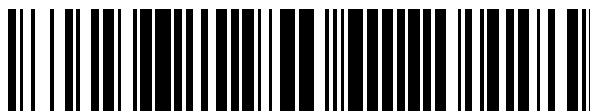


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 627**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04015239 .9**
96 Fecha de presentación: **29.06.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1612224**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.01.2006**

54 Título: **Nuevos anticuerpos monoclonales estimuladores o bloqueadores de la tiroides, secuencias peptídicas que corresponden a sus regiones variables, y sus usos en medicina diagnóstica, preventiva y terapéutica**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.06.2012

73 Titular/es:
**B.R.A.H.M.S GMBH
NEUENDORFSTRASSE 25
16761 HENNIGSDORF, DE**

72 Inventor/es:
**Bergmann, Andreas;
Morgenthaler, Nils G.;
Vassart, Gilbert y
Costagliola, Sabine**

74 Agente/Representante:
Mir Plaja, Mireia

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 2 382 627 T3

DESCRIPCIÓN

Nuevos anticuerpos monoclonales estimuladores o bloqueadores de la tiroides, secuencias peptídicas que corresponden a sus regiones variables, y sus usos en medicina diagnóstica, preventiva y terapéutica.

La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos monoclonales (mAb) que reconocen al receptor de tirotropina (TSHr) y tienen actividades estimuladoras o bloqueadoras, a características secuencias de aminoácidos y a otras características de dichos nuevos mAbs, y a varios usos de tales mAbs o sus fragmentos que se unen específicamente en medicina, así como a usos en campos afines que sean concebibles en vista de la exacta información que se da a conocer con respecto a su comportamiento en materia de unión y a sus características estructurales y secuenciales.

Junto con los receptores de lutropina/corionadotropina (LH/CGr) y de folitropina (FSHr), el receptor de tirotropina (TSHr) constituye la subfamilia de receptores de hormonas glicoproteínicas (GPHR), que son a su vez miembros de la gran familia de receptores acoplados a proteínas G tipo rodopsina (GPCR). Los GPHRs albergan a un gran dominio N-terminal extracelular que es responsable de la especificidad de reconocimiento y unión de hormonas, y a una región transmembrana heptahelicoidal que comparten con todos los GPCRs. Esta parte "serpentina" es responsable de la transmisión de la señal de activación, principalmente a la proteína G Gs. El dominio extracelular se compone de dos agrupaciones ricas en cisteína que flanquean a nueve repeticiones ricas en leucina (LRRs). Se ha propuesto un modelo estructural de la parte LRR del ectodominio del TSHr, basado en la estructura cristalina del inhibidor de ribonucleasa porcina (1). El mismo toma la forma de un segmento de herradura, hecho de una sucesión de hebras beta y hélices alfa, en las superficies cóncava y convexa de la herradura, respectivamente. Según los conocimientos actuales, se piensa que los GPHRs son activados por su respectivo ligando (TSH, LH/CG, FSH) tras la interacción de la subunidad beta de las hormonas con residuos específicos de las hebras beta de la herradura.

En contraste con los receptores de LH/CG y de FSH, el TSHr puede también ser activado por autoanticuerpos dirigidos contra su ectodominio (1). Ésta es la causa inmediata de la tirotoxicosis y de la hiperplasia de la tiroides en pacientes con la enfermedad de Graves (5, 6). Tras la publicación de la secuencia completa de aminoácidos del TSHr humano (hTSHr) y de variantes del TSHr de otros mamíferos, fueron generados en distintos animales numerosos anticuerpos contra el TSHr completo o sus secuencias parciales, pero durante mucho tiempo siguieron siendo difíciles de conseguir anticuerpos que tengan propiedades estimuladores de la tiroides y sean agonistas del TSHr.

Los anticuerpos generados en su mayoría presentaban actividad bloqueadora, es decir que eran capaces de disminuir o bloquear, en bioensayos, el efecto estimulador de la TSH en el TSHr. Unos pocos de entre ellos también resultaron ser potentes competidores de los autoanticuerpos estimuladores hallados en sueros de pacientes con enfermedades autoinmunes de la tiroides, y en especial con enfermedad de Graves. Se describen y se reivindican en la Patente Alemana DE 199 07 094 C1 y en la correspondiente WO 00/49050 A2/A3 tales mAbs bloqueadores, y más específicamente mAbs que se unen a epítopes que comprenden los aminoácidos FDSH, que corresponden a los aminoácidos 381 a 384 del TSHr humano (hTSHr). Dicha patente también reivindica el uso de anticuerpos bloqueadores para el tratamiento del hipertiroidismo y de condiciones afines.

Tras años de intentos infructuosos, finalmente han sido desarrollados modelos murinos de la enfermedad de Graves (GD) (7 - 10) y esto ha abierto recientemente el camino al aislamiento de un número limitado de anticuerpos monoclonales (mAbs) con actividad estimuladora de la tiroides (TSAb) (11 - 13). Se demostró que estos mAbs estimulan al TSHr a nivel nanomolar *ex vivo*, y que al ser comparados con TSH bovina o humana los mismos actuaban como agonistas parciales. Por último, recientemente ha sido generado a partir de linfocitos periféricos de un paciente con enfermedad de Graves (14) un único mAb humano con actividad de TSAb. En ninguno de estos casos han sido delineados con precisión los epítopes reconocidos por los mAbs.

Los mAbs con actividad de TSAb constituyen inapreciables herramientas científicas para sondear los mecanismos implicados en la transducción intramolecular de la señal de activación entre el ectodominio del TSHr y otros GPHRs y su dominio serpentina. Sin embargo, tales anticuerpos, al ser potenciales agonistas del TSHr, también pueden ser considerados como candidatos para una serie de usos en medicina diagnóstica y terapéutica para los cuales se usa en la actualidad TSH, ya sea al desnudo o bien etiquetada o bien en forma de conjugados. Uno de tales usos corresponde al uso de TSH, habitualmente como TSH recombinante (p. ej. como Thyrogen®, tirotropina alfa para inyección, Genzyme Therapeutics), como herramienta diagnóstica auxiliar para pruebas de la tiroglobulina (Tg) sérica con o sin exploración de todo el cuerpo (WBS) con radioyodo en el seguimiento de pacientes con un historial de cáncer de tiroides bien diferenciado para detectar la presencia de restos de cáncer o de cáncer residual o recurrente tras tiroidectomía o tratamiento con radioyodo.

En diagnosis, adecuados anticuerpos que compiten con autoanticuerpos patogénicos presentes en la circulación de pacientes afectados por enfermedades autoinmunes de la tiroides, o con poblaciones específicas de tales autoanticuerpos, ya eran considerados como potenciales alternativas a la TSH competidora convencional en ensayos para la determinación de autoanticuerpos, y más específicamente para TSH bovina (bTSH) etiquetada, que se usa en la actualidad en el aplastante número de inmunoensayos competitivos para la determinación de autoanticuerpos para el

- 5 TSHr (TRAb). Tales usos de anticuerpos como competidores están por ejemplo descritos en la EP 1 301 767 A1 (determinación de autoanticuerpos bloqueadores) de los solicitantes, o en la PCT/EP03/12129 (WO 04/048415), que describen, inter alia, el uso de anticuerpos humanos policlonales etiquetados purificados por afinidad como competidores en tales ensayos. Ambas solicitudes describen que el uso de anticuerpos como competidores en comparación con el uso de TSH puede proporcionar ciertas ventajas significativas, p. ej. con respecto a una deseada selectividad de una determinación o a la estabilidad de la unión específica del competidor a preparaciones de TSHr tras un prolongado almacenamiento del kit (kit = conjunto de materiales y utensilios) de ensayo.
- 10 Para ser útiles como alternativas a la TSH en aplicaciones diagnósticas y terapéuticas, los mAbs preferiblemente deben unirse, con la afinidad apropiada, a partes del TSHr implicadas en la unión de la TSH y en la unión de los autoanticuerpos, respectivamente. A efectos terapéuticos o de diagnosis *in vivo* la actividad agonística estimuladora o bien como alternativa la actividad bloqueadora de tales mAbs preferiblemente deberá ser del mismo orden de magnitud como la de la TSH y la de los autoanticuerpos respectivamente, y debe ser observable también bajo condiciones fisiológicas, p. ej. a concentraciones salinas fisiológicas.
- 15 La presente invención aporta, inter alia, una nueva clase de mAbs bien definidos contra el TSHr que satisfacen los requisitos anteriormente expuestos y tienen otras propiedades y ventajas que le resultarán obvias a un experto en la materia al proceder a la lectura de la descripción siguiente.
- 20 La invención, por consiguiente, según uno de sus principales aspectos aporta anticuerpos monoclonales (mAbs) según la reivindicación 1 que tienen actividad estimuladora de la tiroides (TSA_b), o bien que según la reivindicación 2 son anticuerpos bloqueadores de la tiroides. Dichos anticuerpos monoclonales son obtenibles mediante inmunización genética de ratones contra el receptor de TSH humano (hTSHr), selección de los ratones que dan positivo para la presencia de anticuerpos que estimulan o bloquean al hTSHr, generación de hibridomas usando células del bazo de los ratones seleccionados, y expansión, pruebas y selección de los clones de hibridomas que producen mAbs que tienen actividad estimuladora o bloqueadora de la tiroides. La invención también aporta los fragmentos F(ab')₂, Fab o Fv.
- 25 Todos los anticuerpos o sus fragmentos están caracterizados por una combinación de las características siguientes:
- 30 a. Compiten con la TSH bovina por los epítopes del TSHr humano,
 - b. Compiten con los autoanticuerpos de los sueros de pacientes con la enfermedad de Graves, así como con los autoanticuerpos de los sueros de pacientes que albergan autoanticuerpos bloqueadores para epítopes del TSHr humano,
 - c. Se unen a epítopes conformacionales del TSHr humano situados en los primeros 281 aminoácidos del TSHr humano,
 - 35 d. Se unen a receptores de TSH (TSHr) originarios de humanos, ratones, ratas, gatos, perros y ovejas, y
 - e. Sus constantes de disociación K_d, al ser medidas en experimentos de saturación en tubos recubiertos con una preparación de TSHr humano recombinante, están situadas dentro de la gama de valores que va desde la 20x10⁻¹⁰M hasta la 0,5x10⁻¹⁰M.
- 40 Los mAbs estimuladores, es decir, los mAbs que tienen actividad estimuladora de la tiroides (mTSA_b) y se comportan como agonistas del TSHr humano al ser sometidos a ensayo en medios con concentraciones salinas fisiológicas,
- 45 f. tienen regiones variables de sus cadenas pesadas y livianas respectivamente que presentan al menos una homología del 90% con las cadenas pesadas según la ID SEC N°: 1 o la ID SEC N°: 9 y/o con las cadenas livianas según la ID SEC N°: 2 o la ID SEC N°: 10, o bien
 - g. son mAbs humanizados o de cadena única o fragmentos de mAbs que contienen al menos las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de la cadena pesada según la ID SEC N°: 3, la ID SEC N°: 4, o la ID SEC N°: 11 y la ID SEC N°: 5; y/o las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de la cadena liviana según la ID SEC N°: 6, la ID SEC N°: 7 o la ID SEC N°: 12 y la ID SEC N°: 8 o la ID SEC N°: 13.
- 50 Los mAbs bloqueadores, es decir, los mAbs que tienen actividad bloqueadora de la tiroides (mTBA_b) y se comportan como antagonistas del TSHr humano,
- h. tienen regiones variables de sus cadenas pesadas y livianas respectivamente que presentan al menos una homología del 90% con la cadena pesada según la ID SEC N°: 14 y/o con la cadena liviana según la ID SEC N°: 15, o bien
 - 55 i. son mAbs humanizados o de cadena única o fragmentos de mAbs que contienen al menos las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de la cadena pesada según la ID SEC N°: 16, la ID SEC N°: 17 o la ID SEC N°: 18; y/o las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de la cadena liviana según la ID SEC N°: 19, la ID SEC N°: 20 o la ID SEC N°: 21.
- 60 Se pormenorizan en las reivindicaciones 3 a 4 adicionales realizaciones actualmente preferidas o características que caracterizan a los anticuerpos específicos preferidos.
- Los usos que se prefieren y se conciben en la actualidad están reivindicados en las reivindicaciones 5 a 7 y serán descritos más detalladamente a continuación.

En las reivindicaciones 1 y 2 y en la solicitud una frase tal como la que dice "obtenibles mediante inmunización genética de ratones contra el receptor de TSH humano (hTSHr), selección de los ratones que dan positivo para la presencia de anticuerpos que estimulan (o bloquean) al TSHr humano (hTSHr), o generación de hibridomas usando células del bazo de los ratones seleccionados" debe según los criterios establecidos ser considerada como característica de producto según proceso que no implica limitación alguna de las reivindicaciones o de la enseñanza técnica a los anticuerpos que se hacen de hecho mediante dicho protocolo, es decir, mediante inmunización genética de un ratón. Si anticuerpos obtenidos mediante otras técnicas de inmunización presentan todas las características que se pormenorizan en la reivindicación 1 o 2 y/o en las reivindicaciones dependientes o en la siguiente descripción, los mismos deben ser considerados como anticuerpos según la reivindicación 1 o la reivindicación 2.

Además, en la reivindicación 1 o 2 y en la descripción siguiente el vocablo "fragmentos" en el sentido que aquí tiene significa fragmentos bivalentes o monovalentes de unión específica de anticuerpos según la reivindicación 1 o 2. Un experto en la materia sabe que tales fragmentos pueden ser fragmentos $F(ab')_2$ obtenibles mediante digestión de anticuerpos completos (inmunoglobulinas) con pepsina, fragmentos Fab obtenibles mediante digestión de anticuerpos completos (inmunoglobulinas) con papaína, y fragmentos producidos sintéticamente o bien mediante métodos de ingeniería genética, tales como fragmentos Fv que comprendan esencialmente tan sólo las regiones variables completas de fragmentos Fab. Con el vocablo "anticuerpos" se pretende en general cubrir también a los así llamados anticuerpos "de cadena única" (SAB) o a los fragmentos Fv de cadena única (scFv) que constan de regiones variables de una cadena pesada y una cadena liviana enlazadas por una mitad enlazadora artificial, y a los anticuerpos "humanizados" en los cuales al menos la parte Fc, o incluso algunas o todas las regiones constantes y/o secuencias armazón de las cadenas variables de un anticuerpo murino nativo están sustituidas por correspondientes partes o secuencias de aminoácidos de correspondientes anticuerpos humanos. Tales anticuerpos humanizados son especialmente preferidos para usos *in vivo* en humanos como agentes terapéuticos o diagnósticos auxiliares.

Las secuencias de aminoácidos, es decir, las secuencias peptídicas, se describen en toda la descripción haciendo referencia al "Listado de Secuencias" adjunto en el que se relacionan secuencias de regiones de cadena variable y CDRs (regiones determinantes de la complementariedad) de los mAbs estimuladores IRI-SAb2, IRI-SAb3 (de la ID SEC N°: 1 a la ID SEC N°: 13) y del anticuerpo bloqueador 1H7 (de la ID SEC N°: 14 a la ID SEC N°: 21) de acuerdo con la Figura 5. En caso de discrepancias entre el Listado de Secuencias y la Figura 5, las secuencias representadas en la Figura 5 deben ser consideradas como las secuencias correctas.

Cuando se citan valores numéricos, los mismos deben considerarse como obtenidos en mediciones llevadas a cabo de acuerdo con los relevantes procedimientos que se perfilan en la parte experimental de la presente solicitud.

Si se usa la expresión "agonista" o "agonista pleno", dichas expresiones pueden expresarse como porcentaje de la actividad (producción de cAMP) (cAMP = monofosfato de adenosina cíclico) ejercida en un bioensayo por TSH bovina (concentración de saturación) en células que expresan el hTSHr. "Agonista" habitualmente significa más de un 20%, y más habitualmente un 40% o más, y "agonista pleno" habitualmente significa un 80% o más de la actividad de la TSH bovina.

En la presente solicitud los solicitantes describen la generación de una serie de mAbs, dos de los cuales tienen actividades estimuladoras de la tiroides y otro es un potente anticuerpo bloqueador. Uno de los mAbs, denominado de aquí en adelante IRI-SAb2, es un agonista pleno a baja nanomolar del TSHr, cuyo epítipo sorprendentemente se demostró que se solapa estrechamente con el epítipo del potente anticuerpo bloqueador llamado 1H7.

Además, tras inyección intravenosa en ratones, el IRI-SAb2 produjo hipertiroidismo. Además de signos histológicos de hiperestimulación, las glándulas tiroides de los animales a los que se les efectuó la inyección presentaban signos de infiltración con macrófagos y necrosis folicular.

Se usó un modelo murino experimental de enfermedad de Graves para producir dicha nueva serie de anticuerpos monoclonales (mAbs), que incluye a mAbs con potente actividad estimuladora de la tiroides (TSAb). De 129 mAbs que reconocían al receptor de TSH (TSHr), siete presentaban actividad de TSAb. Dos de éstos, denominados IRI-SAb2 e IRI-SAb3, presentaban una particularmente alta potencia (en la gama nanomolar baja) y eficacia. El IRI-SAb2 se comportó como un agonista pleno del TSHr humano, incluso al ser sometido a ensayo en concentraciones salinas fisiológicas. Tanto el IRI-SAb2 como el IRI-SAb3, así como el 1H7, fueron desplazados del TSHr por autoanticuerpos de pacientes con enfermedad de Graves ($n = 100$) o que albergan anticuerpos bloqueadores de la tiroides ($n = 8$), pero no de sujetos de control ($n = 104$) o de pacientes con tiroiditis de Hashimoto ($n = 20$). Los epítopes del IRI-SAb2 y del IRI-SAb3 fueron mapeados con precisión, a nivel de los aminoácidos, hasta la parte aminoterminal de la parte cóncava de la estructura en herradura del ectodominio del TSHr. Dichos epítopes se solapan estrechamente entre sí y, sorprendentemente, con el epítipo de un mAb con actividad bloqueadora (1H7). Al ser inyectados por vía intravenosa en ratones, ambos mAbs produjeron signos biológicos e histológicos de hipertiroidismo. Inesperadamente, también desencadenaron una respuesta inflamatoria en las glándulas tiroides. Estos nuevos mAbs, con sus epítopes conformacionales delineados, abren el camino a la identificación de los mecanismos moleculares implicados en la activación del TSHr.

Se describe a continuación más detalladamente la invención haciendo referencia a los siguientes ejemplos no limitativos y a las figuras.

5 En las Figuras:

La Figura 1 muestra el efecto de mAbs estimuladores en la acumulación de cAMP (cAMP = monofosfato de adenosina cíclico) y en la unión de TSH. **A** y **B** son curvas de concentración-acción de IgG (**A**) o Fab (**B**) de IRI-SAb2, IRI-SAb3 y a efectos comparativos IRI-SAb1 en la acumulación de cAMP intracelular medida en células JP26 en medio salino isotónico normal. Los resultados están expresados en pmoles de cAMP/ml. Se usaron 100 mIU/ml (mIU = miliunidades internacionales) de bTSH (bTSH = TSH bovina) para evaluar la máxima estimulación de la producción de cAMP. Todas las mediciones fueron llevadas a cabo por duplicado. **C**: Efecto de varias concentraciones de IgG de IRI-SAb1, 2 y 3 o mAb 1H7 en la inhibición de la unión de 125 I-bTSH a hTSHr inmovilizados en tubos recubiertos, según medición efectuada mediante un ensayo comercial (DYNO-test® TRAK human; B.R.A.H.M.S Aktiengesellschaft, de Hennigsdorf, Alemania). Los resultados están expresados como 125 I-bTSH unida, en cpm. Todas las mediciones se hicieron por triplicado.

La Figura 2 muestra la competición entre mAbs y anticuerpos de paciente por la unión al TSHr. Fueron sometidos a ensayo en total 232 sueros para determinar su efecto inhibitorio en la unión de tres nuevos mAbs, y de IRI-TSAb1 a efectos comparativos, al TSHr. Control: 104 sueros de control de donantes de sangre sin historial personal o familiar de enfermedad autoinmune endocrina. E. de Graves: 100 sueros de pacientes con GD con contenido de TSAb. TBAb: 8 sueros de pacientes TBAb positivos con hipotiroidismo autoinmune. E. de Hashimoto: 20 sueros de pacientes con hipotiroidismo autoinmune sin TBAb o TBII. **A**, **B**, **C** y **D**: IRI-SAb1, 2, 3 y mAb 1H7 respectivamente, usado como indicador. **E**: TSH bovina usada como indicador (LUMitest® TRAK human, B.R.A.H.M.S Aktiengesellschaft). Los resultados fueron expresados como inhibición porcentual de la unión de anticuerpos o bTSH. La distribución de autoanticuerpos se muestra en forma de gráficos de puntos y gráficos de cajas, que indican las percentilas 25-75 (caja) con (línea) mediana, percentila 10-90 (bigotes). ***, $P < 0,0001$ (mediante análisis de suma de rangos de Mann-Whitney).

La Figura 3 muestra la localización de los epítopes de IRI-SAb2, IRI-SAb3 y 1H7. **A**: Representaciones esquemáticas de TSHr. Las siete hélices transmembrana están dibujadas como redes helicoidales. Los círculos cerrados en la parte N-terminal representan la parte LRR del ectodominio (residuos 54-254). **B**: Representaciones esquemáticas de la parte LRR del TSHr con los ocho residuos mutados en la quimera T56. **C**: Representación esquemática de una sola LRR estructural. **D**: Mapeo de los epítopes de IRI-SAb1, 2, 3 y 1H7 con hTSHr mutantes transfectados en células COS. T56 es un mutante de TSHr con ocho residuos mutados (véase la anterior representación esquemática). T90 es un mutante de TSHr con 20 residuos mutados con sosias de LHR. Células COS fueron transfectadas con TSHr mutados o de tipo salvaje, coloreadas con mAbs y analizadas por FACS (FACS = clasificación de células activada por fluorescencia) como se describe en Material y Métodos.

La Figura 4 muestra la cartografía del epítipo de IRI-SAb2, IRI-SAb3 y 1H7. Hebras β de las nueve LRRs del ectodominio del TSHr. Tan sólo están representados los residuos X, putativamente enfrentados a la hormona y a los anticuerpos. La numeración parte del primer aminoácido del péptido señal del TSHr. Los residuos implicados en el reconocimiento del TSHr por parte del anticuerpo fueron identificados individualmente (en caja negra), o bien en combinación (rodeados por una caja de trazos). **A**: Cartografía del epítipo del IRI-SAb2. **B**: Cartografía del epítipo del IRI-SAb3. **C**: Cartografía del epítipo del 1H7.

La Figura 5 muestra secuencias de aminoácidos de regiones variables de IRI-SAb2, IRI-SAb3 y 1H7; alineaciones de secuencias de regiones variables de cadenas pesadas (VH) y livianas (VL). Las regiones CDRs están enmarcadas en cajas. Los aminoácidos están numerados según la nomenclatura de Kabat. En cajas negras: los cuatro residuos que son distintos entre las CDRs de IRI-SAb2 y de IRI-SAb3.

La Figura 6 muestra que los anticuerpos IRI-SAb2 y 3 estimulan al TSHr de ratón *in vitro*: **A**: FACS con los cuatro anticuerpos en la línea celular MT3 que expresa al TSHr de ratón. Las células fueron coloreadas con cada anticuerpo y analizadas como se ha descrito anteriormente. **B**: Curva de concentración-acción de IgGs de IRI-SAb2 y 3 en la acumulación de cAMP intracelular medida en células MT3 en medio salino isotónico normal. Fue también llevada a cabo una curva de concentración-acción con TSH bovina (datos no ilustrados), y se muestra la meseta correspondiente a la máxima estimulación de la producción de cAMP alcanzada con 100 mIU/ml de bTSH (bTSH = tiotropina bovina). Los resultados están expresados en pmoles de cAMP/ml. Todas las mediciones fueron llevadas a cabo por duplicado.

La Figura 7 muestra la T4 y TSH total en sueros de ratones hembra tratados con 100 μ g de IRI-SAb2 y de IRI-SAb3 purificados. Se usaron como control grupos tratados con PBS (PBS = solución salina tratada con fosfato), mAb BA8 o mAb 1H7. T4 (μ g/dl) y TSH (mIU/l) respectivamente, 48 horas (**A** y **C**) y cuatro días (**B** y **D**) postinyección. La distribución de valores se muestra como gráficos de puntos, con (línea) mediana. **, $P < 0,01$ (análisis de suma de rangos de Mann-Whitney). **E**. Valores de T4 en ratones tratados con IRI-SAb2 o PBS (control) 8 horas, 24 horas y 7 días

postinyección. Debido a las repetidas hemorragias, fue recolectada una mínima cantidad de suero y los valores de TSH no fueron evaluados en este experimento.

Pueden deducirse adicionales características de la presente invención de la siguiente descripción detallada de experimentos y resultados.

1. Material y Métodos

1.1. Reactivos

Se han descrito en otra parte los anticuerpos monoclonales 3G4 (15) y BA8 (16). El anticuerpo monoclonal IRI-SAb1, que fue investigado más de cerca a efectos comparativos, también ha sido ya parcialmente caracterizado (11). La TSH bovina fue adquirida a la Sigma (Chemical Co., de St. Louis, MO). Todos los cebadores que se usaron para PCR (PCR = Reacción en Cadena de la Polimerasa), clonación o secuenciación fueron sintetizados por la Eurogentec (de Seraing, Bélgica) y las secuencias están disponibles a petición.

1.2. Animales usados, muestreo, generación de hibridomas

Ratones NMRI hembra de seis semanas de edad [lco:NMRI (IOPS:Han)] fueron inmunizados con codificación del cDNA para el TSHr humano como ya se ha descrito (8). Fueron obtenidas muestras de sangre 8 semanas después de la inmunización inicial. Para todas las determinaciones los sueros fueron sometidos a ensayo individualmente. Los ratones fueron manejados y albergados según los procedimientos aprobados por el comité local para el bienestar de los animales. Fue seleccionado el ratón 42, que dio positivo para la presencia en suero de anticuerpos que estimulan al hTSHr, y se llevó a cabo como ha sido descrito anteriormente (11, 16) la fusión de células del bazo con mieloma NS1/0. 1200 clones fueron expandidos en medio líquido tras selección en medio HAT-metilcelulosa (medio ClonCell-HY selectivo, STEMCELL Technologies Inc., de Vancouver, Canadá).

1.3. Caracterización de anticuerpos en el suero del ratón 42 seleccionado para la producción de hibridomas

1.3.1. Citometría de flujo

Fue llevado a cabo análisis por FACS como se ha descrito anteriormente (16) con 2 µl de suero en células CHO que expresan el hTSHr [JP19 (17)]. Los resultados están expresados en AFU (unidades arbitrarias de fluorescencia).

1.3.2. Medición de la actividad de TSAb

La actividad de TSAb fue medida usando células CHO que expresaban el hTSHr [JP26 (17)], como se ha descrito (18). Fueron sometidas a ensayo en todos los experimentos muestras por duplicado; y los resultados están expresados como pmoles de cAMP/ml.

1.3.3. Cribaje para la selección de mAbs con actividad de Ig (TBII) inhibidora de la unión de TSAb o de TSH

Fueron recogidos los supernatantes y la presencia de anticuerpos contra hTSHr fue evaluada usando tres ensayos: FACS sobre células JP19 con 10 µl de supernatante (véase lo indicado anteriormente); Competición por la unión a ¹²⁵I-TSH que fue llevada a cabo con tubos recubiertos para el ensayo DYNObest® TRAK human (B.R.A.H.M.S Aktiengesellschaft, de Hennigsdorf) (19) y con 50 µl de supernatante; Estimulación de la producción de cAMP usando células CHO JP26 (véase lo indicado anteriormente) con 10 µl de supernatante. Los hibridomas que dieron positivo en los tres ensayos fueron clonados y expandidos y se determinó el isotopo de Ig de mAb (IsoStrip^{MF}, Roche, Bélgica).

1.4. Caracterización de los mAbs seleccionados

1.4.1. Actividades de TSAb y TBII

Los mAbs y los Fabs seleccionados (generados tras digestión con papaína) fueron purificados mediante cromatografía de afinidad en Sefarosa-proteína A (kit de preparación der Fabs ImmunoPure^{MF}, Pierce, Perbio Science, Bélgica) y fueron sometidos a ensayo para determinar su capacidad para estimular la producción de cAMP usando células CHO JP26 en medio isotónico normal (véase lo indicado anteriormente). Para la determinación de la actividad de TBII, distintas cantidades de anticuerpos fueron añadidas en 250 µl de tampón A (NaOH-Hepes 20mM, pH 7,5, NaCl 50mM, 1% de BSA, 10% de glicerol, 2 mg/ml de IgG de ratón) a tubos recubiertos con hTSHr. Tras 1 h de incubación a temperatura ambiente, fueron añadidos en el mismo tampón 50 µl de ¹²⁵I-TSH (B.R.A.H.M.S Aktiengesellschaft). Los tubos fueron incubados por espacio de 2 h a temperatura ambiente y lavados cuatro veces con 2 ml de tampón de lavado (HCl-Tris 8mM, NaCl 60mM, 0,02% de Tween-20, pH 7,5), y fue contada la radiactividad unida.

1.4.2. Determinación de la K_d

5 ng (~ 200.000 RLU) de anticuerpo monoclonal etiquetado con éster de acridinio (20) y distintas cantidades de anticuerpos no etiquetados fueron añadidos en 0,3 ml de tampón A a tubos recubiertos con TSHr. Los tubos fueron incubados por espacio de 24 h a temperatura ambiente y fueron lavados cuatro veces con 2 ml de tampón de lavado, y las RLU fueron medidas en un luminómetro.

1.4.3. Competición entre mAbs y autoanticuerpos en tubos recubiertos con hTSHr

Fueron añadidos a tubos recubiertos con TSHr 150 µl de tampón (KOH-Hepes 100mM, pH 7,5, EDTA 20mM, N-etilmaleimida 0,5mM, 1% de BSA, 0,5% de Triton X100, 30 µg/ml de anticuerpo anti-TSH humana, 2 mg/ml de IgGs de ratón) y 100 µl de patrones o sueros de pacientes. Tras 2 h de incubación, fueron añadidos como indicador 50 µl de PBS que contenía 5 ng de anticuerpo etiquetado. Los tubos fueron incubados durante la noche a 4°C y lavados cuatro veces con 2 ml de tampón de lavado, y las RLU unidas fueron medidas en luminómetro. Los resultados fueron expresados como índice de inhibición (InI) calculado como: $\text{InI (\%)} = 100 - 100 \times (\text{velocidad de conteo para el suero de ensayo} / \text{velocidad de conteo para los sueros patrón cero})$. Los sueros de enfermedad de Graves (GD) fueron obtenidos de donantes de sangre reclutados para el desarrollo de diagnóstico *in vitro*, que fue aprobado por un comité ético nacional. Los sueros de pacientes con enfermedad tiroidea autoinmune, que eran clínicamente hipotiroideos pero contenían altos niveles de TBII, fueron un amable obsequio de la Dra. Daphne Khoo (del Hospital General de Singapur). Todos los donantes de sangre dieron su consentimiento por escrito.

1.4.4. Análisis de los datos

Las curvas de concentración-acción, las curvas de saturación y los análisis de Scatchard y estadísticos (mediante la prueba de la suma de rangos de Mann-Whitney no paramétrica) se ajustaron y computaron con el programa Prism® (GraphPad Software, Inc., de San Diego, CA, EE.UU.).

1.5. Ensayo *in vivo* con mAbs estimuladores

Se inyectaron en la vena caudal de ratones Balb/c hembra de 8 semanas de edad 100 µg de mAbs purificados (IRI-SAB2, IRI-SAB3, 1H7, BA8). Fueron obtenidas muestras de sangre en varios puntos en el tiempo postinyección. Se usaron como controles PBS y mAb BA8.

1.6. Ensayos de determinación de la T4 y la TSH total

La T4 total fue medida con un kit comercial (T4 mAb, ICN Pharmaceuticals, Nueva York, EE.UU.). La TSH fue medida como se ha descrito anteriormente (21).

1.7. Microscopía de luz e inmunohistoquímica

A los cuatro días postinyección con mAbs purificados, los ratones fueron exsanguinados mediante punción cardíaca bajo anestesia con Nembutal. Las glándulas tiroideas fueron retiradas y procesadas para microscopía de luz e inmunohistoquímica. Secciones congeladas fueron sometidas a coloración con inmunoperoxidasa usando anticuerpos monoclonales específicos para células inmunes CDR5RA-positivas y células de macrófagos Mac-1-positivas, como se ha descrito anteriormente (22).

1.8. Análisis de los genes de las regiones variables

El RNA total fue aislado con el RNeasy Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, EE.UU.). A continuación de la síntesis de cDNA de primera hebra con hexámeros aleatorios, las regiones Fv de cadena pesada y liviana fueron amplificadas usando cebadores degenerados descritos por Kettleborough et al. (23) y secuenciadas. Las secuencias fueron comparadas con secuencias disponibles de genes de Ig de ratón usando IMGT/V-QUEST (<http://imgt.cines.fr/textes/vquest/>). La relación de mutación de sustitución/silenciosa R/S fue calculada para las regiones armazón (FR) y CDR de la cadena pesada y liviana. Una relación R/S de CDR > 2,9 (calculada para mutaciones somáticas que se dan aleatoriamente en un gen que codifica una proteína cuya estructura no tiene que ser preservada) es indicativa de una maduración activada por antígeno de los anticuerpos, mientras que una más baja relación de mutación R/S de FR (< 2,9) refleja la presión negativa de componentes estructurales que tienen que ser conservados (24).

2. Resultados

2.1. El ratón seleccionado para la fusión de hibridomas

Veinte ratones NMRI hembra fueron inmunizados contra el TSHr humano siguiendo el protocolo de inmunización genética anteriormente descrito (12). Los ratones fueron sangrados ocho semanas después de la primera inyección de DNA y los anticuerpos contra el TSHr fueron detectados por FACS en todos los sueros de ratones inmunizados, yendo los valores desde $20 \pm 2,5$ AFU (AFU = unidades arbitrarias de fluorescencia) hasta 91 ± 7 AFU (valores de los controles: $6 \pm 0,82$ AFU). La actividad de TBII estaba análogamente presente en todos los sueros de ratones inmunizados, yendo los valores desde un 42 hasta un 92% de inhibición de la unión de TSH etiquetada (ratones de control: $2 \pm 0,5\%$). Era detectable actividad de TSAb en solamente cinco sueros, con valores de cAMP de más de 5 pmoles/ml (ratones de control: $0,77 \pm 0,15$ pmoles/ml). Tres ratones presentaban una T4 total significativamente más

alta que la de los controles ($> 4,5 \mu\text{g/dl}$). El ratón 42, que dio positivo en los cuatro ensayos y presentaba los más altos valores de TBII, TSAb y T4 total, fue seleccionado para la fusión de hibridomas.

2.2. Cribaje y selección de mAb con actividad de TSAb

De 1.200 hibridomas que fueron analizados, 129 dieron positivo tras cribaje por FACS sobre células JP19. Treinta de éstos dieron positivo para TBII en el ensayo TRAK, y de los mismos siete estimularon la producción de cAMP en las células JP26, bajo incubación en medio salino normal (véase el apartado de Métodos). Los valores de cAMP iban de $9,3 \pm 0,2$ pmoles/ml a $188,3 \pm 8,7$ pmoles/ml (supernatantes de control: $1,49 \pm 0,15$ pmoles/ml). De los siete supernatantes que presentaban actividad de TSAb, dos alcanzaron una estimulación de la producción de cAMP que llegó a ser de un 67% (IRI-SAb2, $188,3 \pm 8,7$ pmoles/ml, o 126 veces el valor de cAMP basal) y de un 20% (IRI-SAb3, $56 \pm 1,2$ pmoles/ml, o 37 veces el valor de cAMP basal) de la estimulación máxima ocasionada por una concentración a saturación de TSH bovina (100 mIU/ml , 280 ± 21 pmoles/ml). Estos dos mAbs fueron seleccionados para producción, y purificados para su adicional análisis. Los isotipos de IgG eran IgG2a para IRI-SAb2 e IgG1 para IRI-SAb3.

2.3. Caracterización funcional del IRI-SAb2 y del IRI-SAb3

2.3.1. Actividad de TSAb de las IgGs

Varias concentraciones de IRI-SAb2 y de IRI-SAb3 purificados fueron sometidas a ensayo para determinar su capacidad para estimular la producción de cAMP en células JP26 incubadas en medio salino normal. Se observó en ambos casos un incremento dependiente de la concentración de la producción de cAMP, con estimulaciones máximas de 131 veces y 105 veces los valores de cAMP basales para IRI-SAb2 e IRI-SAb3, respectivamente (Figura 1A). Estos valores representaban un 98% y un 80% respectivamente de la estimulación máxima generada en el mismo experimento por una concentración a saturación de TSH bovina (100 mIU/ml). Los valores EC_{50} eran de $2,75 \pm 0,25 \text{ nM}$ y $16,5 \pm 3,5 \text{ nM}$ para IRI-SAb2 e IRI-SAb3, respectivamente. Comparativamente, la estimulación máxima alcanzada por el IRI-SAb1 anteriormente caracterizado (11) ($\text{EC}_{50} = 3,6 \pm 0,6 \text{ nM}$) era tan sólo de un 10% del valor alcanzado con la TSH bovina (Figura 1A, gráfico insertado). Estos resultados indican que bajo las condiciones del ensayo el IRI-SAb2 se comporta como un agonista pleno del hTSHr.

Fueron similares las cinéticas de la acumulación de cAMP intracelular tras estimulación de células JP26 con $30 \mu\text{g/ml}$ de los tres mAbs o con TSH bovina (1 mIU/ml). El 80% de los valores máximos fue alcanzado en menos de 5 min. para IRI-SAb1 y tras 10-20 min. para IRI-SAb2, IRI-SAb3 y TSH. El tiempo medio para alcanzar el 50% de los valores alcanzados a las 2 h fue de 4 ± 1 min. para IRI-SAb2, 7 ± 1 min. para IRI-SAb3 y 5 ± 1 min. para TSH (media $\pm$ gama) (no ilustrado).

2.3.2. Actividad de TSAb de los fragmentos Fab

Las eficacias de los tres fragmentos Fab de mAb en la estimulación de la producción de cAMP fueron similares a las obtenidas con las correspondientes inmunoglobulinas intactas, comportándose el IRI-SAb2 de nuevo como agonista pleno (Figura 1B). Los valores EC_{50} estaban situados dentro de la misma gama como los que presentaban las IgGs intactas ($1,2 \pm 0,5 \text{ nM}$ y $74 \pm 4 \text{ nM}$ para IRI-SAb2 e IRI-SAb3, respectivamente).

2.3.3. Actividad de TBII de los mAbs

Varias concentraciones de IRI-SAb1, IRI-SAb2 e IRI-SAb3 fueron incubadas con TSH etiquetada con ^{125}I en tubos recubiertos con TSHr (Figura 1C). Fue también sometido a ensayo el mAb 1H7, del que en el cribaje original se detectó que bloqueaba la unión de TSH pero carecía de actividad de TSAb. Los anticuerpos IRI-SAb2, IRI-SAb3 y 1H7 competían con la unión de TSH, y las concentraciones requeridas para desplazar un 50% de la TSH etiquetada con ^{125}I eran las de $2 \pm 0,5 \text{ nM}$ ($0,3 \pm 0,075 \mu\text{g/ml}$), $3,3 \pm 0,2 \text{ nM}$ ($0,5 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$) y $2,6 \pm 0,2 \text{ nM}$ ($0,4 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$), respectivamente. En contraste con ello, el IRI-SAb1 era poco eficaz, y a una concentración de $10 \mu\text{g/ml}$ (66 nM), era desplazado menos del 5% de la TSH etiquetada con ^{125}I .

Los anticuerpos purificados fueron a continuación etiquetados con éster de acridinio y usados en experimentos de saturación en tubos recubiertos con hTSHr. La K_d del mAb IRI-SAb1 anteriormente descrito era la de $2 \times 10^{-8} \text{ M}$. La afinidad de unión de IRI-SAb2, IRI-SAb3 y 1H7 era del orden de 10^{-10} M , pero se observaron curvas de saturación bifásica (K_{d1} : $0,7 \times 10^{-10} \text{ M}$, $2,8 \times 10^{-10} \text{ M}$, $1,2 \times 10^{-10} \text{ M}$, respectivamente. K_{d2} : $12,3 \times 10^{-10} \text{ M}$, $19,6 \times 10^{-10} \text{ M}$, $13,3 \times 10^{-10} \text{ M}$, respectivamente). Estas K_d s eran similares a la de la TSH bovina (K_{d1} : $0,2 \times 10^{-10} \text{ M}$, K_{d2} : $4,1 \times 10^{-10} \text{ M}$) (25) y a la de un anticuerpo monoclonal humano con propiedades de TSAb recientemente publicado (K_d : $5 \times 10^{-10} \text{ M}$) (14). Podría interpretarse que las dos distintas constantes de disociación presentadas por los anticuerpos IRI-SAb2, IRI-SAb3 y 1H7 para el TSHr reflejaban una preparación heterogénea de TSHr (parcialmente desnaturalizado) en los tubos recubiertos.

Tomando en consideración la aparentemente variable afinidad para la unión a preparaciones de hTSHr, puede decirse que las constantes de disociación K_d de los nuevos anticuerpos según la presente invención, al ser medidas en experimentos de saturación en tubos recubiertos con una preparación de TSHr humano recombinante, están situadas dentro de la gama de valores que va desde aproximadamente $20 \times 10^{-10} \text{ M}$ hasta aproximadamente $0,5 \times 10^{-10} \text{ M}$.

2.3.4. Competición con sueros de pacientes con enfermedad de Graves por la unión al TSHr

Los cuatro mAbs etiquetados con éster de acridinio fueron usados como indicadores de unión en tubos recubiertos con hTSHr (20). La competición fue sometida a ensayo con los sueros de 104 sujetos de control eutiroideos, 100 pacientes con enfermedad de Graves, 8 pacientes que dieron positivo en un ensayo de la actividad de bloqueo de la TSH (TBAb) y 20 pacientes TBII-negativos con enfermedad de Hashimoto. Exceptuando el IRI-SAb1, con todos los mAbs entraron eficaz y significativamente en competición los anticuerpos de los pacientes con enfermedad de Graves o TBAb-positivos, en comparación con los sujetos de control o con los pacientes con enfermedad de Hashimoto (Figura 2).

2.4. Caracterización de los epítopes

2.4.1. IRI-SAb2, IRI-SAb3 y 1H7

Los anticuerpos IRI-SAb2, IRI-SAb3 y 1H7 reconocieron al TSHr de ser humano, ratón, rata, gato, perro y oveja, al ser sometidos a ensayo por FACS (datos no ilustrados). Las quimeras entre el receptor de TSH y el receptor de LH/CG apuntaban, para los tres mAbs, a epítopes situados en los primeros 281 residuos del ectodominio (datos no ilustrados). Entonces sometimos a ensayo la capacidad de estos anticuerpos para interactuar con residuos de la superficie interior de la región en herradura del TSHr. Se ha demostrado que esta superficie (Figura 3A y Figura 3B) está compuesta de nueve unidades de siete residuos, X_1 - X_2 -L- X_3 -L- X_4 - X_5 . Las cadenas laterales de los residuos X se predice que quedarán encaradas al solvente, estando disponibles para la interacción con hormonas o anticuerpos (Figura 3C). Este modelo ha sido validado demostrando que el intercambio de específicos residuos X entre los GPHRs redundaba en un intercambio de la especificidad de reconocimiento en las correspondientes quimeras (3). Los tres mAbs no reconocieron a la quimera T90, que alberga 20 sustituciones de residuos X (Figura 3D), ni a la quimera T56, donde estaban mutados residuos X en 8 posiciones (3 residuos en la LRR1, 2 residuos en la LRR2 y 3 residuos en LRR7) (Figura 3B y Figura 3D). Entonces sometimos a ensayo un total de 35 mutantes donde residuos X estaban mutados individualmente, o en combinación. Los resultados están compilados en la Figura 4.

El epítipo de IRI-SAb2 incluía una serie de nueve residuos X que pertenecían a la LRR1, 2 y 3 (Figura 4A). Fue interesante constatar que, con la excepción de I^{60} (X_4 de la LRR1), ninguno de estos residuos fue capaz de afectar el reconocimiento de los constructos por parte del anticuerpo, al haber sido mutado en aislamiento. En contraste con ello, los tres triples mutantes ($X_{2,3,4}$ de la LRR1, $X_{2,3,5}$ de la LRR2 y $X_{2,3,4}$ de la LRR3) ya no eran reconocidos por el anticuerpo IRI-SAb2. Las mutaciones “en bloque” de los residuos $X_{1,2,3,4,5}$ de las LRR4 a 6 no deterioraban la interacción del anticuerpo IRI-SAb2 con el TSHr.

El epítipo del anticuerpo IRI-SAb3 incluía residuos X pertenecientes a las repeticiones ricas en leucina LRR1 a LRR6 (Figura 4B). Contrariamente a lo que sucede en la situación con el IRI-SAb2, muchos residuos abolieron completamente el reconocimiento del TSHr por parte del IRI-SAb3 al haber sido el mismo mutado individualmente: I^{60} y E^{61} (X_4 y X_5 de LRR1), Y^{82} e I^{85} (X_3 y X_5 de LRR2), E^{107} y R^{109} (X_3 y X_4 de LRR3), E^{157} (X_3 de LRR5) y K^{183} (X_3 de LRR6). Solamente en la LRR4 era necesaria la sustitución simultánea de los residuos $X_{2,3,4}$ para deteriorar la interacción. Las mutaciones de todos los residuos $X_{1,2,3,4,5}$ de las LRR7, 8 y 9 no deterioraban la interacción del IRI-SAb3 con el TSHr.

El epítipo del mAb 1H7 incluía residuos X que pertenecían a las repeticiones ricas en leucina LRR1 a LRR4 (Figura 4C). Los residuos que deterioraban plenamente el reconocimiento del TSHr al haber sido mutados individualmente eran los siguientes: T^{56} y K^{58} (X_2 y X_3 de LRR1), R^{80} e Y^{82} (X_2 y X_3 de LRR2), R^{109} (X_4 de LRR3). Análogamente a la observación con el IRI-SAb3, la mutación simultánea de los residuos $X_{2,3,4}$ de la LRR4 fue necesaria para deteriorar la interacción del 1H7 con el TSHr. Carecían de efecto las mutaciones en combinación de los residuos $X_{1,2,3,4,5}$ de la LRR5 y de la LRR6.

2.4.2. IRI-SAb1 (Investigado a efectos comparativos)

Los resultados de FACS de células COS-7 transfectadas con el TSHr de varias especies demostraron que el IRI-SAb1 reconoce al TSHr humano muy eficientemente, y en menor grado al receptor de oveja. Este anticuerpo no se unía al TSHr de rata, gato o perro, ni al receptor de ratón. Un primer análisis de la unión del IRI-SAb1 a una serie de quimeras entre los receptores de TSH de rata y humano apuntaba a un segmento del ectodominio entre las posiciones 21 (G^{21} , el primer aminoácido tras el péptido señal) y 165, que abarca la parte de agrupación de cisteína N-terminal y la primera mitad de la región estructurada en herradura [que contiene las repeticiones ricas en leucina (LRR) uno a cinco]. La alineación de TSHr de varias especies identificó dos residuos, el Q^{45} (situado en la región de agrupación de cisteína N-terminal) y el Q^{91} (situado en el bucle entre la segunda hoja β y la segunda hélice α de la región de las LRRs), que estaban sustituidos en los TSHr de las especies no reconocidas (por un H^{45} y un R^{91} , respectivamente). Cuando estos dos residuos “humano-específicos” fueron introducidos en el ambiente de TSHr de rata, fue restaurado el reconocimiento de la quimera. Estos resultados indican que Q^{45} y Q^{91} son con la máxima probabilidad parte del epítipo del IRI-SAb1. Finalmente, este anticuerpo fue sometido a ensayo por FACS sobre la quimera T90 (3), en la cual casi todos los residuos $X_{2,3,4,5}$ de las hebras β de las LRRs del TSHr estaban intercambiados con sus sosías del LH/CGr (véase la ref. (3) y la Figura 3C para los detalles). Estas sustituciones de aminoácidos no afectaron al reconocimiento por parte del IRI-SAb1, indicando que, de acuerdo con los datos de unión (Figura 1C), el epítipo de este anticuerpo no se solapa con la superficie interior de la región en herradura del TSHr (Figura 3D).

2.5. Secuencia y análisis estructural de las regiones variables de los anticuerpos IRI-SAb2, IRI-SAb3 y 1H7

Se determinaron las secuencias nucleotídicas de los genes V que codifican para los distintos mAbs y las correspondientes secuencias de aminoácidos (Figura 5). Se observa una alta identidad de secuencias entre las cadenas pesadas (93%) y las cadenas livianas (91%) de los anticuerpos IRI-SAb2 e IRI-SAb3, respectivamente. El mAb 1H7 compartía un 72-75% de la identidad con el IRI-SAb2 o el IRI-SAb3 para su cadena pesada y un 50-52% para la cadena liviana (Figura 5). Una relación de mutación de sustitución/silenciosa (R/S) > 2,9 dentro de las CDRs de cadena pesada reflejaba la presión selectiva positiva del antígeno en estos anticuerpos (24).

Los anticuerpos IRI-SAb2 e IRI-SAb3 se diferencian tan sólo en cuatro residuos CDR (Figura 5). Según la numeración de Kabat, el IRI-SAb2 tiene N⁵³ y R⁹³ en la cadena liviana, donde el IRI-SAb3 tiene S⁵³ y S⁹³. Son también variables dos residuos en la cadena pesada: F⁵³ y T⁵⁷ para el IRI-SAb2 e Y⁵³ y A⁵⁷ para el IRI-SAb3 (Figura 5). Los residuos en la posición 53 y 93 en la cadena liviana y en la posición 53 en la cadena pesada están situados en la superficie de la molécula, en la región de unión del antígeno predicha. Dichos residuos podrían interactuar con residuos del TSHr y podrían ser los responsables de las ligeramente distintas capacidades de los anticuerpos IRI-SAb2 y 3 para estimular al TSHr.

2.6. Actividad biológica de los anticuerpos IRI-SAb2 e IRI-SAb3 en ratones, *ex vivo* e *in vivo*

La capacidad de los dos anticuerpos para interactuar con el TSHr de ratón fue sometida a ensayo usando una línea celular CHO (MT3) que expresaba el receptor murino (datos no publicados). Mientras que el IRI-SAb1 no se unía al TSHr de ratón por FACS (véase lo indicado anteriormente), los anticuerpos IRI-SAb2, IRI-SAb3 y 1H7 reconocían igual de bien a los receptores humanos y murinos (Figura 6A). Estos resultados están de acuerdo con los datos relativos a los epítopes. Los residuos que se comprobó que son importantes en la interacción de los tres anticuerpos están conservados al 100% entre los TSHr humano y murino.

Los anticuerpos IRI-SAb2 e IRI-SAb3 fueron entonces sometidos a ensayo para determinar su capacidad para estimular al TSHr de ratón en medio salino normal (Figura 6B). Se observó un incremento dependiente de la concentración de la producción de cAMP, con una estimulación máxima de 22 veces los valores de cAMP basales para los dos anticuerpos. Esto representaba un 134% de la estimulación máxima generada en el mismo experimento por una concentración a saturación de TSH bovina. Las AC₅₀ eran 1,3 ± 0,66nM para el IRI-SAb2 y 3,8 ± 0,48nM para el IRI-SAb3.

Entonces se valoró la actividad estimuladora *in vivo* de los anticuerpos IRI-SAb2 e IRI-SAb3 mediante inyección intravenosa de IgGs en ratones. Sirvieron de controles PBS, el mAb BA8 (carente de actividad biológica) y el mAb 1H7. Dos días después de la inyección (Figura 7A), los niveles de T4 total eran casi el doble en los ratones a los que se les inyectó IRI-SAb2 o IRI-SAb3, en comparación con los grupos de control. De los 10 ratones a los que se les inyectó IRI-SAb2 o IRI-SAb3, nueve presentaron un muy bajo nivel de TSH, de menos de 10 mIU/l. En contraste con ello, los niveles de TSH en los grupos de control eran muy heterogéneos: Tan sólo 2 ratones de los 15 controles presentaban unos valores de TSH de menos de 10 mIU/l (Figura 7C). En todos los ratones a los que se les inyectó IRI-SAb2 o IRI-SAb3, los niveles de T4 se mantuvieron altos de manera estable a los cuatro días postinyección (Figura 7B) y los valores de TSH se mantuvieron por debajo de 10 mIU/l (Figura 7D). A continuación investigamos las respuestas a corto y largo plazo a los TSAb, en un grupo de ratones a los que se les inyectó IRI-SAb2 (Figura 7E). Los niveles de T4 ya eran elevados (8,18 ± 0,83 µg/l) a las 8 horas postinyección. Estos niveles disminuían ligeramente a las 24 horas y se habían casi normalizado a los siete días postinyección, lo cual es coherente con la indicada vida media en suero de la IgG2a de ratón (6-8 días).

En estos ratones hipertiroides, la morfología de la tiroides estaba considerablemente modificada en comparación con los ratones de control. Las capas epiteliales foliculares estaban a menudo hechas de células hipertróficas, con polos apicales irregulares que sobresalían al interior del coloide. También fueron detectados numerosos tirocitos necróticos, vertidos en algunos lúmenes foliculares, lo cual se considera como un signo de un efecto tóxico de la hiperestimulación aguda. También se observaron en los folículos que eran algunos tirocitos moribundos con núcleos excéntricos pignóticos. Se observó un extenso infiltrado en toda la glándula. Estas células, en el intersticio, fueron tipificadas inmunohistoquímicamente como células inmunes CD45+, y se observaron numerosos macrófagos Mac-1+ positivos entre los tirocitos y dentro del coloide.

2.7 Deposición al amparo del Tratado de Budapest

Los hibridomas que producen los dos anticuerpos estimuladores IRI-SAb2 e IRI-SAb3 y el anticuerpo bloqueador 1H7 fueron depositados el 27 de mayo de 2004 en la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, y les fueron asignados los Números de Acceso (Eingangsnummern), DSM ACC2664, DSM ACC2662 y DSM ACC2663, respectivamente. Se adjuntan los Formularios de Recepción Internacional de la Autoridad Depositaria Internacional DSMZ.

Discusión

Con una notable excepción (14), han sido generados anticuerpos monoclonales con una convincente actividad estimuladora de la tiroides tan sólo a partir de modelos murinos de enfermedad de Graves (11-13). Esto implica que se ha obtenido éxito de animales en los cuales ha sido quebrada la tolerancia a sí mismos, lo cual puede a su vez explicar el bajo rendimiento de estos experimentos. Puesto que el cribaje funcional de mAbs de ratones hipertiroideos se hace habitualmente con células transfectadas que expresan el receptor humano, es de esperar que los mAbs identificados reconozcan epítopes comunes al ratón y al hombre. De entre los de una serie de mAbs estimuladores y bloqueadores aislados a partir de ratones con enfermedad de Graves experimental, se han estudiado en detalle tres monoclonales con actividad de TSAb (IRI-SAb1, IRI-SAb2, IRI-SAb3) y uno con actividad bloqueadora (ref. (11) y la presente solicitud).

Conclusiones:

a. El anticuerpo IRI-SAb2 es un agonista pleno del TSHr humano

A pesar de que se considera que actúan en la gama nanomolar baja (25-28), los autoanticuerpos con actividad de TSAb presentan una amplia gama de eficacia en los ensayos basados en cAMP que se usan actualmente. La observación de que el llevar a cabo ensayos con TSAb en medios de baja salinidad ocasionaba un significativo incremento de la sensibilidad, condujo a los técnicos a adoptar condiciones salinas bajas para realizar ensayos clínicos estándar de TSAb (29). Análogamente, los primeros mAbs murinos con actividad de TSAb fueron principalmente sometidos a ensayo en medios de baja salinidad (13) y no hubo indicación acerca de su funcionamiento como agonistas plenos o parciales del TSHr humano. Un anticuerpo monoclonal de hámster era claramente un agonista parcial (12). El IRI-SAb2 y, en menor grado, el IRI-SAb3 constituyen una excepción. Al ser sometidos a ensayo bajo condiciones de salinidad normal, su capacidad para estimular la acumulación de cAMP en células CHO que expresan el hTSHr asciende a un 98% y un 80% de la estimulación máxima alcanzada por la bTSH, lo cual está a la altura de los más fuertes TSAb que se encuentran en raros pacientes. Combinada con esta alta eficacia, su potencia se aproxima a la de la TSH (EC_{50} $2,75 \pm 0,25$ nM y $16,5 \pm 3,5$ nM frente a 1 nM para la bTSH). La afinidad de unión al TSHr humano tanto del IRI-SAb2 como del IRI-SAb3 es igual a la de autoanticuerpos purificados de pacientes con enfermedad de Graves (25). En comparación, los previamente caracterizados IRI-SAb1 (Figura 1A) y mAb MS-1 (12) son débiles agonistas parciales, que sugieren que no reconocen bien al epítipo "disparador". Asimismo, contrariamente al MS-1, que presenta una curva de concentración-acción de forma acampanada (interpretada como indicación de regulación a la baja del TSHr) (12), el IRI-SAb2 y el IRI-SAb3 presentan clásicas curvas sigmoides de concentración-acción en gráficos semilogarítmicos, sin indicio alguno de regulación a la baja o desensibilización a altas concentraciones de mAb (Figura 1A). Un monoclonal humano descrito recientemente (14) se aproxima a las características funcionales del IRI-SAb2. Sin embargo queda por demostrar si se comporta como un agonista pleno del TSHr humano en medio salino normal.

b. La actividad estimuladora del IRI-SAb2 y del IRI-SAb3 está preservada en los fragmentos Fab

La dimerización/oligomerización de los GPCRs es tema de intenso interés en la actualidad. A pesar de ciertas indicaciones contradictorias, no hay sin embargo fuerte evidencia de que la modificación del estado de di/oligomerización de los GPCRs o de los GPHRs esté implicada en el proceso de activación, *per se*. Nuestros resultados con fragmentos Fab de IRI-SAb2 y de IRI-SAb3 confirman anteriores resultados obtenidos con TSAb de pacientes (1, 30) de que los anticuerpos monovalentes son tan activos como las IgGs intactas, descartando que la activación por parte de estos anticuerpos se derivase de una agregación o dimerización forzada.

c. Delineación molecular de epítipes conformacionales de TSAb: hay más de una manera de estimular al TSHr

Desde los primeros estudios, cuando llegó a estar disponible el cDNA de TSHr clonado, se dedujo que los epítipes de los TSAb de los pacientes con enfermedad de Graves eran conformacionales (1, 31 - 33). Esta noción está de acuerdo con los resultados obtenidos con los actuales así como los anteriormente descritos mAbs con actividad estimuladora (12, 13). El IRI-SAb1 se unía tan sólo al TSHr humano y su epítipo estaba localizado en la parte N-terminal del ectodominio. Este epítipo comprende a un residuo de glutamina (Q^{45}), localizado en la primera agrupación de cisteína del ectodominio, inmediatamente del lado de cola con respecto a la parte LRR. Q^{45} pertenece a un segmento del receptor del que se predice que será altamente conformacional y estará particularmente bien expuesto a la interacción con TSAb en constructos en los cuales la parte serpentina del TSHr ha sido sustituida por un anclaje de glicosilfosfatidilinositol. El epítipo del IRI-SAb1 contiene un segundo residuo de glutamina (Q^{91}) situado en la parte convexa de la estructura en herradura del ectodominio, en la hélice α de la segunda LRR. No es de esperar que esta cara de la herradura establezca contacto directo con TSH (3), lo cual es coherente con la ausencia de actividad desplazadora de la TSH del IRI-SAb1 (Figura 1C). Esto hace surgir la posibilidad de que algunos anticuerpos sin actividad de TBII pudiesen actuar como TSAb. A pesar de que han sido descritos pacientes con enfermedad de Graves TBII-negativos, los mismos son raros, de acuerdo con la noción de que la mayoría de TSAb no compiten con la TSH por la unión al TSHr (19). En coincidencia con este parecer, el IRI-SAb1 no es desplazado por la inmensa mayoría de los autoanticuerpos de pacientes con enfermedad de Graves (Figura 2A).

Contrariamente al IRI-SAb1, los monoclonales IRI-SAb2 e IRI-SAb3 según la presente invención no son específicos del TSHr humano; sino que reconocen al TSHr de varias especies, incluyendo a la del ratón, en la cual fueron generados. Mientras que sus epítopes estaban también localizados en la parte N-terminal del receptor, contrariamente al IRI-SAb1, dichos monoclonales comprenden varios residuos que pertenecen a las hebras β de LRRs. Como tales, sus epítopes están mapeados en la cara cóncava de la parte aminoterminal de la estructura en herradura (Figuras 3 y 4), una región de la que se ha demostrado que está directamente implicada en interacciones específicas con TSH (3). Una comparación detallada, al nivel de los aminoácidos individuales, de los epítopes del IRI-SAb2 y del IRI-SAb3 pone de manifiesto un extensivo solapamiento que comprende a las hojas β de las LRR1, 2 y 3 (Figura 4). Es interesante constatar que el epítope del IRI-SAb3 sigue extendiéndose hasta residuos de LRR4, 5 y 6 (Figura 4). Considerando la más débil eficacia del IRI-SAb3 en comparación con el IRI-SAb2, esto sugiere que la actividad agonística puede depender más de la naturaleza de los residuos que interactúan que de la extensión de la superficie de interacción. A pesar de que la interpretación de tal solapamiento debe tomarse con cierta precaución (las sustituciones de aminoácidos de las que se deducen pueden ocasionar perturbaciones estructurales de largo alcance), estos datos delinean a las hojas β de las repeticiones ricas en leucina LRR1 a 3 como hojas que contienen un “disparador de la activación” del ectodominio del TSHr. En paralelo a esta observación, el muy limitado número de sustituciones de aminoácidos en las regiones Fv del IRI-SAb2 y del IRI-SAb3 que previsiblemente interactuarán con los epítopes (tres residuos, dos en las cadenas livianas y uno en las cadenas pesadas) (Figura 5) indica que los dos mAbs son originarios de una redistribución de genes común. Dicho muy limitado número de sustituciones de aminoácidos demuestra que la diferencia entre la actividad agonista parcial o plena de los anticuerpos depende de diferencias estructurales muy sutiles. A su vez, estas observaciones abren el camino a la identificación de las interacciones activadoras de la región disparadora, mediante mutagénesis recíproca dirigida por el sitio de los anticuerpos recombinantes y los constructos de ectodominio.

d. Los epítopes de mAbs fuertemente estimuladores y bloqueadores no se solapan entre sí y con los determinantes de la unión a TSH

El epítope del mAb 1H7 fuertemente bloqueador se solapa notablemente con los de los anticuerpos IRI-SAb2 e IRI-SAb3. Comparte 5 residuos con cada uno de ellos (T^{56} y K^{58} , R^{80} , Y^{82} , R^{109} con el IRI-SAb2; Y^{82} , R^{109} , F^{130} , G^{132} , F^{134} con el IRI-SAb3). De nuevo debe tomarse con precaución la interpretación de tal solapamiento al nivel de los aminoácidos individuales (véase lo expuesto anteriormente). Sin embargo, esta observación es una fuerte indicación de que la diferencia entre los anticuerpos estimuladores y bloqueadores puede comprender epítopes muy similares y cercanos. Estudios funcionales que implicasen a constructos mutados tanto del ectodominio como de los mAbs recombinantes dotados o no de actividad estimuladora deberían ayudar a delinear los residuos implicados en el disparador de la activación. No sorprendentemente, el mAb bloqueador 1H7 es asimismo desplazado del receptor por autoanticuerpos de pacientes con enfermedad de Graves tales como el IRI-SAb2, y el IRI-SAb3 (Figura 2D). Esta observación está completamente de acuerdo con los recientes resultados que demuestran que los autoanticuerpos purificados de pacientes con actividad bloqueadora “pura” (es decir que no presentan actividad de TSA) no pueden distinguirse de los TSA purificados en cuanto a su capacidad para ser desplazados del TSHr por autoanticuerpos de clásicos pacientes con enfermedad de Graves (25). Juntas, estas observaciones ponen en tela de juicio a la noción de que los anticuerpos activadores y bloqueadores reconocerían a los epítopes situados en las partes aminoterminal y carboxiterminal del ectodominio (33, reseña).

e. Los anticuerpos monoclonales IRI-SAb2 y 3 son eficaces estimuladores del TSHr murino *ex vivo* e *in vivo*

Su aislamiento a partir de un ratón que presentaba signos de tirotoxicosis sugirió fuertemente que el IRI-SAb2 y el IRI-SAb3 eran responsables del estado hipertiroides (o contribuían al mismo). Como se ha expuesto anteriormente, esto implica que se ha quebrado la tolerancia a sí mismo y que algunos anticuerpos en este animal deben ser capaces de reconocer y activar al TSHr murino. Tanto el IRI-SAb2 como el IRI-SAb3 presentan estas características al ser sometidos a ensayo *ex vivo* sobre células CHO que expresan el TSHr de ratón (Figura 6). Inesperadamente, tanto el IRI-SAb2 como el IRI-SAb3 eran agonistas más fuertes que la TSH bovina en este sistema de ensayo (Figura 6). Es concebible que estabilizasen más eficientemente la conformación activa del ectodominio en comparación con la TSH bovina, no habiéndose explorado la situación con la TSH murina.

Asimismo, la diferencia de eficacia de los dos mAbs que se observó en la estimulación del TSHr humano no se observa con el receptor de ratón (comparar la Figura 1 con la Figura 6).

De acuerdo con estas observaciones, los ratones a los que se les inyectaron por vía intravenosa IRI-SAb2 e IRI-SAb3 presentaron signos biológicos de hipertiroidismo (Figura 7). La cinética del cambio de la T4 total en plasma tras inyección de IRI-SAb2 era en términos generales compatible con las conocidas vidas medias del isotipo IgG2a de ratón (34), sin signo alguno de desensibilización aguda (Figura 7E). La histología de las glándulas, cuatro días después de la inyección de IRI-SAb2 o de IRI-SAb3, presenta los esperados signos de hiperestimulación de los tirocitos. Inesperadamente, sin embargo, dicha histología también revelaba agudos signos de inflamación y toxicidad, con numerosos macrófagos infiltrados y células moribundas descamadas en los espacios coloides. Este panorama podría interpretarse como la consecuencia de una estimulación aguda del TSHr, que induce una sobreproducción de H_2O_2 en

la membrana apical, seguida de un proceso inflamatorio. La capacidad de producir una estimulación puramente humoral por parte de los TSAb para ocasionar una reacción inflamatoria en las glándulas de ratones no inmunizados es interesante en el contexto de la patofisiología de la enfermedad de Graves. Según lo comúnmente sabido los signos inflamatorios del tejido tiroideo que se observan en la enfermedad de Graves son la consecuencia de una reacción autoinmune en curso, mantenida por antígenos locales. Nuestros resultados sugieren que la sobreestimulación *per se* puede contribuir de manera importante al cuadro inflamatorio. Futuros estudios en los cuales se administrarán crónicamente a ratones no acondicionados IRI-SAb2 e IRI-SAb3 demostrarán si la sobreestimulación de las glándulas puede por sí misma conducir a una reacción autoinmune con generación de autoanticuerpos anti-tiroglobulina y/o anti-tiroperoxidasa.

Perspectivas:

Como ya se ha señalado, los anticuerpos monoclonales que se describen en la presente solicitud constituyen prometedoras nuevas herramientas para sondear los mecanismos moleculares implicados en la activación del TSHr.

Regiones variables de estos mAbs pueden ser clonadas y, en contraste con la TSH, pueden ser fácilmente producidas como material recombinante. Tanto las regiones CDR de los anticuerpos como la parte LRR del receptor pueden ser modificadas mediante mutagénesis dirigida por el sitio y pueden ser sometidas a ensayo en ensayos funcionales. Esto debería abrir el camino a la identificación de residuos interactuantes en las dos partes asociadas, lo cual a su vez puede proporcionar pistas acerca de los cambios conformacionales asociados a los mecanismos de activación.

Desde un punto de vista clínico, se usan cada vez más en varios campos de la medicina anticuerpos monoclonales con actividad biológica (35). Con su alta potencia y eficacia, su larga vida media y su más bajo coste de producción previsto, el IRI-SAb2 y el IRI-SAb3 (o derivados humanizados de los mismos) pueden ser vistos como una interesante alternativa a la TSH recombinante para varios protocolos *in vivo* en el hombre. Éstos incluyen la estimulación de restos de la tiroides o metástasis, en pacientes con cáncer de tiroides diferenciado antes de la medición de la tiroglobulina en suero y de la exploración de todo el cuerpo con I^{131} (36) o de la administración de dosis terapéuticas de I^{131} . En consecuencia, la presente invención, según uno de sus aspectos, también se refiere al uso de mAbs de la presente invención, o de fragmentos o formas humanizadas o de cadena única de los mismos, en forma no etiquetada o etiquetada con un marcador detectable o con un radioisótopo, para la preparación de medicamentos terapéuticos o de composiciones y agentes diagnósticos a efectos de obtención de imágenes y de diagnosis *in vivo*.

El mAb bloqueador 1H7 es de interés como potencial alternativa para un uso (método terapéutico) en el tratamiento del hipertiroidismo de acuerdo con la DE 199 07 094 C1 y la correspondiente WO 00/49050 A2/A3. En consecuencia, la presente invención también cubre el uso de tal mAb bloqueador para la preparación de un medicamento para tratar el hipertiroidismo.

Por añadidura, su alta afinidad para unirse al TSHr humano puede cualificar el IRI-SAb2 y al IRI-SAb3, así como al 1H7, como indicadores en inmunoensayos *in vitro* o con aplicación en la obtención de imágenes o bien, ligados a un radiomarcador o a un agente citotóxico o a una toxina, para la destrucción especialmente de metástasis no absorbedoras de yodo de los cánceres de tiroides menos diferenciados.

Péptidos correspondientes a regiones variables o a CDRs de los nuevos mAbs pueden ser usados a efectos de ensayo, como inmunógenos y en purificación por afinidad.

Lista de referencias:

1. Rapoport,B., Chazenbalk,G.D., Jaume,J.C., and McLachlan,S.M. 1998. The thyrotropin (TSH) receptor: interaction with TSH and autoantibodies. *Endocr.Rev.* **19**:673-716.
2. Szkudlinski,M.W., Fremont,V., Ronin,C., and Weintraub,B.D. 2002. Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiol Rev.* **82**:473-502.
3. Smits,G., Campillo,M., Govaerts,C., Janssens,V., Richter,C., Vassart,G., Pardo,L., and Costagliola,S. 2003. Glycoprotein hormone receptors: determinants in leucine-rich repeats responsible for ligand specificity. *EMBO J.* **22**:2692-2703.
4. Kajava,A.V., Vassart,G., and Wodak,S.J. 1995. Modeling of the three-dimensional structure of proteins with the typical leucine-rich repeats. *Structure.* **3**:867-877.
5. Weetman,A.P. 2000. Graves' Disease. *N Engl J Med* **343**:1236-1248.
6. Prabhakar,B.S., Bahn,R.S., and Smith,T.J. 2003. Current perspective on the pathogenesis of Graves' disease and ophthalmopathy. *Endocr.Rev.* **24**:802-835.
7. Shimojo,N., Kohno,Y., Yamaguchi,K., Kikuoka,S., Hoshio-ka,A., Niimi,H., Hirai,A., Tamura,Y., Saito,Y., Kohn, L.D. et al. 1996. Induction of Graves-like disease in mice by immunization with fibroblasts transfected with the thyrotropin receptor and a class II molecule. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**:11074-11079.
8. Costagliola,S., Many,M.C., Deneff,J.F., Pohlenz,J., Refetoff,S., and Vassart,G. 2000. Genetic immunization of outbred mice with thyrotropin receptor cDNA provides a model of Graves' disease. *J.Clin.Invest* **105**:803-811.
9. Nagayama,Y., Kita-Furuyama,M., Ando,T., Nakao,K., Mizuguchi,H., Hayakawa,T., Eguchi,K., and Niwa,M. 2002. A novel murine model of Graves' hyperthyroidism with intramuscular injection of adenovirus expressing the

- thyrotropin receptor. *J.Immunol.* **168**:2789-2794.
10. Rao,P.V., Watson,P.F., Weetman,A.P., Carayanniotis,G., and Banga,J.P. 2003. Contrasting activities of thyrotropin receptor antibodies in experimental models of Graves' disease induced by injection of transfected fibroblasts or deoxyribonucleic acid vaccination. *Endocrinology* **144**:260-266.
 11. Costagliola,S., Franssen,J.D., Bonomi,M., Urizar,E., Willnich,M., Bergmann,A., and Vassart,G. 2002. Generation of a mouse monoclonal TSH receptor antibody with stimulating activity. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **20**;299:891-896.
 12. Ando,T., Latif,R., Pritsker,A., Moran,T., Nagayama,Y., and Davies,T.F. 2002. A monoclonal thyroid-stimulating antibody. *J.Clin.Invest* **110**:1667-1674.
 13. Sanders,J., Jeffreys,J., Depraetere,H., Richards,T., Evans,M., Kiddie,A., Brereton,K., Groenen,M., Oda,Y., Furmaniak,J. et al. 2002. Thyroid-stimulating monoclonal antibodies. *Thyroid* **12**:1043-1050.
 14. Sanders,J., Evans,M., Premawardhana,K.E., Depraetere,H., Jeffreys,J., Richards,T., Furmaniak,J., and Rees Smith,B. 2003. Human monoclonal thyroid stimulating autoantibody. *The Lancet* **362**:126-128.
 15. Costagliola,S., Khoo,D., and Vassart,G. 1998. Production of bioactive amino-terminal domain of the thyrotropin receptor via insertion in the plasma membrane by a glycosylphosphatidylinositol anchor. *FEBS Lett* **436**:427-433.
 16. Costagliola,S., Rodien,P., Many,M.C., Ludgate,M., and Vassart,G. 1998. Genetic immunization against the human thyrotropin receptor causes thyroiditis and allows production of monoclonal antibodies recognizing the native receptor. *J.Immunol.* **160** :1458-1465.
 17. Perret,J., Ludgate,M., Libert,F., Gerard,C., Dumont,J.E., Vassart,G., and Parmentier,M. 1990. Stable expression of the human TSH receptor in CHO cells and characterization of differentially expressing clones.

- Biochem.Biophys.Res.Communic.* **171**:1044-1050.
18. Van Sande,J., Lejeune,C., Ludgate,M., Munro,D.S., Vassart,G., Dumont,J.E., and Mockel,J. 1992. Thyroid stimulating immunoglobulins, as thyrotropin, activate both the cyclic AMP and PIP2 cascades in CHO cells expressing the TSH receptor. *Mol.Cell Endocrinol.* **88**:R1-R5.
 19. Costagliola,S., Morgenthaler,N.G., Hoermann,R., Badenhoop,K., Struck,J., Freitag,D., Poertl,S., Weglöhner,W., Hollidt,J.M., Quadbeck,B. et al. 1999. Second generation assay for thyrotropin receptor antibodies has superior diagnostic sensitivity for Graves' disease. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **84**:90-97.
 20. Minich,W.B., Lenzner,C., and Morgenthaler,N.G. 2004. Antibodies to TSH-receptor in thyroid autoimmune disease interact with monoclonal antibodies whose epitopes are broadly distributed on the receptor. *Clin Exp.Immunol.* **136**:129-136.
 21. Weiss,R.E., Forrest,D., Pohlenz,J., Cua,K., Curran,T., and Refetoff,S. 1997. Thyrotropin regulation by thyroid hormone in thyroid hormone receptor β -deficient mice. *Endocrinology* **138**:3624-3629.
 22. Costagliola,S., Many,M.C., Stalmans Falys,M., Tonacchera,M., Vassart,G., and Ludgate,M. 1994. Recombinant thyrotropin receptor and the induction of autoimmune thyroid disease in BALB/c mice: a new animal model. *Endocrinology* **135**:2150-2159.
 23. Kettleborough,C.A., Saldanha,J., Ansell,K.H., and Bendig,M.M. 1993. Optimization of primers for cloning libraries of mouse immunoglobulin genes using the polymerase chain reaction. *Eur.J Immunol.* **23**:206-211.
 24. Jukes,T.H. and King,J.L. 1979. Evolutionary nucleotide replacements in DNA. *Nature* **281**:605-606.
 25. Morgenthaler,N.G., Minich,W.B., Willnich,M., Bogusch,T., Hollidt,J.M., Weglohner,W., Lenzner,C., and Bergmann,A. 2003. Affinity purification and diagnostic use of TSH receptor autoantibodies from human serum. *Molecular and Cellular Endocrinology* **212**:73-79.

26. Chazenbalk, G.D., Wang, Y., Guo, J., Hutchison, J.S., Segal, D., Jaume, J.C., McLachlan, S.M., and Rapoport, B. 1999. A Mouse Monoclonal Antibody to a Thyrotropin Receptor Ectodomain Variant Provides Insight into the Exquisite Antigenic Conformational Requirement, Epitopes and in Vivo Concentration of Human Autoantibodies. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* **84**:702-710.
27. Cornelis, S., Uttenweiler-Joseph, S., Panneels, V., Vassart, G., and Costagliola, S. 2001. Purification and characterization of a soluble bioactive amino-terminal extracellular domain of the human thyrotropin receptor. *Biochemistry* **40**:9860-9869.
28. Jaume, J.C., Kakinuma, A., Chazenbalk, G.D., Rapoport, B., and McLachlan, S.M. 1997. Thyrotropin receptor autoantibodies in serum are present at much lower levels than thyroid peroxidase autoantibodies: analysis by flow cytometry. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **82**:500-507.
29. Kasagi, K., Hidaka, A., Hatabu, H., Lu, C., Misaki, T., Iida, Y., and Konishi, J. 1989. Mechanisms of increased sensitivity for detection of thyroid stimulating antibodies by use of hypotonic medium. *Acta Endocrinol.Copenh.* **121**:216-222.
30. Rees Smith, B., McLachlan, S.M., and Furmaniak, J. 1988. Autoantibodies to the thyrotropin receptor. *Endocr.Rev.* **9**:106-121.
31. Libert, F., Lefort, A., Gerard, C., Parmentier, M., Perret, J., Ludgate, M., Dumont, J.E., and Vassart, G. 1989. Cloning, sequencing and expression of the human thyrotropin (TSH) receptor: evidence for binding of autoantibodies. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **165**:1250-1255.
32. Nagayama, Y., Kaufman, K.D., Seto, P., and Rapoport, B. 1989. Molecular cloning, sequence and functional expression of the cDNA for the human thyrotropin receptor. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **165**:1184-1190.
33. Rapoport, B. and McLachlan, S. 2000. Thyroid Autoantibodies in Graves' disease. In *Graves' Disease Pathogene-*

- sis and Treatment. B.Rapoport and McLachlan, S., editors. Kluwer Academic Publishers, Boston. 43-66.
34. Vieira, P. and Rajewsky, K. 1988. The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice. *Eur.J Immunol.* **18**:313-316.
35. Gura, T. 2002. Therapeutic antibodies: Magic bullets hit the target. *Nature* **417**:584-586.
36. Pacini, F., Molinaro, E., Castagna, M.G., Agate, L., Elisei, R., Ceccarelli, C., Lippi, F., Taddei, D., Grasso, L., and Pinchera, A. 2003. Recombinant Human Thyrotropin-Stimulated Serum Thyroglobulin Combined with Neck Ultrasonography Has the Highest Sensitivity in Monitoring Differentiated Thyroid Carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* **88**:3668-3673.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> B.R.A.H.M.S Aktiengesellschaft

<120> Nuevos anticuerpos monoclonales estimuladores y bloqueadores de la tiroides, secuencias de sus regiones variables, y sus usos en medicina diagnóstica, preventiva y terapéutica

<130> 4363 EP/AS

<160> 21

<170> Patentin versión 3.1

<210> 1

<211> 97

<212> PRT

<213> mamífero

<400> 1

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr Thr Met Asn Trp
1 5 10 15

Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn
20 25 30

Pro Phe Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Gly Lys Ala
35 40 45

Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu
50 55 60

Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Val
65 70 75 80

Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser
85 90 95

Ser

<210> 2

<211> 84

<212> PRT

<213> mamífero

<400> 2

Glu Gly Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val
1 5 10 15

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gly Gly Gln Ser Leu Glu Leu Leu Ile Tyr
20 25 30

Gly Ala Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Arg
35 40 45

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser Glu
50 55 60

Asp Met Thr Asn Tyr Phe Cys Glu Gln Tyr Ser Arg Tyr Pro Leu Thr
65 70 75 80

Phe Gly Ala Gly

<210> 3
<211> 12
<212> PRT
<213> mamífero
<400> 3

Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr Thr Met Asn
1 5 10

<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> mamífero
<400> 4

Leu Ile Asn Pro Phe Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln
1 5 10

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> mamífero
<400> 5

Arg Val Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp
1 5

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> mamífero
<400> 6

Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> mamífero
<400> 7

Gly Ala Ser Asn Arg His Thr
1 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> mamífero
 <400> 8

Glu Gln Tyr Ser Arg Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 9
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> mamífero
 <400> 9

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr Thr Met Asn Trp
 1 5 10 15

Val Lys Gln Ser His Gly Tyr Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn
 20 25 30

Pro Tyr Asn Gly Gly Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala
 35 40 45

Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu
 50 55 60

Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Val
 65 70 75 80

Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 85 90 95

Ser

<210> 10
 <211> 84
 <212> PRT
 <213> mamífero
 <400> 10

Glu Gly Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val
 1 5 10 15

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Val Gly Gln Ser Leu Glu Leu Leu Ile Tyr
 20 25 30

Gly Ala Ser Ser Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser
 35 40 45

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asp Val Gln Ser Glu
50 55 60

Asp Met Thr Asn Tyr Phe Cys Glu Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
65 70 75 80

Phe Gly Ala Gly

<210> 11
<211> 13
<212> PRT
<213> mamífero
<400> 11

Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Ala Asn Tyr Asn Gln
1 5 10

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> mamífero
<400> 12

Gly Ala Ser Ser Arg His Thr
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> mamífero
<400> 13

Glu Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 14
<211> 99
<212> PRT
<213> mamífero
<400> 14

Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His Trp
1 5 10 15

Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp
20 25 30

Pro Ser Asp Ser Tyr Ser Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala
35 40 45

Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser
50 55 60

Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Tyr
65 70 75 80

Gly Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
85 90 95

Val Ser Ser

<210> 15
<211> 83
<212> PRT
<213> mamífero
<400> 15

Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10 15

Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp
20 25 30

Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly
35 40 45

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp
50 55 60

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Tyr Thr Phe
65 70 75 80

Gly Gly Gly

<210> 16
<211> 12
<212> PRT
<213> mamífero
<400> 16

Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His
1 5 10

<210> 17
<211> 13
<212> PRT
<213> mamífero
<400> 17

Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Ser Asn Tyr Asn Gln
1 5 10

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> mamífero
 <400> 18

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

<210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> mamífero
 <400> 19

Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5

<210> 20
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> mamífero
 <400> 20

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> mamífero
 <400> 21

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Tyr Thr
 1 5

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpos monoclonales (mAbs) que tienen actividad estimuladora de la tiroides (TSA_b), cuyos anticuerpos monoclonales son obtenibles mediante inmunización genética de ratones contra el receptor de TSH humano (hTSH_r), selección de los ratones que dan positivo para la presencia de anticuerpos, generación de hibridomas usando células del bazo de los ratones seleccionados, y expansión, ensayo y selección de los clones de hibridomas que producen mAbs o fragmentos F(ab')₂, Fab o Fv de tales anticuerpos monoclonales, cuyos anticuerpos son producidos por células de hibridomas depositadas al amparo del Tratado de Budapest del 27 de mayo de 2004 en la DSMZ de Braunschweig con los Números de Acceso DSM ACC2664 y DSM ACC2662.
2. Anticuerpos monoclonales (mAbs) que tienen actividad bloqueadora de la tiroides (TBA_b), cuyos anticuerpos monoclonales son obtenibles mediante inmunización genética de ratones contra el receptor de TSH humano (hTSH_r), selección de los ratones que dan positivo para la presencia de anticuerpos, generación de hibridomas usando células del bazo de los ratones seleccionados, y expansión, ensayo y selección de los clones de hibridomas que producen mAbs o fragmentos F(ab')₂, Fab o Fv de tales anticuerpos monoclonales, cuyos anticuerpos son producidos por células de hibridomas depositadas al amparo del Tratado de Budapest el 27 de mayo de 2004 en la DSMZ de Braunschweig con el Número de Acceso ACC2663.
3. Anticuerpos o fragmentos según la reivindicación 1, caracterizados por el hecho de que los mAbs pertenecen al isotipo de IgG IgG2A y contienen una cadena pesada según la ID SEC N°: 1 y una cadena liviana según la ID SEC N°: 2, o son fragmentos derivados de tales anticuerpos.
4. Anticuerpos o fragmentos según la reivindicación 1, caracterizados por el hecho de que los mAbs pertenecen al isotipo de IgG IgG1 y contienen una cadena pesada según la ID SEC N°: 9 y una cadena liviana según la ID SEC N°: 10, o son fragmentos derivados de tales anticuerpos.
5. Uso de anticuerpos o fragmentos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en inmunoensayos competitivos *in vitro* o en bioensayos *in vitro* para la determinación de autoanticuerpos contra el receptor de TSH (TRA_b).
6. Uso según la reivindicación 5, en donde los anticuerpos o fragmentos llevan una etiqueta que permite una detección de sus preparaciones de unión al TSH_r.
7. Uso de anticuerpos o fragmentos según las reivindicaciones 1 a 4, en donde dichos anticuerpos están etiquetados o llevan un radioisótopo que permite la obtención de imágenes *in vivo* de tejido y/o células que presentan el TSH_r.

Figura 1

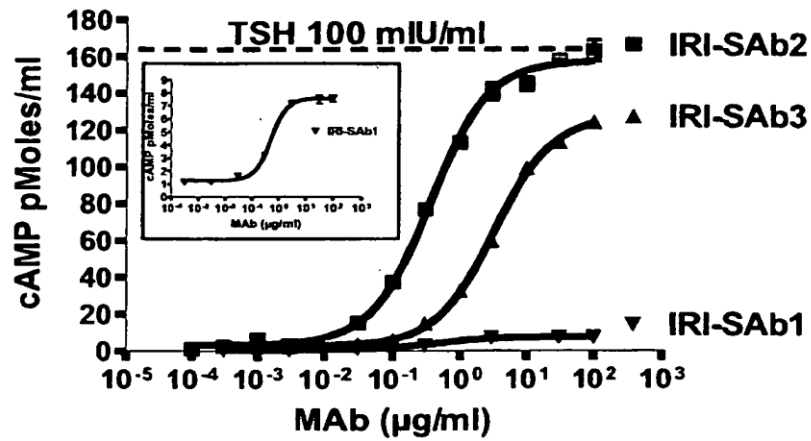
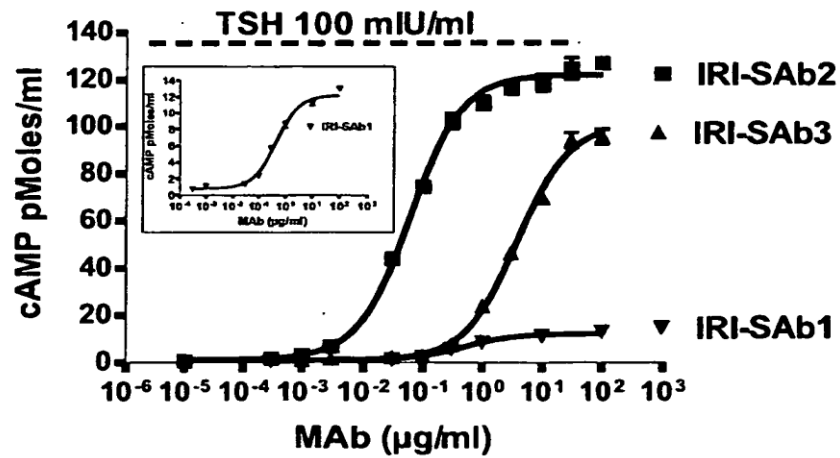
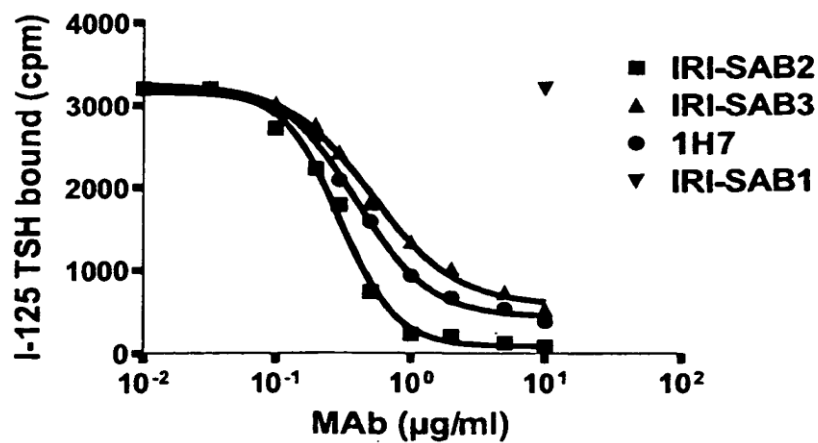
A**B****C**

Figura 2

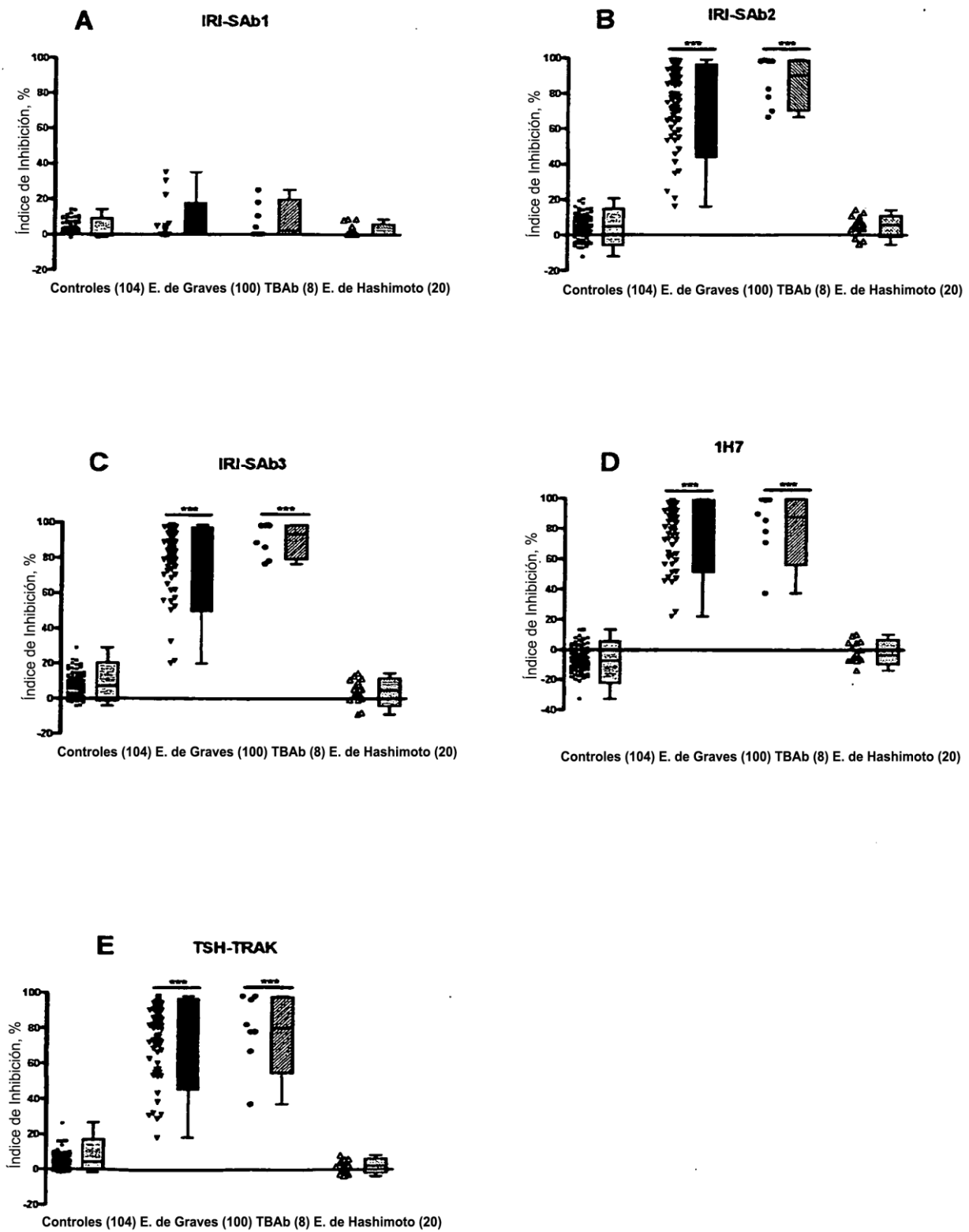


Figura 3

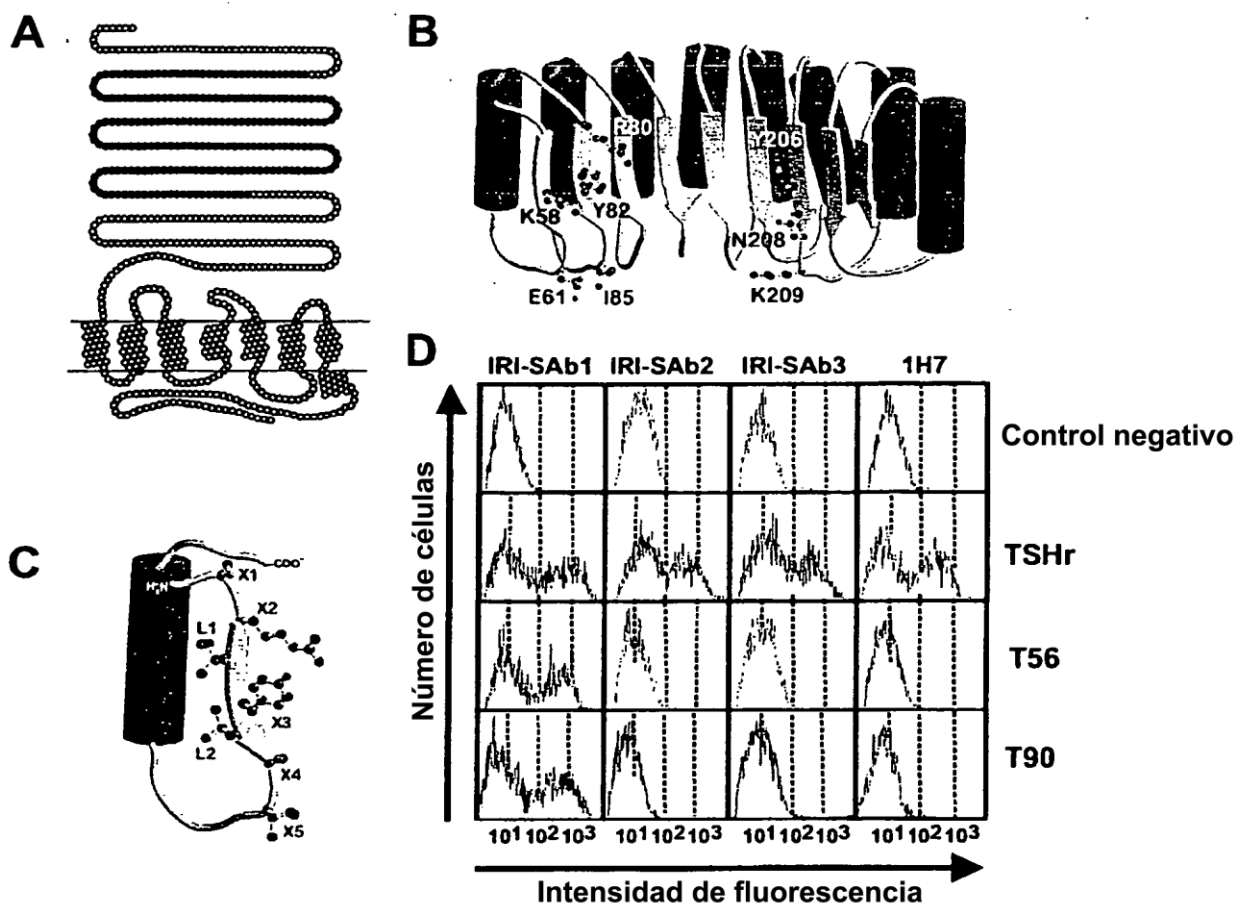


Figura 4

AEpítotope IRI-SAb2

	LRR1	LRR2	LRR3	LRR4	LRR5	LRR6	LRR7	LRR8	LRR9
X1	Q55	S79	T104	K129	F154	L180	D203	S229	K250
X2	T56	R80	H105	F130	I155	T181	A204	L230	E251
L									
X3	K58	Y82	E107	G132	E157	K183	Y206	D232	I253
L									
X4	I60	S84	R109	F134	T159	Y185	N208	S234	R255
X5	E61	I85	N110	N135	D160	N186	K209	Q235	N256

BEpítotope IRI-SAb3

	LRR1	LRR2	LRR3	LRR4	LRR5	LRR6	LRR7	LRR8	LRR9
X1	Q55	S79	T104	K129	F154	L180	D203	S229	K250
X2	T56	R80	H105	F130	I155	T181	A204	L230	E251
L									
X3	K58	Y82	E107	G132	E157	K183	Y206	D232	I253
L									
X4	I60	S84	R109	F134	T159	Y185	N208	S234	R255
X5	E61	I85	N110	N135	D160	N186	K209	Q235	N256

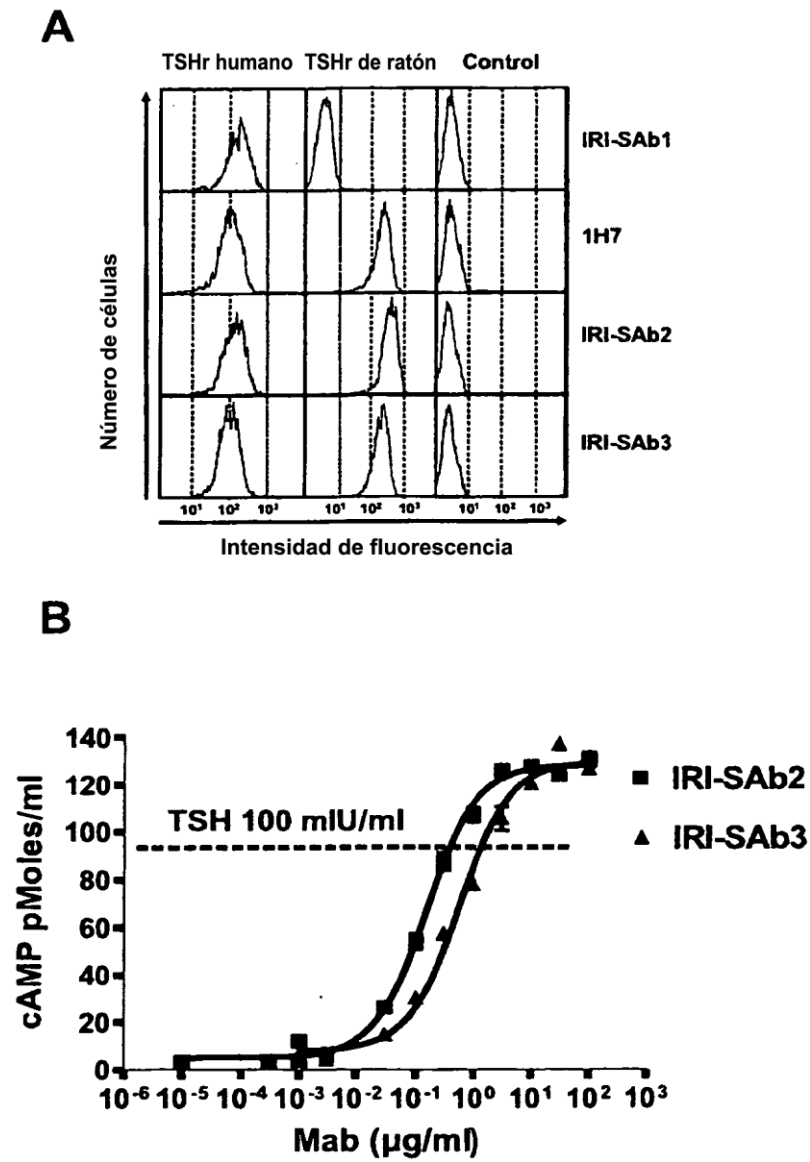
CEpítotope 1H7

	LRR1	LRR2	LRR3	LRR4	LRR5	LRR6	LRR7	LRR8	LRR9
X1	Q55	S79	T104	K129	F154	L180	D203	S229	K250
X2	T56	R80	H105	F130	I155	T181	A204	L230	E251
L									
X3	K58	Y82	E107	G132	E157	K183	Y206	D232	I253
L									
X4	I60	S84	R109	F134	T159	Y185	N208	S234	R255
X5	E61	I85	N110	N135	D160	N186	K209	Q235	N256

Figura 5

VH		24	CDR1	35	49	CDR2	61
IRI-SAb2	AY60795 ^A	.SCKASGYSTAYTMWVKQSHGKNLEWIGLINEFGNGGNYNQKF					
IRI-SAb3	AY60797	.SCKASGYSTAYTMWVKQSHGYNLEWIGLINEFGNGGNYNQKF					
1H7	AY60799	.SCKTSGYTFTSYMMHWVKQRPQGQGLEWIGLEIDPDSYSYNYNQKF					
IRI-SAb2		EGKATLTVDKSSSTTAYMELLSLTSEDSAVYYCARRVWD..YFDYW					
IRI-SAb3		KGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARRVWD..YFDYW					
1H7		KGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARNYSGYYFDYW					CDR3
IRI-SAb2		GQGTSLTVSS					
IRI-SAb3		GQGTTLTVSS					
1H7		GQGTTLTVSS					
VL		25	CDR1	34	50	CDR2	56
IRI-SAb2	AY60796	.EGSITCKASQNVGTNVAVWYQQKGGQSLELLIYGASNRHTGVPDR					
IRI-SAb3	AY60798	.EGSITCKASQNVGTNVAVWYQQKVGQSLELLIYGASSRHTGVPDR					
1H7	AY607100	.KVTMTCSASSSVS YMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAR					
IRI-SAb2		FTGRSGTGDTLTITNVQSEDMTNYFCEQYSRYPLTFGAG..					
IRI-SAb3		FTGSGSGTGDTLTITVDVQSEDMTNYFCEQYSSYPLTFGAG..					
1H7		FSGSGSGTSYSLTISSEAEADAATYYQQQWSSNPYTFGGG..					CDR3

Figura 6



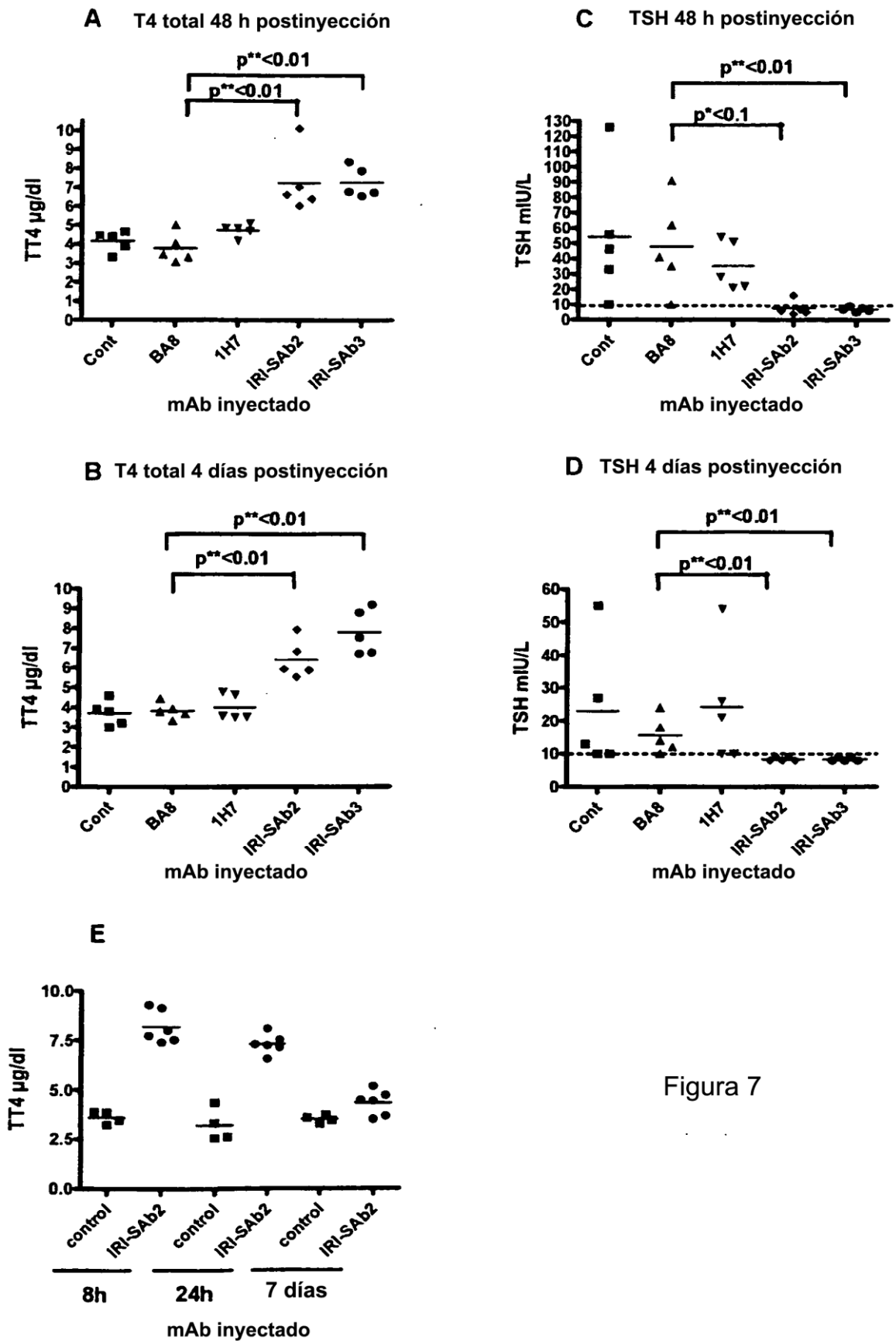


Figura 7