuerpos monoclonales humanos de receptor de TSH que se unen al receptor de TSH. Algunos de los anticuerpos antiidiotípicos producidos de este modo podrían tener potencial como nuevos ligandos para ensayos de anticuerpos de receptor de TSH, TSH y compuestos relacionados. También pueden ser agentes eficaces *in vivo* para regular la acción de los anticuerpos de receptor de TSH, TSH y compuestos relacionados.

Son bien conocidos otros métodos de identificación y provisión de nuevos tipos de sitios de unión de anticuerpo usando anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, mediante el cribado con anticuerpos de colecciones peptídicas aleatorias expuestas en fago como se describe en JC Scott y GP Smith; "Searching for peptide ligands with an epitope library"; Science 1990; 249(4967): 386-390 y MA Myers, JM Davies, JC Tong, J Whisstock, M Scealy, IR MacKay, MJ Rowley; "Conformational epitopes on the diabetes autoantigen GAD₆₅ identified by peptide phage display and molecular modelling"; Journal of Immunology 2000; 165: 3830-3838. Puede llevarse también a cabo el cribado con anticuerpos de compuestos no peptídicos y colecciones de compuestos no peptídicos.

Pueden ser también útiles nuevos tipos de sitios de unión de anticuerpo de receptor de TSH, identificados y proporcionados usando estos procedimientos, como nuevos ligandos en ensayos de anticuerpos de receptor de TSH, TSH y compuestos relacionados. Además, pueden ser agentes eficaces *in vivo* para regular la acción de los anticuerpos de receptor de TSH, TSH y compuestos relacionados.

A la vista del valor potencial de los anticuerpos monoclonales humanos de receptor de TSH, se han realizado considerables esfuerzos durante muchos años por producir dichos anticuerpos (véanse, por ejemplo, B Rees Smith, SM McLachlan, J Furmaniak; "Autoantibodies to the thyrotropin receptor"; Endocrine Reviews 1988; 9: 106-121. Sin embargo, hasta la fecha estos esfuerzos han sido inútiles (véanse, por ejemplo, SM McLachlan, B Rapoport; "Monoclonal, human autoantibodies to the TSH receptor--The Holy Grail and why are we looking for it"; Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1996; 81: 3152-3154 y JHW van der Heijden, TWA de Bruin, KAFM Gludemans, J de Kruij, JP Banga, T Logtenberg; "Limitations of the semisynthetic library approach for obtaining human monoclonal autoantibodies to the thyrotropin receptor of Graves' disease"; Clinical and Experimental Immunology 1999; 118: 205-212).

Kohn *et al.* describen la caracterización de autoanticuerpos monoclonales estimulantes de tiroides e inhibidores de la unión a tirotrópina a partir de un paciente con la enfermedad de Hashimoto cuyos hijos tenían enfermedad tiroidea intrauterina y neonatal en Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1997, vol. 82, nº 12, páginas 3998-4009.

Akamizu *et al.* describen la caracterización de anticuerpos monoclonales recombinantes anti-receptor de tirotrópina (TSHRab) derivados de linfocitos de pacientes con la enfermedad de Graves: "Epitope and binding study of two stimulatory TSHRab" en Endocrinology 1999, vol. 140, nº 4, páginas 1594-1601. Los mismos autores describen también un análisis molecular anticuerpos anti-receptor de tirotrópina (TSAb) estimulantes implicados en la enfermedad de Graves en Journal of Immunology, 1996, 157: 3148-3152.

Yoshida *et al.* describen anticuerpos monoclonales del receptor de tirotrópina que se unen a una subunidad de 56 kDa del receptor de tirotrópina y muestran bioactividades heterogéneas en Journal of Biological Chemistry, 1998, vol. 263, nº 31, páginas 16341-16347.

Valente *et al.* describen anticuerpos monoclonales del receptor de tirotrópina derivados de linfocitos de pacientes con la enfermedad de Graves en Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, vol. 79, páginas 6680-6684.

Ninguna de las referencias de la técnica anterior describe anticuerpos que tengan los altos niveles de actividad inhibidora y estimulante de los anticuerpos dados a conocer por la presente invención.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un copartícipe de unión para el receptor de TSH capaz de interaccionar con el receptor de TSH de manera comparable a la interacción de autoanticuerpos de receptor de TSH con el receptor de TSH, es en particular un objeto de la presente invención proporcionar anticuerpos monoclonales humanos de receptor de TSH que exhiban una interacción comparable con la misma como se observa con anticuerpos de receptor de TSH presentes en los sueros de pacientes con la enfermedad de Graves hipertiroides, y también proporcionar preparaciones recombinantes de los mismos. Las considerables dificultades de producir anticuerpos monoclonales humanos de receptor de TSH se han superado en la invención descrita en la presente memoria. En particular, se describe la producción exitosa de un anticuerpo monoclonal humano de receptor de TSH con las características de los autoanticuerpos encontrados en los sueros de pacientes con la enfermedad de Graves hipertiroides. El anticuerpo monoclonal humano de receptor de TSH que se ha producido (descrito en la presente memoria como hMAb TSHR1) se une al receptor de TSH con alta afinidad y de tal modo que pequeñas cantidades del anticuerpo inhiben la unión de TSH marcada al receptor de TSH y estas pequeñas cantidades actúan como potentes estimulantes del tiroides. Los fragmentos Fab del anticuerpo y las preparaciones Fab recombinantes son

estimulantes del tiroides e inhibidores de la unión de TSH marcada similarmente eficaces a la IgG intacta. El Fab monoclonal y/o IgG intacta pueden marcarse con ¹²⁵I o biotina y mostrarse que se unen al receptor de TSH. Dicha unión se inhibe por los autoanticuerpos de receptor de TSH en los sueros de pacientes.

- 5 La presente invención se define en las reivindicaciones 1 a 32 adjuntas. Se proporciona un copartícipe de unión para el receptor de TSH, comprendiendo dicho copartícipe de unión, o derivando de, un anticuerpo monoclonal humano o recombinante, o uno o más fragmentos del mismo, reactivo con el receptor de TSH.

Se proporciona un copartícipe de unión para el receptor de TSH, comprendiendo dicho copartícipe de unión, o derivando de, un anticuerpo monoclonal humano, o uno o más fragmentos del mismo, reactivo con el receptor de TSH.

- 10 Se proporciona un copartícipe de unión para el receptor de TSH, comprendiendo dicho copartícipe de unión, o derivando de, un anticuerpo recombinante humano, o uno o más fragmentos del mismo, reactivo con el receptor de TSH.

Se proporciona un anticuerpo monoclonal humano, o uno o más fragmentos del mismo, reactivo con el receptor de TSH.

- 15 En particular, se proporciona un anticuerpo recombinante humano, o uno o más fragmentos del mismo, reactivo con el receptor de TSH.

Particularmente, se proporciona uno o más fragmentos de un anticuerpo recombinante humano reactivo con el receptor de TSH.

- 20 Un copartícipe de unión, y en particular un anticuerpo monoclonal humano o recombinante reactivo con el receptor de TSH, puede caracterizarse adicionalmente por su capacidad de inhibir la unión de TSH al receptor de TSH y/o por su capacidad de estimular el receptor de TSH, ambas de las cuales se ha observado que son comparables con las propiedades inhibidora y estimulante respectivas de autoanticuerpos de receptor de TSH presentes en sueros obtenidos de pacientes con la enfermedad de Graves.

- 25 Más particularmente, un copartícipe de unión, y en particular un anticuerpo monoclonal humano o recombinante, puede caracterizarse por una actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH al receptor de TSH de al menos 15 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o más preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o uno o más fragmentos de dicho anticuerpo monoclonal o recombinante.

- 30 Más particularmente, un copartícipe de unión, y en particular un anticuerpo monoclonal o recombinante humano, puede caracterizarse adicionalmente por una actividad estimulante con respecto a la producción de AMPc por células que expresan el receptor de TSH de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o más preferiblemente de al menos aproximadamente 240 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o uno o más fragmentos de dicho anticuerpo monoclonal o recombinante.

En una divulgación preferida, un copartícipe de unión, y en particular un anticuerpo monoclonal o recombinante humano, puede caracterizarse por:

- 40 (i) una actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH al receptor de TSH de al menos aproximadamente 15 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg o más preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg; y
- 45 (ii) una actividad estimulante con respecto a la producción de AMPc por células que expresan el receptor de TSH de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg; más preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg o más preferiblemente de al menos aproximadamente 240 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg;
- 50 o uno o más fragmentos de dicho anticuerpo monoclonal o recombinante.

En el caso en que un copartícipe de unión comprenda o derive de uno o más fragmentos de un anticuerpo monoclonal o recombinante reactivo con el receptor de TSH, en particular por ejemplo uno o más fragmentos Fab de un anticuerpo monoclonal o recombinante reactivo con el receptor de TSH, puede preferirse que dicho copartícipe de unión pueda caracterizarse por una actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH al receptor de TSH de al

menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg o más preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg.

- 5 Puede preferirse también en el caso en que el copartícipe de unión comprenda o derive de uno o más fragmentos de un anticuerpo monoclonal o recombinante reactivo con el receptor de TSH, en particular por ejemplo uno o más fragmentos Fab de un anticuerpo monoclonal o recombinante reactivo con el receptor de TSH, que dicho copartícipe de unión pueda caracterizarse por una actividad estimulante con respecto a la producción de AMPc por células que expresan el receptor de TSH de al menos aproximadamente 50 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 100 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg o más preferiblemente de al menos aproximadamente 200 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg.

- 15 Puede preferirse adicionalmente en el caso en que el copartícipe de unión comprenda o derive de uno o más fragmentos de un anticuerpo monoclonal o recombinante reactivo con el receptor de TSH, en particular por ejemplo uno o más fragmentos Fab de un anticuerpo monoclonal o recombinante reactivo con el receptor de TSH, que dicho copartícipe de unión pueda caracterizarse por:

- (i) una actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH al receptor de TSH de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg o más preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg; y
- 20 (ii) una actividad estimulante con respecto a la producción de AMPc por células que expresan el receptor de TSH de al menos aproximadamente 50 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 100 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg o más preferiblemente de al menos aproximadamente 200 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg.

- 25 En un caso preferido, se proporciona un copartícipe de unión para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal humano), siendo capaz dicho copartícipe de unión de unirse al receptor de TSH preferiblemente para estimular el receptor de TSH y que comprende un dominio V_H de anticuerpo seleccionado del grupo consistente en un dominio V_H como se muestra en la SEQ ID NO. 1 y un dominio V_H que comprende una o más CDR de V_H con una secuencia aminoacídica seleccionada de las SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 y SEQ ID NO. 4.

- 30 En una primera divulgación, por lo tanto, se proporciona un copartícipe de unión para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal humano), siendo dicho copartícipe de unión capaz de unirse al receptor de TSH preferiblemente para estimular el receptor de TSH y que comprende un dominio V_H de anticuerpo como se muestra en la SEQ ID NO. 1.

- 35 En una segunda divulgación, por lo tanto, se proporciona un copartícipe de unión para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal humano), siendo dicho copartícipe de unión capaz de unirse al receptor de TSH preferiblemente para estimular el receptor de TSH y que comprende un dominio V_H de anticuerpo que comprende una o más CDR de V_H con una secuencia aminoacídica seleccionada de las SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 y SEQ ID NO. 4.

- 40 Se apreciará que un copartícipe de unión puede comprender un dominio V_H de anticuerpo sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria en ausencia de un dominio V_L de anticuerpo. Es conocido que los dominios de inmunoglobulina individuales, especialmente los dominios V_H , son capaces de unirse a antígenos diana de manera específica. Como alternativa, un copartícipe de unión puede comprender un dominio V_H de anticuerpo emparejado con un dominio V_L de anticuerpo, proporcionando un sitio de unión de anticuerpo que comprende ambos dominios V_H y V_L para un receptor de TSH, empleando técnicas bien conocidas en la materia (Biochim. Biophys. Acta, 192 (1969) 277-285; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 89, pág.10026-10030, noviembre de 1992).

- 45 En un caso preferido, sin embargo, la presente divulgación proporciona un copartícipe de unión para el receptor de TSH, siendo dicho copartícipe de unión capaz de unirse al receptor de TSH preferiblemente para estimular el receptor de TSH y que comprende:

un dominio V_H de anticuerpo seleccionado del grupo consistente en:

- 50 un dominio V_H como se muestra en la SEQ ID NO. 1 y un dominio V_H que comprende una o más CDR de V_H con una secuencia aminoacídica seleccionada de las SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 y SEQ ID NO. 4; y/o

un dominio V_L de anticuerpo seleccionado del grupo consistente en:

un dominio V_L como se muestra en la SEQ ID NO. 6 y un dominio V_L que comprende una o más CDR de V_L con una secuencia aminoacídica seleccionada de las SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8 y SEQ ID NO. 9.

Puede preferirse según la presente divulgación que el copartícipe de unión sustancialmente como se describe

- anteriormente en la presente memoria comprenda un dominio V_H de anticuerpo sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria emparejado con un dominio V_L de anticuerpo sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria, proporcionando un sitio de unión de anticuerpo que comprende ambos dominios V_H y V_L para el receptor de TSH aunque, como se debate adicionalmente, pueden usarse
- 5 independientemente un dominio V_H de anticuerpo o un dominio V_L de anticuerpo para unirse a un receptor de TSH. Por lo tanto, se apreciará que un copartícipe de unión sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria puede comprender un dominio V_H de anticuerpo sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria en ausencia de un dominio V_L de anticuerpo. Por lo tanto, se apreciará también que un
- 10 copartícipe de unión sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria puede comprender un dominio V_L de anticuerpo sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria en ausencia de un dominio V_H de anticuerpo. Como alternativa, un copartícipe de unión sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria puede comprender un dominio V_H de anticuerpo emparejado con un dominio V_L de anticuerpo sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria, proporcionando un sitio de unión de anticuerpo que comprende ambos dominios V_H y V_L para el receptor de TSH.
- 15 Las realizaciones preferidas según la presente divulgación pueden incluir por tanto un copartícipe de unión sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria que comprende un dominio V_H de anticuerpo como se muestra en la SEQ ID NO. 1 emparejado con un dominio V_L de anticuerpo como se muestra en la SEQ ID NO. 6, proporcionando un sitio de unión de anticuerpo que comprende ambos de estos dominios V_H y V_L para el receptor de TSH.
- 20 Se prevé adicionalmente según la presente divulgación que los dominios V_H sustancialmente como se describen anteriormente en la presente memoria puedan emparejarse con dominios V_L distintos de los descritos específicamente en la presente memoria. Se prevé adicionalmente según la presente divulgación que los dominios V_L sustancialmente como se describen anteriormente en la presente memoria puedan emparejarse con dominios V_H distintos de los descritos específicamente en la presente memoria.
- 25 Según un aspecto adicional de la presente divulgación, se proporciona un copartícipe de unión sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria para el receptor de TSH, siendo dicho copartícipe de unión capaz de unirse al receptor de TSH de modo para estimular el receptor de TSH y que puede comprender:
- un dominio V_H de anticuerpo que comprende:
- un dominio V_H que comprende una o más CDR de V_H con una secuencia aminoacídica seleccionada de las SEQ ID
- 30 NO. 2, SEQ ID NO. 3 y SEQ ID NO. 4; y/o
- un dominio V_L de anticuerpo que comprende:
- un dominio V_L que comprende una o más CDR de V_L con una secuencia aminoacídica seleccionada de las SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8 y SEQ ID NO. 9.
- 35 Pueden tomarse una o más CDR como se designan anteriormente de los dominios V_H y V_L descritos anteriormente en la presente memoria e incorporarse a una estructura adecuada. Por ejemplo, la secuencia aminoacídica de una o más CDR sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria puede incorporarse a regiones estructurales de anticuerpos diferentes del hMAb TSHR1 dado a conocer específicamente en la presente memoria, incorporando así dichos anticuerpos la una o más CDR y siendo capaces de unirse al receptor de TSH, preferiblemente para estimular el receptor de TSH sustancialmente como se describe anteriormente en la presente
- 40 memoria. Como alternativa, la presente divulgación puede proporcionar un polipéptido capaz de unirse al receptor de TSH para estimular el receptor de TSH sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria y que comprende la conformación estructural primaria de aminoácidos representada por una o más CDR como se describen específicamente en la presente memoria, opcionalmente junto con aminoácidos adicionales, pudiendo dichos aminoácidos adicionales potenciar la afinidad de unión de una o más CDR como se describen en la presente
- 45 memoria por el receptor de TSH o pudiendo no tener sustancialmente un papel en la modificación de las propiedades de unión del polipéptido al receptor de TSH.
- La presente divulgación comprende también variantes, análogos, derivados y fragmentos del anticuerpo monoclonal humano específico dado a conocer en la presente memoria, dominios V_H , CDR y polipéptidos dados a conocer en la presente memoria, reteniendo dichas variantes, análogos, derivados y fragmentos la capacidad de interactuar con
- 50 el receptor de TSH (tal como, por ejemplo, para estimular el receptor de TSH) sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria.
- Los términos “variantes”, “análogos”, “derivados” y “fragmentos” como se usan en la presente memoria pueden caracterizarse como anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o polipéptidos que retienen esencialmente la misma función o actividad biológica que un anticuerpo monoclonal humano que tiene un dominio V_H como se muestra en la
- 55 SEQ ID NO.1 y un dominio V_L como se muestra en la SEQ ID NO.6, y en particular respecto a las propiedades de unión del mismo al receptor de TSH. Las variantes, análogos, derivados y fragmentos y las variantes, análogos y derivados de los fragmentos como se describen en la presente memoria tienen adecuadamente una conformación estructural primaria de aminoácidos en que se sustituyen, eliminan o añaden, en cualquier combinación, varios o

unos pocos (tales como 5 a 10, 1 a 5 o a 1 a 3) restos aminoacídicos de un anticuerpo monoclonal humano que tiene un dominio V_H como se muestra en la SEQ ID NO.1 y un dominio V_L como se muestra en la SEQ ID NO. 6. Se prefieren especialmente entre estas las sustituciones, adiciones y deleciones silenciosas que no alteran o no alteran sustancialmente la actividad o función biológica de un anticuerpo monoclonal humano que tiene un dominio V_H como se muestra en la SEQ ID NO.1 y un dominio V_L como se muestra en la SEQ ID NO.6. Pueden preferirse las sustituciones conservativas como se describen a continuación con más detalle en la presente memoria.

Más particularmente, las variantes, análogos o derivados de un anticuerpo monoclonal humano que tiene un dominio V_H como se muestra en la SEQ ID NO.1 y un dominio V_L como se muestra en la SEQ ID NO.6 pueden ser aquellos en que uno o más de los restos aminoacídicos se sustituyen por un resto aminoacídico conservado o no conservado (preferiblemente un resto aminoacídico conservado), o aquellos en que uno o más de los restos aminoacídicos incluyen un grupo sustituyente o similar. Dichas variantes, derivados y análogos se considera que están dentro del alcance de los especialistas en la materia a partir de las enseñanzas de la misma.

Lo más típicamente, las variantes, análogos o derivados son aquellos que varían de un anticuerpo monoclonal humano de referencia que tiene un dominio V_H como se muestra en la SEQ ID NO.1 y un dominio V_L como se muestra en la SEQ ID NO.6 mediante sustituciones aminoacídicas conservativas. Dichas sustituciones son aquellas que sustituyen un aminoácido dado por otro aminoácido de características similares. Se consideran típicamente como sustituciones conservativas los reemplazos, uno por otro, entre los aminoácidos alifáticos A, V, L e I; entre los restos hidroxílicos S y T; entre los restos ácidos D y E; entre los restos amídicos N y Q; entre los restos básicos K y R y entre los restos aromáticos F e Y.

Se apreciará que el término fragmento como se usa en la presente memoria se refiere en particular a fragmentos de anticuerpos como se describen específicamente en la presente memoria y forma un aspecto importante de la presente divulgación. De este modo, un anticuerpo monoclonal o anticuerpo recombinante humano como se proporciona por la presente divulgación puede proporcionarse como cualquiera de los siguientes fragmentos: (i) el fragmento Fab consistente en los dominios V_L , V_H , C_L y C_H1 ; (ii) el fragmento Fd consistente en los dominios V_H y C_H1 ; (iii) el fragmento Fv consistente en los dominios V_L y V_H ; (iv) el fragmento dAb que consiste en un dominio V_H ; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos $F(ab')_2$, un fragmento divalente que comprende dos fragmentos Fab ligados y (vii) moléculas de Fv monocaténarias (scFv), en las que un dominio V_H y un dominio V_L están ligados por un engarce peptídico que permite que los dos dominios se asocien formando un sitio de unión de antígeno.

Como alternativa, un anticuerpo monoclonal o recombinante humano según la presente divulgación puede comprender un anticuerpo de IgG entero, con lo que el anticuerpo incluye las regiones variables y constantes.

La presente divulgación proporciona también un copartícipe de unión adicional capaz de unirse al receptor de TSH, que puede competir por la unión al receptor de TSH con un copartícipe de unión del receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal humano) sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria, no comprendiendo dicho copartícipe de unión adicional la TSH. Preferiblemente, este copartícipe de unión adicional puede comprender un anticuerpo adicional que tiene un sitio de unión para una región epitópica del receptor de TSH, y que puede competir por la unión al receptor de TSH con un copartícipe de unión del receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal humano) sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria. Uno de dichos copartícpes de unión adicionales adecuados puede comprender un anticuerpo monoclonal de ratón, que puede producirse preferiblemente según técnicas sustancialmente como se describen en los ejemplos, empleando la inmunización de ratones con receptor de TSH mediante técnicas conocidas en la materia.

La presente divulgación puede proporcionar también un copartícipe de unión adicional capaz de unirse al receptor de TSH que puede comprender, o deriva de, un anticuerpo monoclonal o recombinante humano o uno o más fragmentos del mismo, reactivo con el receptor de TSH. En particular, este copartícipe de unión adicional puede comprender un anticuerpo adicional que tiene un sitio de unión para una región epitópica del receptor de TSH, siendo capaz dicho anticuerpo adicional de unirse al receptor de TSH y pudiendo competir por la unión al receptor de TSH con un copartícipe de unión del receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal humano) sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria. Dicho copartícipe de unión adicional puede derivar adecuadamente de un copartícipe de unión específica como se describe en la presente memoria, hMAb TSHR 1, mediante técnicas de mutagénesis adecuadas tales como mutaciones puntuales o similares, para obtener un copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH que pueda competir con un copartícipe de unión sustancialmente como se describe en la presente memoria (tal como hMAb TSHR1) por la interacción con el receptor de TSH.

Preferiblemente, un copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH puede comprender un anticuerpo monoclonal o recombinante y puede caracterizarse por una actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH al receptor de TSH de al menos aproximadamente 15 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg o más preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o uno o más fragmentos del anticuerpo. Puede preferirse también que dicho copartícipe de unión adicional según la presente invención pueda caracterizarse por una actividad estimulante con respecto a la producción de AMPc por

células que expresan el receptor de TSH de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg o más preferiblemente de al menos aproximadamente 240 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o uno o más fragmentos del anticuerpo.

Puede preferirse aún más que dicho copartícipe de unión adicional de la presente divulgación pueda caracterizarse por:

(i) una actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH al receptor de TSH de al menos aproximadamente 15 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg o más preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg; y

(ii) una actividad estimulante con respecto a la producción de AMPc por células que expresan el receptor de TSH de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg o más preferiblemente de al menos aproximadamente 240 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg;

o uno o más fragmentos del mismo.

Un anticuerpo monoclonal de ratón preferido que proporciona un copartícipe de unión adicional según la presente divulgación comprende 9D33 preparado adicionalmente en los ejemplos y que tiene secuencias aminoácídicas y polinucleotídicas como se ilustran por las Figuras 9 a 12 y las listas de secuencias 19 a 38. Según la presente divulgación, por lo tanto, se proporciona un copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal de ratón) que comprende un dominio V_H de anticuerpo como se muestra en la SEQ ID NO. 19.

Un copartícipe de unión adicional proporcionado por la presente divulgación puede caracterizarse también por comprender un dominio de anticuerpo V_H que comprende una o más CDR de V_H con una secuencia aminocídica seleccionada de las SEQ ID NO. 20, SEQ ID NO. 21 y SEQ ID NO. 22.

Se apreciará que un copartícipe de unión adicional según la presente divulgación puede comprender un dominio V_H de anticuerpo sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria en ausencia de un dominio V_L de anticuerpo. Es conocido que los dominios de inmunoglobulina individuales, especialmente los dominios V_H , son capaces de unirse a antígenos diana de manera específica. Como alternativa, un copartícipe de unión adicional según la presente divulgación puede comprender un dominio V_H de anticuerpo emparejado con un dominio V_L de anticuerpo, proporcionando un sitio de unión de anticuerpo que comprende ambos dominios V_H y V_L para un receptor de TSH, empleando técnicas bien conocidas en la materia (Biochim. Biophys. Acta, 192 (1969) 277-285; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 89, pág. 10026-10030, noviembre de 1992).

En un caso preferido, sin embargo, la presente divulgación proporciona un copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH, comprendiendo dicho copartícipe de unión adicional:

un dominio V_H de anticuerpo seleccionado del grupo consistente en:

un dominio V_H como se muestra en la SEQ ID NO. 19 y un dominio V_H que comprende una o más CDR de V_H con una secuencia aminoácídica seleccionada de las SEQ ID NO. 20, SEQ ID NO. 21 y SEQ ID NO. 22; y/o

un dominio V_L de anticuerpo seleccionado del grupo consistente en:

un dominio V_L como se muestra en la SEQ ID NO. 24 y un dominio V_L que comprende una o más CDR de V_L con una secuencia aminoácídica seleccionada de las SEQ ID NO. 25, SEQ ID NO. 26 y SEQ ID NO. 27.

Puede preferirse según la presente divulgación que un copartícipe de unión adicional sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria comprenda un dominio V_H de anticuerpo como se describe anteriormente en la presente memoria emparejado con un dominio V_L de anticuerpo sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria, proporcionando un sitio de unión de anticuerpo que comprende ambos dominios V_H y V_L para el receptor de TSH aunque, como se debate adicionalmente, pueden usarse independientemente un dominio V_H de anticuerpo o un dominio V_L de anticuerpo para unirse a un receptor de TSH.

Por lo tanto, se apreciará que un copartícipe de unión adicional sustancialmente como se describe en la presente memoria puede comprender un dominio V_H de anticuerpo sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria en ausencia de un dominio V_L de anticuerpo. Por lo tanto, se apreciará también que un copartícipe de unión adicional sustancialmente como se describe en la presente memoria puede comprender un dominio V_L de anticuerpo sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria en ausencia de un dominio V_H de anticuerpo. Como alternativa, un copartícipe de unión adicional sustancialmente como se describe

anteriormente en la presente memoria puede comprender un dominio V_H de anticuerpo emparejado con un dominio V_L de anticuerpo sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria, proporcionando un sitio de unión de anticuerpo que comprende ambos dominios V_H y V_L para el receptor de TSH.

5 Las realizaciones preferidas según la presente divulgación pueden incluir por tanto un copartícipe de unión adicional sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria que comprende un dominio V_H de anticuerpo como se muestra en la SEQ ID NO. 19 emparejado con un dominio V_L de anticuerpo como se muestra en la SEQ ID NO. 24, proporcionando un sitio de unión de anticuerpo que comprende ambos de estos dominios V_H y V_L para el receptor de TSH.

10 Se prevé adicionalmente según la presente divulgación que el dominio V_H sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria pueda emparejarse con dominios V_L distintos de los descritos específicamente en la presente memoria. Se prevé adicionalmente también según la presente divulgación que los dominios V_L sustancialmente como se describen anteriormente en la presente memoria puedan emparejarse con dominios V_H distintos de los descritos específicamente en la presente memoria.

15 Según una realización adicional de la presente divulgación, se proporciona un copartícipe de unión adicional sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria para el receptor de TSH, siendo capaz dicho copartícipe de unión de unirse al receptor de TSH para inhibir la estimulación del receptor de TSH, y que puede comprender:

un dominio V_H de anticuerpo que comprende:

20 un dominio V_H que comprende una o más CDR de V_H con una secuencia aminoacídica seleccionada de las SEQ ID NO. 20, SEQ ID NO. 21 y SEQ ID NO. 22; y/o

un dominio V_L de anticuerpo que comprende:

un dominio V_L que comprende una o más CDR de V_L con una secuencia aminoacídica seleccionada de las SEQ ID NO. 25, SEQ ID NO. 26 y SEQ ID NO. 27.

25 Una o más CDR como se designan anteriormente pueden tomarse de los dominios V_H y V_L descritos anteriormente en la presente memoria e incorporarse a una estructura adecuada. Por ejemplo, la secuencia aminoacídica de las una o más CDR sustancialmente como se describen anteriormente en la presente memoria puede incorporarse a regiones estructurales de anticuerpos que difieren del 9D33 dado a conocer específicamente en la presente memoria, incorporando así dichos anticuerpos la una o más CDR y siendo capaces de unirse al receptor de TSH. Como alternativa, la presente divulgación puede proporcionar un polipéptido capaz de unirse al receptor de TSH que
30 comprende la conformación estructural primaria de aminoácidos como se representa por una o más CDR como se describen específicamente en la presente memoria, opcionalmente junto con aminoácidos adicionales, pudiendo potenciar dichos aminoácidos adicionales la afinidad de unión de las una o más CDR como se describen en la presente memoria por el receptor de TSH, o pudiendo no tener sustancialmente un papel en la modificación de las propiedades de unión del polipéptido al receptor de TSH.

35 Se apreciará que el término fragmento, como se usa en la presente memoria, se refiere en particular a fragmentos de anticuerpos como se describen específicamente en la presente memoria y forma un aspecto importante de la presente divulgación. De este modo, un copartícipe de unión adicional según la presente divulgación puede proporcionarse como cualquiera de los siguientes fragmentos: (i) el fragmento Fab consistente en los dominios V_L , V_H , C_L y C_H1 ; (ii) el fragmento Fd consistente en los dominios V_H y C_H1 ; (iii) el fragmento Fv consistente en los
40 dominios V_L y V_H ; (iv) el fragmento dAb que consiste en un dominio V_H ; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos $F(ab')_2$, un fragmento divalente que comprende dos fragmentos Fab ligados y (vii) moléculas de Fv monocaténarias (scFv) en las que un dominio V_H y un dominio V_L están ligados por un engarce peptídico que permite que los dos dominios se asocien formando un sitio de unión de antígeno.

45 Como alternativa, un anticuerpo monoclonal o recombinante de ratón según la presente divulgación, tal como 9D33, puede comprender un anticuerpo de IgG entero, con lo que el anticuerpo incluye las regiones variables y constantes.

Se proporciona también por la presente divulgación un polinucleótido que comprende:

(i) una secuencia nucleotídica como se muestra en las SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13, SEQ ID NO. 15, SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 17 o SEQ ID NO. 18, que codifica una secuencia aminoacídica de un dominio V_H , un dominio V_L o CDR de anticuerpo como se muestra en las SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8 o SEQ ID NO. 9;
50

(ii) una secuencia nucleotídica que codifica un copartícipe de unión para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal humano) sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria, o que codifica una secuencia aminoacídica de un dominio V_H , dominio V_L o CDR de anticuerpo de un copartícipe de unión del receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal humano) sustancialmente como se describe
55 anteriormente en la presente memoria;

- (iii) una secuencia nucleotídica que difiere de cualquier secuencia de (i) en la secuencia de codón debido a la degeneración del código genético;
- (iv) una secuencia nucleotídica que comprende una variación alélica de cualquier secuencia de (i);
- 5 (v) una secuencia nucleotídica que comprende un fragmento de cualquiera de las secuencias (i), (ii), (iii) o (iv), y en particular una secuencia nucleotídica que comprende un fragmento de cualquiera de las secuencias (i), (ii), (iii), (iv) o (v) y que codifica un fragmento Fab, un fragmento Fd, un fragmento Fv, un fragmento dAb, una región CDR aislada, fragmentos F(ab')₂ o un fragmento scFv, de un anticuerpo monoclonal humano sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria;
- 10 (vi) una secuencia nucleotídica que difiere de cualquier secuencia (i) debido a la mutación, delección o sustitución de una base nucleotídica y que codifica un copartícipe de unión para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal humano) sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria, o que codifica una secuencia aminoacídica de un dominio V_H, dominio V_L o CDR de anticuerpo, de un copartícipe de unión para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal humano) sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria.
- 15 Se proporciona también por la presente divulgación un polinucleótido que comprende:
- (i) una secuencia nucleotídica como se muestra en las SEQ ID NO. 29, SEQ ID NO. 30, SEQ ID NO. 31, SEQ ID NO. 32, SEQ ID NO. 34, SEQ ID NO. 35, SEQ ID NO. 36 o SEQ ID NO. 37, que codifica una secuencia aminoacídica de un dominio V_H, dominio V_L o CDR de anticuerpo, como se muestra en las SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 20, SEQ ID NO. 21, SEQ ID NO. 22, SEQ ID NO. 24, SEQ ID NO. 25, SEQ ID NO. 26 o SEQ ID NO. 27;
- 20 (ii) una secuencia nucleotídica que codifica un copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal de ratón) sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria, o que codifica una secuencia aminoacídica de un dominio V_H, dominio V_L o CDR de anticuerpo, de un copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal de ratón) sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria;
- 25 (iii) una secuencia nucleotídica que difiere de cualquier secuencia de (i) en la secuencia de codón debido a la degeneración del código genético;
- (iv) una secuencia nucleotídica que comprende una variación alélica de cualquier secuencia (i);
- (v) una secuencia nucleotídica que comprende un fragmento de cualquiera de las secuencias (i), (ii), (iii) o (iv), y en particular una secuencia nucleotídica que comprende un fragmento de cualquiera de las secuencias (i), (ii), (iii),
- 30 (iv) o (v) y que codifica un fragmento Fab, un fragmento Fd, un fragmento dAb, una región CDR aislada, fragmentos F(ab')₂ o un fragmento scFv, de un anticuerpo monoclonal de ratón sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria;
- (vi) una secuencia nucleotídica que difiere de cualquier secuencia (i) debido a la mutación, delección o sustitución de una base nucleotídica y que codifica un copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH
- 35 (típicamente un anticuerpo monoclonal de ratón) sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria, o que codifica una secuencia aminoacídica de un dominio V_H, dominio V_L o CDR de anticuerpo de un copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal de ratón) sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria.
- 40 Los polinucleótidos variantes según la presente divulgación son adecuadamente al menos un 70% idénticos en toda su longitud a cualquier secuencia polinucleotídica (i), los más altamente preferidos son polinucleótidos que comprenden una región que es al menos un 80% idéntica en toda su longitud a cualquier secuencia polinucleotídica (i), se prefieren particularmente los polinucleótidos al menos un 90% idénticos en toda su longitud a cualquier secuencia polinucleotídica (i), y entre estos polinucleótidos particularmente preferidos, se prefieren especialmente aquellos con al menos un 95% de identidad.
- 45 La presente divulgación proporciona adicionalmente un sistema de vector biológicamente funcional que porta un polinucleótido sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria y que es capaz de introducir el polinucleótido en el genoma de un organismo hospedador.
- La presente divulgación se refiere también a células hospedadoras que se transforman con polinucleótidos de la invención y a la producción de copartícpes de unión para el receptor de TSH de la invención por técnicas recombinantes. Las células hospedadoras pueden modificarse por ingeniería genética para incorporar
- 50 polinucleótidos y expresar copartícpes de unión para el receptor de TSH de la presente divulgación.
- Las secuencias aminoacídicas de hMAb TSHR 1, un anticuerpo monoclonal humano según la presente invención, y las secuencias nucleotídicas que lo codifican, las secuencias aminoacídicas de 9D33, un anticuerpo monoclonal de ratón que representa un copartícipe de unión adicional según la presente divulgación, y las secuencias nucleotídicas

que lo codifican, se muestran en las listas de secuencias como se describen a continuación en la presente memoria y pueden asignarse como sigue.

Para hMAb TSHR1:

Secuencias aminoacídicas

- 5 SEQ ID NO. 1 V_H
- SEQ ID NO. 2 CDRI de V_H
- SEQ ID NO. 3 CDRII de V_H
- SEQ ID NO. 4 CDRIII de V_H
- SEQ ID NO. 5 región variable y constante adyacente de cadena pesada
- 10 SEQ ID NO. 6 V_L
- SEQ ID NO. 7 CDRI de V_L
- SEQ ID NO. 8 CDRII de V_L
- SEQ ID NO. 9 CDRIII de V_L

Secuencias nucleotídicas

- 15 SEQ ID NO. 10 V_H
- SEQ ID NO. 11 CDRI de V_H
- SEQ ID NO. 12 CDRII de V_H
- SEQ ID NO. 13 CDRIII de V_H
- SEQ ID NO. 14 región variable y constante adyacente de cadena pesada
- 20 SEQ ID NO. 15 V_L
- SEQ ID NO. 16 CDRI de V_L
- SEQ ID NO. 17 CDRII de V_L
- SEQ ID NO. 18 CDRIII de V_L

Para 9D33:

25 Secuencias aminoacídicas

- SEQ ID NO. 19 V_H
- SEQ ID NO. 20 CDRI de V_H
- SEQ ID NO. 21 CDRII de V_H
- SEQ ID NO. 22 CDRIII de V_H
- 30 SEQ ID NO. 23 región variable y constante adyacente de cadena pesada
- SEQ ID NO. 24 V_L
- SEQ ID NO. 25 CDRI de V_L
- SEQ ID NO. 26 CDRII de V_L
- SEQ ID NO. 27 CDRIII de V_L
- 35 SEQ ID NO. 28 región variable y constante adyacente de cadena ligera

Secuencias nucleotídicas

- SEQ ID NO. 29 V_H

SEQ ID NO. 30 CDR1 de V_H

SEQ ID NO. 31 CDR2 de V_H

SEQ ID NO. 32 CDR3 de V_H

SEQ ID NO. 33 región variable y constante adyacente de cadena pesada

5 SEQ ID NO. 34 V_L

SEQ ID NO. 35 CDR1 de V_L

SEQ ID NO. 36 CDR2 de V_L

SEQ ID NO. 37 CDR3 de V_L

SEQ ID NO. 38 región variable y constante adyacente de cadena ligera.

10 Las secuencias anteriores para el hMAb TSHR1 pueden observarse también con referencia a las Figuras. 4, 5, 6 y 7, en las que:

la Figura 4 muestra la secuencia nucleotídica de la cadena pesada de hMAb TSHR1, junto con la región constante adyacente,

dando la Figura. 4a la secuencia nucleotídica *per se*;

15 dando la Figura 4b la secuencia nucleotídica anotada con el cebador de PCR, las regiones CDR1, CDR2, CDR3 y constantes;

la Figura 5 muestra la secuencia aminoacídica de la cadena pesada de hMAb TSHR1, junto con la región constante adyacente,

dando la Figura 5a la secuencia aminoacídica *per se*;

20 dando la Figura. 5b la secuencia aminoacídica anotada con las regiones CDR1, CDR2, CDR3 y constante;

la Figura 6 muestra la secuencia nucleotídica de cadena ligera de hMAb TSHR1,

dando la Figura 6a la secuencia nucleotídica *per se*;

dando la Figura 6b la secuencia nucleotídica anotada con el cebador de PCR, las regiones CDR1, CDR2 y CDR3;

la Figura. 7 muestra la secuencia aminoacídica de la cadena ligera de hMAb TSHR1,

25 dando la Figura 7a la secuencia aminoacídica *per se*;

dando la Figura 7b la secuencia aminoacídica anotada con las regiones CDR1, CDR2 y CDR3.

Se apreciará a partir de lo anterior que, para la cadena V_H de hMAb TSHR1, las secuencias nucleotídicas de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 como se muestran en la Figura 4b corresponden a las secuencias V_HCDR1, V_HCDR2 y V_HCDR3 mostradas en las SEQ ID NO. 11, 12 y 13 respectivamente, y que las secuencias aminoacídicas de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 como se muestran en la Figura 5b corresponden a las secuencias V_HCDR1, V_HCDR2 y V_HCDR3 mostradas en las SEQ ID NO. 2, 3 y 4 respectivamente. Se apreciará también a partir de lo anterior que, para la cadena V_L de hMAb TSHR1, las secuencias nucleotídicas de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 como se muestran en la Figura 6b corresponden a las secuencias V_LCDR1, V_LCDR2 y V_LCDR3 mostradas en las SEQ ID NO. 16, 17 y 18 respectivamente, y que las secuencias aminoacídicas de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 como se muestran en la Figura 7b corresponden a las secuencias V_LCDR1, V_LCDR2 y V_LCDR3 mostradas en las SEQ ID NO. 7, 8 y 9 respectivamente.

El análisis de la estructura cristalina del Fab de hMAb TSHR1 (determinada mediante técnicas conocidas en la materia) permitió el refinamiento de las secuencias nucleotídicas de HC y LC determinadas usando cebadores de PCR que son degenerados. En particular, se identificó un artefacto de secuenciación de HC para los nucleótidos 115-120. La secuenciación indicaba cagctg (transcrito a los aminoácidos His Val), mientras que la estructura cristalina indicaba más fiablemente los aminoácidos Gln Leu (siendo las bases correspondientes cagctg), mostrándose las secuencias refinadas en las figuras y listas de secuencias acompañantes. El análisis de estructura cristalina permitió también el refinamiento de las secuencias aminoacídicas derivadas de HC y LC, particularmente en la región del cebador de PCR degenerado. En el caso de LC, se encontró que el aa2 era Pro por PCR-TI, pero que era Thr a partir de la estructura cristalina. En el caso de HC, se encontró que el aa2 era Met por PCR-TI, pero que era Val a partir de la estructura cristalina. De nuevo, se muestran estas secuencias refinadas en las figuras y listas de secuencias acompañantes.

Las secuencias anteriores para 9D33 pueden observarse también por referencia a las Figuras 9, 10, 11 y 12, en las que:

la Figura 9 muestra la secuencia nucleotídica de la cadena pesada de 9D33, junto con la región constante adyacente,

5 dando la Figura 9a la secuencia nucleotídica *per se*;

dando la Figura 9b la secuencia nucleotídica anotada con el cebador de PCR, las regiones CDRI, CDRII, CDRIII y constante;

la Figura 10 muestra la secuencia aminoacídica de la cadena pesada de 9D33, junto con la región constante adyacente,

10 dando la Figura 10a la secuencia aminoacídica *per se*;

dando la Figura 10b la secuencia aminoacídica anotada con el cebador de PCR, las regiones CDRI, CDRII, CDRIII y constante;

la Figura 11 muestra la secuencia nucleotídica de la cadena ligera de 9D33,

dando la Figura 11a la secuencia nucleotídica *per se*;

15 dando la Figura 11b la secuencia nucleotídica anotada con el cebador de PCR, las regiones CDRI, CDRII, CDRIII y constante;

la Figura 12 muestra la secuencia aminoacídica de la cadena ligera de 9D33,

dando la Figura 12a la secuencia aminoacídica *per se*;

20 dando la Figura 12b la secuencia aminoacídica anotada con el cebador de PCR, las regiones CDRI, CDRII, CDRIII y constante.

Se apreciará a partir de lo anterior que, para la cadena V_H de 9D33, las secuencias nucleotídicas de las regiones CDRI, CDRII y CDRIII como se muestran en la Figura 9b corresponden a las secuencias V_HCDRI, V_HCDRII y V_HCDRIII mostradas en las SEQ ID NO. 30, 31 y 32 respectivamente, y que las secuencias aminoacídicas de las regiones CDRI, CDRII y CDRIII como se muestran en la Figura 10b corresponden a las secuencias V_HCDRI, V_HCDRII y V_HCDRIII mostradas en las SEQ ID NO. 20, 21 y 22 respectivamente. Se apreciará también a partir de lo anterior que, para la cadena V_L de 9D33, las secuencias nucleotídicas de las regiones CDRI, CDRII y CDRIII como se muestran en la Figura 11b corresponden a las secuencias V_LCDRI, V_LCDRII y V_LCDRIII mostradas en las SEQ ID NO. 35, 36 y 37 respectivamente, y que las secuencias aminoacídicas de las regiones CDRI, CDRII y CDRIII como se muestran en la Figura 12b corresponden a las secuencias V_LCDRI, V_LCDRII y V_LCDRIII mostradas en las SEQ ID NO. 25, 26 y 27 respectivamente.

La presente divulgación proporciona también un proceso de provisión de un anticuerpo monoclonal humano de receptor de TSH sustancialmente como se describe en la presente memoria, comprendiendo dicho proceso:

35 (i) proporcionar una fuente de linfocitos de un sujeto, teniendo dicho sujeto una actividad de anticuerpo de receptor de TSH mayor de aproximadamente 0,04 unidades de NIBSC 90/672 por ml de suero con respecto a la inhibición de la unión de TSH al receptor de TSH;

(ii) aislar linfocitos de dicha fuente de linfocitos (i);

(iii) immortalizar los linfocitos aislados; y

(iv) clonar los linfocitos immortalizados para producir una colonia immortalizada que secreta un anticuerpo monoclonal humano del receptor de TSH sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria.

40 Como alternativa, un proceso de provisión de un anticuerpo monoclonal humano del receptor de TSH sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria puede definirse como un proceso que comprende:

45 (i) proporcionar una fuente de linfocitos de un sujeto, teniendo dicho sujeto una actividad de anticuerpo de receptor de TSH mayor de aproximadamente 0,1 unidades de NIBSC 90/672 por mol de suero con respecto a la actividad estimulante de la producción de AMPc por células que expresan el receptor de TSH;

(ii) aislar linfocitos de dicha fuente de linfocitos (i);

(iii) immortalizar los linfocitos aislados; y

(iv) clonar los linfocitos inmortalizados para producir una colonia inmortalizada que secreta un anticuerpo monoclonal humano del receptor de TSH sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria.

Preferiblemente, un proceso según la presente divulgación comprende aislar linfocitos de sangre periférica, tejido tiroideo, tejido de bazo, nódulos linfáticos o médula ósea, lo más típicamente de sangre periférica. Típicamente, la fuente de linfocitos para uso en un método según la presente invención puede caracterizarse adicionalmente por obtenerse a partir de un sujeto que tiene niveles de anticuerpo de receptor de TSH en suero mayores de aproximadamente 0,1 unidades de NIBSC 90/672 por ml con respecto a la inhibición de la unión de TSH al receptor de TSH, o más típicamente, mayores de aproximadamente 0,2 unidades de NIBSC 90/672 por ml con respecto a la inhibición de la unión de TSH al receptor de TSH, o más típicamente, mayores de aproximadamente 0,3 unidades de NIBSC 90/672 por ml con respecto a la inhibición de la unión de TSH al receptor de TSH, y estando preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0,3 a 0,5 unidades de NIBSC 90/672 por ml o más con respecto a la inhibición de la unión de TSH al receptor de TSH. Como alternativa, o adicionalmente, la fuente de linfocitos para uso en un método según la presente invención típicamente puede caracterizarse adicionalmente por obtenerse a partir de un sujeto que tiene niveles de anticuerpo de receptor de TSH en suero mayores de aproximadamente 0,2 unidades de NIBSC 90/672 por ml con respecto a la actividad estimulante de producción de AMPc por células que expresan el receptor de TSH, o más típicamente mayores de aproximadamente 0,5 unidades de NIBSC 90/672 por ml con respecto a la actividad estimulante de producción de AMPc por células que expresan el receptor de TSH, y estando preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0,5 a 1,0 unidades de NIBSC 90/672 por ml o más con respecto a la actividad estimulante de la producción de AMPc por células que expresan el receptor de TSH. Se apreciará a partir de lo anterior que la respuesta inmunitaria al receptor de TSH de un sujeto del que se aíslan linfocitos debería estar preferiblemente en fase altamente activa.

Preferiblemente, un proceso según la presente divulgación comprende infectar los linfocitos aislados con virus de Epstein Barr y fusionar adecuadamente los linfocitos así inmortalizados con una estirpe celular de ratón/humana. Adecuadamente, un proceso según la presente divulgación comprende adicionalmente cribar en los clones resultantes los anticuerpos de receptor de TSH, por ejemplo, mediante la inhibición de la unión de ¹²⁵I-TSH al receptor de TSH en un sistema de ensayo que tiene una sensibilidad de al menos aproximadamente 1 unidad/l de NIBSC 90/672.

La presente divulgación proporciona adicionalmente un proceso de preparación de un anticuerpo recombinante humano, o de uno o más fragmentos del mismo, del receptor de TSH, comprendiendo dicho proceso la clonación y expresión de un anticuerpo monoclonal humano del receptor de TSH como se proporciona por la presente invención mediante un proceso sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria, o uno o más fragmentos derivados del mismo.

La presente divulgación proporciona adicionalmente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano del receptor de TSH obtenido mediante un proceso sustancialmente como se describe anteriormente. Preferiblemente, dicho anticuerpo monoclonal o recombinante humano obtenido del receptor de TSH según la presente invención puede caracterizarse por una actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH al receptor de TSH de al menos aproximadamente 15 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg o más preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o uno o más fragmentos de dicho anticuerpo monoclonal o recombinante humano.

Más particularmente, puede preferirse que dicho anticuerpo monoclonal o recombinante humano según la presente divulgación pueda caracterizarse adicionalmente por una actividad estimulante con respecto a la producción de AMPc por células que expresan el receptor de TSH de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg o más preferiblemente de al menos aproximadamente 240 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o uno o más fragmentos de dicho anticuerpo monoclonal o recombinante humano.

En una realización preferida de la presente invención, dicho anticuerpo monoclonal o recombinante humano según la presente invención puede caracterizarse por:

(i) una actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH al receptor de TSH de al menos aproximadamente 15 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg o más preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg; y

(ii) una actividad estimulante con respecto a la producción de AMPc por células que expresan el receptor de TSH de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más

preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg o más preferiblemente de al menos aproximadamente 240 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg;

o uno o más fragmentos de dicho anticuerpo monoclonal o recombinante humano.

5 Puede preferirse también que uno o más fragmentos de un anticuerpo monoclonal o recombinante humano así obtenido según la presente invención, en particular por ejemplo uno o más fragmentos Fab del mismo, puedan caracterizarse por una actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH al receptor de TSH de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg o más preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg. Puede preferirse también que
10 dichos uno o más fragmentos puedan caracterizarse por una actividad estimulante con respecto a la producción de AMPc por células que expresan el receptor de TSH de al menos aproximadamente 50 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o más preferiblemente de al menos aproximadamente 100 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg o más preferiblemente de al menos aproximadamente 200 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg.

15 Más preferiblemente, dichos uno o más fragmentos Fab pueden caracterizarse por:

(i) una actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH al receptor de TSH de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg o más preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg; y

20 (ii) una actividad estimulante, con respecto a la producción de AMPc por células que expresan el receptor de TSH, de al menos aproximadamente 50 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o más preferiblemente de al menos aproximadamente 100 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg o más preferiblemente de al menos aproximadamente 200 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg.

25 Un proceso sustancialmente como se describe anteriormente puede comprender adicionalmente una etapa de proceso adicional mediante la cual se somete el anticuerpo monoclonal o recombinante humano obtenido a técnicas de procesamiento adicionales adecuadas (tales como técnicas de mutagénesis adecuadas, tales como mutaciones puntuales o similares) para obtener un copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH que pueda competir con un copartícipe de unión sustancialmente como se describe en la presente memoria (tal como hMAb TSHR1) por la interacción con el receptor de TSH. Dichas técnicas de procesamiento adicionales son bien conocidas por un
30 especialista en la materia. La presente divulgación proporciona adicionalmente un copartícipe de unión adicional al receptor de TSH obtenido mediante dichas técnicas de procesamiento adicionales.

Preferiblemente, dicho copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH puede comprender un anticuerpo monoclonal o recombinante y puede caracterizarse por una actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH al receptor de TSH de al menos aproximadamente 15 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más
35 preferiblemente de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg o más preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o uno o más fragmentos del mismo. Puede preferirse también que dicho copartícipe de unión adicional según la presente divulgación pueda caracterizarse por una actividad estimulante con respecto a la producción de AMPc por
40 células que expresan el receptor de TSH de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg o más preferiblemente de al menos aproximadamente 240 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o uno o más fragmentos del mismo.

45 Puede preferirse aún más también que dicho copartícipe de unión adicional según la presente invención pueda caracterizarse por:

(i) una actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH al receptor de TSH de al menos aproximadamente 15 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente
50 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg o más preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg; y

(ii) una actividad estimulante con respecto a la producción de AMPc por células que expresan el receptor de TSH de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más
55 preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg o más preferiblemente de al menos aproximadamente 240 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg,

o uno o más fragmentos del mismo.

Un copartícipe de unión para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) según la presente divulgación puede tener aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas.

En consecuencia, puede emplearse un copartícipe de unión para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) según la presente divulgación en métodos de cribado para detectar autoanticuerpos del receptor TSH en sueros de paciente y también en métodos de diagnóstico. De este modo, puede emplearse un copartícipe de unión para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) según la presente divulgación en lugar de, o además de, competidores del mismo descritos para uso en métodos de cribado para detectar autoanticuerpos del receptor de TSH y también en métodos de diagnóstico. De forma similar, puede emplearse un copartícipe de unión del receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) según la presente divulgación en lugar de, o además de, competidores del mismo descritos para uso en kits para uso en la detección de autoanticuerpos del receptor de TSH.

La presente invención proporciona por lo tanto también un método de cribado de autoanticuerpos del receptor de TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto sospechoso de padecer, o susceptible de tener o de estar recuperándose de, una enfermedad autoinmunitaria asociada a una reacción inmunitaria a un receptor de TSH, comprendiendo dicho método:

- (a) proporcionar dicha muestra de fluido corporal de dicho sujeto;
- (b) proporcionar uno o más pares de moléculas de unión, en las que una primera molécula de dicho par de unión comprende un copartícipe de unión o un copartícipe de unión adicional del receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) según la presente invención y una segunda molécula de dicho par de unión comprende una región de unión con la que interacciona dicho copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional;
- (c) poner en contacto dicha muestra con dichos uno o más pares de moléculas de unión para permitir a dicha segunda molécula de dicho par de unión interaccionar con (i) autoanticuerpos del receptor de TSH presentes en dicha muestra, o (ii) dicho copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano); y
- (d) monitorizar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión con dichos autoanticuerpos presentes en dicha muestra, proporcionando así una indicación de la presencia de dichos autoanticuerpos del receptor de TSH en dicha muestra.

Un método según la presente divulgación para la detección de autoanticuerpos como se describe anteriormente es particularmente ventajoso en términos del nivel de sensibilidad que puede conseguirse mediante el uso del mismo. Esto puede ilustrarse adicionalmente con referencia a los ejemplos y figuras, en que la Figura 3a muestra una representación gráfica de una comparación entre un ensayo de autoanticuerpos de TSHR basado en hMAb TSHR1-biotina y ensayos anteriores. La sensibilidad del ensayo basado en hMAb TSHR1-biotina es claramente superior según la concentración del estándar internacional NIBSC 90/672 detectable. Esto se confirmó en un estudio de sueros de 72 pacientes con enfermedad de Graves mostrado en la Figura 3b.

Por lo tanto, se proporciona adicionalmente por la presente divulgación un método de cribado de autoanticuerpos de receptor de TSH en una muestra de fluido obtenida de un sujeto sospechoso de padecer, o susceptible de tener o de estar recuperándose de, una enfermedad autoinmunitaria asociada a una reacción inmunitaria al receptor de TSH, comprendiendo dicho método:

- (a) proporcionar dicha muestra de fluido corporal de dicho sujeto;
- (b) proporcionar uno o más pares de moléculas de unión, en las que una primera molécula de dicho par de unión comprende un copartícipe de unión o un copartícipe de unión adicional del receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) según la presente invención y una segunda molécula de dicho par de unión comprende una región de unión con la que interacciona dicho copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional, en el que la interacción de dichas moléculas de unión es tal que es detectable una valoración de autoanticuerpo en dicha muestra esencialmente correspondiente a 0,4 U/l del estándar internacional NIBSC 90/672;
- (c) poner en contacto dicha muestra con dichos uno o más pares de moléculas de unión para permitir a dicha segunda molécula de dicho par de unión interaccionar con (i) autoanticuerpos del receptor de TSH presentes en dicha muestra, o (ii) dicho copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) según la presente invención; y
- (d) monitorizar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión con dichos autoanticuerpos presentes en dicha muestra, proporcionando así una indicación de la presencia de dichos autoanticuerpos del receptor de TSH en dicha muestra.

La sensibilidad anterior puede conseguirse también en un método o kit de ensayo según la presente divulgación mediante el uso de un anticuerpo policlonal humano o no humano del receptor de TSH, TSH o una o más variantes,

análogos, derivados o fragmentos de la misma, o un copartícipe de unión del receptor de TSH que tiene una afinidad por el receptor de TSH de 10^{10} M^{-1} o mayor, que exhibe generalmente una afinidad suficiente por el receptor de TSH para proporcionar un método o kit de sensibilidad definida. La preparación de dichos anticuerpos policlonales, TSH o una o más variantes, análogos, derivados o fragmentos de la misma es bien conocida en la materia. Por ejemplo, se describen análogos superactivos de TSH en Nature, Biotechnology, volumen 14, octubre de 1995, páginas 1257-1263, aunque este artículo no da a conocer el uso de dicha TSH superactiva en un método o kit como se proporciona ahora por la presente divulgación.

Por lo tanto, se proporciona adicionalmente por la presente divulgación un método de cribado de autoanticuerpos del receptor de TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto sospechoso de padecer, o susceptible de tener o de estar recuperándose de, una enfermedad autoinmunitaria asociada a una reacción inmunitaria al receptor de TSH, comprendiendo dicho método:

- (a) proporcionar dicha muestra de fluido corporal de dicho sujeto;
- (b) proporcionar uno o más pares de moléculas de unión, en las que una primera molécula de dicho par de unión comprende un anticuerpo policlonal humano o no humano del receptor de TSH y una segunda molécula de dicho par de unión comprende una región de unión con la que interacciona dicho anticuerpo policlonal, en las que la interacción de dichas moléculas de unión es tal que es detectable una valoración de autoanticuerpo en dicha muestra esencialmente correspondiente a 0,4 U/l del estándar internacional NIBSC 90/672;
- (c) poner en contacto dicha muestra con dichos uno o más pares de moléculas de unión para permitir a dicha segunda molécula de dicho par de unión interactuar con (i) autoanticuerpos del receptor de TSH presentes en dicha muestra, o (ii) dicho anticuerpo policlonal; y
- (d) monitorizar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión con dichos autoanticuerpos presentes en dicha muestra, proporcionando así una indicación de la presencia de dichos autoanticuerpos del receptor de TSH en dicha muestra.

Se proporciona también por la presente divulgación un método de cribado de autoanticuerpos del receptor de TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto sospechoso de padecer, o susceptible de tener o de estar recuperándose de, una enfermedad autoinmunitaria asociada a una reacción inmunitaria del receptor de TSH, comprendiendo dicho método:

- (a) proporcionar dicha muestra de fluido corporal de dicho sujeto;
- (b) proporcionar uno o más pares de moléculas de unión, en las que una primera molécula de dicho par de unión comprende TSH o una o más variantes, análogos, derivados o fragmentos de la misma y una segunda molécula de dicho par de unión comprende una región de unión con la que interacciona dicha TSH o variante, análogo, derivado o fragmento de la misma, en las que la interacción de dichas moléculas de unión es tal que es detectable una valoración de autoanticuerpo en dicha muestra esencialmente correspondiente a 0,4 U/l del estándar internacional NIBSC 90/672;
- (c) poner en contacto dicha muestra con dichos uno o más pares de moléculas de unión para permitir a dicha segunda molécula de dicho par de unión interactuar con (i) autoanticuerpos del receptor de TSH presentes en dicha muestra, o (ii) dicha TSH o una o más variantes, análogos, derivados o fragmentos de la misma; y
- (d) monitorizar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión con dichos autoanticuerpos presentes en dicha muestra, proporcionando así una indicación de la presencia de dichos autoanticuerpos del receptor de TSH en dicha muestra.

Se da a conocer más adicionalmente también un método de cribado de autoanticuerpos del receptor de TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto sospechoso o de padecer, o susceptible de tener o de estar recuperándose de, una enfermedad autoinmunitaria asociada a una reacción inmunitaria al receptor de TSH, comprendiendo dicho método:

- (a) proporcionar dicha muestra de fluido corporal de dicho sujeto;
- (b) proporcionar uno o más pares de moléculas de unión, en las que una primera molécula de dicho par de unión comprende un copartícipe de unión para el receptor de TSH que tiene una afinidad por el receptor de TSH de 10^{10} M^{-1} o mayor y una segunda molécula de dicho par de unión comprende una región de unión con la que interacciona dicho anticuerpo policlonal, en las que la interacción de dichas moléculas de unión es tal que es detectable una valoración de autoanticuerpo en dicha muestra esencialmente correspondiente a 0,4 U/l del estándar internacional NIBSC 90/672;
- (c) poner en contacto dicha muestra con dichos uno o más pares de moléculas de unión para permitir a dicha segunda molécula de dicho par de unión interactuar con (i) autoanticuerpos de receptor de TSH presentes en dicha muestra, o (ii) dicho copartícipe de unión para TSH; y

(d) monitorizar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión con dichos autoanticuerpos presentes en dicha muestra, proporcionando así una indicación de la presencia de dichos autoanticuerpos de receptor de TSH en dicha muestra.

Se proporciona también por la presente divulgación el uso de un copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) según la presente divulgación para detectar autoanticuerpos del receptor de TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto sospechoso de padecer, o susceptible de tener o de estar recuperándose de, una enfermedad autoinmunitaria asociada a una reacción inmunitaria al receptor de TSH, en el que la interacción de dicho copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional con el receptor de TSH es tal que es detectable una valoración de autoanticuerpo en dicha muestra esencialmente correspondiente a 0,4 U/I del estándar internacional NIBSC 90/672.

Se da a conocer también el uso de un anticuerpo policlonal humano o no humano del receptor de TSH para detectar autoanticuerpos del receptor de TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto sospechoso de padecer, o susceptible de tener o de estar recuperándose de, una enfermedad autoinmunitaria asociada a una reacción inmunitaria al receptor de TSH, en el que la interacción de dicho anticuerpo policlonal con el receptor de TSH es tal que es detectable una valoración de autoanticuerpo en dicha muestra esencialmente correspondiente a 0,4 U/I del estándar internacional NIBSC 90/672.

Se da a conocer también el uso de TSH o una o más variantes, análogos, derivados o fragmentos de la misma para detectar autoanticuerpos del receptor de TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto sospechoso de padecer, o susceptible de tener o de estar recuperándose de, una enfermedad autoinmunitaria asociada a una reacción inmunitaria al receptor de TSH, en el que la interacción de dicha TSH o una o más variantes, análogos, derivados o fragmentos de la misma con el receptor de TSH es tal que es detectable una valoración de autoanticuerpos en dicha muestra esencialmente correspondiente a 0,4 U/I del estándar internacional NIBSC 90/672.

Se da a conocer aún más adicionalmente el uso de un copartícipe de unión del receptor de TSH que tiene una afinidad por el receptor de TSH de 10^{10} M^{-1} o mayor para detectar autoanticuerpos del receptor de TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto sospechoso de padecer, o susceptible de tener o de estar recuperándose de, una enfermedad autoinmunitaria asociada a una reacción inmunitaria al receptor de TSH, en el que la interacción de dicho copartícipe de unión con el receptor de TSH es tal que es detectable una valoración de autoanticuerpo en dicha muestra esencialmente correspondiente a 0,4 U/I del estándar internacional NIBSC 90/672.

Se apreciará que las moléculas de unión del uno o más pares de unión pueden ser antígeno-anticuerpo (por ejemplo, [receptor o epítipo de TSH]-[anticuerpo monoclonal o recombinante de receptor de TSH]), anticuerpo antiidiotípico-anticuerpo monoclonal o recombinante de receptor de TSH o miembro de unión al anticuerpo de receptor de TSH-anticuerpo monoclonal o recombinante de receptor de TSH novedoso. Preferiblemente, las moléculas de unión de los pares de unión son de antígeno-anticuerpo, a saber, [receptor de TSH o uno o más epítipos del mismo]-[anticuerpo monoclonal recombinante de receptor de TSH], en que los epítipos pueden ser "independientes" o estar presentes en un polipéptido estructural mayor o similar.

Preferiblemente, la presente divulgación proporciona un método de cribado de autoanticuerpos del receptor de TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto sospechoso de padecer de, o susceptible de tener o de estar recuperándose de, una enfermedad autoinmunitaria asociada a una reacción inmunitaria a un receptor de TSH, comprendiendo dicho método:

(a) proporcionar dicha muestra de fluido corporal de dicho sujeto;

(b) poner en contacto dicha muestra con (i) un receptor de TSH completo, o uno o más epítipos del mismo o un polipéptido que comprende uno o más epítipos de un receptor de TSH, y (ii) un copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional del receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) según la presente invención, en condiciones que permitan la interacción del receptor de TSH con autoanticuerpos producidos en respuesta al receptor de TSH, para permitir a dicho receptor de TSH, o dichos uno o más epítipos del mismo o dicho polipéptido, interaccionar con autoanticuerpos del receptor de TSH presentes en dicha muestra o dicho copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH (típicamente, un anticuerpo monoclonal o recombinante humano); y

(c) monitorizar la interacción de dicho receptor de TSH, o dichos uno o más epítipos del mismo o dicho polipéptido, con dichos autoanticuerpos presentes en dicha muestra, proporcionando así una indicación de la presencia de dichos autoanticuerpos del receptor de TSH en dicha muestra.

En ciertas realizaciones, un método según la presente divulgación puede emplear también uno o más competidores que compiten en la interacción de un anticuerpo policlonal, TSH o una o más variantes, análogos, derivados o fragmentos de la misma, o un copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional del receptor de TSH sustancialmente como se describe anteriormente en las realizaciones específicas de los métodos proporcionadas por la presente divulgación y la segunda molécula del par de unión, o receptor de TSH, o uno o más epítipos de la misma o el polipéptido. Dichos competidores pueden comprender TSH o uno o más anticuerpos monoclonales reactivos con el receptor de TSH, tales como anticuerpos monoclonales de ratón reactivos con el receptor de TSH.

Preferiblemente, un método según la presente divulgación como se designa anteriormente comprende adicionalmente un medio de marcaje para un copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) según la presente divulgación y en que el medio de marcaje adecuado de los uno o más competidores apropiados como se describen anteriormente incluyen

5 marcajes enzimáticos, marcajes isotópicos, marcajes quimioluminiscentes, marcajes fluorescentes, tintes y similares.

La presente divulgación proporciona también un kit para cribar autoanticuerpos del receptor de TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto sospechoso de padecer, o susceptible de tener o de estar recuperándose de, una enfermedad autoinmunitaria asociada a una reacción inmunitaria a un receptor de TSH, comprendiendo dicho kit:

10 (a) uno o más pares de moléculas de unión, en el que una primera molécula de dicho par de unión comprende un copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) según la presente invención y una segunda molécula de dicho par de unión comprende una región de unión con la que interacciona dicho copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional;

(b) un medio para poner en contacto dicha muestra de fluido corporal de dicho sujeto con dichos uno o más pares de moléculas de unión para permitir a dicha segunda molécula de dicho par de unión interaccionar con (i) autoanticuerpos del receptor de TSH presentes en dicha muestra, o (ii) dicho copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional de receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano); y

(c) un medio para monitorizar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión con dichos autoanticuerpos presentes en dicha muestra, proporcionando así una indicación de la presencia de dichos autoanticuerpos del receptor de TSH en dicha muestra.

La presente invención proporciona también un kit para cribar autoanticuerpos del receptor de TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto sospechoso de padecer, o susceptible de tener o de estar recuperándose de, una enfermedad autoinmunitaria asociada a una reacción inmunitaria a un receptor de TSH, comprendiendo dicho kit:

25 (a) uno o más pares de moléculas de unión, en el que una primera molécula de dicho par de unión comprende un copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) según la presente invención y una segunda molécula de dicho par de unión comprende una región de unión con la que interacciona dicho copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional, en el que la interacción de dichas moléculas de unión es tal que es detectable una valoración de autoanticuerpo en dicha muestra esencialmente correspondiente a 0,4 U/l del estándar internacional NIBSC 90/672;

(b) un medio para poner en contacto dicha muestra de fluido corporal de dicho sujeto con dichos uno o más pares de moléculas de unión para permitir a dicha segunda molécula de dicho par de unión interaccionar con (i) autoanticuerpos de receptor de TSH presentes en dicha muestra, o (ii) dicho copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional de receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) según la presente invención; y

(c) un medio para monitorizar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión con dichos autoanticuerpos presentes en dicha muestra, proporcionando así una indicación de la presencia de dichos autoanticuerpos del receptor de TSH en dicha muestra.

Se da a conocer también un kit para el cribado de autoanticuerpos del receptor de TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto sospechoso de padecer, o susceptible de tener o de estar recuperándose de, una enfermedad autoinmunitaria asociada a una reacción inmunitaria al receptor de TSH, comprendiendo dicho kit:

(a) uno o más pares de moléculas de unión, en el que una primera molécula de dicho par de unión comprende un anticuerpo policlonal humano o no humano del receptor de TSH y una segunda molécula de dicho par de unión comprende una región de unión con la que interacciona dicho anticuerpo policlonal, en el que la interacción de dichas moléculas de unión es tal que es detectable una valoración de autoanticuerpo en dicha muestra esencialmente correspondiente a 0,4 U/l del estándar internacional NIBSC 90/672;

(b) un medio para poner en contacto dicha muestra de fluido corporal de dicho sujeto con dichos uno o más pares de moléculas de unión para permitir a dicha segunda molécula de dicho par de unión interaccionar con (i) autoanticuerpos del receptor de TSH presentes en dicha muestra, o (ii) dicho anticuerpo policlonal; y

(c) un medio para monitorizar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión con dichos autoanticuerpos presentes en dicha muestra, proporcionando así una indicación de la presencia de dichos autoanticuerpos del receptor TSH en dicha muestra.

Se da a conocer también un kit para el cribado de autoanticuerpos del receptor de TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto sospechoso de padecer, o susceptible de tener o de estar recuperándose de, una enfermedad autoinmunitaria asociada a una reacción inmunitaria el receptor de TSH, comprendiendo dicho kit:

- (a) uno o más pares de moléculas de unión, en el que una primera molécula de dicho par de unión comprende TSH o una o más variantes, análogos, derivados o fragmentos de la misma, y una segunda molécula de dicho par de unión comprende una región de unión con la que interacciona dicha TSH o una o más variantes, análogos, derivados o fragmentos de la misma, en el que la interacción de dichas moléculas de unión es tal que es detectable una valoración de autoanticuerpo en dicha muestra esencialmente correspondiente a 0,4 U/I del estándar internacional NIBSC 90/672;
- (b) un medio para poner en contacto dicha muestra de fluido corporal de dicho sujeto con dichos uno o más pares de moléculas de unión para permitir a dicha segunda molécula de dicho par de unión interaccionar con (i) autoanticuerpos del receptor de TSH presentes en dicha muestra, o (ii) TSH o una o más variantes, análogos, derivados o fragmentos de la misma; y
- (c) un medio para monitorizar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión con dichos autoanticuerpos presentes en dicha muestra, proporcionando así una indicación de la presencia de dichos autoanticuerpos del receptor de TSH en dicha muestra.
- Se da a conocer también un kit para el cribado de autoanticuerpos del receptor de TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto sospechoso de padecer, o susceptible de tener o de estar recuperándose de, una enfermedad autoinmunitaria asociada a una reacción inmunitaria al receptor de TSH, comprendiendo dicho kit:
- (a) uno o más pares de moléculas de unión, en el que una primera molécula de dicho par de unión comprende un copartícipe de unión para el receptor de TSH que tiene una afinidad por el receptor de TSH de 10^{10} M^{-1} o mayor y una segunda molécula de dicho par de unión que comprende una región de unión con la que interacciona dicho copartícipe de unión, en el que la interacción de dichas moléculas de unión es tal que es detectable una valoración de autoanticuerpo en dicha muestra esencialmente correspondiente a 0,4 U/I del estándar internacional NIBSC 90/672;
- (b) un medio para poner en contacto dicha muestra de fluido corporal de dicho sujeto con dichos uno o más pares de moléculas de unión para permitir a dicha segunda molécula de dicho par de unión interaccionar con (i) autoanticuerpos del receptor de TSH presentes en dicha muestra, o (ii) dicho copartícipe de unión del receptor de TSH; y
- (c) un medio para monitorizar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión con dichos autoanticuerpos presentes en dicha muestra, proporcionando así una indicación de la presencia de dichos autoanticuerpos del receptor de TSH en dicha muestra.
- Se apreciará que las moléculas de unión del uno o más pares de unión pueden ser antígeno-anticuerpo (por ejemplo, [receptor o epítipo de TSH]-[anticuerpo de receptor de TSH monoclonal o recombinante]), anticuerpo antiidiotípico-anticuerpo monoclonal o recombinante de receptor de TSH o elemento de unión al anticuerpo de receptor de TSH-anticuerpo monoclonal o recombinante de receptor de TSH novedoso. Preferiblemente, las moléculas de unión de los pares de unión son de antígeno-anticuerpo, a saber, [receptor de TSH o uno o más epítipos del mismo]-[anticuerpo monoclonal o recombinante de receptor de TSH], en que los epítipos pueden ser "independientes" o estar presentes en un polipéptido estructural mayor o similar.
- La presente invención da a conocer preferiblemente un kit para el cribado de autoanticuerpos del receptor de TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto sospechoso de, o susceptible de tener o de estar recuperándose de, una enfermedad autoinmunitaria asociada a una reacción inmunitaria al receptor de TSH, comprendiendo dicho kit:
- (a) un receptor de TSH completo o uno o más epítipos del mismo o un polipéptido que comprende uno o más epítipos del receptor de TSH;
- (b) un copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) según la presente invención;
- (c) un medio para poner en contacto dicha muestra de fluido corporal de dicho sujeto, dicho receptor de TSH, o dichos uno o más epítipos del mismo o dicho polipéptido, y dicho copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano), en condiciones que permitan la interacción del receptor de TSH con autoanticuerpos producidos en respuesta al receptor de TSH para permitir a dicho receptor de TSH, o dichos uno o más epítipos de mismo o dicho polipéptido, interaccionar con autoanticuerpos de un receptor de TSH presentes en dicha muestra o dicho copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano); y
- (d) un medio para monitorizar la interacción de dicho receptor de TSH, o dichos uno o más epítipos del mismo o dicho polipéptido, con dichos autoanticuerpos presentes en dicha muestra, proporcionando así una indicación de la presencia de dichos autoanticuerpos del receptor de TSH en dicha muestra.
- En ciertas realizaciones, un kit según la presente divulgación puede comprender adicionalmente uno o más

competidores que compiten en la interacción de un anticuerpo policlonal, TSH o una o más variantes, análogos, derivados o fragmentos de la misma, o un copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional del receptor de TSH, como se definen respectivamente anteriormente, y la segunda molécula del par de unión, o el receptor de TSH, o el uno o más epítomos del mismo o el polipéptido. Dichos competidores pueden comprender TSH o uno o más anticuerpos monoclonales reactivos con el receptor de TSH, tales como anticuerpos monoclonales de ratón reactivos con el receptor de TSH.

Un kit como se designa anteriormente comprende adicionalmente de forma adecuada un medio de marcaje para un copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) según la presente divulgación y, cuando sea apropiado, uno o más competidores como se describen anteriormente, siendo el medio de marcaje adecuado sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria.

En presencia de autoanticuerpos del receptor de TSH, se reducirá la unión del receptor de TSH a un copartícipe de unión del receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) en un método o kit como se describe anteriormente.

Un copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional del receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) según la presente invención puede emplearse también en métodos y kits de ensayo sustancialmente como se describe anteriormente para TSH y ligandos relacionados.

Por lo tanto, la presente divulgación proporciona también un método de ensayo de TSH y ligandos relacionados, comprendiendo dicho método:

- (a) proporcionar una muestra sospechosa de contener o que contiene TSH o ligandos relacionados;
- (b) proporcionar uno o más pares de moléculas de unión, en el que una primera molécula de dicho par de unión comprende un copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) según la presente invención y una segunda molécula de dicho par de unión comprende una región de unión con que interacciona dicho copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional;
- (c) poner en contacto dicha muestra con dichos uno o más pares de moléculas de unión para permitir a dicha segunda molécula de dicho par de unión interaccionar con (i) TSH o ligandos relacionados presentes en dicha muestra o (ii) dicho copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional del receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano); y
- (d) monitorizar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión con TSH o ligandos relacionados presentes en dicha muestra, proporcionando así una indicación de la presencia de TSH o ligandos relacionados en dicha muestra.

La presente divulgación proporciona también un kit para ensayar TSH o ligandos relacionados, comprendiendo dicho kit:

- (a) uno o más pares de moléculas de unión, en el que una primera molécula de dicho par de unión comprende un copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) según la presente invención y una segunda molécula de dicho par de unión comprende una región de unión con la que interacciona dicho copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional;
- (b) un medio para poner en contacto una muestra sospechosa de contener o que contiene TSH o ligandos relacionados con dichos uno o más pares de moléculas de unión para permitir a dicha segunda molécula de dicho par de unión interaccionar con (i) TSH o ligandos relacionados presentes en dicha muestra, o (ii) dicho copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano); y
- (c) un medio para monitorizar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión con TSH o ligandos relacionados presentes en dicha muestra, proporcionando así una indicación de la presencia de TSH o ligandos relacionados en dicha muestra.

La presente divulgación proporciona adicionalmente también un método de identificación de un copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH, siendo dicho copartícipe de unión adicional capaz de unirse al receptor de TSH y que compite por la unión al receptor de TSH con un copartícipe de unión del receptor de TSH sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria, no comprendiendo dicho copartícipe de unión adicional TSH y comprendiendo dicho método:

- (a) proporcionar uno o más pares de moléculas de unión, en el que una primera molécula de dicho par de unión comprende un copartícipe de unión de receptor de TSH sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria y una segunda molécula de dicho par de unión comprende una región de unión con la que

interacciona dicho copartícipe de unión;

(b) proporcionar una molécula de unión adicional para ensayar como copartícipe de unión adicional potencial para el receptor de TSH, que compite por la unión al receptor de TSH con dicha primera molécula de dicho par de unión de (a);

5 (c) poner en contacto dicha molécula de unión adicional de (b) con dichos uno o más pares de moléculas de unión de (a) para permitir a dicha segunda molécula de dicho par de unión de (a) interaccionar con (i) dicha molécula de unión adicional de (b) o (ii) dicha primera molécula de dicho par de unión de (a); y

10 (d) monitorizar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión de (a) con dicha molécula de unión adicional de (b), y evaluar así si dicha molécula de unión adicional de (b) compite por la unión al receptor de TSH con dicha primera molécula de dicho par de unión de (a).

15 La presente divulgación proporciona también un kit para identificar un copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH, siendo capaz dicho copartícipe de unión adicional de unirse al receptor de TSH y que compite por la unión al receptor de TSH con un copartícipe de unión del receptor de TSH sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria, no comprendiendo dicho copartícipe de unión adicional TSH, comprendiendo dicho kit:

(a) uno o más pares de moléculas de unión, en el que una primera molécula de dicho par de unión comprende un copartícipe de unión para el receptor de TSH sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria y una segunda molécula de dicho par de unión comprende una región de unión con la que interacciona dicho copartícipe de unión;

20 (b) un medio para poner en contacto dichos uno o más pares de moléculas de unión de (a) con una molécula de unión adicional para ensayar como copartícipe de unión adicional potencial para el receptor de TSH, que compite por la unión al receptor de TSH con dicha primera molécula de dicho par de unión de (a), para permitir a dicha segunda molécula de dicho par de unión de (a) interaccionar con (i) dicha molécula de unión adicional o (ii) dicha primera molécula de dicho par de unión de (a); y

25 (c) un medio para monitorizar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión de (a) con dicha molécula de unión adicional, y evaluar así si dicha molécula de unión adicional compite por la unión al receptor de TSH con dicha primera molécula de dicho par de unión de (a).

30 Una aplicación adicional de un copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) según la presente divulgación es su uso para identificar y proporcionar nuevos tipos de sitios de unión de anticuerpo de receptor de TSH. Por lo tanto, se proporciona adicionalmente por la presente divulgación un proceso de identificación de una o más regiones epitópicas del receptor de TSH, comprendiendo dicho proceso poner en contacto un copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria con un receptor de TSH completo, o uno o más fragmentos del mismo, para permitir la interacción de dicho copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH con dicho receptor de TSH completo, o dichos uno o más fragmentos del mismo, e identificar los aminoácidos de dicho receptor de TSH completo, o dichos uno o más fragmentos del mismo, con que interacciona dicho copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional. Se analiza adecuadamente la interacción de el copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional con fragmentos seleccionados del receptor de TSH y el receptor de TSH completo, para identificar los aminoácidos del receptor de TSH con que interacciona el copartícipe de unión.

45 Además, la presente divulgación permite la generación de anticuerpos de las regiones de un anticuerpo monoclonal de receptor de TSH según la presente divulgación que se unen con el receptor de TSH. Dichos anticuerpos antiidiotípicos producidos de este modo podrían tener potencial como nuevos ligandos para ensayos de autoanticuerpos de receptor de TSH, TSH y compuestos relacionados. También pueden ser agentes eficaces *in vivo* para la regulación de la acción de los autoanticuerpos de receptor de TSH, TSH y compuestos relacionados. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona adicionalmente uno o más anticuerpos antiidiotípicos generados para unirse a regiones de unión de un copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria, y la preparación de los mismos se describe adicionalmente por los ejemplos.

50 Son bien conocidos otros métodos de identificación y provisión de nuevos tipos de sitios de unión de anticuerpo usando anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, mediante cribado de anticuerpos de colecciones peptídicas aleatorias exhibidas in fago como se describe por JC Scott y GP Smith; "Searching for peptide ligands with an epitope library"; *Science* 1990; 249(4967): 386-390 y MA Myers, JM Davies, JC Tong, J Whisstock, M Scealy, IR MacKay, MJ Rowley; "Conformational epitopes on the diabetes autoantigen GAD₆₅ identified by peptide phage display and molecular modelling"; *Journal of Immunology* 2000; 165: 3830-3838. Puede llevarse a cabo también el cribado de compuestos no peptídicos y colecciones de compuestos no peptídicos.

Los nuevos tipos de sitios de unión de anticuerpo de receptor de TSH identificados y proporcionados usando estos procedimientos pueden ser también útiles como nuevos ligandos en ensayos de autoanticuerpos de receptor de TSH, TSH y compuestos relacionados. Además, pueden ser agentes eficaces *in vivo* para regular la acción de los autoanticuerpos de receptor de TSH, TSH y compuestos relacionados.

- 5 Un copartícipe de unión del receptor de TSH o copartícipe de unión adicional (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) según la presente divulgación sustancialmente como se describe anteriormente en la presente divulgación puede emplearse también útilmente en terapia. Por lo tanto, se proporcionan adicionalmente por la presente divulgación métodos de tratamiento que comprenden la administración de un copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional del receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano)
- 10 sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria, composiciones farmacéuticas que comprenden un copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional del receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria (junto con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables para ellos), y el uso de un copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria en la fabricación de un medicamento o composición.
- 15

- Un copartícipe de unión del receptor de TSH, en particular un anticuerpo monoclonal humano del receptor de TSH derivado de linfocitos de pacientes según la presente divulgación, es un reactivo valioso para comprender la patogénesis de la enfermedad de Graves y para desarrollar nuevos métodos de medida de autoanticuerpos de receptor de TSH, por ejemplo, como sustitutos de TSH en ensayos de unión competitiva sustancialmente como se describen anteriormente en la presente memoria. También un copartícipe de unión estimulante según la presente invención tiene aplicaciones *in vivo* cuando el tejido que contiene el receptor de TSH (por ejemplo, tejido tiroideo o tejido de cáncer de tiroides) requiere estimulación. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona un medicamento o composición para uso en la estimulación del tejido tiroideo y/o tejido que contiene el receptor de TSH. En particular, un copartícipe de unión estimulante para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) según la presente invención puede emplearse en oncología, y en particular para uso en el diagnóstico, gestión y tratamiento del cáncer de tiroides.
- 20
- 25

- Como alternativa, un copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional del receptor de TSH según la presente divulgación puede ser un potente antagonista de TSH o autoanticuerpo (anticuerpo bloqueante) y dicho anticuerpo de receptor de TSH bloqueante según la presente invención es valioso para aplicaciones *in vivo* cuando la actividad del tejido que contiene el receptor de TSH (por ejemplo, tejido tiroideo o tejido de cáncer de tiroides) requiere inactivación o volverse insensible a TSH, autoanticuerpos de receptor de TSH u otros estimulantes.
- 30

- Se dan a conocer también en combinación un copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria, junto con uno o más agentes adicionales capaces de inactivar o volver insensible a tejido que contiene un receptor de TSH, autoanticuerpos de receptor de TSH u otros estimulantes. Típicamente, el uno o más agentes adicionales actúan independientemente del receptor de TSH.
- 35

- Una aplicación terapéutica particular en que la unión del autoanticuerpo de receptor de TSH requiere inactivación o inhibición es en el tratamiento de enfermedad de los tejidos retroorbitales del ojo asociada a autoinmunidad al receptor de TSH, y el uso de un anticuerpo bloqueante que interacciona con el receptor de TSH, tal como 9D33, para inhibir la unión de autoanticuerpo de receptor de TSH tiene por tanto una utilidad terapéutica importante en el tratamiento de dicha enfermedad. El tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria que requiere la inhibición de la unión de autoanticuerpo de TSH, tal como la enfermedad debatida anteriormente de tejidos retroorbitales del ojo asociada a autoinmunidad al receptor de TSH, puede emplear como alternativa un anticuerpo antiidiotípico de un copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional como se proporciona por la presente invención, y dichos anticuerpos antiidiotípicos forman un aspecto adicional de la presente divulgación como se describe en la presente memoria y se proporcionan detalles preparatorios adicionales de los mismos en los ejemplos.
- 40
- 45

- Por lo tanto, más específicamente, la presente divulgación proporciona el uso en el tratamiento de enfermedad de los tejidos retroorbitales del ojo asociada a autoinmunidad al receptor de TSH de un copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH, inhibiendo dicho copartícipe de unión adicional sustancialmente la unión al receptor de TSH de un copartícipe de unión para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria. La presente divulgación proporciona adicionalmente el uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de los tejidos retroorbitales del ojo asociada a la activación y/o estimulación del receptor de TSH de un copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH, inhibiendo dicho copartícipe de unión adicional sustancialmente la unión al receptor de TSH de un copartícipe de unión para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria. Se proporciona también un método de tratamiento de enfermedad de los tejidos retroorbitales del ojo asociada a autoinmunidad al receptor de TSH, comprendiendo dicho método la administración a un paciente que padece o es susceptible de dicha enfermedad de una cantidad terapéuticamente eficaz de un copartícipe de unión adicional del receptor de TSH, inhibiendo dicho copartícipe de unión adicional sustancialmente la unión al receptor de TSH de un copartícipe
- 50
- 55
- 60

de unión para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria. Un copartícipe de unión adicional para uso en estas realizaciones de la presente divulgación comprende preferiblemente un anticuerpo bloqueante que puede inhibir sustancialmente la unión de un copartícipe de unión como se proporciona por la presente invención, y como tal la unión de anticuerpo de receptor de TSH al receptor de TSH, y uno de dichos anticuerpos preferidos puede comprender 9D33 como se describe en la presente memoria.

La presente divulgación proporciona también el uso de un anticuerpo antiidiotípico generado en una región de unión de un copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional según la presente invención en el tratamiento de la enfermedad de los tejidos retroorbitales del ojo asociada a autoinmunidad al receptor de TSH. La presente divulgación proporciona adicionalmente el uso de un anticuerpo antiidiotípico generado en una región de unión de un copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional según la presente divulgación en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedad de los tejidos retroorbitales del ojo asociada a la activación y/o estimulación del receptor de TSH. Se proporciona también un método de tratamiento de enfermedad de los tejidos retroorbitales del ojo asociada a autoinmunidad al receptor de TSH, comprendiendo dicho método la administración a un paciente que padece o es susceptible de dicha enfermedad de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo antiidiotípico generado en una región de unión de un copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional según la presente invención.

Una de las ventajas principales de un anticuerpo monoclonal como se proporciona por la presente divulgación frente a la TSH en dichas aplicaciones *in vitro* y/o *in vivo* es la facilidad relativa con que dichos anticuerpos pueden manipularse. Por ejemplo, la manipulación de la región de unión del receptor de TSH de un anticuerpo monoclonal según la presente divulgación para cambiar las características del mismo, tales como afinidad y características biológicas, incluyendo el grado de actividades agonista o antagonista de TSH. También los anticuerpos monoclonales según la presente invención tienen una semivida mucho más larga que la TSH *in vivo*, y esto puede tener considerables ventajas en aplicaciones *in vivo*. Además, la semivida de los anticuerpos puede manipularse, por ejemplo, los fragmentos Fab de anticuerpo tienen una semivida mucho más corta que la IgG intacta.

Las composiciones farmacéuticas según la presente divulgación incluyen aquellas adecuadas para administración oral, parenteral y tópica, aunque la vía más adecuada dependerá generalmente de la afección del paciente y de la enfermedad específica que se esté tratando. La cantidad precisa de un copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria a administrar a un paciente será responsabilidad del médico a cargo, aunque la dosis empleada dependerá de una serie de factores, incluyendo la edad y sexo del paciente, la enfermedad específica que se esté tratando y la vía de administración, sustancialmente como se describe anteriormente.

Se proporciona adicionalmente por la presente divulgación un método de estimulación de tejido tiroideo y/o tejido que contiene un receptor de TSH, comprendiendo dicho método administrar a un paciente necesitado de dicha estimulación una cantidad eficaz en diagnóstico o terapia de un copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria.

La presente divulgación proporciona también en combinación un copartícipe de unión para el receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) sustancialmente como se describe anteriormente en la presente memoria, junto con uno o más agentes adicionales capaces de estimular el tejido tiroideo y/o tejido que contiene un receptor de TSH, para uso simultáneo, separado o secuencial en la estimulación de tejido tiroideo y/o tejido que contiene un receptor de TSH. Preferiblemente, el uno o más agentes adicionales comprenden TSH humana recombinante y/o una o más variantes, análogos, derivados o fragmentos de la misma, o variantes, análogos o derivados de dichos fragmentos. Como alternativa, el uno o más agentes adicionales pueden actuar independientemente de la unión al receptor de TSH.

Un copartícipe de unión para el receptor de TSH o copartícipe de unión adicional (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) según la presente divulgación puede emplearse también como fuente de reemplazo para suero de paciente que se requiere que contenga anticuerpo o anticuerpos de receptor de TSH para uso en kits comerciales. Además, un copartícipe de unión o copartícipe de unión adicional del receptor de TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) puede proporcionarse según la presente divulgación en una preparación que se requiera que comprenda una concentración definida de anticuerpo o anticuerpos de receptor de TSH, y de este modo puede proporcionarse una preparación con una actividad definida, tal como actividad estimulante, con respecto al receptor de TSH. Opcionalmente, dicha preparación puede comprender uno o más anticuerpos monoclonales humanos adicionales tales como anticuerpos monoclonales de GAD, TPO o similares.

Las siguientes explicaciones ilustrativas se proporcionan para facilitar la comprensión de ciertos términos usados en la presente memoria. Las explicaciones se proporcionan por conveniencia y no son limitantes de la invención.

COPARTÍCIPE DE UNIÓN DE UN RECEPTOR DE TSH describe una molécula que tiene especificidad de unión por

el receptor de TSH. Un copartícipe de unión como se describe en la presente memoria puede ser un derivado natural o producirse sintéticamente total o parcialmente. Dicho copartícipe de unión tiene un dominio o región que se une específicamente con, y por lo tanto es complementario de, una o más regiones epitópicas del receptor de TSH. En particular, un copartícipe de unión como se describe en la presente memoria puede ser un anticuerpo monoclonal o recombinante del receptor de TSH, y más particularmente puede ser un anticuerpo monoclonal o recombinante humano del receptor de TSH.

DOMINIO C denota una región de secuencia aminoacídica relativamente constante en moléculas de anticuerpo.

CDR denota regiones determinantes de la complementariedad que están presentes tanto en la cadena pesada como ligera de moléculas de anticuerpo y representan regiones de gran variabilidad de secuencia. Las CDR representan aproximadamente un 15 a 20% de los dominios variables y representan los sitios de unión de antígeno de un anticuerpo.

FR denota regiones estructurales y representan el resto de los dominios ligeros variables y dominios pesados variables no presentes en las CDR.

HC denota parte de una cadena pesada de una molécula de anticuerpo que comprende el dominio variable de cadena pesada y el primer dominio de una región constante de IgG.

CÉLULA HOSPEDADORA es una célula que se ha transformado o transfectado o que es capaz de transformación o transfección por una secuencia polinucleotídica exógena.

IDENTIDAD, como es conocido en la materia, es la relación entre dos o más secuencias polipeptídicas, o dos o más secuencias polinucleotídicas, como se determina comparando las secuencias.

LC denota una cadena ligera de una molécula de anticuerpo.

NIBSC 90/672 es un estándar internacional para anticuerpo estimulante del tiroides. El estándar internacional para actividad estimulante del tiroides consiste en un lote de ampollas que contienen proteínas plasmáticas liofilizadas de un único paciente humano con altos niveles de autoanticuerpos de receptor de TSH. La preparación se ha evaluado en un estudio colaborativo internacional y se ha mostrado que posee tanto actividad estimulante del tiroides como de unión al receptor de tiroides. En la 46ª reunión de 1995, el Comité de expertos sobre estandarización biológica de la OMS estableció la preparación codificada como 90/672 como el estándar internacional para anticuerpo estimulante del tiroides. Cada ampolla contiene el residuo liofilizado de 1,0 ml de una disolución que contiene tampón fosfato 0,02 M, proteínas plasmáticas humanas dializadas y 0,1 unidades internacionales (100 miliunidades internacionales) por ampolla por definición.

ESTIMULACIÓN DE UN RECEPTOR DE TSH por un anticuerpo monoclonal humano como se describe en la presente memoria denota la capacidad del mismo para unirse a un receptor de TSH y modificar así, por ejemplo, la producción de AMP cíclico como resultado de dicha unión al receptor de TSH. Dicha estimulación es análoga a las respuestas observadas en la unión de TSH, o autoanticuerpos de receptor de TSH, al receptor de TSH, y de este modo un anticuerpo monoclonal humano como se describe en la presente memoria proporciona esencialmente las mismas o similares respuestas de unión que las observadas con la unión de TSH o autoanticuerpo de receptor de TSH a un receptor de TSH.

DOMINIO V denota una región de secuencia aminoacídica altamente variable en moléculas de anticuerpo.

DOMINIO V_H denota regiones o dominios variables en cadenas pesadas de moléculas de anticuerpo.

DOMINIO V_L denota regiones o dominios variables en cadenas ligeras de moléculas de anticuerpo.

La presente invención se ilustrará ahora mediante las siguientes figuras y ejemplos, que no limitan el alcance de la invención en modo alguno.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

Aislamiento de linfocitos y clonación de autoanticuerpos monoclonales humanos de receptor de TSH

Se obtuvo sangre de un paciente con enfermedad de Graves y diabetes sacarina de tipo I que tenía altos niveles de autoanticuerpos séricos de receptor de TSH (TRAb). Se obtuvo la aprobación del Comité de ética para los estudios. Se aislaron linfocitos de sangre periférica en Ficoll-Paque (Amersham Biosciences; Chalfont St Giles, HP8 4SP, RU) a partir de una muestra de sangre de 20 ml y se infectaron entonces con virus de Epstein Barr (EBV) (European Collection of Cell Cultures--ECACC; Porton Down, SP4 OJG, RU) y se cultivaron en capas de alimentación de macrófagos de ratón como se describe anteriormente (N Hayakawa, LDKE Premawardhana, M Powell, M Masuda, C Arnold, J Sanders, M Evans, S Chen, J C Jaume, S Baekkeskov, B Rees Smith, J Furnaniak; "Isolation and characterization of human monoclonal autoantibodies to glutamic acid decarboxylase"; *Autoimmunity* 2002; 35: 343-

355). Se fusionaron entonces linfocitos B inmortalizados con EBV con la estirpe celular híbrida de ratón/humano K6H6/B5 (WL Carroll, K Thilemans, J Dille, R Levy; "Mouse×human heterohybridomas as fusion partners with human B cell tumors"; Journal of Immunological Methods 1986; 89: 61-72) y se clonaron dos veces mediante dilución limitante a 5 células/pocillo y en el momento final a ½ célula/pocillo, obteniéndose una sola colonia (BJ Bolton, NK Spurr. "B-lymphocytes" en: RI Freshney, MG Freshney (eds). "Culture of immortalized cells". Wiley-Liss, Nueva York 1996; 283-297). Se cribaron en los pocillos originales y clones posteriores los autoanticuerpos de receptor de TSH mediante la inhibición de la unión de ¹²⁵I-TSH a receptor de TSH solubilizado (véase a continuación). Los clones individuales productores de autoanticuerpos de receptor de TSH se cultivaron en matraces de cultivo de tejido.

Producción, purificación y marcaje de preparaciones de anticuerpo monoclonal de receptor de TSH

Se produjeron MAb de receptor de TSH como se describe anteriormente (Y Oda, J Sanders, M Evans, A Kiddie, A Munkley, C James, T Richards, J Wills, J Furmaniak, B Rees Smith; "Epitope analysis of the human thyrotropin (TSH) receptor using monoclonal antibodies"; Thyroid 2000; 10: 1051-1059) y se prepararon también a partir de ratones inmunizados con ADNc de TSHR completo clonado en pcDNA3.1 (UA Hasan, AM Abai, DR Harper, BW Wren, WJW Morrow; "Nucleic acid immunization: Concepts and techniques associated with third generation vaccines"; Journal of Immunological Methods 1999; 229: 1-22).

Se purificaron las IgG de los sobrenadantes de cultivo de tejido usando cromatografía de afinidad en Prosep A (Millipore UK Ltd.; Watford, WD18 8YH, RU) según las instrucciones del fabricante y se valoró la pureza por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (PAGE).

Se determinó el isotipo de la cadena pesada humana usando un ensayo de difusión radial ("The Binding Site"; Birmingham, B29 6AT, RU). Se determinó el isotipo de la cadena ligera humana usando transferencia Western con anticuerpos monoclonales de ratón específicos anti-cadena kappa humana y anti-cadena lambda humana (Sigma-Aldrich Company Ltd; Gillingham, SP8 4XT, RU).

Se trataron las preparaciones de IgG purificadas con mercuripapaína (Sigma-Aldrich) a una relación de enzima/proteína de entre 1:10 y 1:100 (dependiendo del anticuerpo monoclonal particular) y se pasaron a través de una columna Prosep A para eliminar cualquier IgG intacta o fragmento Fc de la preparación de Fab (Y Oda, J Sanders, S Roberts, M Maruyama, R Kato, M Perez, V B Petersen, N Wedlock, J Furmaniak, B Rees Smith; "Binding characteristics of antibodies to the TSH receptor"; Journal of Molecular Endocrinology 1998; 20: 233-244). La IgG intacta era indetectable por PAGE-SDS en las preparaciones de Fab. Se marcaron las preparaciones de IgG y Fab de los anticuerpos monoclonales con ¹²⁵I como se describe anteriormente (Y Oda, J Sanders, S Roberts, M Maruyama, R Kato, M Perez, V B Petersen, N Wedlock, J Furmaniak, B Rees Smith; "Binding characteristics of antibodies to the TSH receptor"; Journal of Molecular Endocrinology; 1998; 20: 233-244). Se marcaron las preparaciones de IgG con hidrazida de biotina (Pierce Rockford Ill. 61105 EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron cristales de fragmentos Fab del autoanticuerpo monoclonal humano de receptor de TSH y se determinó su estructura cristalina usando técnicas estándar.

Pacientes

Se estudiaron los sueros de pacientes con enfermedad de Graves de diferente duración de la enfermedad. Los sueros de pacientes estudiados mostraron inhibición de la unión de TSH marcada con ¹²⁵I al receptor de TSH (véase a continuación). Además, se estudiaron sueros de 2 pacientes con enfermedad de Addison (A1 y A2) y altos niveles de autoanticuerpos de 21-OH (113 y 1970 unidades por mL, kit RSR) y sueros de 2 pacientes con diabetes sacarina de tipo 1 (D1 y D2) con altos niveles de GAD₆₅ (3700 y 37,5 unidades por mL; kit RSR). Se obtuvo el consentimiento informado para el estudio de los pacientes. Se estudiaron también los sueros de donantes de sangre sanos (adquiridos en Golden West Biologicals, Vista, Calif. 92083, EE.UU.). Se obtuvo la primera preparación estándar internacional de TRAb (90/672) del National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC; Potters Bar, EN6 3QH, RU).

Inhibición de la unión de ¹²⁵I-TSH y ¹²⁵I-MAb TSHR de ratón al receptor de TSH

Se llevaron a cabo ensayos de inhibición de la unión usando tubos recubiertos con receptor de TSH como se describe anteriormente (J Sanders, Y Oda, S Roberts, A Kiddie, T Richards, J Bolton, V McGrath, S Walters, D Jaskolski, J Furmaniak, B Rees Smith; "The interaction of TSH receptor autoantibodies with ¹²⁵I-labeled TSH receptor"; Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1999; 84: 3797-3802) (reactivos de RSR Ltd). Brevemente, se incubaron 100 µl de muestra (sobrenadante de cultivo de tejido, IgG o fragmento Fab purificado, suero de paciente o estándares NIBSC 90/672) en tubos recubiertos con receptor de TSH a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación suave. Después de la aspiración, se lavaron los tubos dos veces con 1 ml de tampón de ensayo (NaCl 50 mmol/l, Tris-HCl 10 mmol/l pH 7,8, 0,1% de Triton X-100) antes de la adición de 100 µl de ¹²⁵I-TSH o ¹²⁵I-MAb (5×10⁴ cpm) e incubación a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Se lavaron entonces los tubos dos veces con 1 ml de tampón de ensayo, se sometieron a aspiración y a recuento en un contador gamma.

Se calculó la inhibición de la unión como:

100 × 1 - cpm unidos en presencia de material de ensayo

cpm unidos en presencia de material de control

Los materiales de control usados fueron medio de cultivo, un conjunto de sueros de donantes de sangre sanos o como se indica de otro modo.

5 Análisis de las actividades estimulantes del tiroides

Se llevaron a cabo estudios de la capacidad de las preparaciones de autoanticuerpo monoclonal y sueros de paciente de estimular la producción de AMP cíclico (o AMPc) en células CHO que expresaban el receptor hTSH (aproximadamente 50.000 receptores por célula) (Y Oda, J Sanders, S Roberts, M Maruyama, R Kato, M Perez, VB Petersen, N Wedlock, J Furnaniak, B Rees Smith; "Binding characteristics of antibodies to the TSH receptor"; Journal of Molecular Endocrinology 1998; 20: 233-244) según el método de R Latif, P Graves, TF Davies; "Oligomerization of the human thyrotropin receptor"; Journal of Biological Chemistry 2001; 276: 45217-45224. Brevemente, se sembraron células CHO en placas de 96 pocillos (30.000 células por pocillo) y se incubaron durante 24 horas en DMEM (Invitrogen Ltd; Paisley PA4 9RF, RU) que contenía un 10% de suero fetal de ternero. Se continuó entonces el cultivo en DMEM sin suero fetal de ternero durante 24 horas adicionales. Se retiró entonces el DMEM y se añadieron TSH, IgG, Fab y suero de ensayo (100 µl diluidos en disolución salina tamponada de Hanks exenta de NaCl que contenía glucosa 1 g/l, Hepes 20 mmol/l, sacarosa 222 mmol/l, seroalbúmina bovina (BSA) 15 g/l y 3-isobutil-1-metilxantina 0,5 mmol/l, pH 7,4) y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Después de la retirada de las disoluciones de ensayo, se lisaron las células y se ensayó el AMP cíclico usando un sistema de inmunoensayo enzimático Biotrak de Amersham Biosciences; Chalfont St Giles, HPS 4SP, RU. En algunos experimentos, se valoró la capacidad de los sueros de paciente y anticuerpos monoclonales de ratón de TSHR de inhibir la actividad estimulante de TSH o hMAb TSHR1. Se llevó a cabo esto comparando (a) los efectos estimulantes de TSH o hMAb TSHR1 solos con (b) los efectos estimulantes de TSH o hMAb TSHR1 en presencia de sueros de paciente o anticuerpo monoclonal de ratón.

Análisis génico de la región variable

Se preparó el ARN total a partir de 1×10^7 células de un clon productor de autoanticuerpo de receptor de TSH usando el método de fenol-guanidina ácida (P Chomczynski, N Sacchi; "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction"; Analytical Biochemistry 1987; 162: 156-159) y ARNm preparado usando perlas magnéticas de oligo-dT (Dynal Biotech Ltd; Wirral, CH62 3QL, RU). Se efectuaron reacciones de PCR-TI usando reactivos de Invitrogen Ltd; Paisley PA4 9RF, RU.

Se diseñaron cebadores oligonucleotídicos codificantes usando las secuencias recomendadas por la base de datos V-base del Medical Research Council (www.mrc-cpe.cam.ac.uk). Los cebadores anticodificantes específicos de la cadena pesada y la cadena ligera lambda de IgG1 humana se basaron en secuencias de ADN que codifican la región constante. Tanto los cebadores codificantes como anticodificantes incluían secuencias de sitio de endonucleasa de restricción 5' adicionales para facilitar la clonación de los productos de PCR. Se efectuaron reacciones de PCR-TI de cadena pesada y cadena ligera lambda de IgG1 usando el panel completo de cebadores apropiados. Se sintetizaron todos los cebadores por Invitrogen Ltd. La reacción de TI tuvo lugar a 50°C durante 10 minutos, seguida inmediatamente de 40 ciclos de PCR (15 s a 94°C, 30 s a 55°C, 30 s a 72°C). Se clonaron los productos de PCR-TI en pUC18 y se preparó ADN usando el kit Wizard de Promega UK Ltd; Southampton SO16 7NS, RU y secuenciado por el método de Sanger-Coulson (F Sanger, S Nicklen, A R Coulson; "DNA sequencing with chain terminating inhibitors"; Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 1977; 74: 5463-5467). Se compararon las secuencias de la región V con secuencias disponibles de genes de Ig humanos usando Igbblast (www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/igblast.cgi).

Ensayo de inmunoprecipitación (IPA)

Se dispuso el ADNc que codifica el receptor de TSH completo en dirección 3' del promotor T7 en pYES2 (Invitrogen) y se usó en un sistema TnT *in vitro* (Promega UK Ltd), produciendo receptor de TSH marcado con ^{35}S -metionina como se describe anteriormente (L Prentice, J Sanders, M Perez, R Kato, J Sawicka, Y Oda, D Jaskolski, J Furmaniak, B Rees Smith; "Thyrotropin (TSH) receptor autoantibodies do not appear to bind to the TSH receptor produced in an in vitro transcription/translation system"; Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1997; 82: 1288-1292). Brevemente, se añadieron 50 µl de receptor de TSH marcado con ^{35}S (25.000-30.000 cpm) diluidos en HSB (Tris-HCl 150 mmol/l, pH 8,3, NaCl 200 mmol/l y seroalbúmina bovina 10 mg/ml que contiene 1% de Tween 20) a alícuotas de 50 µl por duplicado de muestra de ensayo diluida y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Se precipitaron entonces los complejos inmunitarios mediante la adición de proteína-A-Sepharose (Sigma-Aldrich) y se sometieron a recuento en un contador de centelleo.

Preparaciones de receptor de TSH y transferencia Western

Se expresó receptor de TSH humano completo en células CHO-K1, se extrajo con 1% de Triton X-100 y se purificó mediante cromatografía de afinidad de anticuerpo monoclonal de receptor de TSH como se describe anteriormente (Y Oda, J Sanders, M Evans, A Kiddie, A Munkley, C James, T Richards, J Wills, J Furmaniak, B Rees Smith;

"Epitope analysis of the human thyrotropin (TSH) receptor using monoclonal antibodies"; Thyroid 2000; 10: 1051-1059).

Se procesó el receptor de TSH producido por células CHO purificado en geles de PAGE-SDS al 9%, se transfirió a nitrocelulosa y se hizo reaccionar con anticuerpos de ensayo como se describe anteriormente (Y Oda, J Sanders, M Evans, A Kiddie, A Munkley, C James, T Richards, J Wills, J Furmaniak, B Rees Smith; "Epitope analysis of the human thyrotropin (TSH) receptor using monoclonal antibodies"; Thyroid 2000; 10: 1051-1059).

Análisis epitópico usando péptidos de receptor de TSH

Se proporcionaron amablemente por el Dr. J Morris (JC Morris, ER Bergert, DJ McCormick; "Structure-function studies of the human thyrotropin receptor. Inhibition of binding of labeled thyrotropin (TSH) by synthetic human TSH receptor peptides"; Journal of Biological Chemistry 1993; 268: 10900-10905) 26 péptidos de 25 aa de longitud cada uno que cubrían todo el dominio extracelular del receptor de TSH humano. Se usó un péptido 21-OH humano (C1, SSSRVYPYKDRARLPL) que se une a un MAb M21-OH5 (S Chen, J Sawicka, L Prentice, J F Sanders, H Tanaka, V Petersen, C Betterle, M Volpato, S Roberts, M Powell, B Rees Smith, J Furmaniak; "Analysis of autoantibody epitopes on steroid 21-hydroxylase using a panel of monoclonal antibodies"; Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1998; 83: 2977-2986) como control positivo y se usó un anticuerpo monoclonal humano de GAD₆₅ (N Hayakawa, LDKE Premawardhana, M Powell, M Masuda, C Arnold, J Sanders, M Evans, S Chen, J C Jaume, S Baekkeskov, B Rees Smith, J Furmaniak; "Isolation and characterization of human monoclonal autoantibodies to glutamic acid decarboxylase"; Autoimmunity 2002; 35: 343-355) como control negativo. Se llevó a cabo el ELISA peptídico como se describe anteriormente (Y Oda, J Sanders, M Evans, A Kiddie, A Munkley, C James, T Richards, J Wills, J Furmaniak, B Rees Smith; "Epitope analysis of the human thyrotropin (TSH) receptor using monoclonal antibodies"; Thyroid 2000; 10: 1051-1059).

Interacción de preparaciones de autoanticuerpo monoclonal de TSHR con el receptor de TSH recubierto sobre tubos de plástico o pocillos de placa ELISA

(a) Autoanticuerpo marcado con ¹²⁵I

Se incubaron muestras de ensayo que incluían sueros de paciente (100 µl) en tubos recubiertos con receptor de TSH (RSR Ltd.) a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación suave. Después de la aspiración, se lavaron los tubos dos veces con 1 ml de tampón de ensayo antes de la adición de 100 µl de preparación de autoanticuerpo marcado (30.000 cpm) y la incubación a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Se lavaron entonces los tubos dos veces con 1 ml de tampón de ensayo, se sometieron a aspiración y a recuento en un contador gamma. Se calculó la inhibición de la unión de autoanticuerpo marcado con ¹²⁵I usando la fórmula de la inhibición de la unión de TSH (véase anteriormente).

(b) Autoanticuerpo monoclonal marcado con biotina y TSH marcada con biotina

Se usó el procedimiento descrito anteriormente (J Bolton, J Sanders, Y Oda, C Chapman, R Konno, J Furmaniak y B Rees Smith; "Measurement of thyroid-stimulating hormone receptor autoantibodies by ELISA"; Clinical Chemistry, 1999; 45: 2285-2287). Brevemente, se incubaron muestras de ensayo que incluían sueros de paciente (75 µl) en pocillos de placa ELISA recubiertos con receptor de TSH (RSR Ltd) durante 2 horas con agitación (200 rpm) en un agitador de placa ELISA. Se retiraron entonces las muestras de ensayo y se lavaron los pocillos una vez con tampón de ensayo. Se añadieron entonces autoanticuerpo monoclonal de receptor de TSH marcado con biotina (1 ng en 100 µl) o TSH porcina marcada con biotina (RSR Ltd; 5 ng en 100 µl) y se continuó la incubación durante 25 minutos a temperatura ambiente sin agitación. Se lavaron los pocillos una vez, se añadieron 100 µl de estreptavidina-peroxidasa (RSR Ltd; 10 ng en 100 µl) y se continuó la incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente sin agitación. Se lavaron entonces los pocillos 3 veces, y se añadió el sustrato de peroxidasa tetrametilbencidina (RSR Ltd; 100 µl). Después de incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente sin agitación, se añadieron 50 µl de H₂SO₄ 0,5 M para detener la reacción del sustrato y se leyó la absorbancia de cada pocillo a 450 nm en un lector de placas ELISA. Se expresó la inhibición de la unión de MAb biotinilado o TSH como un índice calculado como:

$100 \times 1 - \frac{\text{absorbancia de la muestra de ensayo a 450 nm}}{\text{absorbancia del control sérico negativo a 450 nm}}$

Análisis de Scatchard de la unión de autoanticuerpo monoclonal a tubos recubiertos con receptor de TSH

Se incubaron IgG o Fab no marcados en 50 µl de tampón de ensayo y 50 µl de IgG o Fab de hMAb marcado con ¹²⁵I (30.000 cpm en tampón de ensayo) durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave, se lavaron dos veces con 1 ml de tampón de ensayo y se sometieron a recuento en un contador gamma. Se representó la concentración de IgG o Fab unido frente a unido/libre (G Scatchard; "The attraction of proteins for small molecules and ions"; Annals of the New York Academy of Sciences 1949; 51: 660-672) para derivar las constantes de asociación.

Unión del receptor de TSH a tubos recubiertos con autoanticuerpos monoclonales de receptor de TSH

Se incubaron muestras de ensayo que incluían sueros de paciente (100 µl) y receptor de TSH solubilizado con detergente (20 µl) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadieron entonces alícuotas de 50 µl por duplicado de la mezcla de incubación a tubos de plástico (Nunc Maxisorp) que se habían recubierto con Fab de autoanticuerpo monoclonal de receptor de TSH (200 µl de 10 µg/ml durante una noche a 4°C, seguido de lavado y recubrimiento posterior). Después de incubación durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave, se lavaron los tubos, se añadieron 100 µl (40.000 cpm) de anticuerpo monoclonal 4E31 C-terminal de receptor de TSH marcado con ¹²⁵I (J Sanders, Y Oda, A Kiddie, T Richards, J Bolton, V McGrath, S Walters, D Jaskolski, J Furmaniak, B Rees Smith; "The interaction of TSH receptor autoantibodies with ¹²⁵I-labelled TSH receptor"; Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1999; 84: 3797-3802) y se continuó la incubación durante 1 hora adicional con agitación suave. Se lavaron entonces los tubos y se sometieron a recuento de ¹²⁵I.

Clonación y expresión de Fab de hMAb TSHR1 recombinante en *E. coli*

Se cortó el producto de PCR-TI de cadena pesada de hMAb TSHR1 (véase la sección de análisis génico de la región variable) con las endonucleasas de restricción XhoI y SpeI y se cortó el producto de PCR de la cadena ligera de hMAb TSHR1 con las endonucleasas de restricción SacI y XbaI, y se clonaron ambos ADNc de cadena pesada y ligera en el vector ImmunoZap H/L (Stratagene Europe; Amsterdam, Holanda) (I Matthews, G Sims, S Ledwidge, D Stott, D Beeson, N Willcox, A Vincent; "Antibodies to acetylcholine receptor in parous women with myasthenia: evidence for immunization by fetal antigen"; Laboratory Investigation 2002; 82: 1-11) bajo el control del promotor lacZ. Se preparó ADN de plásmido usando el kit de purificación de plásmido Qiagen midi (Qiagen Ltd; Crawley, RH10 9AX, RU) y se confirmó la presencia de ADNc de cadena pesada y ligera de hMAb TSHR1 mediante secuenciación usando el método de Sanger-Coulson (F Sanger, S Nicklen, A R Coulson; "DNA sequencing with chain terminating inhibitors"; Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 1977; 74: 5463-5467). Se transformó ADN de plásmido en dos cepas de *E. coli* diferentes (a) XL1-Blue MRF' (Stratagene) y (b) HB2151 (Amersham Biosciences) y se cultivó durante una noche a 37°C en placas de agar LB-ampicilina (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l, ampicilina a una concentración final 100 µg/ml) (15 g/l de agar). Se cultivaron los precultivos (una colonia en 3 ml de LB-ampicilina con 1% de glucosa) a 37°C durante una noche con agitación. La producción del Fab recombinante se inhibe en presencia de glucosa. Se diluyeron los precultivos 1/100 después de incubación de una noche (0,5 ml en 50 ml de LB-ampicilina) y se cultivaron a 37°C hasta que la DO₆₀₀ estuvo entre 0,4-0,6. Se dispusieron estos cultivos a 30°C con agitación durante 20 minutos. Después de ello, se añadió 0,5 ml de D-tiogalactósido de isopropilo (IPTG) a una concentración final de 1 mmol/l y se continuaron incubando los cultivos durante una noche (16 horas) a 30°C con agitación. Se centrifugaron entonces los cultivos a 3000 rpm durante 30 minutos a 4°C y se recuperaron los sobrenadantes de cultivo y sedimentos. Se resuspendieron los sedimentos en 1 ml de tampón TES enfriado con hielo (Tris-HCl 0,2 mol/l, pH 8,0, EDTA 0,5 mol/l y sacarosa 0,5 mol/l) mediante vórtice. Se añadieron 1,5 ml adicionales de tampón TES enfriado con hielo diluido 5 veces en H₂O, se agitó con vórtice de nuevo la mezcla, se incubó en hielo durante 30 minutos y se recentrifugó entonces, dando un segundo sobrenadante o fracción periplasmática (FP). Se filtraron el sobrenadante de cultivo y la FP a través de un filtro de 0,45 µm y se dializaron durante una noche con Tris 10 mmol/l, pH 7,5, NaCl 50 mmol/l. Se prepararon también sobrenadante de cultivo o FP de células XL1-Blue MRF' y HB2151 no transformadas y XL1-Blue MRF' transformadas con plásmido de hMAb TSHR1 (XL1-Blue MRF'/hMAb TSHR1) y HB2151 transformadas con plásmido de hMAb TSHR1 (HB2151/hMAb TSHR1) con glucosa sin IPTG, concretamente no inducidas. Se ensayaron en los sobrenadantes de cultivo y FP (a) su capacidad de inhibir la unión de TSH a TSHR, (b) su capacidad de estimular la producción de AMP cíclico en células CHO que expresan TSHR y (c) la concentración de Fab recombinante total mediante radioinmunoensayo. En este ensayo, se incubaron los patrones y materiales de ensayo, incluyendo sobrenadantes de cultivo y FP (100 µl por duplicado) en ~~tampón~~ de ensayo (NaCl 50 mmol/l, Tris-HCl 10 mmol/l, pH 7,8, 0,1% de Triton X-100) durante 1 hora a temperatura ambiente en tubos de plástico recubiertos con IgG de cabra anti-humana específica de Fab (de Sigma Aldrich, Poole, BH12 4QH, RU). Se lavaron entonces los tubos con tampón de ensayo (2x1 ml) y se añadieron 100 µl de Fab de hMAb TSHR1 marcado con ¹²⁵I (30.000 cpm), seguido de incubación a temperatura ambiente. Después de 1 hora, se lavaron los tubos de nuevo (2x1 ml) y se sometieron a recuento de ¹²⁵I. Se representaron las cuentas unidas frente a la concentración de Fab (Fab de hMAb TSHR1 producido por hibridoma) en los patrones (5-500 ng/ml) y se leyó la concentración de Fab recombinante en los diversos materiales de ensayo a partir de esta curva de calibración. El límite de detección para este ensayo era de 5-10 ng/ml de Fab.

Clonación y expresión de 4B4 recombinante (un MAb humano de ácido glutámico descarboxilasa o GAD) y Fab híbridos recombinantes (HC y LC mixtos de hMAb TSHR1 y 4B4)

Se produjeron Fab de 4B4 recombinante (4B4 se describe con detalle por N Hayakawa, LDKE Premawardhana, M Powell, M Masuda, C Arnold, J Sanders, M Evans, S Chen, J C Jaume, S Baekkeskov, B Rees Smith, J Furmaniak. "Isolation and characterization of human monoclonal antibodies to glutamic acid decarboxylase". Autoimmunity 2002 volumen 35, pág. 343-355) y Fab híbridos recombinantes mediante clonación de los HC y LC respectivos en el vector ImmunoZap H/L y se expresaron en células HB2151 como se describe para Fab de hMAb TSHR1 recombinante. Se ensayó en los sobrenadantes de cultivo y fracción periplasmática (a) su capacidad de inhibir la unión de TSH al TSHR, (b) su capacidad de estimular la producción de AMP cíclico en células CHO que expresan TSHR y (c) la concentración de Fab recombinante total como se describe anteriormente. Además, se valoró la

actividad del Ab de GAD como se describe a continuación.

Medida de la actividad de Fab de Ab de GAD recombinante en sobrenadantes de cultivo y fracciones periplasmáticas

Se usó un ensayo basado en la capacidad de la preparación de Fab de Ab de GAD de inhibir la unión de GAD marcada con ^{125}I (de RSR Ltd, Cardiff, CF23 SHE, RU) al anticuerpo monoclonal humano de GAD (4B4). En el ensayo, se incubaron muestras de ensayo diluidas en tampón de ensayo de Ab de GAD (NaCl 150 mmol/l, Tris-HCl 50 mmol/l, pH 8,0, 1% en v/v de Tween 20, seroalbúmina bovina 1 g/l y NaN_3 0,5 g/l) (50 μl por duplicado con GAD marcada con ^{125}I (30.000 cpm en 50 μl de tampón de ensayo de Ab de GAD) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadieron entonces 50 μl de IgG de 4B4 (0,1 $\mu\text{g/ml}$ en tampón de ensayo de Ab de GAD) y se continuó la incubación durante 24 horas a temperatura ambiente. Se añadió entonces proteína A en fase sólida (50 μl en tampón de ensayo de Ab de GAD, de RSR Ltd.) para precipitar complejos de IgG de 4B4-GAD marcada con ^{125}I (la proteína A no reacciona con complejos de Fab y GAD marcada con ^{125}I). Después de dejar proceder la reacción con proteína A durante 1 hora a temperatura ambiente, se sedimentaron los precipitados mediante centrifugación (1500 g durante 30 minutos a 4°C), se lavaron con 1 ml de tampón de ensayo de Ab de GAD y se sometieron a recuento de ^{125}I . La unión de GAD marcada con ^{125}I en ausencia de IgG de 4B4 era un 4-5% de las cpm totales añadidas.

Producción de anticuerpos antiidiotípicos de hMAb TSHR1

Se inmunizaron por vía intraperitoneal ratones BALB/c de 6-8 semanas de edad con 50 μg de Fab de hMAb TSHR1 en coadyuvante completo de Freund seguido de una segunda inyección con 50 μg de Fab de hMAb TSHR1 en coadyuvante incompleto de Freund después de 25 días, y una inyección adicional de 50 μg de Fab de hMAb TSHR1 4 días antes de la extracción del bazo. Se fusionaron las células de bazo de ratones positivos de anticuerpo (véase a continuación) con una estirpe celular de mieloma de ratón y se aislaron los anticuerpos monoclonales como anteriormente para MAb TSHR. Se midieron los niveles de anticuerpo antiidiotípico en sueros de ratón y pocillos de cultivo celular mediante la inhibición de la unión de Fab de ^{125}I -hMAb TSHR1 a tubos recubiertos con TSHR. En particular, se incubaron alícuotas de 60 μl de muestra de ensayo por duplicado (diluida en tampón de ensayo: NaCl 50 mmol/l, Tris-HCl 10 mmol/l, pH 7,8, 0,1% de Triton X-100) con 60 μl de Fab de ^{125}I -hMAb TSHR1 (30.000 cpm diluido en tampón de ensayo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se transfirieron 100 μl de la mezcla a tubos recubiertos con TSHR por duplicado (RSR Ltd) con 20 μl de tampón de inicio (véase anteriormente) y se continuó la incubación durante dos horas adicionales a temperatura ambiente con agitación. Se lavaron entonces los tubos con 2 x 1 ml de tampón de ensayo y se sometieron a recuento de ^{125}I . La presencia de anticuerpos antiidiotípicos reactivos con hMAb TSHR1 era evidente por la capacidad de las muestras de ensayo de inhibir la unión de Fab de hMAb TSHR1 marcado con los tubos recubiertos con TSHR.

Resultados

Se sembraron linfocitos (30×10^6) obtenidos a partir de 20 ml de sangre de paciente a 1×10^6 por pocillo en una placa de 48 pocillos con 200 μl de sobrenadante de EBV sobre capas de alimentación de macrófagos de ratón. El día 11 después de la infección con EBV, se monitorizó en los sobrenadantes la inhibición de la unión de ^{125}I -TSH. Se encontró que un pocillo era positivo de inhibición de la unión, aumentando los niveles de inhibición a más de un 90% de inhibición el día 16 y permaneciendo a ese nivel hasta el día 24, después de dicho tiempo se redujeron. Se multiplicaron los cultivos y se fusionaron con células K6H6/B5 los días 21, 23, 26 y 27 después de la infección con EBV; en total se llevaron a cabo 7 experimentos de fusión. Se sembró cada fusión por 3 placas de 96 pocillos (concretamente, 21 placas en total) y se obtuvo un pocillo que producía establemente anticuerpos con actividad inhibidora de la unión de ^{125}I -TSH. Esto fue seguido por 3 rondas de reclonación para dar un solo clon productor de un anticuerpo monoclonal humano que inhibía la unión de TSH marcada al receptor de TSH. Este autoanticuerpo monoclonal humano de receptor de TSH se designó hMAb TSHR1 y era de la subclase IgG1, con una cadena ligera lambda.

Se muestra en la Figura 1 la capacidad de diferentes concentraciones de IgG y Fab de hMAb TSHR1 de inhibir la unión de TSH marcada al receptor de TSH. Como puede observarse en la Figura 1, con tan solo 1 ng/ml de estas preparaciones se inhibía la unión de TSH, obteniéndose más de un 90% de inhibición con 1000 ng/mL. IgG y Fab de hMAb TSHR1 estimulaban también la producción de AMP cíclico en células CHO transfectadas con el receptor de TSH como se muestra en la Figura 2. Con tan solo 1 ng/ml de IgG o Fab de hMAb TSHR1, se causaba una fuerte estimulación del AMP cíclico. Se observaron niveles de estimulación similares con TSH porcina 0,1 ng/ml y con TSH humana 10 ng/ml. Se muestra en la Figura 3 la comparación de la capacidad del suero de donante de linfocitos original (tomado en el mismo momento que la muestra de sangre para el aislamiento de linfocitos) para inhibir la unión de TSH marcada al receptor de TSH y para estimular la producción de AMP cíclico en células CHO transfectadas con receptor de TSH. La inhibición de la unión de TSH pudo detectarse con suero diluido 500 veces, mientras que la estimulación del AMP cíclico pudo detectarse con suero diluido 5000 veces.

Los análisis de IgG de hMAb TSHR1 marcada con ^{125}I unida a tubos recubiertos con receptor de TSH y de Scatchard indicaban una constante de asociación de $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$. Esta unión se inhibía por los sueros de pacientes con enfermedad de Graves que tenían autoanticuerpos de receptor de TSH (detectables mediante la inhibición de la

unión de TSH marcada) (Tabla 1). El Fab de hMAb TSHR1 marcado con ¹²⁵I se unía también a tubos recubiertos con receptor de TSH (constante de asociación por análisis de Scatchard= $4,5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$) y esta unión se inhibía por sueros de Graves positivos de autoanticuerpo de receptor de TSH (Tabla 2). Además, las preparaciones solubilizadas con detergente pudieron unirse a tubos de plástico recubiertos con hMAb TSHR1, y esta unión pudo inhibirse por sueros que contenían autoanticuerpos de receptor de TSH (Tabla 3).

Como se muestra en la Tabla 4, el hMAb TSHR1-biotina se unía a placas ELISA recubiertas con receptor de TSH y la unión se inhibía por la preparación de referencia internacional NIBSC 90/672 y el suero de pacientes con enfermedad de Graves. No se observó inhibición de la unión por sueros de donantes de sangre sanos. La Figura 3a muestra una representación gráfica de una comparación entre un ensayo de autoanticuerpos de TSHR basado en hMAb TSHR1-biotina y ensayos anteriores. La sensibilidad del ensayo basado en hMAb TSHR1-biotina es claramente superior según la concentración del estándar internacional NIBSC 90/672 detectable. Esto se confirmó en un estudio de sueros de 72 pacientes con enfermedad de Graves mostrado en la Figura 3b. Los sueros de donantes de sangre sanos (n= 100) y los sueros de sujetos con enfermedades no tiroideas (n= 43) dieron respectivamente valores de hasta un 10% de inhibición de la unión de hMAb TSHR1 y de hasta un 11% de inhibición de la unión de TSH en este estudio.

La IgG de hMAb TSHR1 no reaccionaba con preparaciones de receptor de TSH completo en análisis de transferencia Western ni reaccionaba bien con receptor de TSH completo marcado con ³⁵S en el ensayo de inmunoprecipitación ni en el ELISA peptídico de receptor de TSH. Esta falta de reactividad indica que el hMAb TSHR1 reacciona con epítomos conformaciones en lugar de lineales en el receptor de TSH.

El análisis de secuencia de los genes que codifican el hMAb TSHR1 indicaba que los genes de la región V de la cadena pesada eran de la familia VH5, el gen D de la familia D6-13 y el gen J de la familia JH5, y para la cadena ligera, la región V es de la estirpe germinal VL1-11 y la región J es de la estirpe germinal JL3b. Se muestran en las Figuras 4 y 5 las secuencias nucleotídica y aminoácídica de la cadena pesada, respectivamente, y se muestran en las Figuras 6 y 7 las secuencias nucleotídica y aminoácídica de la cadena ligera, respectivamente. Estas secuencias son un refinamiento de las secuencias nucleotídicas de HC y LC determinadas usando cebadores de PCR que son degenerados. En particular, se identificó un artefacto de secuenciación de HC para los nucleótidos 115-120. La secuenciación indicaba cagctg (transcrito a los aminoácidos His Val), mientras que la estructura cristalina indicaba más fiablemente los aminoácidos Gln Leu (siendo las bases correspondientes cagctg). El análisis de la estructura cristalina posibilitó también el refinamiento de las secuencias aminoácídicas derivadas de HC y LC, particularmente en la región cebadora de PCR degenerada. En el caso de LC, se encontró que el aminoácido 2 era Pro por PCR-TI, pero que era Thr por la estructura cristalina. En el caso de HC, se encontró que el aminoácido 2 era Met por PCR-TI, pero que era Val por la estructura cristalina.

Se muestra en la Tabla 5 la comparación de las actividades de preparaciones de IgG de hMAb TSHR1 y el estándar internacional para autoanticuerpos de receptor de TSH en términos de inhibición de la unión de TSH marcada. Esto posibilitó estimar la actividad específica de la IgG de hMAb TSHR1 como 138 unidades de NIBSC 90/672 por mg de proteína cuando los ensayos se llevaron a cabo en suero y de 163 unidades por mg cuando los ensayos se llevaron a cabo en tampón de ensayo (media de los dos valores= 150 unidades/mg). Las preparaciones de Fab de hMAb TSHR1 eran de 288 y 309 unidades por mg en suero y tampón de ensayo, respectivamente (media de los dos valores= 300 unidades/mg). La Tabla 6 muestra un análisis similar del suero de donante de linfocitos y de IgG de suero de donante. Como puede observarse, el suero de donante contiene una media de 0,38 unidades/ml de NIBSC 90/672 (0,36 y 0,4 en suero y tampón de ensayo, respectivamente) y la IgG de suero de donante tiene una actividad específica media de 0,059 unidades por mg de proteína. Estos resultados se resumen en la Tabla 7, y la comparación con la actividad específica de IgG de hMAb TSHR1 (150 unidades/mg) indica que la IgG de autoanticuerpo monoclonal es 2500 veces más activa que la IgG de suero de donante de linfocitos en términos de inhibición de la unión de TSH.

Se muestra también en la Tabla 7 la valoración inicial de las actividades de diversas IgG y preparaciones séricas en términos de estimulación del AMP cíclico en células CHO transfectadas con el receptor de TSH. La estimulación del ensayo de AMP cíclico se caracteriza por una considerable variabilidad intra- e interensayos. Esto se relaciona con varios factores, incluyendo la variación en el número y calidad de células sembradas inicialmente en las placas de 96 pocillos y la variación en la tasa de crecimiento de las células sembradas durante las siguientes 48 horas. En consecuencia, se llevaron a cabo los ensayos de IgG y Fab de hMAb TSHR1, suero de donante de linfocitos e IgG de suero y NIBSC 90/672 repetidamente, y se resumen los resultados en la Tabla 8. La actividad específica de la IgG de hMAb TSHR1 era de 318 unidades por mg en el ensayo de estimulación, comparado con 0,1 unidades por mg para la IgG de suero de donante de linfocitos, concretamente, la IgG de autoanticuerpo monoclonal era aproximadamente 3000 veces más activa que la IgG de suero de donante en términos de estimulación de la producción de AMP cíclico. Este valor está razonablemente de acuerdo con el valor de 2500 veces observado para la inhibición de las medidas de unión de TSH (véase anteriormente y las Tablas 5 y 6). La Tabla 9 muestra un análisis adicional de los efectos estimulantes sobre el receptor de TSH de IgG y Fab de hMAb TSHR1 e IgG de suero de donante de linfocitos.

Los efectos de TSH porcina e IgG de hMAb TSHR1 sobre la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que expresan el receptor de TSH eran aditivos, como puede observarse en los resultados mostrados en la

Tabla 10.

Se muestran en la Tabla 11 los resultados típicos observados en el ensayo de estimulación de AMP cíclico con la preparación de referencia NIBSC 90/672.

Las Tablas 12 y 13 muestran los efectos de diversos sobrenadantes de cultivo de *E. coli* en términos de inhibición de la unión de TSH marcada y estimulación de la producción de AMP cíclico, respectivamente. Los cultivos transformados (con plásmido de hMAb TSHR1) e inducidos con IPTG de ambas cepas de *E. coli* producían suficientes cantidades de Fab de hMAb TSHR recombinante para actuar como potentes inhibidores de la unión de TSH (Tabla 12) y potentes estimulantes de la producción de AMP cíclico (Tabla 13). Los sobrenadantes de cultivo de control (de células no transformadas y células transformadas pero no inducidas) no producían niveles detectables de las actividades de inhibición de la unión (Tabla 12) ni la estimulación (Tabla 13).

En experimentos de control adicionales, se analizó un Fab de anticuerpo humano recombinante producido mediante clonación y expresión de HC y LC de un anticuerpo monoclonal humano de GAD (4B4). Los ensayos de sobrenadantes de cultivo y fracciones periplasmáticas indicaron que el Fab de 4B4 recombinante no tenía una inhibición detectable de la actividad de unión de TSH (Tablas 14 y 15) o de la actividad estimulante de TSHR (Tablas 16 y 17). Además, los Fab híbridos consistentes en (a) HC de hMAb TSHR1 y LC de 4B4, (b) LC de hMAb TSHR1 y HC de 4B4 no mostraron interacción con TSHR en ningún ensayo (Tablas 14-17). Los ensayos de actividad de Ab de GAD en estas diversas preparaciones de Fab recombinante fueron capaces de detectar la expresión de Ab de GAD solo en células transformadas con HC de 4B4 y LC de 4B4 (Tablas 18 y 19). El Fab de hMAb TSHR1 recombinante no mostraba actividad de Ab de GAD detectable y tampoco los híbridos de Fab consistentes en mezclas de HC y LC de 4B4 y hMAb TSHR1 (Tablas 18 y 19).

Se inhibió la capacidad de hMAb TSHR1 de estimular la producción de AMP cíclico en células CHO transfectadas con TSHR por sueros de pacientes que contenían autoanticuerpos de TSHR que actuaban como antagonistas de TSH (Figura 8). Además, un anticuerpo monoclonal de ratón de TSHR (9D33) era capaz de bloquear las actividades de estimulación de hMAb TSHR1 (Tabla 20), mientras que otro MAb de ratón de TSHR (2B4) era ineficaz (Tabla 20). Sin embargo, el 2B4 era capaz de bloquear las actividades estimulantes de TSH al igual que 9D33 (Tabla 21). La Tabla 22 muestra la capacidad de 2B4 y 9D33 de inhibir la unión de TSH marcada con ^{125}I y hMAb TSHR1 marcado con ^{125}I a tubos de plástico de TSHR. El 9D33 era capaz de inhibir la unión de TSH marcada y la unión de hMAb TSHR1 marcado bastante eficazmente (más de un 50% de inhibición a $10\text{ }\mu\text{g/ml}$). El 2B4 era un inhibidor eficaz de la unión de TSH marcada a TSHR (más de un 80% de inhibición a $1\text{ }\mu\text{g/ml}$), pero tenía solo un efecto minoritario sobre la unión de hMAb TSHR1 (11% de inhibición a $1\text{ }\mu\text{g/ml}$) o sobre la unión de 9D33 (22% de inhibición a $1\text{ }\mu\text{g/ml}$). Se inhibía la unión de 9D33 marcado a tubos recubiertos con TSHR por sueros de pacientes con enfermedad de Graves que contenían autoanticuerpos de TSHR (medidos mediante la inhibición de la unión de TSH marcada a TSHR), mientras que los sueros de donantes de sangre sanos y los sueros de pacientes con otras enfermedades autoinmunitarias tenían poco o ningún efecto (Tabla 23). Se inhibió la unión de 9D33 marcado a TSHR por autoanticuerpos de TSHR con propiedades agonista o antagonista de TSH (Tabla 24) y por el estándar internacional NIBSC 90/672 (Tabla 25). El análisis de Scatchard indicó que 9D33 y 2B4 tenían afinidades de $2\times 10^{10}\text{ M}^{-1}$ y de $1\times 10^{10}\text{ M}^{-1}$, respectivamente, por los receptores de TSH recubiertos sobre tubos de plástico.

La inmunización de ratones con Fab de hMAb TSHR1 dio como resultado la producción de anticuerpos en los sueros de ratón (anticuerpos policlonales) que eran capaces de unirse a Fab de hMAb TSHR1 de tal modo que se inhibía la capacidad del Fab de unirse al TSHR (Tabla 26). Además, un anticuerpo monoclonal producido a partir de células de bazo de un ratón inmunizado con Fab de hMAb TSHR1 era también capaz de inhibir la unión de Fab al TSHR (Tabla 27).

Globalmente, el análisis indica que el anticuerpo monoclonal hMAb TSHR1 tiene las características de unión a receptor de TSH y estimulación de tiroides de los autoanticuerpos de receptor de TSH en el suero de donante de linfocitos. Como se detalla anteriormente, el anticuerpo monoclonal se produjo también como una preparación de Fab recombinante.

CONCLUSIONES

(a) Se ha producido un anticuerpo monoclonal humano del receptor de TSH que tiene propiedades similares al autoanticuerpo de receptor de TSH en el suero de pacientes donantes. El anticuerpo monoclonal se produjo también como una preparación de Fab recombinante.

(b) La IgG y Fab del anticuerpo monoclonal y las preparaciones de Fab recombinante son potentes estimulantes del tiroides y eficaces inhibidores de la unión de TSH marcada al receptor de TSH.

(c) La unión de preparaciones de IgG y Fab de MAb marcados al receptor de TSH está inhibida por sueros positivos de autoanticuerpo de receptor de TSH de pacientes con enfermedad de Graves, pero no por sueros de donantes de sangre sanos o sueros de pacientes con otras enfermedades autoinmunitarias. Los sistemas de ensayo de autoanticuerpos de TSHR basados en la inhibición de la unión de hMAb TSHR1 marcado al receptor de TSH son más sensibles que los demás ensayos descritos hasta ahora.

(d) Los autoanticuerpos de receptor de TSH que actúan como antagonistas de TSH, así como los autoanticuerpos de receptor de TSH que actúan como agonistas de TSH, inhiben la unión de hMAb TSHR1 marcado al receptor de TSH.

5 (e) Las preparaciones de hMAb TSHR1 recubiertas sobre tubos de plástico se unen a receptor de TSH, y esta unión se inhibe por autoanticuerpos de receptor de TSH en diferentes sueros de pacientes.

(f) Se encontró que un anticuerpo monoclonal de ratón (9D33) que inhibe la unión de hMAb TSHR1 a TSHR bloqueaba también la actividad estimulante de hMAb TSHR1 y TSH.

10 (g) Se han producido anticuerpos policlonales y monoclonales de ratón de hMAb TSHR1 que se unen a hMAb TSHR1 de tal modo que evitan su unión al receptor de TSH. Estos anticuerpos antiidiotípicos compiten por lo tanto con el TSHR por el hMAb TSHR1 y como tales pueden ser alternativas útiles al TSHR en aplicaciones en que se requiera un copartícipe de unión para autoanticuerpos de TSHR.

(h) Estos resultados indican que el hMAb TSHR1 y/o sus derivados y/o sus competidores pueden usarse como reemplazo de TSH en

- 15 (i) ensayos de autoanticuerpos de receptor de TSH, TSH y ligandos relacionados,
- (ii) diversas aplicaciones *in vivo* que implican la provisión de actividades agonista de TSH o antagonista de TSH,
- (iii) la identificación y provisión de nuevos tipos de sitios de unión de autoanticuerpo de receptor de TSH.

20 **Tabla 1.** Efecto de los sueros de paciente sobre la unión de IgG de hMAb TSHR1 marcada con ^{125}I al receptor de TSH y comparación con el efecto sobre la unión de TSH marcada con ^{125}I al receptor de TSH

Material de ensayo	Inhibición de la unión de hMAb TSHR1 marcado	Inhibición de la unión de TSH	Material de ensayo	Inhibición de la unión de hMAb TSHR1 marcado	Inhibición de la unión de TSH
G1	62	80	N1	3,1	7,7
G2	91	93	N2	2,4	2,6
G3	91	76	N3	-1,0	4,5
G4	94	92	N4	-11	6,5
G5	93	94	N5	1,7	5,0
G6	76	85	N6	2,8	1,7
G7	87	90	N7	5,2	-0,8
G8	65	45	N8	3,5	0,2
G9	88	90	N9	2,8	-0,6
G10/10	83	59	N10	4,5	2,2
G10/20	69	43	D1	-4,8	2,2
G10/40	56	29	A1	-3,1	1,3
G10/80	42	19	A2	-3,5	-3,0
G11/10	75	73			
G11/20	59	54			
G11/40	39	33			
G11/80	22	18			

G1-G11 son sueros de pacientes con un historial de enfermedad de Graves.

El suero G9 tiene altos niveles de bloqueo de TSH (concretamente, actividad antagonista de TSH).

G10 y G11 tienen altos niveles de actividad estimulante del tiroides.

25 G10 es el suero de donante de linfocitos.

/10, /20 etc. indican el factor de dilución en un conjunto de sueros de donantes de sangre sanos.

N1-N10 son sueros de donantes de sangre sanos.

D1 es de un paciente con diabetes sacarina de tipo 1 (positivo de autoanticuerpos de ácido glutámico descarboxilasa).

A1 y A2 son de pacientes con la enfermedad de Addison (positivos de autoanticuerpos de esteroide 21-hidroxilasa).

- 5 En presencia del conjunto de sueros de donantes de sangre sanos, aproximadamente un 25% de la IgG de MAb marcada con ¹²⁵I se unió a los tubos recubiertos con TSHR.

Tabla 2. Efecto de los sueros de paciente sobre la unión de Fab de hMAb TSHR1 marcado con ¹²⁵I al receptor de TSH y comparación con el efecto sobre la unión de TSH marcada con ¹²⁵I al receptor de TSH

Material de ensayo	Inhibición de la unión de Fab marcado	Inhibición de la unión de TSH
NIBSC 90/672 diluido en un conjunto de sueros de donantes de sangre sanos		
a 1 U/l	17	13
a 2 U/l	27	24
a 4 U/l	47	44
a 8 U/l	61	65
Suero de donante de sangre sano A	-3	<10
Suero de donante de sangre sano B	3	<10
Suero de donante de sangre sano C	4	<10
Suero de donante de sangre sano D	-4	<10
Suero de donante de sangre sano E	0	<10
Suero de Graves F	64	78
Suero de Graves G	42	54
Suero de Graves H	49	69
Suero de Graves I	24	36
Suero de Graves J	76	88

- 10 **Tabla 3.** Unión de TSHR a tubos de plástico recubiertos con Fab de hMAb TSHR1 e inhibición de la unión de TSHR por sueros que contienen autoanticuerpos de TSHR

Material de ensayo	cpm unidades ¹
Suero de donante de sangre sano A	8406
Suero de donante de sangre sano B	8430
Suero positivo de autoanticuerpo de TSHR 1	1527
Suero positivo de autoanticuerpo de TSHR 2	1131
Suero positivo de autoanticuerpo de TSHR 3	1199

¹Se detectó la unión de TSHR usando un anticuerpo monoclonal de ratón marcado con ¹²⁵I del extremo C de TSHR; cpm totales: 39.000 por tubo.

- 15 **Tabla 4.** Efecto de las muestras de suero de paciente sobre la unión de hMAb TSHR1 marcado con biotina y TSH marcada con biotina a pocillos de placa ELISA recubiertos con TSHR

	hMAb TSHR1-biotina		TSH-biotina	
	DO ₄₅₀	% de inhibición	DO ₄₅₀	% de inhibición
Conjunto de HBD	1,852	0	1,778	0
Conjunto de HBD más 1 U/ml	1,46	21	1,489	16
Conjunto de HBD más 2 U/ml	1,168	37	1,304	27

Conjunto de HBD más 4 U/ml	0,792	57	0,947	47
Conjunto de HBD más 8 U/ml	0,539	71	0,492	72
Conjunto de HBD más 40 U/ml	0,118	94	0,233	87
Suero P1	1,415	24	1,397	21
Suero P2	1,264	32	1,256	29
Suero P3	0,558	70	0,408	77
Suero P4	0,763	59	0,907	49
Suero P5	1,047	43	-	
Suero P6	0,843	55	-	
Suero P7	1,429	23	-	
HBD 1	1,745	6	1,713	4
HBD 2	1,807	2	-	
HBD 3	1,779	4	1,626	9
HBD 4	1,821	2	-	
HBD 5	1,841	1	1,660	7
HBD 6	1,762	5	1,777	0
HBD 7	1,799	3	1,767	1
HBD 8	1,783	4	1,703	4
HBD 9	1,792	3	1,669	3

HBD= suero de donante de sangre sano

U/ml son unidades de NIBSC 90/672

Los sueros P1-P7 son de pacientes con enfermedad de Graves

- 5 **Tabla 5.** Inhibición de la unión de TSH por la preparación de referencia de la OMS NIBSC 90/672 y por preparaciones de IgG y Fab de hMAb TSHR1

Muestra	Muestras diluidas en suero ¹				Muestras diluidas en tampón de ensayo			
	% de inhibición	Unidades/l	Unidades/mg	Media de unidades/mg	% de inhibición	Unidades/l	Unidades/mg	Media de unidades/mg
NIBS 90/672								
0,125 unidades/l					2			
0,25 unidades/l					4			
0,5 unidades/l					11			
1,0 unidades/l	15				19			
2,0 unidades/l	28				38			
4,0 unidades/l	48				64			
8,0 unidades/l	69				83			
40,0 unidades/l	95				94			
IgG de hMAb TSHR1								
0 ng/ml	1				0			
0,3 ng/ml	1				2			

1 ng/ml	3				3			
3 ng/ml	7				10	0,46		
10 ng/ml	21	1,48	148		33	1,73	173	
30 ng/ml	46	3,9	130	138	70	4,8	160	163
100 ng/ml	81	13,5	135		92	15,6	156	
300 ng/ml	92				95	>40		
Fab de hMAb TSHR1								
0,3 ng/ml	5				-2			
1 ng/ml	5				1			
3 ng/ml	16	1,05	351		16	0,8	265	
10 ng/ml	36	2,77	277		52	2,9	291	309
30 ng/ml	69	8,0	267	288	86	9,6	372	
100 ng/ml	89	23,7	237		92	16,9		
300 ng/ml	93				94			
IgG de 2G4 ²								
0,3 ng/ml	2				-3			
3 ng/ml	1				-6			
30 ng/ml	0				-5			
300 ng/ml	3				-4			
Fab ² de 2G4								
0,3 ng/ml	4				-5			
3 ng/ml	4				-6			
30 ng/ml	1				-5			
300 ng/ml	2				-6			

¹Conjunto de sueros de donantes de sangre sanos, solo un 14,9% de las cpm totales se unieron al TSHR en presencia de este conjunto de sueros. Solo un 14,7% de las cpm totales se unieron al TSHR en presencia de tampón.

5 ²2G4 es un autoanticuerpo monoclonal humano de peroxidasa tiroidea.

Tabla 6. Inhibición de la unión de TSH por suero de donante de linfocitos e IgG de suero de donante

Muestra	Muestras diluidas en suero ¹				Muestras diluidas en tampón de ensayo			
	% de inhibición	Unidades/l ²	Unidades/mg (o unidades/ml en suero no diluido)	Media de unidades/mg o (unidades/ml)	% de inhibición	Unidades/l ²	Unidades/mg (o unidades/ml en suero no diluido)	Media de unidades/mg o (unidades/ml)
Suero de donante								
diluido 1000x	6				10			
diluido 300x	18	1,2	(0,36)		28	1,3	(0,39)	
diluido 100x	42	13,2	(0,32)	(0,36)	62	3,9	(0,39)	(0,40)
diluido 30x	78	11,3	(0,39)		91	13,5	(0,41)	
diluido 10x	93	34			95	>40		
IgG de suero de donante								

0 mg/ml	0	0			0			
0,01 mg/l	7				19	0,87		
0,03 mg/ml	23	1,6	0,053		37	1,9	0,063	
0,1 mg/ml	57	5,1	0,051	0,054	78	6,4	0,064	0,063
0,3 mg/ml	85	17	0,057		93	19	0,063	
1 mg/ml	96	43			96	>40		
Suero del conjunto de donantes de sangre sanos								
diluido 1000x	0				3			
diluido 100x	1				4			
diluido 10x	1				11			
IgG del conjunto de donantes de sangre sanos								
0,01 mg/ml	2				2			
0,1 mg/ml	1				5			
1 mg/ml	3				7			

¹Conjunto de sueros de donantes de sangre sanos. Solo un 14,7% de las cpm totales se unieron al TSHR en presencia de este conjunto de sueros. Solo un 16,3% de las cpm totales se unieron al TSHR en presencia de tampón.

- 5 ²Las unidades mostradas son preparación de referencia de autoanticuerpo de TSHR internacional NIBSC 90/672.

Tabla 7. Actividades específicas de hMAb TSHR1 y preparaciones de suero e IgG de donante de linfocitos

Preparación	Ensayo de inhibición de la unión de TSH		Ensayo de estimulación de AMP cíclico	
	Unidades/mg ^{1,2}	Unidades/mmol ^{1,2}	Unidades/mg ¹	Unidades/mmol ¹
IgG de hMAb TSHR1	150	22	180	26
Fab de hMAb TSHR1	300	15	700	35
IgG de suero de donante	0,059	0,009	0,33	0,048
Unidades/ml de suero de donante	0,38		1,8	

¹Las unidades mostradas son de NIBSC 90/672.

²Los valores son una media de resultados obtenidos en suero y tampón de ensayo (véanse las Tablas 5 y 6).

- 10 **Tabla 8.** Sumario de actividades específicas de hMAb TSHR1 y suero e IgG de donante de linfocitos determinadas en varios ensayos de estimulación de AMP cíclico

Preparación	Unidades medias por mg	Número de determinaciones	Desviación estándar
IgG de hMAb TSHR1	318	16	189
Fab de hMAb TSHR1	492	10	184
IgG de suero de donante	0,10	10	0,08
Unidades/ml de suero de donante	0,9	4	0,6

Tabla 9. Análisis adicional de los efectos de IgG y Fab de hMAb TSHR1 y de IgG de suero de donante de linfocitos en el ensayo de estimulación de AMP cíclico

Muestra	AMP cíclico medio por pocillo (pmol)	Número de determinaciones	Desviación estándar
<u>IgG de hMAb TSHR1</u>			
0 ng/ml	0,96	6	0,048
0,3 ng/ml	1,25	6	0,12
1 ng/ml	1,84	6	0,16
3 ng/ml	3,4	5	0,37
10 ng/ml	6,6	5	0,62
<u>Fab de hMAb TSHR1</u>			
0 ng/ml	0,60	6	0,068
0,3 ng/ml	1,11	6	0,11
1 ng/ml	1,99	6	0,39
3 ng/ml	4,9	6	0,44
10 ng/ml	10,6	6	0,86
<u>MAb humano de control (2G4)¹</u>			
IgG 0 ng/ml	0,72	11	0,19
IgG 10 ng/ml	0,61	11	0,16
Fab 10 ng/ml	0,61	4	0,044
<u>IgG de suero de donante de linfocitos</u>			
3 µg/ml	1,67	6	0,38
10 µg/ml	4,20	6	0,93
30 µg/ml	6,22	6	0,73
<u>IgG de suero del conjunto de donantes de sangre sanos</u>			
30 µg/ml	0,38	6	0,10

¹2G4 es un autoanticuerpo monoclonal humano de peroxidasa tiroidea

5 **Tabla 10.** Efecto aditivo de TSH e IgG de hMAb TSHR1 en ensayos de estimulación de AMP cíclico

Experimento 1		Experimento 2	
Muestra	AMP cíclico ¹ (pmol por pocillo)	Muestra	AMP cíclico ¹ (pmol por pocillo)
A tampón solo	0,57	A tampón solo	0,42
B TSH porcina 0,1 ng/ml	1,07	B TSH porcina 0,05 ng/ml	1,07
C hMAb TSHR1 1 ng/ml	1,41	C hMAb TSHR1 0,5 ng/ml	0,92
B más C	2,08	B más C	1,92

¹Los valores mostrados son medias de determinaciones por duplicado estrechamente coincidentes.

Tabla 11. Efectos de NIBSC 90/672 en el ensayo de estimulación de AMP cíclico

Muestra	AMP cíclico medio por pocillo (pmol)	Número de determinaciones	Desviación estándar
Tampón solo	0,60	6	0,068
0,1 unidades/l	1,09	6	0,085
0,3 unidades/l	1,49	5	0,11
1,0 unidades/l	3,52	5	0,46
3,0 unidades/l	8,16	6	1,39

Tabla 12. Inhibición de la unión de 125 I-TSH a tubos recubiertos con TSHR mediante Fab de hMAb TSHR1 recombinante expresado en dos cepas de E. coli diferentes (células XL1-Blue MRF' y HB2151)

Muestra	Dilución del sobrenadante de cultivo ²	% de unión	% inhibición ³ de
Tampón de unión solo ¹		12,1	0
Sobrenadante de cultivo de células XL1-Blue MRF' no transformadas	4x	11,6	3,9
	8x	11,5	4,5
	16x	11,9	1,5
	32x	11,9	1,5
	64x	11,9	1,0
	128x	12,1	-0,5
Sobrenadante de cultivo de células XL1-Blue MRF' transformadas pero no inducidas	4x	11,5	5,0
	8x	11,6	4,2
	16x	11,8	2,2
	32x	11,1	8,4
	64x	11,7	3,4
	128x	11,1	8,0
Sobrenadante de cultivo de células XL1-Blue MRF' transformadas e inducidas	4x	1,5	87,4
	8x	2,3	81,3
	16x	4,7	60,9
	32x	7,2	40,2
	64x	8,9	26,4
	128x	10,3	14,8
Sobrenadante de cultivo de células HB2151 no transformadas	4x	11,2	7,3
	8x	11,1	8,1
	16x	10,9	9,7
	32x	10,8	10,2
	64x	10,8	10,2
	128x	10,6	12,3
Sobrenadante de cultivo de células HB2151 transformadas pero no inducidas	4x	10,7	11,6
	8x	10,5	13,3
	16x	10,6	11,8
	32x	10,7	11,4
	64x	10,9	9,6
	128x	10,6	11,8
Sobrenadante de cultivo de células HB2151 transformadas e inducidas	4x	1,0	92,0
	8x	1,0	91,4

	16x	1,3	89,0
	32x	2,2	82,0
	64x	4,3	64,1
	128x	6,7	44,8

¹Tampón de ensayo = NaCl 50 mmol/l, Tris-HCl 10 mmol/l, pH 7,8

²Todas las diluciones eran en tampón de ensayo

³Se calculó la inhibición de la unión usando la fórmula:

5 $\% \text{ de inhibición} = 100 - (A/B \times 100)$

en que A= unión en presencia de muestra de ensayo y B= unión en presencia de tampón de ensayo.

Tabla 13. Estimulación de la producción de AMPc en células CHO transfectadas con TSHR por Fab de hMAb TSHR1 recombinante expresado en dos cepas de *E. coli* diferentes (células XL1-Blue MRF' y HB2151)

Muestra	Dilución sobrenadante cultivo ²	del de	pmol/pocillo de célula	Media	Veces el nivel basal ³
Tampón de ensayo solo ¹			0,54	0,49	1
			0,44		
Sobrenadante de cultivo de células XL1-Blue MRF' no transformadas	10x		0,32	0,33	0,68
			0,35		
Sobrenadante de cultivo de células XL1-Blue MRF' transformadas pero no inducidas	10x		0,52	0,62	1,3
			0,73		
	50x		0,50	0,49	0,99
			0,48		
Sobrenadante de cultivo de células XL1-Blue MRF' transformadas e inducidas	10x		>6,4	>6,4	>13,1
			>6,4		
	50x		3,5	3,6	7,3
			3,6		
Sobrenadante de cultivo de células HB2151 no transformadas	10x		0,39	0,37	0,76
			0,35		
Sobrenadante de cultivo de células HB2151 transformadas pero no inducidas	10x		0,29	0,37	0,76
			0,45		
	50x		0,37	0,37	0,76
			0,37		
Sobrenadante de cultivo de células HB2151 transformadas e inducidas	10x		>6,4	>6,4	>13,1
			>6,4		
	50x		>6,4	>6,4	>13,1
			>6,4		

10 ¹Tampón de ensayo= disolución salina tamponada de Hanks (exenta de NaCl) que contiene glucosa 1 g/l, HEPES 20 mmol/l, sacarosa 222 mmol/l, seroalbúmina bovina (SAB) 15 g/l y 2-isobutil-1-metilxantina 0,5 mmol/l, pH 7,4

²Diluciones en tampón de ensayo

³Basal= AMPc producido en presencia de tampón de ensayo solo

Tabla 14. Inhibición de la unión de ^{125}I -TSH a tubos recubiertos con TSHR por Fab de hMAb TSHR1 recombinante, Fab de 4B4 recombinante (un MAb humano de GAD) y Fab híbridos recombinantes (HC y LC mixtos de los dos Fab). Expresión en células HB2151 de *E. coli*

ENSAYOS DE FRACCIONES PERIPLASMÁTICAS

Muestra de ensayo	Dilución de la fracción periplasmática (FP) y (concentración de Fab total en la FP no diluida)	% de unión de ^{125}I -TSH	% de inhibición ¹
Tampón de ensayo solo		11,5	0
Células no transformadas	4x 8x (id) 16x	11,8 11,8 12,2	-2,7 -2,7 -5,9
Células positivas de HC/LC de hMAb TSHR1 transformadas pero no inducidas	4x 8x (177 ng/ml) 16x	1,6 3,6 6,4	86 ^a 68 45
Células positivas de HC/LC de hMAb TSHR1 transformadas e inducidas	4x 8x (364 ng/ml) 16x	0,95 1,4 2,7	92 88 77
Células positivas de HC de hMAb TSHR1/LC de 4B4 transformadas pero no inducidas	4x 8x (id) 16x	12,0 12,1 12,4	-3,9 -4,8 -7,8
Células positivas de HC de hMAb TSHR1/LC de 4B4 transformadas e inducidas	4x 8x (83 ng/ml) 16x	11,4 11,8 11,7	0,9 -2,1 -1,8
Células positivas de HC de 4B4/LC de hMAb TSHR1 transformadas pero no inducidas	4x 8x (id) 16x	11,9 12,2 12,4	-3,5 -6,1 -7,8
Células positivas de HC de 4B4/LC de hMAb TSHR1 transformadas e inducidas	4x 8x (850 ng/ml) 16x	11,8 11,2 11,9	-2,8 3,1 -3,2
Células positivas de HC/LC de 4B4 transformadas pero no inducidas	4x 8x (id) 16x	12,1 12,0 12,1	-5,4 -4,0 -4,8
Células positivas de HC/LC de 4B4 transformadas e inducidas	4x 8x (265 ng/ml) 16x	11,7 11,7 12,0	-1,2 -1,4 -4,2

5

¹Se calculó la inhibición usando la fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - (A/B \times 100)$$

en que A= % de unión de ^{125}I -TSH en presencia de la muestra de ensayo, B= % de unión de ^{125}I -TSH en presencia de tampón de ensayo

10 ^aLa detección de la actividad del Ab de TSHR en las células no inducidas era debida a la actividad constitutiva del promotor, que da un bajo nivel de expresión de Fab en ausencia de IPTG.

Id= indetectable

Tabla 15. Inhibición de la unión de ^{125}I -TSH a tubos recubiertos con TSHR por Fab de hMAb TSHR1 recombinante, Fab de 4B4 recombinante (un MAb humano de GAD) y Fab híbridos recombinantes (HC y LC mixtos de los dos Fab). Expresión en células HB2151 de *E. coli*

ENSAYOS DE SOBRENADANTES DE CULTIVO

Muestra de ensayo	Dilución del sobrenadante de cultivo y (concentración de Fab total en el sobrenadante no diluido)	% de unión de ^{125}I -TSH	% de inhibición ¹
Tampón de ensayo solo		11,1	0
Células no transformadas	4x 8x (id) 16x	11,8 13,1 11,1	-6,5 -18 -0,3
Células positivas de HC/LC de hMAb TSHR1 transformadas pero no inducidas	4x 8x (id) 16x	10,8 12,1 11,9	2,1 -9,8 -8,1
Células positivas de HC/LC de hMAb TSHR1 transformadas e inducidas	4x 8x (421 ng/ml) 16x	1,1 1,2 1,1	91 90 90
Células positivas de HC de hMAb TSHR1/LC de 4B4 transformadas pero no inducidas	4x 8x (id) 16x	11,8 12,5 12,0	-7,0 -13,0 -1,3
Células positivas de HC de hMAb TSHR1/LC de 4B4 transformadas e inducidas	4x 8x (262 ng/ml) 16x	10,8 11,1 11,3	2,7 -0,4 -2,6
Células positivas de HC de 4B4/LC de hMAb TSHR1 transformadas pero no inducidas	4x 8x (id) 16x	11,9 12,7 11,8	-7,4 -15 -7,0
Células positivas de HC de 4B4/LC de hMAb TSHR1 transformadas e inducidas	4x 8x (84 ng/ml) 16x	10,5 10,8 11,2	4,8 2,4 -0,9
Células positivas de HC/LC de 4B4 transformadas pero no inducidas	4x 8x (id) 16x	11,9 12,6 12,0	-7,5 -14 -9,0
Células positivas de HC/LC de 4B4 transformadas e inducidas	4x 8x (522 ng/ml) 16x	10,5 11,0 11,0	-4,7 0,7 0,5

5

¹Véase la nota al pie de la Tabla 14

Id= indetectable

Tabla 16. Estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO transfectadas con Fab de hMAb TSHR1 recombinante, Fab de 4B4 recombinante (un MAb humano de GAD) y Fab híbridos recombinantes (HC y LC mixtos de los dos FAB). Expresión en células HB2151 de *E. coli*

10

ENSAYOS DE SOBRENADANTES DE CULTIVO

Muestra de ensayo ¹	Dilución del sobrenadante de cultivo ² y (concentración de Fab total en sobrenadantes no diluidos)	pmol de AMP cíclico/pocillo de célula	Media de pmol de AMP cíclico/pocillo de célula	Veces del nivel estimulación basal ³
Tampón de ensayo solo ¹		0,35 0,25 0,33	0,31	1

Células no transformadas	10x (id)	0,51 0,67 0,48	0,55	1,8
Células positivas de HC/LC de hMAb TSHR1 transformadas pero no inducidas	10 x (id)	0,84 1,80 2,13	1,59	5,1 ^a
Células positivas de HC/LC de hMAb TSHR1 transformadas e inducidas	10x (421 ng/ml)	>6,4 >6,4 >6,4	>6,4	>20
Células positivas de HC de hMAb TSHR1/LC de 4B4 transformadas pero no inducidas	10x (id)	0,55 0,63 0,58	0,59	1,9
Células positivas de HC de hMAb TSHR1/LC de 4B4 transformadas e inducidas	10x (262 ng/ml)	0,47 0,47 0,52	0,48	1,6
Células positivas de HC de 4B4/LC de hMAb TSHR1 transformadas pero no inducidas	10x (id)	0,65 0,59 0,60	0,61	2,0
Células positivas de HC de 4B4/LC de hMAb TSHR1 transformadas e inducidas	10x (84 ng/ml)	0,51 0,37 0,38	0,42	1,4
Células positivas de HC/LC de 4B4 transformadas pero no inducidas	10x (id)	0,65 0,73 0,64	0,67	2,2
Células positivas de HC/LC de 4B4 transformadas e inducidas	10x (522 ng/ml)	0,55 0,41 0,35	0,44	1,4

¹Tampón de ensayo: disolución salina tamponada de Hanks (exenta de NaCl) que contiene glucosa 1 g/l, HEPES 20 mmol/, sacarosa 222 mmol/l, seroalbúmina bovina (SAB) 15 g/l y 2-isobutil-1-metilxantina 0,5 mmol/l, pH 7,4

²Diluciones en tampón de ensayo

5 ³Basal= producción de AMP cíclico en presencia de tampón de ensayo solo

^aLa detección de la actividad de estimulación de AMP cíclico en las células no inducidas era debida a la actividad constitutiva del promotor, que da un bajo nivel de expresión de Fab en ausencia de IPTG. Los niveles de Fab recombinante total fueron indetectables (límite de detección = 5-10 ng/ml), mientras que la estimulación del ensayo de AMP cíclico puede detectar hasta 0,3 ng/ml de Fab de hMAb TSHR1-

10 id = indetectable.

Tabla 17. Estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO transfectadas con TSHR por Fab de TSHR1 recombinante, Fab de 4B4 recombinante (un MAb humano de GAD) y Fab híbridos recombinantes (HC y LC mixtos de los dos Fab). Expresión en células HB2151 de *E. coli*

ENSAYOS DE FRACCIONES PERIPLASMÁTICAS

Muestra de ensayo	Dilución de la fracción periplasmática (FP) ² y (concentración de Fab total en la FP no diluida)	pmol de AMP cíclico/pocillo de célula	Media de pmol de AMP cíclico/pocillo de célula	Veces del nivel de estimulación basal ³
Tampón de ensayo solo		0,35 0,25 0,33	0,31	1
Células no transformadas	10x (id)	0,31 0,22 0,35	0,29	0,9
Células positivas de HC/CL de hMAb TSHR1 transformadas pero no inducidas	10x (177 ng/ml)	>6,4 >6,4 >6,4	>6,4	>20,6 ^a
Células positivas de HC/LC de hMAb TSHR1 transformadas e inducidas	10x (364 ng/ml)	>6,4 >6,4 -	>6,4	>20,6 ^a
Células positivas de HC de hMAb TSHR1/LC de 4B4 transformadas pero no inducidas	10x (id)	0,40 0,33 0,33	0,35	1,1
Células positivas de HC de hMAb TSHR1/LC de 4B4 transformadas e inducidas	10x (83 ng/ml)	0,31 0,31 0,41	0,34	1,1
Células positivas de HC de 4B4/LC de hMAb TSHR1 transformadas pero no inducidas	10x (id)	0,29 0,31 0,29	0,30	1,0
Células positivas de HC de 4B4/LC de hMAb TSHR1 transformadas e inducidas	10x (850 ng/ml)	0,23 0,25 0,24	0,24	0,8
Células positivas de HC/LC de 4B4 transformadas pero no inducidas	10x (id)	0,33 0,35 0,29	0,32	1,0
Células positivas de HC/LC de 4B4 transformadas e inducidas	10x (265 ng/ml)	0,40 0,38 0,32	0,37	1,2
IgG de hMAb de TSHR1 1 ng/ml (producido por hibridoma)		2,0 2,0 2,0	2,0	6,4

5

Id: indetectable; ^{1,2,3}véanse las notas al pie de la Tabla 16

^aLa detección de la actividad del Ab de TSHR en las células no inducidas era debida a la actividad constitutiva del promotor, que da un bajo nivel de expresión de Fab en ausencia de IPTG.

Tabla 18. Inhibición de la unión de IgG de 4B4 (un MAb de GAD producido por hibridoma) a 125 I-GAD por Fab de hMAb TSHR1 recombinante, Fab de 4B4 recombinante y Fab híbridos recombinantes (HC y LC mixtos de los dos Fab). Expresión en células HB2151 de *E. coli*

ENSAYOS DE FRACCIONES PERIPLASMÁTICAS

Muestra de ensayo añadida con IgG de 4B4 y 125 I-GAD	Dilución de la fracción periplasmática (FP) y (concentración de Fab total en la FP no diluida)	% de unión de 125 I-GAD	% de inhibición ¹
Tampón de ensayo de Ab de GAD		28	0
F(ab') ₂ de 4B4 1 µg/ml (producido por hibridoma) 0,1 µg/ml 0,01 µg/ml 0,001 µg/ml		5,5 12 24 29	80 57 14 -3,9
Células no transformadas	4x 8x (id) 16x	27 28 29	0,9 -1,7 -6,3
Células positivas de HC/LC de hMAb TSHR1 transformadas pero no inducidas	4x 8x (177 ng/ml) 16x	28 28 28	-2,6 -0,5 -0,8
Células positivas de HC/LC de hMAb TSHR1 transformadas e inducidas	4x 8x (364 ng/ml) 16x	27 27 29	0,7 1,4 -4,2
Células positivas de HC de hMAb TSHR1/LC de 4B4 transformadas pero no inducidas	4x 8x (id) 16x	28 28 27	-1,1 -0,2 1,1
Células positivas de HC de hMAb TSHR1/LC de 4B4 transformadas e inducidas	4x 8x (83 ng/ml) 16x	28 28 28	-1,4 -0,7 -2,4
Células positivas de HC de 4B4/LC de hMAb TSHR1 transformadas pero no inducidas	4x 8x (id) 16x	28 28 28	-2,9 -3,2 -3,1
Células positivas de HC de 4B4/LC de hMAb TSHR1 transformadas e inducidas	4x 8x (850 ng/ml) 16x	27 28 28	1,7 -0,2 -1,0
Células positivas de HC/LC de 4B4 transformadas pero no inducidas	4x 8x (id) 16x	29 28 27	-4,4 -1,5 1,7
Células positivas de HC/LC de 4B4 transformadas e inducidas	4x 8x (265 ng/ml) 16x	21 24 26	23,2 12,5 5,6

5

¹Se calculó la inhibición de la unión usando la fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - (A/B \times 100)$$

en que A= % de unión de 125 I-GAD en presencia de la muestra de ensayo, B= % de unión de 125 I-GAD en presencia de tampón de ensayo

10 Id= indetectable.

Tabla 19. Inhibición de la unión de IgG de 4B4 (un MAb de GAD producido por hibridoma) a 125 I-GAD por Fab de hMAb TSHR1 recombinante, Fab de 4B4 recombinante y Fab híbridos recombinantes (HC y LC mixtos de los dos Fab). Expresión en HB2151 de *E. coli*.

ENSAYOS DE SOBRENADANTES DE CULTIVO

Muestra de ensayo añadida con IgG de 4B4 y 125 I-GAD	Dilución del sobrenadante de cultivo y (concentración de Fab total en el sobrenadante no diluido)	% de unión de 125 I-GAD	% de inhibición ¹
Tampón de ensayo		26	0
F(ab') ₂ de 4B4 1 µg/ml (producido por hibridoma) 0,1 µg/ml 0,01 µg/ml 0,001 µg/ml		5,2 11 22 28	80 58 15 -5,2
Células HB2151 no transformadas	4x 8x (id) 16x	28 29 28	-5,5 -9,1 -6,3
Células positivas de HC/LC de hMAb TSHR1 transformadas pero no inducidas	4x 8x (id) 16x	28 29 28	-7,0 -9,5 -5,2
Células positivas de HC/LC de hMAb TSHR1 transformadas e inducidas	4x 8x (421 ng/ml) 16x	28 28 28	-7,0 -6,4 -5,6
Células positivas de HC de hMAb TSHR1/LC de 4B4 transformadas pero no inducidas	4x 8x (id) 16x	29 29 28	-9,0 -7,9 -7,6
Células positivas de HC de hMAb TSHR1/LC de 4B4 transformadas e inducidas	4x 8x (262 ng/ml) 16x	27 28 28	-2,2 -5,5 -5,1
Células positivas de HC de 4B4/LC de hMAb TSHR1 transformadas pero no inducidas	4x 8x (id) 16x	28 28 28	-4,4 -7,0 -5,5
Células positivas de HC de 4B4/LC de hMAb TSHR1 transformadas e inducidas	4x 8x (84 ng/ml) 16x	27 28 27	-2,0 -5,7 -2,5
Células positivas de HC/LC de 4B4 transformadas pero no inducidas	4x 8x (id) 16x	28 28 27	-4,8 -4,8 -1,7
Células positivas de HC/LC de 4B4 transformadas e inducidas	4x 8x (522 ng/ml) 16x	11 14 17	59 46 34

5

¹Véase la nota al pie de la Tabla 18

Id= Indetectable

Tabla 20. Efectos de los anticuerpos monoclonales de ratón de TSHR sobre la estimulación de la producción de AMP cíclico inducida por hMAb TSHR1 en células CHO que expresan TSHR

Muestra de ensayo ¹	pmol de AMP cíclico/pocillo de célula	Media de pmol de AMP cíclico/pocillo de célula	DE	Veces del nivel de estimulación basal ³
Fab de hMAb TSHR1 5 ng/ml				
(a) tampón de ensayo ¹	3,252 2,418 -	2,835	-	3,9

(b) 2G2 ³	4,278 3,392 3,116	3,595	0,496	4,9
(c) 2B4 ⁴	3,320 2,632 2,864	2,939	0,286	4,0
(d) 9D33 ⁴	0,506 0,394 0,428	0,443	0,047	0,61
Tampón de ensayo solo ¹	0,696 0,742 0,742	0,727	0,02	1
2G2 solo ³	0,252 0,306 0,376	0,311	0,051	0,43
2B4 solo ⁴	0,298 0,318 0,376	0,331	0,033	0,46
9D33 solo ⁴	0,280 0,318 0,340	0,313	0,025	0,43

¹Todas las diluciones se hicieron en tampón de ensayo (disolución salina tamponada de Hanks (exenta de NaCl)) que contiene glucosa 1 g/l, HEPES 20 mmol/l, sacarosa 222 mmol/l, seroalbúmina bovina (SAB) 15 g/l y 2-isobutil-1-metilxantina 0,5 mmol/l, pH 7,4

5 ²Basal= producción de AMP cíclico en presencia de tampón de ensayo solo

³2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón de tiroglobulina (100 µg/ml de preparación de IgG)

⁴2B4 y 9D33 son anticuerpos monoclonales de ratón de TSHR (100 µg/ml de preparaciones de IgG)

Tabla 21. Efectos de anticuerpos monoclonales de ratón de TSHR sobre la estimulación inducida por pTSH de la producción de AMP cíclico en células CHO que expresan TSHR

Muestra de ensayo ¹	pmol de AMP cíclico/pocillo de célula	Media de pmol de AMP cíclico/pocillo de célula	DE	Veces del nivel de estimulación basal ²
pTSH 0,5 ng/ml más:				
(a) tampón de ensayo ¹	4,016 2,746 4,960	3,91	0,91	11,5
(b) 2B4 ⁴	0,878 0,710 0,742	0,78	0,07	2,3
(c) 9D33 ⁴	0,436 0,436 0,410	0,43	0,01	1,3
Tampón de ensayo solo ¹	0,384 0,318 0,318	0,34	0,03	1
2B4 solo ⁴	0,446 0,486 0,552	0,49	0,04	1,4

9D33 solo ⁴	0,332 0,362 0,304	0,33	0,02	0,97
------------------------	-------------------------	------	------	------

^{1,2,4}Véanse las notas al pie de la Tabla 20. En un experimento separado, se mostró que un MAb de ratón de control de tiroglobulina (IgG de 2G2 100 µg/ml) no tenía efecto sobre la estimulación por pTSH (0,5 ng/ml) de la producción de AMP cíclico (pTSH más tampón de ensayo= 12,7 veces el nivel basal; pTSH más 2G2 = 11,7 veces el nivel basal)

5

Tabla 22. Inhibición por diversos MAb de la unión de ¹²⁵I-TSH, ¹²⁵I-hMAb TSHR1 o ¹²⁵I-9D33 a tubos recubiertos con TSHR

IgG de ensayo y concentración (µg/ml) ¹	Inhibición de la unión de ¹²⁵ I-TSH ²	Inhibición de la unión de ¹²⁵ I-hMAb TSHR1 ²	Inhibición de la unión de ¹²⁵ I-9D33 ²
IgG de 9D33	0,001 0 0,01 17 0,1 34 1 58 10 68	0 3 21 44 56	4 9 35 64 71
IgG de 2B4	0,001 15 0,01 36 0,1 62 1 83 10 85	0 0 0 11 18	4 5 15 22 22
IgG de hMAb TSHR1	0,001 13 0,01 60 0,1 89 1 94 10 95	41 70 88 93 94	1,1 18 72 90 93

¹Todas las diluciones estaban en un conjunto de sueros de donantes de sangre sanos (conjunto HBD)

10 ²Se calculó la inhibición de la unión usando la fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - (A/B \times 100)$$

en que A: % de unión en presencia de muestra de ensayo y B= % de unión en presencia del conjunto de HBD

El Mab de ratón de control de tiroglobulina (2G2, 0,001-100 µg/ml) no tenía efecto sobre la unión de TSH, hMAb TSHR1 o 9D33 marcados.

15 **Tabla 23.** Efecto de los sueros de paciente sobre la unión de ¹²⁵I-9D33 y la unión de ¹²⁵I-TSH a tubos recubiertos con TSHR

Suero de ensayo ¹	¹²⁵ I-9D33 unido (% de las cuentas totales añadidas)	Inhibición de la unión de ¹²⁵ I-9D33 (%) ²	Inhibición de la unión de ¹²⁵ I-TSH (%) ²
Conjunto de HBD	11	0	0
G1	2,2	79	90
G2	4,3	74	59
G3	3,2	69	78
G4	5,8	45	50
G5	4,0	62	78
G6	5,1	67	51
G7	5,9	44	74
G8	2,6	75	82

G9	2,0	81	90
G10	5,5	48	62
G11	3,1	62	59
G12	4,0	43	51
G13	6,0	50	59
G14	5,3	71	80
G15	3,1	77	98
G16	2,4	80	93
G17	2,1	84	94
G18	1,7	73	83
G19	2,9	80	94
G20	2,1	71	80
A1	10	1,9	0
A2	10	2,3	0
D1	11	0	0
D2	10	4,5	0
N1	12	-15	6,7
N2	7,9	25	4,1
N3	11	0	6,3
N4	11	-5,0	6,5
N5	9,1	14	6,3
N6	11	-2,1	7,2
N7	14	-37	-1,4
N8	11	-2,1	5,9
N9	12	-9,8	6,7

¹Conjunto de HBD= conjunto de sueros de donantes de sangre sanos

G1-G20 son sueros de pacientes con enfermedad de Graves

5 D1 y D2 son de pacientes con diabetes sacarina de tipo I (positivos de autoanticuerpos de ácido glutámico descarboxilasa)

A1 y A2 son de pacientes con enfermedad de Addison (positivos de autoanticuerpos de esteroide 21-hidroxilasa)

N1-N9 son de donantes de sangre sanos individuales

²Se calculó la inhibición de la unión usando la fórmula:

% de inhibición= $100 - (A/B \times 100)$

10 en que A: % de unión en presencia de muestra de ensayo y B= % de unión en presencia de un conjunto de sueros de donantes de sangre sanos.

Tabla 24. Efecto de sueros de paciente con actividades agonista de TSH y antagonista de TSH sobre la unión de ¹²⁵I-9D33 a tubos recubiertos con TSHR

Muestra de ensayo y dilución ¹	¹²⁵ I-9D33 unido (% de cuentas totales añadidas)	Inhibición de la unión de ¹²⁵ I-9D33 ² (%)
Conjunto de HBD	11	0
Suero A 1:320	6,4	39

	1:160	4,7	55
	1:80	3,3	69
	1:40	2,8	73
	1:20	2,4	77
	1:10	2,0	82
Suero B	1:320	9,1	13
	1:160	8,3	21
	1:80	6,4	39
	1:40	4,9	53
	1:20	3,8	64
	1:10	2,5	76
Suero C	1:320	9,7	7,6
	1:160	8,9	15
	1:80	8,0	24
	1:40	6,3	40
	1:20	5,1	51
	1:10	3,7	65
Suero D	1:320	9,4	11
	1:160	8,2	22
	1:80	7,2	32
	1:40	5,2	51
	1:20	4,3	59
	1:10	3,3	69

¹Conjunto de HBD = conjunto de sueros de donantes de sangre sanos; los sueros de ensayo se diluyeron en este conjunto

Los sueros A y B tienen actividad antagonista de TSH y los sueros C y D actividad agonista de TSH

5 ²Se calculó la inhibición de la unión con la fórmula usada en la Tabla 23.

Tabla 25. Efecto de NIBSC 90/672 sobre la unión de ¹²⁵I-9D33 y la unión de ¹²⁵I-TSH a tubos recubiertos con TSHR

Concentración de 90/672 ¹	¹²⁵ I-9D33 unido (% de cuentas totales añadidas)	Inhibición de la unión de ¹²⁵ I-9D33 ² (%)	Inhibición de la unión de ¹²⁵ I-TSH2 (%)
40 U/l	4,1	72	92
8 U/l	7,1	52	68
2 U/l	11	28	23
1 U/l	13	10	12
0 U/l	15	0	0

¹90/672 diluido en un conjunto de sueros de donantes de sangre sanos

²Se calculó la inhibición de la unión con la fórmula usada en la Tabla 23.

Tabla 26. Inhibición de la unión de Fab de ^{125}I -hMAb TSHR1 a tubos recubiertos de TSHR por anticuerpos policlonales antiidiotípicos de hMAb TSHR1 en sueros de un ratón inmunizado con Fab de hMAb TSHR1

Muestra de ensayo	Dilución ¹ de la muestra de ensayo	% de inhibición ² de la unión de Fab de ^{125}I -hMAb TSHR1 a TSHR
Tampón de ensayo		0
Sueros de un ratón inmunizado con Fab de hMAb TSHR1	1:100.000	1,3
	1:50.000	7,9
	1:10.000	49,8
	1:5.000	73,0
	1:1.000	94,8
Suero de ratón no inmunizado	1:500	-0,8

¹Muestras de ensayo diluidas en tampón de ensayo. La unión en presencia de tampón de ensayo fue de un 43%

5 ²Se calculó la inhibición de la unión usando la fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - (A/B - 100)$$

en que

A= % de unión de Fab de ^{125}I -hMAb TSHR1 en presencia de muestra de ensayo y B= % de unión de Fab de ^{125}I -hMAb TSHR1 en presencia de tampón de ensayo.

10 **Tabla 27.** Inhibición de la unión de Fab de ^{125}I -hMAb TSHR1 a tubos recubiertos de TSHR por un anticuerpo monoclonal antiidiotípico de ratón IgG de 7E51

Muestra de ensayo	% de unión de Fab de ^{125}I -hMAb TSHR1 a TSHR	% de inhibición ¹ de la unión de Fab de ^{125}I -hMAb TSHR1
Tampón de ensayo solo	16,3	0
IgG de 7E51 diluido en tampón de ensayo	1 µg/ml	11,0
	10 µg/ml	60,7
	100 µg/ml	89,4

¹Véase la nota al pie de la Tabla 26.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> RSR Limited
- <120> Copartícipes de unión para el receptor de tirotropina y usos de los mismos
- <130> P452347WO
- 5 <150> GB 0227964.4
- <151> 29-11-2002
- <150> GB 0302140.9
- <151> 29-01-2003
- <150> GB 0315147.9
- 10 <151> 27-06-2003
- <160> 38
- <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 121
- 15 <212> PRT
- <213> humano
- <400> 1

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

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

5 <213> humano

<400> 2

Ser Tyr Trp Ile Asn

1 5

<210> 3

10 <211> 17

<212> PRT

<213> humano

<400> 3

Arg Ile Asp Pro Thr Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

15 <210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> humano

<400> 4

5 Leu Glu Pro Gly Tyr Ser Ser Thr Trp Ser Val Asn
1 5 10

<210> 5

<211> 131

<212> PRT

<213> humano

10 <400> 5

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Arg Gly Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Leu Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Thr Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Lys Gly His Val Thr Val Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Gly Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Glu Pro Gly Tyr Ser Ser Thr Trp Ser Val Asn Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro
130

<210> 6

<211> 111

15 <212> PRT

<213> humano

<400> 6

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

<210> 7

<211> 13

5 <212> PRT

<213> humano

<400> 7

Ser Gly Asn Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Ala Val Asn
 1 5 10

<210> 8

10 <211> 7

<212> PRT

<213> humano

<400> 8

Tyr Asp Asp Gln Leu Pro Ser
 1 5

15 <210> 9

<211> 11

<212> PRT

ES 2 371 244 T3

<213> humano

<400> 9

Thr Ser Trp Asp Asp Ser Leu Asp Ser Gln Leu
1 5 10

<210> 10

5 <211> 363

<212> ADN

<213> humano

<400> 10

```

caaatgcagc tggatgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc    60
tcctgtaggg gttctggata caggtttacc agctactgga tcaactgggt gcgccagctg    120
cccgggaaag gcctagagtg gatgggcagg attgataccta ctgactctta taccaactac    180
agtccatcct tcaaaggcca cgtcaccgtc tcagctgaca agtccatcaa cactgcctac    240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accggcatgt attactgtgc gaggctcgaa    300
ccgggctata gcagcacctg gtccgtaa at tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc    360
tca

```

10 <210> 11

<211> 15

<212> ADN

<213> humano

<400> 11

15 agctactgga tcaac 15

<210> 12

<211> 51

<212> ADN

<213> humano

20 <400> 12

```

aggattgata ctactgactc ttataccaac tacagtccat ccttcaaagg c    51

```

<210> 13

<211> 36

<212> ADN

	<213>	humano	
	<400>	13	
		ctcgaaccgg gctatagcag cacctgggtcc gttaa	36
	<210>	14	
5	<211>	394	
	<212>	ADN	
	<213>	humano	
	<400>	14	
		caaatgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc	60
		tcctgtaggg gttctggata caggtttacc agctactgga tcaactgggt gcgccagctg	120
		cccgggaaag gcctagagtg gatgggcagg attgatccta ctgactctta taccaactac	180
		agtccatcct tcaaaggcca cgtcaccgtc tcagctgaca agtccatcaa cactgcctac	240
		ctgcagtgga gcagcctgaa ggccctggac accggcatgt attactgtgc gaggctcgaa	300
		ccgggctata gcagcacctg gtccgtaaat tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc	360
10		tcagcctcca ccaagggcc atcgggtcttc cccc	394
	<210>	15	
	<211>	333	
	<212>	ADN	
	<213>	humano	
15	<400>	15	
		ctgcctgtgc tgactcagcc accctcggtg tctggagccc ccaggcagag ggtcaccatc	60
		tcctgttctg gaaacagctc caacatcgga aataatgctg taaactggta ccagcagctc	120
		ccaggaaagg ctcccaaact cctcatttat tatgatgac aactgccctc aggggtctct	180
		gaccgattct ctggctccag gtctggcacc tccgcctccc tggccatccg tgggctccag	240
		tctgaggatg aggttgatta ttactgtaca tcatgggatg acagcctgga tagtcaactg	300
		ttcggcggag ggaccaggct gaccgtccta ggt	333
	<210>	16	
	<211>	39	
	<212>	ADN	
20	<213>	humano	
	<400>	16	

tctggaaaca gctccaacat cggaaataat gctgtaaac

39

<210> 17

<211> 21

<212> ADN

5 <213> humano

<400> 17

tatgatgatac aactgccctc a

21

<210> 18

<211> 33

10 <212> ADN

<213> humano

<400> 18

acatcatggg atgacagcct ggatagtcaa ctg

33

<210> 19

15 <211> 119

<212> PRT

<213> ratón

<400> 19

Asp Val Gln Ile Gln Gln Pro Gly Thr Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Asn Tyr Gly Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

5 <213> ratón

<400> 20

Thr Tyr Trp Met His
1 5

<210> 21

<211> 17

10 <212> PRT

<213> ratón

<400> 21

Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 22

15 <211> 10

<212> PRT

<213> ratón

<400> 22

Asn Tyr Gly Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 23
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> ratón

5 <400> 23

```

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

<210> 24
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> ratón

10 <400> 24

Gly Val Glu Met Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Thr Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

5 <213> ratón

<400> 25

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10

<210> 26

<211> 7

10 <212> PRT

<213> ratón

<400> 26

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 27

15 <211> 9

<212> PRT

<213> ratón

<400> 27

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr
1 5

<210> 28

<211> 110

<212> PRT

5 <213> ratón

<400> 28

Gly Val Glu Met Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Thr Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Leu Met Leu
100 105 110

<210> 29

<211> 357

10 <212> ADN

<213> ratón

<400> 29

gacgtccaga tccagcagcc tgggactgag cttgtgaagc ctggggcttc agtgagactg 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc acctactgga tgcactgggt gaagcagagg 120
cctggacaag gccttgagtg gatcggagag attgatcctt ctgatagtta tactaactat 180
aatcaaaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcacctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgttc aagaaactac 300
ggtagtggtt actactttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctcctca 357

<210> 30

	<211>	15	
	<212>	ADN	
	<213>	ratón	
	<400>	30	
5	acctactgga tgcac		15
	<210>	31	
	<211>	51	
	<212>	ADN	
	<213>	ratón	
10	<400>	31	
	gagattgatc cttctgatag ttatactaac tataatcaaa agttcaaggg c		51
	<210>	32	
	<211>	30	
	<212>	ADN	
15	<213>	ratón	
	<400>	32	
	aactacggta gtggctacta ctttgactac		30
	<210>	33	
	<211>	373	
20	<212>	ADN	
	<213>	ratón	
	<400>	33	
	gacgtccaga tccagcagcc tgggactgag cttgtgaagc ctggggcttc agtgagactg		60
	tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc acctactgga tgcactgggt gaagcagagg		120
	cctggacaag gccttgagtg gatcggagag attgatcctt ctgatagtta tactaactat		180
	aatcaaaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac		240
	atgcacctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgttc aagaaactac		300
	ggtagtggct actactttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctcctcagcc		360
	aaaacaacac ccc		373
	<210>	34	

ES 2 371 244 T3

	<211>	318	
	<212>	ADN	
	<213>	ratón	
	<400>	34	
	ggcgttgaga tgacacagtc gccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc	60	
	atgacctgca gtgccagctc aagtgttaagt tacatgcact ggtaccagca gaagtcaggc	120	
	acctcccca aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcgc	180	
	ttcagtgcca gtgggtctgg gacctcttac tctctcaca tcagcagcat ggagactgaa	240	
	gatgctgcc cttattactg ccagcagtg agtagtaacc cgtggacgtt cggaggaggc	300	
5	accaaactgg aaatcaaa	318	
	<210>	35	
	<211>	30	
	<212>	ADN	
	<213>	ratón	
10	<400>	35	
	agtgccagct caagtgttaag ttacatgcac	30	
	<210>	36	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
15	<213>	ratón	
	<400>	36	
	gacacatcca aactggcttc t	21	
	<210>	37	
	<211>	27	
20	<212>	ADN	
	<213>	ratón	
	<400>	37	
	cagcagtgga gtagtaaccc gtggacg	27	
	<210>	38	
25	<211>	331	

ES 2 371 244 T3

<212> ADN

<213> ratón

<400> 38

```
ggcgttgaga tgacacagtc gccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
atgacctgca gtgccagctc aagtgttaagt tacatgcact ggtaccagca gaagtcaggc 120
acctcccca aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcgc 180
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcaca tcagcagcat ggagactgaa 240
gatgctgccca cttattactg ccagcagtgg agtagtaacc cgtggacgtt cggaggaggc 300
accaaactgg aaatcaaacg gctgatgctg c 331
```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humano o recombinante humano del receptor de TSH, o uno o más fragmentos del mismo, caracterizado por una actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH marcada con ¹²⁵I al receptor de TSH, determinada usando tubos recubiertos con receptor de TSH, de al menos aproximadamente 15 unidades del estándar internacional NIBSC 90/762 por mg.
2. Un anticuerpo monoclonal humano o recombinante humano o fragmento del mismo según la reivindicación 1, caracterizado por una actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH marcada con ¹²⁵I al receptor de TSH, determinada usando tubos recubiertos con receptor de TSH, de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/762 por mg.
3. Un anticuerpo monoclonal humano o recombinante humano o fragmento del mismo según la reivindicación 2, caracterizado por una actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH marcada con ¹²⁵I al receptor de TSH, determinada usando tubos recubiertos con receptor de TSH, de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/762 por mg.
4. Un anticuerpo monoclonal humano o recombinante humano o fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por una actividad estimulante con respecto a la producción de AMP cíclico por células CHO que expresan aproximadamente 50.000 receptores de TSH humana por célula de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/762 por mg.
5. Anticuerpo monoclonal humano o recombinante humano o fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por una actividad estimulante con respecto a la producción de AMP cíclico por células CHO que expresan aproximadamente 50.000 receptores de TSH humana por célula de al menos aproximadamente 50 unidades del estándar internacional NIBSC 90/762 por mg.
6. Anticuerpo monoclonal humano o recombinante humano o fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por una actividad estimulante con respecto a la producción de AMP cíclico por células CHO que expresan aproximadamente 50.000 receptores de TSH humana por célula de al menos aproximadamente 240 unidades del estándar internacional NIBSC 90/762 por mg.
7. Un anticuerpo monoclonal humano o recombinante humano o fragmento del mismo según la reivindicación 1, en el que
 - (i) la actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH marcada con ¹²⁵I al receptor de TSH, determinada usando tubos recubiertos con receptor de TSH, es de al menos aproximadamente 15 unidades del estándar internacional NIBSC 90/762 por mg; y en el que dicho anticuerpo se caracteriza adicionalmente porque
 - (ii) la actividad estimulante con respecto a la producción de AMP cíclico por células CHO que expresan aproximadamente 50.000 receptores de TSH por célula es de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/762 por mg.
8. Un anticuerpo monoclonal humano o recombinante humano o fragmento del mismo según la reivindicación 7, en el que
 - (i) la actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH marcada con ¹²⁵I al receptor de TSH, determinada usando tubos recubiertos con receptor de TSH, es de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/762 por mg; y en el que dicho anticuerpo se caracteriza adicionalmente porque
 - (ii) la actividad estimulante con respecto a la producción de AMP cíclico por células CHO que expresan aproximadamente 50.000 receptores de TSH por célula es de al menos aproximadamente 240 unidades del estándar internacional NIBSC 90/762 por mg.
9. Un anticuerpo monoclonal humano o recombinante humano o fragmento del mismo según la reivindicación 7, caracterizado por
 - (i) una actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH marcada con ¹²⁵I al receptor de TSH, determinada usando tubos recubiertos con receptor de TSH, de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/762 por mg; y

(ii) una actividad estimulante con respecto a la producción de AMP cíclico por células CHO que expresan aproximadamente 50.000 receptores de TSH por célula de al menos aproximadamente 50 unidades del estándar internacional NIBSC 90/762 por mg.

- 5 10. Un anticuerpo monoclonal humano o recombinante humano o fragmento del mismo del receptor de TSH que comprende un dominio V_H de anticuerpo seleccionado del grupo consistente en un dominio V_H como se muestra en la SEQ ID NO 1 y un dominio V_H que comprende las regiones CDR1 de V_H , CDRII de V_H y CDRIII de V_H de secuencias aminoacídicas como se muestran en la SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4, respectivamente, y un dominio V_L seleccionado del grupo consistente en un dominio V_L como se muestra en la SEQ ID NO 6 y un dominio V_L que comprende las regiones CDRI de V_L , CDRII de V_L y CDRIII de V_L de secuencias aminoacídicas como se muestran en las SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8 y SEQ ID NO 9, respectivamente.
- 10 11. Un anticuerpo monoclonal humano o recombinante humano o fragmento del mismo según la reivindicación 10, que comprende un dominio V_H de anticuerpo como se muestra en la SEQ ID NO 1.
- 15 12. Un anticuerpo monoclonal humano o recombinante humano o fragmento del mismo según la reivindicación 10, que comprende un dominio V_H de anticuerpo que comprende las regiones CDRI de V_H , CDRII de V_H y CDRIII de V_H de secuencias aminoacídicas como se muestran en la SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4, respectivamente.
- 20 13. Un anticuerpo monoclonal humano o recombinante humano o fragmento del mismo según la reivindicación 10, que comprende un dominio V_H de anticuerpo como se muestra en la SEQ ID NO 1 emparejado con un dominio V_L de anticuerpo como se muestra en la SEQ ID NO 6, proporcionando un sitio de unión de anticuerpo que comprende ambos de dichos dominios V_H y V_L del receptor de TSH.
14. Un anticuerpo monoclonal humano o recombinante humano o fragmento del mismo según la reivindicación 10, que comprende:
un dominio V_H de anticuerpo que comprende:
un dominio V_H que comprende las regiones CDRI de V_H , CDRII de V_H , CDRIII de V_H de secuencias aminoacídicas como se muestran en la SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4, respectivamente, y
un dominio V_L de anticuerpo que comprende:
un dominio V_L que comprende las regiones CDRI de V_L , CDRII de V_L , CDRIII de V_L de secuencias aminoacídicas como se muestran en la SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8 y SEQ ID NO 9, respectivamente.
- 30 15. Un anticuerpo adicional o fragmento del mismo capaz de unirse al receptor de TSH y que compite por la unión al receptor de TSH con un anticuerpo monoclonal humano o anticuerpo recombinante humano del receptor de TSH o un fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado por una actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH marcada con ^{125}I al receptor de TSH, determinada usando tubos recubiertos de receptor de TSH, de al menos aproximadamente 15 unidades del estándar internacional NIBSC 90/762 por mg.
- 35 16. Un anticuerpo adicional o fragmento del mismo según la reivindicación 15 que comprende un sitio de unión para una región epitópica del receptor de TSH y que compite por la unión al receptor de TSH con un anticuerpo o fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
17. Un anticuerpo adicional o fragmento del mismo según la reivindicación 15 que comprende, o deriva de, un anticuerpo monoclonal humano o anticuerpo recombinante humano, o uno o más fragmentos del mismo, reactivo con el receptor de TSH.
- 40 18. Un anticuerpo adicional o fragmento de mismo según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, caracterizado por una actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH marcada con ^{125}I al receptor de TSH, determinada usando tubos recubiertos con receptor de TSH, de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/762 por mg.
- 45 19. Un anticuerpo adicional o fragmento de mismo según la reivindicación 18, en el que la acción inhibidora con respecto a la unión de TSH marcada con ^{125}I al receptor de TSH es de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/762 por mg.
- 50 20. Un anticuerpo adicional o fragmento de mismo según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en el que la actividad estimulante con respecto a la producción de AMP cíclico por células CHO que expresan aproximadamente 50.000 receptores de TSH humanos por célula es de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/762 por mg.
21. Un anticuerpo adicional o fragmento de mismo según la reivindicación 20, en el que la actividad estimulante con respecto a la producción de AMP cíclico por células CHO que expresan aproximadamente 50.000 receptores de TSH humanos por célula es de al menos aproximadamente 240 unidades del estándar internacional NIBSC 90/762

por mg.

22. Un anticuerpo adicional o fragmento del mismo según la reivindicación 15, caracterizado por

5 (i) una actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH marcada con ¹²⁵I al receptor de TSH, determinada usando tubos recubiertos con receptor de TSH, de al menos aproximadamente 15 unidades del estándar internacional NIBSC 90/762 por mg; y en el que dicho anticuerpo se caracteriza adicionalmente por

(ii) una actividad estimulante con respecto a la producción de AMP cíclico por células CHO que expresan aproximadamente 50.000 receptores de TSH por célula de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/762 por mg.

23. Un anticuerpo adicional o fragmento del mismo según la reivindicación 15, caracterizado por

10 (i) una actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH marcada con ¹²⁵I al receptor de TSH, determinada usando tubos recubiertos con receptor de TSH, de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/762 por mg; y en el que dicho anticuerpo se caracteriza adicionalmente por

15 (ii) una actividad estimulante con respecto a la producción de AMP cíclico por células CHO que expresan aproximadamente 50.000 receptores de TSH por célula de al menos aproximadamente 240 unidades del estándar internacional NIBSC 90/762 por mg.

24. Un polinucleótido que comprende:

(i) una secuencia polinucleotídica como se muestra en las SEQ ID NO 10 o SEQ ID NO 15, que codifica una secuencia aminoacídica de un dominio V_H o dominio V_L de anticuerpo como se muestra en las SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 6 respectivamente; o

20 (ii) una secuencia nucleotídica que codifica un anticuerpo monoclonal humano o recombinante humano o fragmento del mismo del receptor de TSH según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, o que codifica una secuencia aminoacídica de un dominio V_H o dominio V_L de anticuerpo de un anticuerpo o fragmento del mismo del receptor de TSH según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14; o

25 (iii) una secuencia nucleotídica que difiere de cualquier secuencia de (i) en la secuencia de codones debido a la degeneración del código genético; o

(iv) una secuencia nucleotídica que comprende un fragmento de cualquiera de las secuencias de (i), (ii) o (iii) y que codifica un fragmento Fab, un fragmento Fd, un fragmento Fv, un fragmento dAB, fragmentos F(ab')₂ o un fragmento scFV de un anticuerpo monoclonal humano o recombinante humano o fragmento del mismo del receptor de TSH según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14.

30 25. Un sistema de vector biológicamente funcional que porta un polinucleótido según la reivindicación 24 y que es capaz de introducir el polinucleótido en el genoma de un organismo hospedador.

26. Una célula hospedadora transformada con un polinucleótido según la reivindicación 25.

35 27. Uno o más anticuerpos antiidiotípicos generados en una región de unión de un anticuerpo monoclonal humano o recombinante humano o fragmento del mismo o un anticuerpo adicional o fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23.

28. Un anticuerpo monoclonal humano o recombinante humano o fragmento del mismo o un anticuerpo adicional o fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 para uso en terapia.

40 29. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal humano o recombinante humano o fragmento del mismo o un anticuerpo adicional o fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, junto con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

30. Uso de un anticuerpo monoclonal humano o recombinante humano o fragmento del mismo o un anticuerpo adicional o fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 4-14 y 20-23 en la fabricación de un medicamento para uso en la estimulación del tejido tiroideo o tejido que contiene un receptor de TSH.

45 31. Uso de un anticuerpo monoclonal humano o recombinante humano o fragmento del mismo o un anticuerpo adicional o fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de cáncer de tiroides.

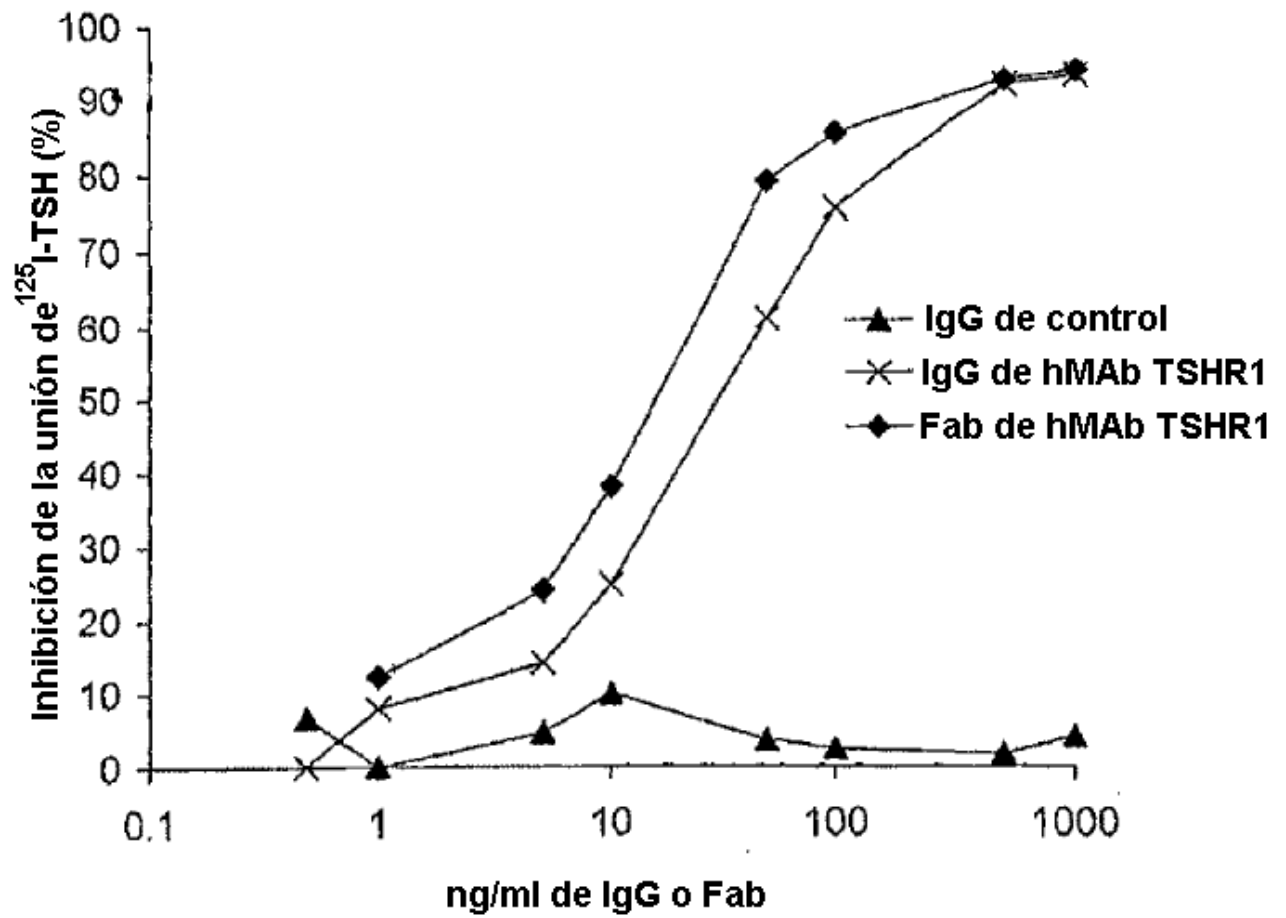


Figura 1. Inhibición de la unión de TSH marcada a tubos recubiertos con TSHR por IgG y Fab de hMAb TSHR1. La IgG de control era un autoanticuerpo monoclonal humano de GAD₆₅

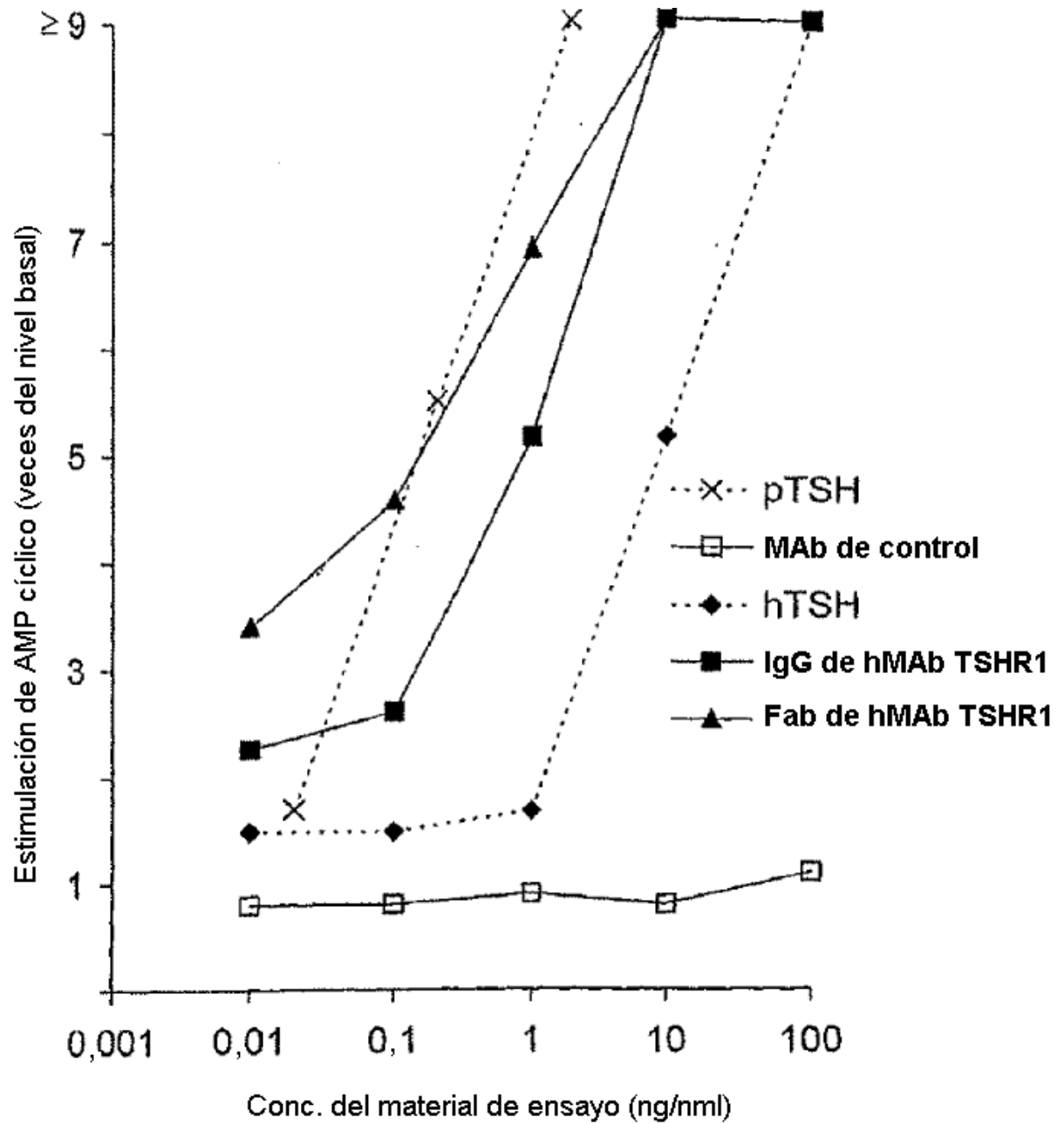


Figura 2. Actividades estimulantes del tiroides de IgG y Fab de hMAb TSHR1, TSH porcina (70 unidades/mg, pTSH), TSH humana recombinante (6,7 unidades/mg, hTSH) y un anticuerpo monoclonal de control (MAb, un autoanticuerpo monoclonal humano de peroxidasa de tiroides (2G4)). Basal= AMPc producido en presencia de solo disolución salina tamponada de Hanks exenta de NaCl.

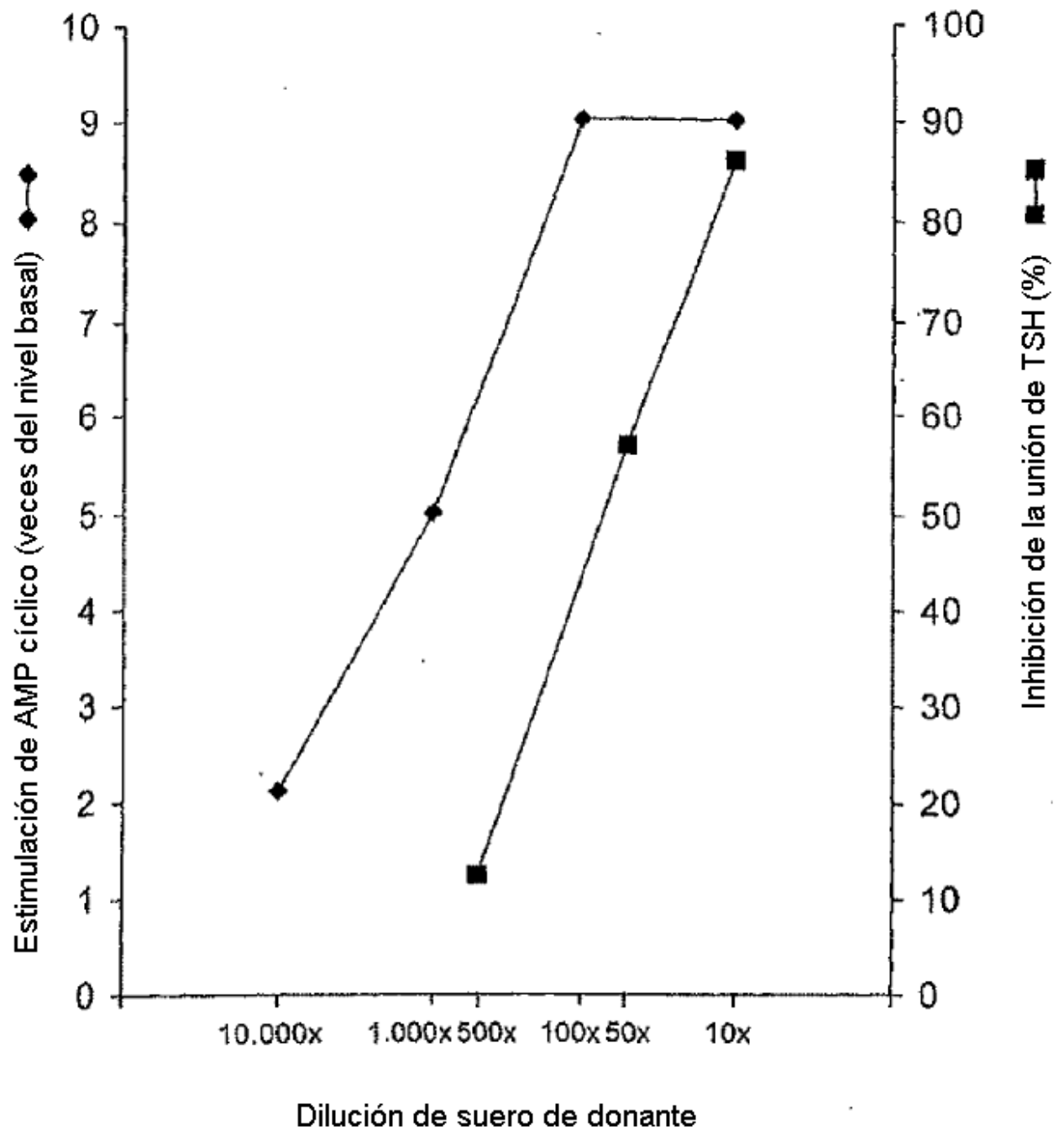


Figura 3. Efecto del suero de donante de linfocitos sobre la inhibición de la unión de TSH a TSHR y sobre la estimulación del AMP cíclico en células CHO transfectadas con TSHR. En el caso del ensayo de inhibición de la unión, se diluyó el suero en un conjunto de sueros de donantes de sangre sanos. Para el ensayo de estimulación, se diluyó el suero en disolución salina tamponada de Hanks exenta de NaCl. Los sueros de donantes de sangre sanos (n= 3) dieron respuestas en el intervalo de 1,1-1,3 veces el nivel basal.

Figura 3a. Comparación de un ELISA de autoanticuerpos de TSHR según la presente invención con ensayos anteriores, en particular, un ELISA basado en TSH-biotina descrito por J. Bolton, J. Sanders, Y. Oda, C. Chapman, R. Cono, J. Fumaniak, B. Rees Smith "Measurement of thyroid-stimulating hormone receptor autoantibodies by ELISA", *Clinical Chemistry* 1999, volumen 45, pág. 2285-2287 y el RIA original descrito por K. Southgate, F.M. Creagh, M. Teece, C. Kingswood, B. Rees Smith. "A receptor assay for the measurement of TSH receptor antibodies in unextracted serum", 1984, *Clinical Endocrinology*, volumen 20, pág. 539-543.

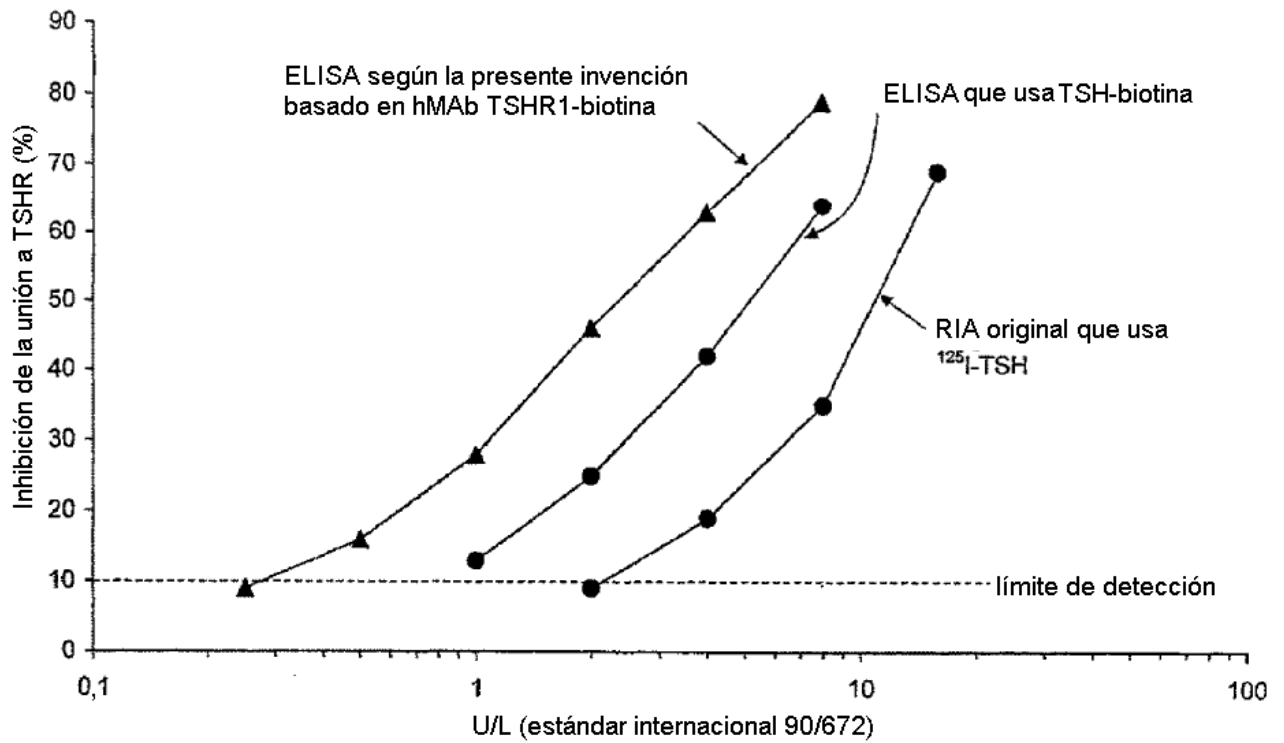


Figura 3b. Comparación de un ELISA de autoanticuerpos de TSHR según la presente invención y un ELISA basado en TSH-biotina descrito por J. Bolton, J. Sanders, Y. Oda, C. Chapman, R. Cono, J. Fumaniak, B. Rees Smith "Measurement of thyroid-stimulating hormone receptor autoantibodies by ELISA", *Clinical Chemistry* 1999, volumen 45, pág. 2285-2287. Se compararon los sueros de 72 pacientes con enfermedad de Graves. $y = 1,1154x - 13,032$, $r = 0,99$

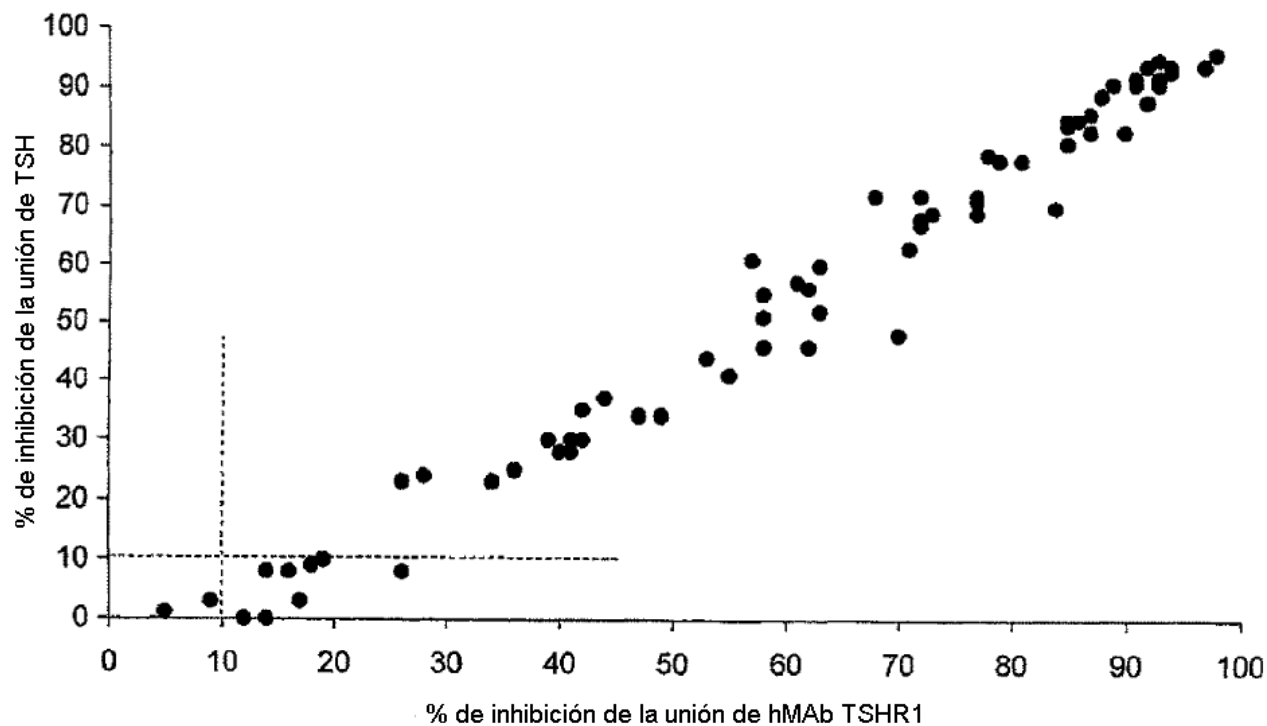


Figura 4. Secuencia nucleotídica de las regiones V, D y J de la cadena pesada de hMAb TSHR1

Figura 4a

```

caaatgcagctggtgcagtcctggagcagaggtgaaaaagcccggggagtc
tctgaagatctcctgtaggggttctggatacaggtttaccagctactgga
tcaactgggtgcgccagctgccgggaaaggcctagagtggatgggcagg
attgatcctactgactcttataccaactacagtcctatccttcaaaggcca
cgtcaccgctctcagctgacaagtccatcaacaactgcctacctgcagtgga
gcagcctgaaggcctcggacacccggcatgtattactgtgcgaggctcgaa
ccgggctatagcagcacctggtcggtaaattggggccagggaaccctggt
cacogtctctcagcctccaccaaggggcccatcggtcttcccc

```

Figura 4b

caaatgcagctgggtgcagctctggagcagaggtgaaaaagcccggggagtc	50
cebador de PCR	
tctgaagatctcctgtaggggttctggatacaggtttaccagotactgga	100
CDR I	
tcaactgggtgcgccagctgccgggaaaggcctagagtggatgggcagg	150
CDR II	
attgatcctactgactcttataccaggtacagtcctatccttcaaaggcca	200
cgtcaccgtctcagctgacaagtcctcaacactgcctacctgcagtggga	250
gcagcctgaaggcctcggacacccggcatgtattactgtgcgaggctcgaa	300
CDR III	
ccgggctataggagcaacctggtccgtaaatgggggccagggaaccctggt	350
región constante	
caccgtctcctcagcctccacccaaggggcccatcggtcttccccc	394

Figura 5. Secuencia aminoacídica de las regiones V, D y J de la cadena pesada de hMAb TSHR1

Figura 5a

QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCRGSGYRFTSYWINWVRQLPGKGLEWMGR
 IDPTDSYTNYSFSGHVTVSADKSINTAYLQWSSLKASDTGMYICARLE
 PGYSSTWSVNWQGTLVTVSSASTKGPSVFP

Figura 5b

QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCRGSGYRFT	SYWINWVRQLPGKGLEWMGR	50
	CDR I	
IDPTDSYTNYSFSGH	VTVSADKSINTAYLQWSSLKASDTGMYICAR LE	100
CDR II		
PGYSSTWSVNW	QGTLVTVSSASTKGPSVFP	131
CDR III	región constante	

Figura 6. Secuencia de ADN de la cadena ligera de hMAb TSHR1

Figura 6a

ctgcctgtgctgactcagccaccctcggtgtctggagccccaggcagag
ggtcaccatctcctgttctggaacagctccaacatcggaataatgctg
taaactgggtaccagcagctcccaggaaaggctcccaaactcctcatttat
tatgatgatcaactgccctcaggggtctctgaccgattctctggctccag
gtctggcacctccgctccctggccatccgtgggctccagtctgaggatg
aggctgattattactgtacatcatgggatgacagcctggatagtcgaactg
ttcggcggaggaggaccaggctgaccgtcctaggt

Figura 6b

ctgcctgtgctgactcagccaccctcggtgtctggagccccaggcagag	50
cebador de PCR	
ggtcaccatctcctgtctggaacagctccaacatcggaataatgctg	100
CDR I	
taaactgggtaccagcagctcccaggaaaggctcccaaactcctcatttat	150
tatgatgatcaactgccctcaggggtctctgaccgattctctggctccag	200
CDR II	
gtctggcacctccgctccctggccatccgtgggctccagtctgaggatg	250
aggctgattattactgtacatcatgggatgacagcctggatagtcgaactg	300
CDR III	
ttcggcggaggaggaccaggctgaccgtcctaggt	333

Figura 7. Secuencia de proteína de la cadena ligera de hMAb TSHR1

Figura 7a

LTVLTPPPSVSGAPRQRVTISCSGNSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIY
YDDQLPSGVSDRFSGSRSGTSASLAIRGLQSEDEADYYCTSWDDSLDSQL
FGGGTRLTVLG

Figura 7b

LTVLTPPPSVSGAPRQRTISC	SGNSSNIGNNAVN	WYQQLPGKAPKLLIY	50
CDR I			
YDDQLPS	GVSDRFSGSRSGTSASLAIRGLQSEDEADYYC	PSWDESLDSOL	100
CDR II		CDR III	
FGGGTRLTVLG			111

Figura 8. Efectos de los sueros de dos pacientes (T1 y T2 con actividad antagonista de TSH) sobre la estimulación de la producción de AMP cíclico (en células CHO transfectadas con TSHR) por pTSH (0,5 ng/ml) e IgG (10 ng/ml) y Fab (5 ng/ml) de hMAb TSHR1

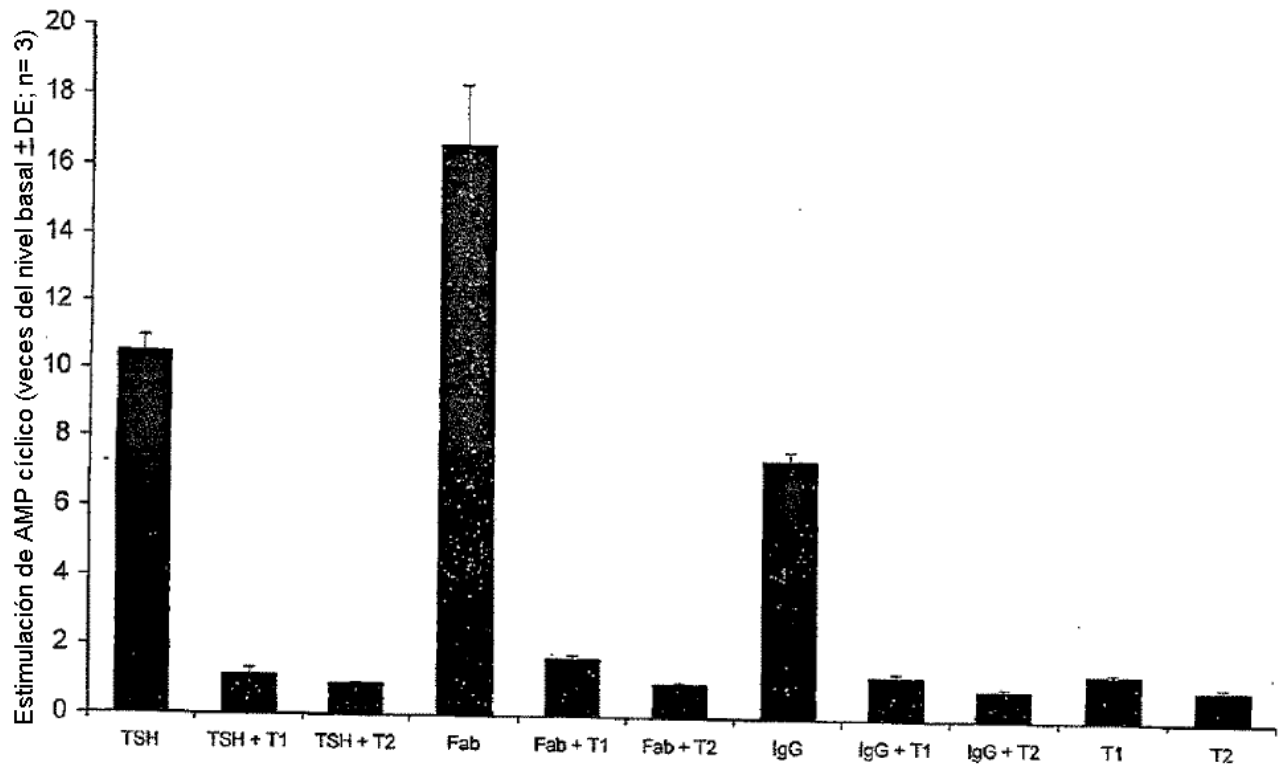


Figura 9. Secuencia nucleotídica de la cadena pesada de 9D33

Figura 9a

gacgtccagatccagcagcctgggactgagcttgtgaagcctggggcttc
agtgagactgtcctgcaaggcttctggctacacottcaccacctaactgga
tgcaactgggtgaagcagaggcctggacaaggccttgagtggatcggagag
attgatccttctgatagttat,actaaactataatcaaaagttcaagggcaa
ggccacattgactgtagacaaatcctccagcacagcctacatgcacctca
gcagcctgacatctgaggactctgcggtctattactgttcaagaaactac
ggtagtggctactactttgactactggggccaaggcaccactctcacagt
ctcctcagccaaaacaacacccc

Figura 9b

gacgtccagatccagcagcctgggactgagcttgtgaagcctggggcttc 50
 cebador de PCR
 agtgagactgtcctgcaaggcttctggctacaccttcaccacctaactgga 100
 CDR I
 tgcactgggtgaagcagaggcctggacaaggccttgagtggatcggagag 150
 CDR II
 attgatccttctgatagttataactataatcaaaagttcaagggcaa 200
 ggccacattgactgtagacaaatcctccagcacagcctacatgcacctca 250
 CDR III
 gcagcctgacatctgaggactctgcgggtctattactgttcaagaactac 300
 ggtagtggctactactttgactactggggccaaggcaccactctcacagt 350
 ctcttcagccaaaacaacacccc 373
 región constante

Figura 10. Secuencia aminocídica de la cadena pesada de 9D33

Figura 10a

DVQIQQPGTELVKPGASVRLSCKASGYTFTTYWMHWVKQRPGQGLEWIGE
 IDPSDSYTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCSRNY
 GSGYYFDYWGQGTTLTVSSAKTTP

Figura 10b

DVQIQQPGTELVKPGASVRLSCKASGYTF	TTYWMHWVKQRPGQGLEWIGE	50
cebador de PCR		
	CDRT	
IDPSDSYTNYNQKFKG	KATLTVDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCSRNY	100
CDR II	CDR III	
GSGYYFDY	WGQGTTLTVSSAKTTP	124
región constante		

Figura 11. Secuencia nucleotídica de la cadena ligera de 9D33

Figura 11a

ggcggttgagatgacacagtcgccagcaatcatgtctgcatctccagggga
gaaggtcaccatgacctgcagtgccagctcaagtgttaagttacatgcaat
ggtaccagcagaagtcaggcacctccccaaaagatggatttatgacaca
tccaaactggcttcttgagtcacctgctcgcttcagtggcagtgggctctgg
gacctcttactctctcacaatcagcagcatggagactgaagatgctgcca
cttattactgccagcagtgaggtagtaaccctggacgttcggtggaggc
accaaactggaaatcaaacggctgatgctgc

Figura 11b

ggcggttgagatgacacagtcgccagcaatcatgtctgcatctccagggga	50
cebador de PCR	
gaaggtcaccatgacctgcagtgccagctcaagtgttaagttacatgcaat	100
CDR I	
ggtaccagcagaagtcaggcacctccccaaaagatggatttatgacaca	150
CDR II	
tccaaactggcttcttgagtcacctgctcgcttcagtggcagtgggctctgg	200
gacctcttactctctcacaatcagcagcatggagactgaagatgctgcca	250
CDR III	
cttattactgctcagcagtgaggtagtaaccctggacgttcggtggaggc	300
accaaactggaaatcaaacggctgatgctgc	331
región constante	

Figura 12. Secuencia aminoacídica de la cadena ligera de 9D33

Figura 12a

GVEMTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMHNYQQKSGTSPKRWIYDT
 SKLASGVPARFSGSGSGTSSYSLTISSMETEDAATYYCQWSSNPWTFGGG
 TKLEIKRLML

Figura 12b

GVEMTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMHNYQQKSGTSPKRWIYDT	50
cebador de PCR	CDR I
SKLASGVPARFSGSGSGTSSYSLTISSMETEDAATYYCQWSSNPWTFGGG	100
CDR II	CDR III
TKLEIKRLML	110
región constante	