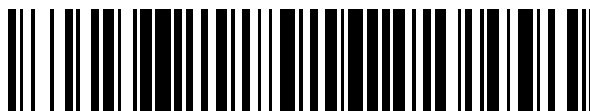


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 482 145**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2007** **E 07732193 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014** **EP 1999153**

54 Título: **Anticuerpos agonistas contra TSHR**

30 Prioridad:

29.03.2006 GB 0606276

12.04.2006 GB 0607376

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

01.08.2014

73 Titular/es:

**KING'S COLLEGE LONDON (100.0%)
AN INSTITUTE INCORPORATED BY ROYAL
CHARTER STRAND
LONDON WC2R 2LS, GB**

72 Inventor/es:

**BANGA, JASVINDER-PAUL, SINGH;
GILBERT, JACQUELINE, ANN;
DUNN-WALTERS, DEBORAH y
PADOA, CAROLYN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 482 145 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos agonistas contra TSHR

La invención se refiere a anticuerpos, particularmente a anticuerpos humanos que se unen a, y antagonizan, el receptor de la hormona estimulante del tiroides (TSHR) en seres humanos y a sus usos en funciones de diagnóstico y terapéuticas.

Como es bien sabido, la glándula tiroidea es un sitio de control metabólico en el organismo. El cáncer de la glándula tiroidea no es particularmente habitual, pero la alta tasa de reaparición de la enfermedad requiere supervisión prolongada. Normalmente, durante el tratamiento del cáncer del tiroides, la mayoría de los tumores tiroideos se extirpa, pero a menudo queda una pequeña cantidad que debe tratarse con radioterapia. Después de cirugía, es necesario tratar al paciente con hormonas tiroideas, ya que el paciente no la producirá más. Una función de la glándula tiroidea es captar el yodo del organismo. Por tanto, debe ser posible tratar cualquier célula tumoral restante con yodo radioactivo. Si bien, por desgracia, las células de cáncer tiroideo no captan yodo bien. Por tanto, para que el yodo radioactivo funcione, el paciente debe de tratarse con TSH recombinante o tener suspendido el tratamiento con hormonas tiroideas para elevar los niveles de TSH naturales, para estimular la captación de yodo. Sin embargo, una parte significativa de los pacientes tratados no responden a la TSH recombinante después de algún tiempo. Además, la TSH recombinante es muy costosa y no a todos los pacientes se les puede ofrecer este tratamiento. La suspensión de la hormona tiroidea tiene efectos secundarios bastante desagradables para el paciente, particularmente fatiga, calambres musculares, hinchazón y estreñimiento. Sería beneficioso si pudiese encontrarse un nuevo tratamiento más asequible que estimulase la captación de yodo, sin ocasionar dichos efectos secundarios desagradables.

La enfermedad de Graves es un trastorno común mediado por anticuerpos en la que el antígeno diana primario se ha identificado como el receptor de la superficie de las células foliculares tiroideas para la hormona estimulante del tiroides (TSHR). Un grupo de anticuerpos anti-TSHR se comportan como agonistas, imitando la acción del ligando natural, la TSH, sobre el receptor y se conocen como anticuerpos estimulantes del tiroides (TSAbs). Los TSAbs hiperestimulan las células foliculares tiroideas para segregar tirosina produciendo hipertiroidismo. Otro grupo de anticuerpos anti-TSHR (TSABs) puede actuar como antagonistas de la unión de la TSH al receptor que ocasionalmente puede conducir a hipotiroidismo. También se han descrito anticuerpos de clase neutra contra el TSHR que no tienen actividad agonista ni antagonista, aunque su función en enfermedades queda por aclarar.

El tratamiento de la enfermedad de Graves ha sido estándar durante casi cincuenta años. Es muy difícil estudiar la enfermedad de Graves debido a que los anticuerpos implicados en la enfermedad están presentes a niveles muy bajos. Sería útil tener anticuerpos que estimulasen el TSHR con el fin de promover estudios en la enfermedad de Graves.

El TSHR pertenece a la familia de receptores acoplados a la proteína G (GPCR) con un gran dominio extracelular, una región de siete dominios transmembrana (TM) y una cola citoplasmática corta. La región TM de los GPCR es responsable de la transmisión de la señal de activación regulando mensajeros secundarios pequeños tales como AMPc, diacilglicerol e inositol trifosfato (IP3). Es probable que el modo de activación del TSHR y la cascada reguladora intracelular consiguiente puedan ser importantes responsables de las variaciones observadas en diferentes pacientes con respecto a hiperplasia tóxica (aumento de la glándula, bocio), complicaciones extratiroideas y respuesta al tratamiento. El TSHR es único entre la gran familia de los GPCR en experimentar modificaciones postraduccionales complejas tales como la escisión en dos subunidades unidas por puentes disulfuro, conocidas como la subunidad A y la subunidad B. La subunidad A de 53 kD, que corresponde al ectodominio del TSHR es de especial interés ya que se une preferencialmente a TSAbs y se ha propuesto que el fragmento escindido resultante liberado en la corriente sanguínea puede ser el estímulo primario para provocar la autoinmunidad en individuos susceptibles.

El aislamiento de TSAbs como anticuerpos monoclonales (mabs) ha sido un objetivo muy buscado, aunque se ha demostrado que es extraordinariamente difícil de conseguir. El establecimiento de modelos animales experimentales de la enfermedad de Grave hipertiroides ha conducido al desarrollo de mabs de IgG con actividad TSAb limitada. Al mismo tiempo, se describió un mab de IgG humano contra TSHR, desarrollado a partir de un paciente con enfermedad de Grave, con fuerte actividad tiroidea en el intervalo de nanogramos. El mab humano actuaba como un agonista completo activando el TSHR a un equivalente de estimulación máximo con respecto al conseguido con concentraciones saturantes de TSH. Más recientemente, también se ha descrito un mab murino desarrollado a partir de un modelo experimental, con eficacia similar, que se comporta como un agonista completo para el TSHR. Además, el mab fue patógeno en experimentos de transferencia de anticuerpos *in vivo* y supuestamente condujo a un infiltrado linfocítico de la glándula tiroidea. Los determinantes sobre el receptor para el agonista completo y otros mabs murinos bloqueantes y estimuladores son dependientes del plegamiento conformacional, tridimensional del ectodominio, que reside en una región rica en repeticiones de leucina dentro de la estructura en forma de herradura. La escasez de autoanticuerpos agonistas completos contra TSHR presente en el suero de pacientes, impide realizar una comparación de sus propiedades, que puede impactar sobre la patogénesis de la enfermedad de Grave. Los autores de la invención han desarrollado sorprendentemente dos anticuerpos que tienen una afinidad extraordinariamente alta por el TSHR y por consiguiente estimulan fuertemente al TSHR. Cabe destacar que, los dos mabs muestran actividad agonista completa contra el TSHR, pero también muestran sutiles diferencias en su

comportamiento a bajas concentraciones de IgG en cuanto a actividad antagonista para el TSHR. Los mabs son patógenos *in vivo* cuando se transfieren a ratones por lo que una sola inyección de cantidades en microgramos de IgG induce hipersecreción rápida de tiroxina lo que conduce a hipertiroidismo sostenido con considerables cambios morfológicos, pero con infiltrado de células mononucleares mínimo en las glándulas tiroideas.

- 5 De acuerdo con la invención, se proporciona un anticuerpo que se une al TSHR humano con alta afinidad y especificidad.

Por consiguiente, se proporciona un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1.

Para que la invención pueda entenderse mejor, se definen algunos términos. A lo largo de la memoria descriptiva pueden encontrarse otras definiciones.

- 10 El término "anticuerpo" es muy conocido en la técnica. En el presente documento significa una inmunoglobulina o cualquier fragmento funcional de la misma. Incluye cualquier polipéptido que tenga un sitio de unión al antígeno. Incluye, aunque sin limitación, anticuerpos monoclonales, policlonales, monoespecíficos, poliespecíficos, no
15 específicos, humanizados, humanos, monocatenarios, quiméricos, sintéticos, recombinantes, híbridos, mutados, injertados y/o generados *in vitro*. El término "anticuerpo" incluye fragmentos de anticuerpo tales como Fab, F (ab')₂, Fv, scFv, Fd, dAb y cualquier otro fragmento de anticuerpo que conserve la función de unión al antígeno. Típicamente, dichos fragmentos comprenderían un dominio de unión al antígeno. Cuando el término "anticuerpo" va precedido de la palabra "intacto" significa una molécula de anticuerpo completa, en particular dos cadenas pesadas, cada una con una región variable y tres regiones constantes, y dos cadenas ligeras, cada una con una región variable y una región constante.
- 20 Los anticuerpos intactos también se conocen como inmunoglobulinas (Ig). Como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos intactos comprenden cadenas ligeras y cadenas pesadas. Las cadenas ligeras se clasifican en dos isotipos, y las cadenas pesadas se clasifican en cinco isotipos (A, D, E, G y M). Algunos isotipos de cadena pesada se dividen además en subclases de isotipos, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Se prefiere particularmente que los anticuerpos de la invención sean anticuerpos de IgG. En particular se prefieren anticuerpos de IgG2b e IgG2a.
- 25 El dominio y las estructuras tridimensionales de diferentes anticuerpos se conocen en la técnica. La cadena ligera está formada por un dominio constante (C) y un dominio variable (V) N terminal. La cadena pesada está formada por tres o cuatro dominios constantes (C_H), un región bisagra, y un dominio variable (V_H) N terminal. El C_H adyacente al dominio V_H se denomina C_{H1}. Los dominios V_H y V_L contienen cuatro regiones de secuencia conservada denominadas regiones marco conservadas (FR, *Framework Regions*) (FR1, FR2, FR3 y FR4), que forman un
30 armazón para tres regiones de secuencia hipervariable denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Las CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) contienen la mayoría de los aminoácidos del anticuerpo que se une específicamente al antígeno. Las CDR de cadena pesada se indican como H1, H2 y H3, mientras que las CDR de cadena ligera se indican como L1, L2 y L3. El término CDR es muy conocido en la técnica. Un experto en la técnica sería capaz de reconocer las CDR en un anticuerpo o fragmento utilizando la numeración de Kabat y los aminoácidos encontrados en cualquier lado de las CDR.
- 35

El fragmento Fab (Fragmento de unión al antígeno) consta de los dominios V_H, C_{H1}, V_L y C_L unidos por enlace covalente mediante un enlace disulfuro entre las regiones constantes. El fragmento Fv es más pequeño y consta de los dominios V_H y V_L no unidos por enlace covalente. Para superar la tendencia de disociación de los dominios no unidos por enlace covalente, puede construirse un fragmento Fv monocatenario (scFv, *single chain* Fv). Los scFv
40 contienen un polipéptido flexible que conecta el extremo C de V_H con el extremo N de V_L, o el extremo C de V_L con el extremo N de V_H. Como conector puede utilizarse un péptido de 15 oligómeros (Gly₄Ser)₃, pero se conocen bien otros conectores.

- Los anticuerpos de la invención pueden unirse al Receptor de la Hormona Estimulante del Tiroides (TSHR) Humano. Preferentemente, los anticuerpos también reaccionan en cruzado con el TSHR de ratón. Además pueden agonizar
45 ese receptor, es decir, estimular la producción de hormona tiroidea. Es posible explorar estas funciones utilizando técnicas muy conocidas en la materia. Un fragmento funcional es un fragmento de anticuerpo que aún puede unirse al TSHR. Además, un fragmento funcional puede antagonizar el TSHR.

- Las expresiones "sitio de unión al antígeno", "dominio de unión al antígeno", y "fragmento de unión al antígeno" significan la parte de un anticuerpo que se une específicamente al antígeno. La parte del antígeno que reconoce el anticuerpo y que se al mismo se denomina como "epítipo". Un dominio de unión al antígeno normalmente
50 comprende regiones variables tanto de la cadena ligera (V_L) como de la cadena pesada (V_H), pero no tiene que comprender ambas. Los fragmentos de unión al antígeno incluyen fragmentos Fab (fragmentos monovalentes que constan de los dominios V_L, V_H, C_L y C_{H1}); fragmentos F(ab')₂ (fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra); fragmentos Fd (los dos dominios V_H y C_{H1});
55 fragmentos Fv (dominios V_L o V_H, fragmentos dAb (Ward y col., (1989) Nature 341: 544-546), una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR); y Fv monocatenarios. Los diversos fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia. Es posible explorar la funcionalidad de los fragmentos, por ejemplo, uniéndose y agonizando a un receptor utilizando técnicas conocidas

en la materia.

Como se conoce en la materia, es posible utilizar anticuerpos murinos de ratones y ratas para terapia en seres humanos. Sin embargo, los anticuerpos de roedores tienden a provocar fuertes respuestas inmunitarias contra Anticuerpos anti Murinos Humanos (HAMA) que limitan su utilidad para la aplicación repetida en el mismo paciente. Por tanto, los anticuerpos de acuerdo con la invención son preferentemente quiméricos, humanizados (con CDR injertada o reformada).

El término “quimérico” se refiere a anticuerpos en los que todas las regiones variables de un anticuerpo de ratón o rata se expresan junto con regiones constantes humanas. Esto dota al anticuerpo de funciones efectores humanas y también reduce la inmunogenicidad (HAMA) ocasionada por la región Fc murina.

Los anticuerpos “humanizados” (denominados también anticuerpos con CDR injertada o reformada)” son una alternativa a los anticuerpos quiméricos en los que solo las regiones determinantes de la complementariedad de las regiones V del anticuerpo del roedor se combinan con las regiones marco conservadas de las regiones V humanas. La idea es que estos anticuerpos deban ser más de tipo humano que quimérico y por tanto quizá menos inmunogénicos que los anticuerpos quiméricos.

También es posible obtener anticuerpos totalmente humanos de ratones transgénicos u otros animales transgénicos. Se han creado ratones transgénicos que tienen un repertorio de segmentos de genes de la línea germinal de la inmunoglobulina humana. Por tanto, cuando estos ratones se inmunizan generan anticuerpos de tipo humano. Los linfocitos B de dichos ratones inmunizados pueden utilizarse en la producción de anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos y ácidos nucleicos de la invención están preferentemente aislados. El término “aislado” se refiere a una molécula sustancialmente libre de su entorno natural. Por ejemplo, una proteína aislada está sustancialmente libre de material celular o de otras proteínas procedentes de la fuente celular o tisular de la que procede. El término también se refiere a preparaciones en las que la proteína aislada es suficientemente pura para composiciones farmacéuticas, o tienen una pureza de al menos 70-80 % (p/p); o al menos 80-90 % (p/p); o al menos del 90-95 %; o al menos del 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o del 100 % (p/p).

La frase “sustancialmente homólogo(a)” significa que la secuencia de aminoácidos o de nucleótidos pertinente (por ejemplo CDR (s), dominio V_H o V_L) será idéntica a o tendrá diferencias mínimas con las secuencias específicamente definidas. Las diferencias mínimas incluyen cambios mínimos de aminoácidos, tales como 1 o 2 sustituciones en una secuencia de 5 aminoácidos de una región específica. En el caso de anticuerpos, el segundo anticuerpo tiene la misma especificidad y tiene al menos el 50 % de la afinidad del mismo.

También forman parte de esta solicitud secuencias sustancialmente idénticas u homólogas (por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 85 %) a las secuencias descritas en este documento. En algunas realizaciones, la identidad de secuencia puede ser de aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o mayor. En particular, cuando se manejan secuencias de las CDR, homología sustancial significa preferentemente al menos una homología del 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %. Cuando se manejan secuencias más grandes, tales como las secuencias de las regiones variables de cadena ligera o pesada, la homología puede ser al menos del 85 %, 87 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. Las secuencias que incluyen regiones constantes pueden tener menos homología, por ejemplo, 75 %, 80 %, 85 %, 87 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o mayor. Las secuencias sustancialmente idénticas u homólogas también incluyen secuencias de ácidos nucleicos que se hibridarán en condiciones de hibridación selectivas (por ejemplo, condiciones de hibridación altamente rigurosas), con el complemento de la cadena específicamente definido. El porcentaje de identidad puede determinarse mediante algoritmos de alineamiento convencionales, por ejemplo, la Herramienta de Alineamiento Local Básica (BLAST) descrita por Altschul y col. ((1990) J. Mol. Biol., 215: 403-410); el algoritmo de Needleman y col. ((1970) J. Mol. Biol., 48: 444-453); o el algoritmo de Meyers y col. ((1988) Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17). El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o de nucleótidos también puede determinarse utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller ((1989) CABIOS, 4: 11-17) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0). Esto deben saberlo los expertos en la técnica.

El término “rigurosas” describe condiciones para hibridación y lavado. Los expertos en la técnica conocen condiciones rigurosas y pueden encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3. 1-6.3. 6.

Pueden producirse anticuerpos por cualquier procedimiento conocido en la materia. Un procedimiento preferido es utilizar técnicas de hibridoma tradicionales (Kohler y Milstein (1975) Nature, 256: 495-499). Para técnicas de producción de anticuerpos adicionales, véase Antibodies: A Laboratory Manual, eds. Harlow y col., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. En la presente invención no existen limitaciones como procedimiento de producción o fuente de anticuerpos.

La invención proporciona anticuerpos que se unen al TSHR como se define en las reivindicaciones adjuntas. También se contempla que un experto en la materia pueda crear más anticuerpos modificando la secuencia (o secuencias) V_H y/o V_L proporcionada. Dichos anticuerpos pueden proceder de un experto en la materia que utilice

- técnicas conocidas en la materia y también se incluyen en la invención. Por ejemplo, en cualquier parte del anticuerpo pueden introducirse modificaciones tales como sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos, siempre que conserve la funcionalidad. Los cambios pueden introducirse en las regiones marco conservadas, especialmente para mejorar, por ejemplo, la estabilidad del anticuerpo. También pueden introducirse cambios en las CDR para modificar la afinidad del anticuerpo por el TSHR. La afinidad de un anticuerpo por el TSHR puede analizarse utilizando técnicas convencionales conocidas en la materia.
- En particular se contemplan modificaciones conservativas en las secuencias V_H y V_L . Dichos cambios producirán moléculas que tengan características funcionales y químicas similares a las de los anticuerpos a partir de los que se realizan las modificaciones. Las modificaciones conservativas son modificaciones sin probabilidad de que cambie drásticamente la forma o función del anticuerpo, tal como reemplazando un aminoácido por otro aminoácido que tenga características similares, por ejemplo, reemplazando un aminoácido hidrófobo por otro aminoácido hidrófobo.
- Cuando se sustituyen aminoácidos, pueden utilizarse aminoácidos naturales, así como aminoácidos de origen no natural, que se han creado, por ejemplo, por síntesis química.
- Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden unirse a otras moléculas. Por ejemplo, los anticuerpos pueden unirse a una proteína o a un polímero no proteínico tal como polietilenglicol, polipropilenglicol y polioxialquilenos. La unión de los anticuerpos a dichas moléculas es bien conocida en la técnica y puede realizarse mediante procedimientos convencionales. La unión de anticuerpos a dichas moléculas puede tener un efecto sobre determinadas características de los anticuerpos, por ejemplo semivida en sangre.
- Otras moléculas que pueden unirse a los anticuerpos incluyen etiquetas o marcadores funcionales o detectables, tales como marcadores enzimáticos, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina, radiomarcadores y restos químicos, por ejemplo biotina. Los anticuerpos también pueden unirse a agentes tóxicos tales como toxinas, moléculas citostáticas o citotóxicas y radioisótopos. Como alternativa, los anticuerpos pueden unirse a otros anticuerpos.
- En una realización particularmente preferida, los anticuerpos se unen a yodo radiactivo.
- La unión de dichas moléculas con anticuerpos es bien conocida en la materia y puede efectuarse mediante técnicas convencionales, por ejemplo, mediante unión covalente.
- La invención también proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican anticuerpos de acuerdo con la invención. Los ácidos nucleicos pueden comprender ADN o ARN y pueden ser sintéticos (completa o parcialmente) o recombinantes (completa o parcialmente).
- Las secuencias de nucleótidos proporcionadas y referencias de las mismas incluyen moléculas de ADN con la secuencia específica e incluyen moléculas de ARN con la secuencia específica en la que la U se sustituye por T.
- Se proporciona particularmente un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo, que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de al menos el 85 % con una secuencia de cadena pesada seleccionada de las secuencias mostradas en las figuras:
- 51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 66, 67, 68, 69, 71, 72; y
una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de al menos 85 % con una secuencia de cadena ligera seleccionada de las secuencias mostradas en las figuras: 55, 60, 70 y 73.
- En particular, las secuencias tienen preferentemente una homología del 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % con las secuencias proporcionadas.
- La invención también proporciona vectores que comprenden al menos un ácido nucleico de acuerdo con la invención.
- También se proporciona una célula huésped que comprende al menos una construcción de este tipo.
- Adicionalmente se proporciona el procedimiento para crear un anticuerpo que comprenda cultivar células huésped en condiciones apropiadas de manera que exprese el anticuerpo a partir del ácido nucleico. Después de la expresión y producción, cualquier fragmento deseado o anticuerpo puede aislarse y/o purificarse utilizando cualquier técnica adecuada, y después utilizarse según sea apropiado.
- En la técnica se conocen sistemas para la clonación y expresión de polipéptidos en una diversidad de células huésped. Como células huésped adecuadas se incluyen células de mamífero, células de insecto, células de plantas, células de levadura o células procariotas, por ejemplo, células de *E. coli*. Como células de mamífero, disponibles en la técnica para la expresión de polipéptidos heterólogos que incluyen líneas celulares linfocíticas (por ejemplo, NSO), células HEK293, células de ovario de hámster Chino (CHO), células COS, células HeLa, células renales de crías de hámster, células de ovocitos.

Se prefiere particularmente que los anticuerpos de la invención sean anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse mediante procedimientos convencionales, como describen Kohler y Milstein por primera vez.

- 5 En particular, los anticuerpos pueden producirse usando un hibridoma. Se proporciona un primer hibridoma que tiene el número de acceso ECACC 06032901. También se proporciona un segundo hibridoma que tiene el número de acceso ECACC 06032902.

También se proporciona un anticuerpo producido por un hibridoma de acuerdo con la invención.

- 10 Adicionalmente se proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo que comprende cultivar un hibridoma de acuerdo con la invención en condiciones que permitan la expresión del anticuerpo y aislar el anticuerpo del cultivo.

Como se sabe en la técnica, un hibridoma es una célula creada artificialmente por fusión de una célula tumoral con un linfocito B. Dichas células se producen en el procedimiento de producción de anticuerpos monoclonales convencional, como describen Kohler y Milstein por primera vez.

- 15 Los anticuerpos de la invención tienen usos múltiples. En primer lugar, pueden utilizarse para impulsar los estudios del TSHR y de la enfermedad de Graves.

- 20 En segundo lugar, los anticuerpos también tienen usos terapéuticos y de diagnóstico. En un uso, los anticuerpos pueden utilizarse para dirigirse a células cancerosas, especialmente a células tumorales tiroideas y a metástasis de tumores tiroideos. Los anticuerpos también pueden utilizarse para administrar compuestos radioactivos tales como yodo radioactivo a las células tumorales ("balas mágicas") o para estimular la captación de yodo radioactivo por parte de las células tumorales, con fines tanto de diagnóstico como terapéuticos. Cuando las células tumorales captan yodo radioactivo, éstas se destruyen. También pueden identificarse explorando la radioactividad utilizando la estrategia de bala mágica o el procedimiento de captación de yodo radioactivo.

Se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención.

- 25 La composición es adecuada para la administración a pacientes. Además del anticuerpo, esta puede comprender uno o más excipientes farmacéuticos apropiados tales como disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción. La preparación de composiciones farmacéuticas y el uso de excipientes son bien conocidos en la técnica. También pueden incluirse otros compuestos activos. Las composiciones farmacéuticas pueden también incluirse en un envase, paquete o dosificador junto con instrucciones para su administración.

- 30 Una composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con su vía de administración deseada. Los procedimientos para realizar la administración son conocidos por los expertos habituales en la materia. También es posible crear composiciones que puedan administrarse por vía tópica u ora, o que puedan transmitirse a través de las membranas mucosas. Por ejemplo, la administración puede ser intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intracavidad, subcutánea o transdérmica.

- 35 Las soluciones o suspensiones utilizadas para aplicación intradérmica o subcutánea típicamente incluyen al menos uno de los siguientes componentes: un diluyente estéril, tal como agua, solución salina, aceites no volátiles, polietilenglicol, glicerina, propilenglicol, u otro disolvente sintético; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido acetilendiaminotetraacético (EDTA); tampones tales como acetato, citrato o fosfato; y agentes de tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases. Dichas preparaciones pueden incluirse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiple.

- 40 Las soluciones o suspensiones utilizadas para administración intravenosa incluyen un transportador tal como solución salina fisiológica, agua bacteriostática, CremophorELT™ (BASF, Parsippany, NJ), etanol o poliol. En todos los casos, la composición debe ser estéril y líquida para facilitar su administración con jeringa. La fluidez adecuada a menudo puede obtenerse usando lecitina o tensioactivos. La composición también debe ser estable en las condiciones de preparación y conservación. La prevención de microorganismos puede realizarse con agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, etc. En muchos casos, en la composición pueden incluirse agente isotónicos (azúcar), polialcoholes (manitol y sorbitol) o cloruro de sodio. La absorción prolongada de la composición puede realizarse añadiendo un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

- 45 Las composiciones orales incluyen un diluyente inerte o un transportador comestible. La composición puede incluirse en gelatina o comprimirse en comprimidos. Con la finalidad de una administración oral, los anticuerpos pueden incorporarse, por ejemplo, con excipientes y prepararse como comprimidos o cápsulas. La composición oral también puede contener, por ejemplo, un aglutinante, un excipiente, un lubricante y saporíferos.

Las composiciones también pueden administrarse mediante una vía transmucosa o transdérmica. Por ejemplo, los anticuerpos que comprenden una parte Fc pueden atravesar membranas mucosas en el intestino, boca o pulmones (mediante receptores de Fc). La administración transmucosa puede realizarse utilizando pastillas para chupar, pulverizaciones nasales, inhaladores o supositorios. La administración transdérmica también puede realizarse utilizando una composición que contenga pomadas, bálsamos, geles o cremas conocidos en la técnica. Para la administración transmucosa o transdérmica, pueden utilizarse penetrantes apropiados para atravesar la barrera.

Para la administración por inhalación, los anticuerpos se administran en un pulverizador en aerosol desde un envase o dosificador presurizado, que contiene un propulsor (por ejemplo, líquido o gas) o un nebulizador.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención se preparan con transportadores para proteger a los anticuerpos contra la eliminación rápida del organismo. A menudo se utilizan polímeros biodegradables (por ejemplo, etilvinilacetato, polianhídridos, ácido poliglucólico, colágeno, poliortoésteres, ácido poliláctico).

Los expertos en la materia conocen procedimientos para la preparación de dichas composiciones farmacéuticas.

Los anticuerpos o composiciones de acuerdo con la invención pueden administrarse en cantidades terapéuticamente eficaces, determinadas, basándose, por ejemplo, en el peso, sexo, edad y afección médica del paciente. Los anticuerpos o composiciones pueden administrarse en una sola dosis, como un bolo o como una terapia continua.

La expresión "cantidad eficaz" se refiere a una dosificación o cantidad que es suficiente para estimular la actividad del TSHR para producir hormona tiroidea o para estimular la captación de yodo.

Como se utiliza en este documento, los términos "sujeto" y "paciente" pretenden incluir animales humanos y no humanos. Como sujetos puede incluirse un paciente humano que tiene un cáncer tiroideo o una metástasis de cáncer tiroideo.

La expresión "animales no humanos" de la invención incluye todos los vertebrados, tales como primates no humanos, cabras, perros, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

Adicionalmente, se proporciona un anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso en terapia.

En particular, la invención proporciona el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención, en la preparación de un medicamento para el diagnóstico o tratamiento del cáncer.

El término cáncer se refiere especialmente a cánceres de la glándula tiroidea y a metástasis de dichos cánceres.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención también pueden utilizarse en ensayos, tales como ensayos de competencia para determinar la presencia de anticuerpos anti-TSHR. Se proporciona un kit para analizar la presencia de anticuerpos anti-TSHR en una muestra, que comprende un soporte en el que las moléculas de TSHR se unen y se marcan anticuerpos de acuerdo con la invención.

También se proporciona un procedimiento para analizar la presencia de anticuerpos anti-TSHR, que comprende:

- a) proporcionar un soporte al cual se unen los TSHR;
- b) aplicar al soporte los anticuerpos marcados de acuerdo con la invención;
- c) aplicar al soporte una muestra de ensayo; y
- d) analizar el desplazamiento de los anticuerpos.

En este procedimiento, los anticuerpos marcados se unen a los TSHR y la cantidad de anticuerpos unidos puede medirse. Si hay anticuerpos anti-TSHR en la muestra de ensayo, éstos competirán con los anticuerpos marcados para unirse a los TSHR. La cantidad de anticuerpos anti-TSHR en la muestra puede analizarse midiendo la diferencia en cantidad de anticuerpos marcados unidos antes y después de la aplicación de la muestra. En la técnica se conocen ensayos de competencia de esta naturaleza y los expertos en la materia pueden utilizar técnicas y aparatos de soporte apropiados. Un anticuerpo marcado es un anticuerpo al cual se ha unido un marcador detectable. Los marcadores adecuados son bien conocidos en la técnica y anteriormente se han comentado ejemplos.

Es útil poder detectar anticuerpos anti-TSHR en una muestra para diagnosticar, por ejemplo, la enfermedad Grave o e hipotiroidismo en un paciente. El procedimiento proporcionado anteriormente podría utilizarse como procedimiento de diagnóstico, en el que en la muestra de ensayo es una muestra de suero extraída del paciente.

A continuación se describirá la invención con detalle, únicamente a modo de ejemplo, con referencia a las figuras:

Figura 1

Curvas de respuesta a la dosis de actividades de anticuerpos estimulantes del tiroides (TSAbs) de IgG de KSAbs1 y KSAbs2 y fragmentos Fab ensayados por bioensayo en células CHO transfectadas de modo estable con el TSHR humano. Se añadieron diversas concentraciones de IgG de KSAbs1 (■-■) y fragmentos Fab (■-...-■) e IgG de KSAbs2

(▲-▲) y fragmentos Fab (▲-.-.-▲) (en ng/ml) a células CHO transfectadas de modo estable con TSHR humano en (A) tampón HBSS isotónico sin sal que contenía sacarosa y HEPES o (B) tampón HBSS isotónico fisiológico que contenía NaCl y el AMPc estimulado medido (en pmol/ml) como se describe en Materiales y Procedimientos. Las respuestas del AMPc de una dosis sub-saturante de bTSH en el medio isotónico sin sal y fisiológico fueron 164 y 157 pmol/ml respectivamente. Los resultados mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Figura 2

Actividad bloqueante de anticuerpos estimulantes del tiroides (TSBAb) de IgG de KSAb1 (□) y KSAb2 (■) medida en células JPO9 utilizando una concentración sub-saturante de bTSH 40 μU. La actividad TSBAb, expresada como % de inhibición de AMPc inducido por TSH, se calculó como se describe en Materiales y Procedimientos. Se examinaron diferentes concentraciones de IgG de KSAb1 y KSAb2 para garantizar que la actividad bloqueante no era dependiente de la concentración del anticuerpo. Los resultados mostrados son representativos de al menos dos experimentos independientes realizados por triplicado.

Figura 3

Curvas de respuesta a la dosis de la actividad de inmunoglobulinas que inhiben la unión a TSH (TBII) de IgG de KSAb1 (■-■) y fragmentos Fab (■-.-.-■) e IgG de KSAb2 (▲-▲) y fragmentos Fab (▲-.-.-▲) utilizando kits TRAK (DYNtest human). Para el ensayo se añadieron diferentes concentraciones de IgG o fragmentos Fab (ng/ml) diluidas en suero humano normal a los tubos revestidos con TSHR humano. Los resultados mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Figura 4

Medición de la afinidad (Kd) de los anticuerpos de (A) IgG de KSAb1 y (B) de KSAB2 por experimentos de unión saturante utilizando tubos revestidos con TSHR humano del kit TRAK (DYNtest human) como fuente de receptor inmovilizado y mab marcado con ¹²⁵I (aproximadamente 2,5 μCi/ml) sin o con concentraciones crecientes de IgG no marcada. Los valores de CI50 y Kd se calcularon utilizando Excel. La afinidad de los anticuerpos se expresó como valores de Kd recíprocos (l/mol). La unión no específica utilizando un mab de IgG irrelevante (GAD1) fue < 5 %. Todas las determinaciones se realizaron en muestras por duplicado.

Figura 5

Estudios de competición utilizando IgG de KSAb1 o fragmentos Fab e IgG de KSAb2 o fragmentos Fab marcados con ¹²⁵I con (A) suero de pacientes (B) entre IgG de KSAb1 y KSAb2 y (C) entre fragmentos Fab de KSAb1 y KSAb2 por la unión al TSHR humano inmovilizado. Se utilizó suero de pacientes con enfermedad de Grave (n = 6) y de pacientes con hipotiroidismo con altos niveles de TSBAb (n = 6). Como control se utilizó suero humano normal (n = 4) de individuos sin historial familiar de enfermedad autoinmunitaria. Los resultados se expresan como unión de IgG con ¹²⁵I. Los resultados muestran el amplio espectro de actividad inhibitoria de todos los sueros de los pacientes con enfermedad de Grave y de pacientes con hipotiroidismo TSBAb positivo con IgG de KSAb1 o KSAb2 marcada con ¹²⁵I lo que confirma que los anticuerpos monoclonales se unen a epítomos autorreactivos similares en el TSHR con respecto a los reconocidos por los sueros de los pacientes. El suero normal de control produjo una inhibición insignificante (<15 %).

Figura 6

Niveles de tiroxina (TT4) en suero a diversos momentos en ratones hembra BALB/c después de transferencia pasiva de (A) IgG de KSAb1 (■-■) y (B) IgG de KSAb2 (▲-▲) por inyección intravenosa. Los valores de TT4 (μg/ml) en ratones individuales de cada grupo (n = 3) se muestran en el momento 0 (antes de la inyección del mab), a las 7, 26 y 70 horas. El resultado de la administración de IgG de KSAb2 por inyección intraperitoneal se muestra en (C). También se muestran ratones control tratados con IgG irrelevante (mab GAD1) (_ _ _). **p<0,01.

Figura 7

Histología de glándulas tiroideas de ratones después de transferencia pasiva de IgG de KSAb1 o KSAb2 para inducir la enfermedad hipertiroidea. Panel A, tiroides de ratones control tratados con GAD1; paneles B y C, IgG de KSAb1 a dosis de 10 y 100 μg respectivamente; Panel D, visión detallada de folículos colapsados del panel B; Paneles E y F, IgG de KSAb2 a dosis de 10 y 100 μg respectivamente. Aumento x60. Células epiteliales apoptóticas dentro del coloide (→) y folículos sin coloide mostraron recubrimiento de células epiteliales de células columnares y cuboidales con multicapa (---►).

Las Figuras 8 a 73 muestran secuencias de anticuerpos que son ejemplos de la invención. Las figuras muestran diversos fragmentos de dos anticuerpos. En la tabla 2 se define el fragmento al cual se refiere cada figura.

Figura 74

Electroforesis en gel de Poliacrilamida-SDS de preparaciones rFab purificadas en condiciones reductoras. El fragmento de la cadena H del rFab se marca con una flecha. M = marcadores patrón de peso molecular.

Figura 75

Actividades de inhibición de la unión de TSH de las IgG de KSAb1 y KSAb2 (marcadas como IgG9 e IgG17 respectivamente) y de fragmentos rFab purificados (marcados como Fab 9 y Fab 17 respectivamente) ensayadas en

ensayo TRAK.

Figura 76

Actividades de anticuerpos estimulantes del tiroides de las IgG de KSAb1 y KSAb2 (marcadas como IgG9 e IgG17 respectivamente) y de fragmentos rFab purificados (marcados como Fab 9 y Fab 17 respectivamente) ensayadas en tampón HBSS isotónico que contiene sacarosa.

Figura 77

Actividades de inhibición de la unión a TSH de las IgG de KSAb1 y KSAb2 (marcadas como IgG9 e IgG17 respectivamente), de fragmentos rFab purificados (marcados como Fab 9 y Fab 17 respectivamente) y de intercambios de cadena L de los fragmentos rFab (marcados como Fab 9.1-17L y Fab 17.4-9L respectivamente) ensayadas en ensayo TRAK.

Figura 78

Actividades de anticuerpos estimulantes del tiroides de las IgG de KSAb1 y KSAb2 (marcadas como IgG9 e IgG17 respectivamente), de fragmentos rFab purificados (marcados como Fab 9 y Fab 17 respectivamente) y de intercambios de cadena L de los fragmentos rFab (marcados como Fab 9.1-17L y Fab 17.4-9L respectivamente) ensayadas en tampón HBSS isotónico que contenía sacarosa.

Figura 79

Alineamiento de las secuencias de genes de VH y VL de anticuerpos estimulantes de tiroides con la familia de genes de la región V murina correspondiente.

Ejemplos

Materiales y Procedimientos

Medición de anticuerpos contra TSHR y ensayos de la función tiroidea

Dependiendo de las muestras a analizar, los anticuerpos contra TSHR se midieron utilizando dos tipos de ensayos de inhibición diferentes de la unión a TSH (kits TRAK RIA porcino y TRAK II [DYNOTest human]) (BRAHMAS GmbH, Alemania) que requerían 50 µl y 100 µl de suero limpio respectivamente, esencialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante (1). Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la unión de ¹²⁵I-TSH. Las actividades de TSAb y TSBA se midieron por bioensayo utilizando células CHO transfectadas de modo estable con TSHR humano, 24 h después de sembrar 30.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano (1, 2). Antes del ensayo, el medio se reemplazó con solución tamponada de Hank isotónica sin cloruro de sodio (HBSS) que contenía sacarosa y complementada con HEPES con isobutil-1-metilxantina (IBMX, Sigma-Aldrich) 0,5 mM para inhibir la actividad fosfodiesterasa (1,2). También se realizaron ensayos en HBSS fisiológica que contenía cloruro de sodio, donde la sacarosa se reemplazó con NaCl 130 mM. A cada pocillo se añadió por triplicado TSH bovina (bTSH, Sigma-Aldrich) (40 µU/ml), suero de ensayo (3 µl) o IgG purificada diluida en el medio HBSS apropiado y se incubó durante 4 h a 37 °C. El AMPc liberado en el medio se midió por RIA (R&D Systems) y los resultados se expresaron como pmoles/ml o estimulación sobre el valor basal obtenido con el medio, como se describe (2). Los TSBA se detectaron de manera similar añadiendo una dosis sub-saturante de bTSH (40 µU/ml) con la muestra de ensayo o suero control y midiendo la reducción en la estimulación de AMPc mediada por TSH, como se describe previamente (2). En nuestro laboratorio, los coeficientes de variación inter e intra-ensayo para los TSABs se habían medido como < 16 % y < 14 % y para los TSBAbs fueron < 24 % y 11 % respectivamente (2). Se determinó la hormona tiroidea total (TT4) por RIA con 25 µl de suero (D S Labs, RU), utilizando suero de cuatro animales BALB/c normales para la determinación de valores basales.

Adenovirus recombinantes

Se construyeron adenovirus recombinantes que expresaban el holoreceptor TSHR humano (TSHR-Ad) utilizando el sistema Vector Adenoviral AdEasy (Quantum Biotechnologies). En resumen, el ADNc del TSHR (26) se escindió de pBluescript IISK por digestión con *KpnI* y *NotI* y se ligó en el vector de transferencia de adenovirus (pShuttleCMV) (Quantum Biotechnologies). Después de la linealización del vector pShuttleCMV/hTSHR CMV con *PmeI* y tratamiento con fosfatasa alcalina, el ADN lineal se cotransformó por electroporación en *E. coli* BJ5183 electrocomponente junto con plásmido súper enrollado que contenía ADN viral, pAdEasy-1. Los recombinantes se seleccionaron en kanamicina, se extrajeron y se sometieron a digestión con *PacI* para exponer los ITR y finalmente se transfectaron en células HEK293A para generar partículas virales. Se utilizaron adenovirus que contenían la subunidad A del TSHR humano (aminoácidos 1 a 289) (denominada subunidad A-Ad). Los adenovirus que expresaban β-galactosidasa se utilizaron como control y se prepararon utilizando el sistema AdEasy. Todas las construcciones de virus se propagaron en células HEK293 y se purificaron dos veces sobre centrifugación en gradiente de CsCl (3, 4), se dializaron frente a PBS y la concentración viral se determinó por absorbancia óptica a 280 nm. Los adenovirus purificados se dividieron en alícuotas y se conservaron a -80 °C.

Inmunización y selección de animales para hibridomas

Todos los ratones se obtuvieron en Harlan RU Ltd.

Se construyeron adenovirus recombinantes que expresaban el holoreceptor del TSHR humano (TSHR-Ad) utilizando el sistema Vector Adenoviral AdEasy (Quantum Biotechnologies). En resumen, el ADNc del TSHR (1) se escindió de pBluescript IISK por digestión con *KpnI* y *NotI* y se ligó en el vector de transferencia de adenovirus (pShuttleCMV) (Quantum Biotechnologies). Después de la linealización del vector pShuttleCMV/hTSHR CMV con *PmeI* y tratamiento con fosfatasa alcalina, el ADN lineal se cotransformó por electroporación en *E. coli* BJ5183 electrocompetente junto con plásmido súper enrollado que contenía ADN viral, pAdEasy-1. Los recombinantes se seleccionaron en kanamicina, se extrajeron y se sometieron a digestión con *PacI* para exponer los ITR y finalmente se transfectaron en células HEK293A para generar partículas virales. Se utilizaron adenovirus que contenían la subunidad A del TSHR humano (aminoácidos 1 a 289) (denominada subunidad A-Ad) (3, 4). Para las inyecciones de la subunidad A-Ad, se utilizó un protocolo de inmunización de dosis bajas de 10^9 partículas (4). Se inmunizaron ratones BALB/c hembra (16 animales, de 7-8 semanas de vida) como se describe y se les extrajo sangre una semana y tres semanas después de la segunda inyección y se evaluaron individualmente con respecto a la actividad TSA. Los animales con actividad TSA constantemente elevada recibieron una tercera inyección de la subunidad A-Ad. Una semana más tarde, esto realizó después por una inyección intraperitoneal de refuerzo de células CHO que expresaban el ectodominio del TSHR mediante un anclaje a GPI (2×10^6 células en PBS 500 μ l) (5). Los animales se sacrificaron tres días después y los bazo se extirparon asépticamente para la producción de hibridomas, seguido de extracción de sangre por punción cardíaca de suero y escisión de glándulas tiroideas para realizar análisis histológico. Todos los experimentos con animales se realizaron con la aprobación de la Home Office Regulations (Reino Unido) y del King's College London, con plena atención de cuidados veterinarios.

Exploración de hibridomas y clonación

Suspensiones de esplenocitos se fusionaron con células de mieloma X63-Ag8653 a una proporción de 5:1 utilizando medio de fusión de PEG para la producción de hibridomas (solución al 50 %, Immune Systems Ltd, RU) en medio RPMI que contenía FCS al 20 %, piruvato sódico 2 mM, L-glutamina 2 mM y PSF al 0,01 % (todo de Invitrogen, RU) y se sembraron en placas de 96 pocillos. Los hibridomas se seleccionaron con hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT, Invitrogen) y medio HT (Immune Systems Ltd). La actividad de TBII de los sobrenadantes (100 μ l) de los pocillos que mostraban crecimiento se sometió a ensayo utilizando el kit TRAK II (DYNOTest human). Los pocillos positivos se expandieron y se subclonaron dos veces a 0,3 células/pocillo en medio complementado con complemento alimentador de Hibridoma del 10 al 20 %, Doma Drive (Immune Systems Ltd). Los hibridomas se isotipificaron utilizando el kit de isotipificación Monoclonal de Ratón (Serotec, RU). La IgG se purificó de los sobrenadantes del cultivo tisular por cromatografía con proteína-A Sepharose (6), la pureza se evaluó por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y se cuantificó por ensayo de proteínas de Bradford.

Preparación de fragmentos Fab

Los fragmentos Fab se prepararon a partir de IgG por digestión con papaína (Sigma-Aldrich), utilizando IgG 2,5 mg, cisteína 1 M (25 μ l), EDTA 20 mM (25 μ l) y 1 mg/ml de papaína en tampón acetato (5 μ l) y se incubaron durante una noche a 37 °C. (6). Después de la adición de yodoacetamida 100 mM (110 μ l) para finalizar la reacción, la digestión se mezcló con proteína-A Sepharose durante 1 h a 4 °C. Después de una breve etapa de centrifugación con microcentrífuga, el sobrenadante se recogió y se dializó durante una noche frente a PBS. La pureza de los fragmentos Fab se examinó por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y la reactividad TSHR se confirmó evaluando la actividad de TBII.

Yodación de IgG y fragmentos Fab y estudios de desplazamiento.

En 10 μ l de PBS se marcaron 0,25 nM de IgG o fragmentos Fab de KSA1 o KSA2 con 5 μ l de 125 I-Na utilizando tubos revestidos con yodogen incubando durante 10 min a temperatura ambiente. El isotipo libre se eliminó por filtración en gel en columnas de Sepharose G25 y se calculó la actividad específica (7). La afinidad de los anticuerpos se midió por análisis de unión de saturación. En resumen, diferentes concentraciones de IgG de KSA1 o KSA2 marcada con 125 I se añadieron por duplicado a tubos revestidos con TSHR humano (del kit TRAK II [DYNOTest human]), se resuspendió en tampón de unión del kit en un volumen final de 200 μ l y se incubó durante una noche en una sala enfriada hasta alcanzar el equilibrio. Después de lavar los tubos 3 veces en tampón de lavado del kit, la unión 125 I-IgG se midió contando la radioactividad en un contador gamma (DPC Laboratories, RU). La unión no específica se restó y los valores Kd se calcularon a una saturación al 50 % utilizando programación Excel. Los resultados de afinidad se expresaron como valores Kd recíprocos (l/mol).

Se realizaron estudios de competencia de manera similar a los anteriores. Diferentes concentraciones de IgG o fragmentos Fab no marcados se resuspendieron en tampón de unión (del kit TRAK II [DYNOTest human]) en un volumen final de 200 μ l y se añadieron a tubos del kit revestidos con TSHR humano. Después de 2 h de incubación con agitación a temperatura ambiente, los tubos se lavaron dos veces con tampón de lavado del kit. Se añadió una concentración sub-saturante de IgG de KSA1 o KSA2 marcada con 125 I, la incubación continuó durante 1 h y los tubos se lavaron y el recuento se realizó en un contador gamma. Para la competencia con los sueros de pacientes con enfermedad de Grave, se añadieron 100 μ l de suero a los tubos revestidos con TSHR como se ha descrito anteriormente. La inhibición de la unión de la IgG de KSA1 o KSA2 marcada con 125 I se determinó y se expresó como porcentaje de inhibición.

Inyección de IgG de KSAb1 y KSAb2 para la estimulación *in vivo* de la glándula tiroidea

La inyección de diferentes dosis de IgG de KSAb1 o KSAb2 purificada se realizó por vía intravenosa e intraperitoneal. Ratones hembra BALB/c (18 animales, de 7-8 semanas de vida) se trataron con una sola inyección intravenosa en la vena de la cola de IgG de KSAb1 o KSAb2 en PBS estéril (50 μ l) que contenía anticuerpo 10 μ g o 100 μ g (3 ratones por grupo). Otro grupo de ratones se trató con una sola inyección intraperitoneal de IgG de KSAb2 en PBS estéril (100 μ g). Para controles, los animales recibieron una inyección intravenosa con el mismo isotipo, mAb de IgG 100 μ g específico para el antígeno de células de islotes, ácido glutámico descarboxilasa (mAb GAD-1). A todos los animales se les extrajo sangre a las 7, 28 y 70 post inyección y se determinaron los niveles de TT4 en suero. Los ratones se sacrificaron a las 70 h y las glándulas tiroideas se extirparon para análisis histológico.

Histología del tiroides

Las glándulas tiroideas se fijaron y se procesaron en formalina. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina para análisis morfológico. Para la detección de linfocitos B y T se realizó inmunohistoquímica en las secciones fijadas de tiroides con anti-CD20 de ratón seguido por detección con el kit anti-cabra de ImmunoCruz (Santa Cruz Biotechnology), los mAb de rata anti-CD4 y CD8 de ratón seguido de detección con anticuerpo anti-rata marcado con biotina (Vector Laboratories, RU) y un conjugado de estreptavidina-biotina con peroxidasa (Dako, Dinamarca). La recuperación de los antígenos se realizó antes de teñir por cocción a presión a un pH 6,0 para los anticuerpos CD20 y CD8, y a un pH 9,0 para el anticuerpo CD4.

Resultados

Se inmunizaron ratones BALB/c se inmunizaron con adenovirus recombinantes que expresaban el holoreceptor del TSHR (TSHR-Ad) y la subunidad A del TSHR (subunidad A-Ad) para inducir la enfermedad hipertiroides de Graves. Se realizó una valoración inicial de anticuerpos anti-TSHR para los TSAbs en extracciones de sangre de muestras individuales de todos los animales.

Una semana después de la segunda inyección, nueve animales fueron positivos (56 %) para actividad TSAbs, que variaba de 3,1 a 92,6 veces de actividad aumentada sobre los niveles basales (Tabla 1). Once animales (68 %) mostraron elevación significativa de niveles de TT4 en suero y por tanto eran hipertiroides (Tabla 1). Estos resultados coinciden por completo con los de Chen y colegas (4). Un animal de este grupo con los niveles TSAbs estables más elevados se seleccionó para la producción de hibridomas y se reforzó con una tercera inyección de la subunidad A-Ad, seguido de una inyección intraperitoneal de células CHO que expresaban altos niveles del ectodominio del TSHR humano unido por el anclaje de glucosilfosfatidilinositol a la superficie de las células de la membrana plasmática una semana después, para expandir la población de linfocitos B esplénicos que segregaban anticuerpos. El suero de los animales seleccionados durante el sacrificio mostraron que eran hipertiroides con valores de TT4 elevados (134 μ g/ml, ratones control BALB/c 56,25 \pm 8,26 μ g/ml), así como que eran altamente positivos a actividad TBII con una inhibición de la unión a 125 I-TSH del 87 %.

Anticuerpos monoclonales

Se recogieron sobrenadantes de cultivo (100 μ l) de pocillos confluentes al 70-80 % y la actividad TBII se analizó cuidadosamente utilizando los kits TRAK II [DYNObest human). Se exploró un total de 250 pocillos, dando como resultado 3 pocillos positivos (pocillo 9, inhibición del 98 %; pocillo 17, del 96 % y pocillo 233, del 80 %). Después de la expansión, la actividad TBII de la línea celular primaria del pocillo 233 disminuyó rápidamente. Las dos líneas restantes se clonaron dos veces a 0,3 células por pocillo y se renombraron como KSAb1 y KSAb2, que habían estado en cultivo continuo durante >7 meses. Los subtipos de cadena H y L para KSAb1 y KSAb2 mostraron que eran IgG2b/k e IgG2a/k respectivamente.

Actividad estimuladora tiroidea de los mAbs

Tanto la IgG de KSAb1 como de KSAb2 estimuló la producción de AMPc en células CHO transfectadas de modo estable con TSHR humano. Se realizaron estudios de respuesta a la dosis inicial en medio que contenía sacarosa sin NaCl utilizado habitualmente por su alta sensibilidad para detectar los TSAbs (8). Como se muestra en la Figura 1A, en los estudios de respuesta a la dosis tanto la IgG de KSAb1 como de KSAb2 mostró curvas sigmoideas típicas estimulando TSHR hasta alcanzar > 98 % de la respuesta conseguida con una dosis sub-saturante de bTSH. Sin embargo, aunque ambos mAbs muestran actividad completamente agonista consiguiendo respuestas estimuladoras de AMPc casi máximas, mostraron diferencias en sus respuestas estimuladoras del AMPc a dosis más bajas de IgG. Por tanto, la KSAb1 y KSAb2 en conjunto mostraron estimulación máxima de 199 y 183 veces sobre el valor basal, con una estimulación de 3 veces obtenida a 1,2 ng/ml y 2,2 ng/ml de IgG respectivamente (Figura 1A). Se determinó que los valores de CE50 para la IgG de KSAb1 y de KSAb2 eran de 9,4 ng/ml y 93 ng/ml respectivamente (Figura 1A). Los fragmentos Fab de KSAb1 y KSAb2 también dieron respuestas TSAbs similares a las de la IgG parental intacta (Figura 1A) y por lo tanto también se comportaron como agonistas completos para el TSHR.

También se realizaron estudios de respuesta a la dosis en concentraciones salinas fisiológicas, aunque estas condiciones de ensayo demuestran sensibilidad reducida en comparación con el uso de tampón HBSS isotónico que

contiene sacarosa sin sal (8). La respuesta a la dosis para la producción de AMPc inducida por TSH no se alteró significativamente en el tampón que contenía NaCl, dando una estimulación máxima con 40 μ U/ml (no mostrada). Cabe destacar que, tanto la IgG de KSAb1 como de KSAb2 continuó mostrando actividad agonista completa con respuestas estimuladoras máximas de AMPc que alcanzaban > 98 % de la respuesta obtenida con dosis sub-saturantes de bTSH (Figura 1B). Se observaron curvas sigmoideas típicas de respuesta a la dosis, que de nuevo a dosis más bajas, mostraron diferencias en la actividad estimuladora del AMPc de la IgG de KSAb1 y KSAb2 (Figura 1B). En condiciones salinas fisiológicas, KSAb1 y KSAb2 continuaron siendo activas a concentraciones de <1 ng/ml y 3 ng/ml respectivamente. Las IgG mostraron valores CE_{50} en el intervalo de nM de 16,5 ng/ml y 100 ng/ml respectivamente (Figura 1B). Además, los fragmentos Fab de KSAb1 y KSAb2 también mostraron eficacias de estimulación del AMPc similares (Figura 1B).

Bloqueo de la actividad de la estimulación mediada por TSH (TSBAb)

La capacidad de la IgG de KSAb1 y de KSAb2 para bloquear la estimulación del AMPc mediada por TSH en células JP09 se midió en un ensayo de bloqueo de estimulación mediado por TSH. En el ensayo se examinaron diferentes concentraciones de IgG para garantizar que la actividad bloqueante no dependía de la concentración de anticuerpos. Mientras que la IgG de KSAb1 mostró actividad TSBAb insignificante, la IgG de KSAb2 mostró una actividad TSBAb reproducible > 20 % en todas las concentraciones de anticuerpos ensayadas (≤ 30 ng/pocillo) equivalente a 240 ng/ml, que estaba por debajo de la concentración sub-saturante de la actividad agonista para KSAb2. Por consiguiente, KSAb2 actúa con débil antagonismo contra la estimulación del AMPc mediada por TSH (Figura 2). Cabe destacar que, por ELISA, ni la IgG de KSAb1 ni la de KSAb2 demuestra reactividad con ningún péptido específico en un conjunto completo de péptidos sintéticos de ectodominio TSHR (2), dando pruebas convincentes sobre el reconocimiento de epítopos conformacionales sobre el receptor (no mostrado).

Inmunoglobulina de inhibición de la unión a TSH (TBII)

En ensayos TBII utilizando kits TRAK II [DYNtest human], los análisis de respuesta a la dosis de la IgG de KSAb1 y KSAb2 mostraron que concentraciones de 3,3 ng/ml y 10 ng/ml eran suficientes para dar una inhibición del 50 % de actividad de unión a 125 I-TSH (Figura 3). Además, para los dos mabs, se consiguió una inhibición del 20 % a concentraciones de 0,7-4,4 ng/ml, mientras que 100 ng/ml fueron suficiente para dar una inhibición del 95 % (Figura 3). Los fragmentos Fab dieron actividad TBII similar a la de la IgG parental, intacta (Figura 3).

Estudios de competencia con KSAb1 y KSAb2

Para los análisis de unión de saturación utilizando tubos revestidos con TSHR humano (de kits TRAK II [DYNtest human]), tanto la IgG de KSAb1 como de KSAb2 marcada con 125 I se unían al receptor con alta afinidad, con valores K_d de $4,5 \times 10^{10}$ l/mol y $6,25 \times 10^{10}$ l/mol respectivamente (Figura 4). Las IgG y los fragmentos Fab de los mabs marcados se utilizaron después como rastreadores en estudios de competencia para estudiar los epítopos sobre el receptor. Se investigó si la IgG de KSAb1 y de KSAb2 marcadas desplazaba autoanticuerpos heterogéneos contra TSHR de pacientes con enfermedad de Grave. El suero de individuos normales, sin historial familiar de autoinmunidad se utilizó como control. Como se muestra en la Figura 5A, los sueros de pacientes con enfermedad de Grave inhibieron la unión de KSAb1 o KSAb2 con el receptor inmovilizado. Además, aunque diferentes sueros competían a un grado similar tanto con la IgG de KSAb1 como con la de KSAb2 marcada, la actividad inhibidora en sus sueros varió, indicando la naturaleza heterogénea de los autoanticuerpos anti-TSHR en suero de diferentes pacientes (Figura 5A). Para investigar los determinantes autoinmunitarios sobre el TSHR presente en otras condiciones, se evaluaron sueros con una fuerte actividad bloqueante de pacientes con hipotiroidismo autoinmunitario que también competían en la unión con el receptor con las IgG de KSAb1 o KSAb2 marcadas (Figura 5A). Finalmente, utilizando concentraciones subsaturantes de 125 I-IgG en tubos revestidos con TSHR humano, tanto la IgG de KSAb1 como de KSAb2 competían entre sí mostrando que sus epítopos se solapaban en el TSHR (Figura 5B). Además, fragmentos Fab de KSAb1 y KSAb2 también competían entre sí, indicando la estrecha asociación de sus determinantes sobre el TSHR (Figura 5C).

También se realizaron estudios de desplazamiento utilizando las IgG de KSAb1 y KSAb2 marcadas como rastreadores con otro panel de mabs de IgG anti-TSHR que son específicos para determinantes lineales sobre el receptor y que muestran actividad estimuladora de tiroides insignificante (9). Ninguna IgG de KSAb1 o de KSAb2 mostró ninguna competición con los mabs A10, A9 y A7 que son específicos para restos localizados en las regiones amino central y carboxi-terminal del receptor respectivamente (9) (no mostrado). Por tanto, los epítopos estimuladores sobre el TSHR son diferentes de los epítopos lineales reconocidos por este panel de mabs anti-TSHR.

Estudios de transferencia pasiva en IgG de KSAb1 y de KSAb2

Se evaluó el efecto de la inyección *in vivo* de la IgG de KSAb1 y de KSAb2 en ratones sin tratar en términos de inducir el hipertiroidismo. Se esperaba que KSAb1 y KSAb2 reaccionaran en cruzado con el TSHR de ratón dado que los dos mab procedían de un ratón que era significativamente hipertiroides. Por vía iv se inyectaron dos dosis de IgG de 10 g y 100 μ g de cada mab en los ratones y se determinó la hipertiroxinemia inducida a diferentes momentos. Como control, se utilizó un mab GAD1 de igual isotipo que un antígeno de las células de los islotes pancreáticos.

Los resultados en la Figura 6 muestran que tanto la IgG de KSAb1 como de KSAb2 son patógenas, con una dosis de 10 µg o 100 µg de KSAb1 y 100 µg de KSAb2 dando como resultado una rápida respuesta estimuladora tiroidea caracterizada por hipertiroidismo a las 7 h de la administración. Los niveles de tiroxina en suero regresaron a la línea basal a las 70 h. La inyección de KSAb2 a una dosis de 10 µg demostró una respuesta más retardada en la elevación de los niveles de TT4, con un máximo a las 28 h (Figura 6). También se examinó el efecto de la inyección intraperitoneal de la IgG de KSAb2, que era similar a la estimulación mediada por la administración intravenosa (Figura 6). Estos resultados también confirman reactividad cruzada de KSAb1 y KSAb2 contra TSHR de ratón.

El análisis histológico de las glándulas tiroideas de ratones tratados con KSAb1 y KSAb2 mostró cambios tanto epiteliales como foliculares en comparación con las glándulas de los animales tratados con el mAb de control (Figura 7, paneles A-F). A diferencia de la glándula tiroidea de los animales tratados con mAb GAD1 control (Figura 7, panel A), los folículos tiroideos de los ratones tratados con IgG de KSAb1 y de KSAb2 eran de tamaño y forma variable, con áreas focales que presentaban pérdida total de coloide luminal asociada con colapso de lumen folicular; en otras áreas, el coloide aparece pálido, fino y también finamente vacuolado (Figura 7, panel B-E). Además, los folículos que contienen el coloide pálido se recubrieron con células epiteliales aplanadas y atenuadas, mientras que los folículos sin coloide mostraron recubrimiento de células epiteliales de células columnares y cuboidales con multicapa (flechas discontinuas en la Figura 7). Además, se encontraron células necróticas individuales que estaban presentes dentro del coloide luminal y también dentro del epitelio de recubrimiento folicular con núcleos picnóticos (mostrado en la Figura 7, panel F). Finalmente, análisis histológicos de las secciones H&E revelaron infiltrado celular no mononuclear en las glándulas de los animales tratados con IgG de KSAb1 y de KSAb2, independientemente de la dosis o de la vía de administración (Figura 7, panel B-F). Esto se verificó después por tinción inmunohistoquímica de las glándulas tiroideas, mediante la cual la tinción con anticuerpos contra CD4, CD8 y CD20 de ratón no identificó ningún infiltrado de linfocitos B o T (no mostrado).

Comparación de fragmentos con anticuerpos

Los fragmentos de la región variable de cadena pesada y ligera, cuyas secuencias se muestran en la Figura 79, se expresaron como fragmentos rFab en *E. coli*, se purificaron y se analizaron con respecto a la unión al TSHR mediante un ensayo de inhibición de unión a TSH y midiendo la acumulación de AMPc después de la estimulación del TSHR. Ambos fragmentos se unían al TSHR. Las diferencias en cuanto a la unión entre los fragmentos y los anticuerpos pueden deberse a impedimentos estéricos en los fragmentos, resultantes del sistema de expresión utilizado. En las Figuras 75 y 76 se muestran los resultados de los ensayos.

Los anticuerpos están clonamente relacionados

La investigación del desarrollo evolutivo de dos anticuerpos indica que ambos surgen del mismo linfocito B sin tratar precursor. Los anticuerpos tienen reordenaciones génicas de línea germinal idéntica. En las regiones V_H y V_L hay una gran cantidad de hipermutaciones somáticas. Sin embargo, aunque las regiones V_H tienen claramente un ancestro común y tienen una gran cantidad de mutaciones en común, las regiones V_L no tienen dichas secuencias conservadas. Sin querer quedar ligado a teoría particular alguna, los inventores suponen que la región V_H contribuye a una función predominante en la función agonista en los anticuerpos y fragmentos. Para confirmar esto, los autores de la invención intercambiaron las cadenas ligeras de los anticuerpos y realizaron ensayos de inhibición de la unión a TSH y a AMPc, los resultados de los ensayos se muestran en las Figuras 77 y 78. Los resultados indican que las regiones V_H son importantes en la función determinante.

Análisis

La generación de mAbs con actividad agonista para el TSHR ha sido un objetivo muy buscado por diversos laboratorios que solo se ha conseguido recientemente (10). El avance en esta consecución ha sido dependiente del establecimiento de modelos experimentales viables de hipertiroidismo inducido por anticuerpos. Sin embargo, la principal excepción ha sido la consecución notable de un anticuerpo monoclonal de IgG humana con todas las propiedades esenciales de un anticuerpo patógeno genuino (11). Entre los diversos mAbs estimulantes del tiroides derivados de modelos experimentales, solo uno mostró actividad agonista completa y fuerzas que coinciden con las presentes en el trastorno humano (12). Los mAbs descritos en este estudio, KSAb1 y KSAb2 se encuentran en esta categoría de anticuerpos asociados a enfermedades ya que presentan (i) actividad agonista completa para el TSHR humano (ii) fuerza en cantidades nanogramo de IgG (iii) alta afinidad por el TSHR humano en el intervalo de 10¹⁰ l/mol y (iv) patogenicidad *in vivo* con la inducción de hipertiroidismo.

Los resultados muestran que los epítomos de KSAb1 y KSAb2 en TSHR son probablemente conformacionales en naturaleza y solapan con determinantes autorreactivos reconocidos por anticuerpos de pacientes. Sus epítomos en el TSHR son posiblemente cercanos y están íntimamente asociados entre sí dado que los fragmentos Fab de KSAb1 y KSAb2 más pequeños también compiten por la unión con el receptor. De manera adicional, el descubrimiento de que estos epítomos también solapan con los determinantes asociados con fuerte antagonismo por la unión de TSH con el TSHR coincide con estudios previos sobre la estrecha relación de los epítomos del receptor asociado con la estimulación del receptor y antagonismo de TSH (12, 13).

Los notables aspectos de los estudios con KSAb1 y KSAb2 se basan en la derivación de dos mabs estimulantes del tiroides con actividad TSHR agonista completa, lo que permite comparar su comportamiento. KSAb1 y KSAb2 tienen afinidades comparables y presentan diferencias en cuanto a la generación de AMPc, particularmente a dosis muy bajas de TSH.

- 5 Los anticuerpos con fuerte actividad TSAb son patógenos y directamente responsables del estado hipertiroides. El examen de niveles de tirosina en suero en ratones individuales mostró que en diversos animales eran los niveles hormonales los que no se correlacionaban con la actividad de TSAb en suero. Esto no era sorprendente ya que también se reconocía una falta de concordancia tanto en pacientes humanos como en diversos modelos de enfermedad de Grave inducida (1, 3, 14, 15). Se confirmó, en un estudio profundo, por transferencia pasiva de IgG de KSAb1 y KSAb2 que estos anticuerpos conducían a un rápido hipertiroidismo en los animales. Además, la vía de inyección intraperitoneal de KSAb 2 también condujo a niveles elevados de TT4 en suero, cuya cinética era similar a la de la vía intravenosa. Las diferencias en cuanto a fuerza entre KSAb1 y KSAb2 observada a dosis más bajas en los experimentos *in vitro* también eran evidentes en los estudios *in vivo*. Por tanto, las inyecciones intravenosas a una dosis más baja de IgG de KSAb2 de 10 µg mostraron cinética retardada de hipertiroidismo inducido en los animales, a diferencia del hipertiroidismo inducido con KSAb1 que mostró inducción similar de tirosina en suero elevada a las dosis de 10 y 100 µg ensayadas. Sin embargo, una vez alcanzados los niveles máximos de tirosina en suero con cualquiera de las dosis de 10 o 100 µg de cualquiera de la IgG de KSAb1 o KSAb2, los niveles hormonales disminuyeron con cinética similar hasta alcanzar niveles basales 70 h después de la inyección.

- 20 Cabe destacar que, los análisis histológicos de las glándulas tiroideas 70 h después de la inyección mostraron cambios morfológicos que sugieren efectos tanto estimuladores como citotóxicos. Los efectos estimuladores se caracterizaron por cambios epiteliales proliferativos evidentes por focos de folículos hiperplásicos con pérdida de formación de coloide asociada con formación de multicapas y colapso luminal. Los efectos citotóxicos estaban presentes como necrosis celulares individuales dentro del epitelio de recubrimiento y tirocitos agonizantes presentes en el material coloidal. Estos efectos citotóxicos probablemente medien como un resultado del aumento de la producción de hormona tiroidea inducida en la glándula por los TSAb lo que conduce a una acumulación masiva de peróxido de hidrógeno en la superficie apical de los folículos tiroideos (16, 17). No hubo pruebas de un infiltrado celular mononuclear, tal como el presente en las glándulas de pacientes con enfermedad de Grave. Es posible que un estudio crónico prolongado de administración de mab pueda conducir a cambios inflamatorios dentro de la glándula tiroidea, pero es interesante que en un estudio profundo similar con su fuerte mab de TSAb, el grupo de Costagliola y colegas (12) describió un infiltrado de células mononucleares en las glándulas de sus ratones hipertiroides. Como en su estudio el intervalo de tiempo después de la única inyección del mab de TSAb fue similar a la del estudio profundo de este informe, esto sugiere que quizá anticuerpos contra diferentes epítomos en el TSHR puedan vincularse a la reacción inflamatoria en la glándula tiroidea (12). Otro estudio reciente de Davies y colegas utilizó un mab de hámster contra TSHR con actividad TSAb más débil que la descrita en este estudio (18) para examinar efectos tanto agudos como crónicos de la administración de mab a ratones (19). Aunque es difícil extraer correlaciones del mab de hámster con los fuertes mab estimulantes indicados en este documento, es interesante destacar que la estimulación crónica no induzca hipertiroidismo en los animales, pero conduzca a la desensibilización del receptor, así como a cambios morfológicos considerables tales como hipertrofia y agotamiento de coloide en las glándulas tiroideas (19). No obstante, no se describió infiltración de células mononucleares en las glándulas tiroideas de los animales después de estimulación crónica con el mab de hámster (19).

- El desarrollo de fuertes mabs estimulantes del tiroides, tales como KSAb1 y KSAb2, abre la vía a una disección molecular del TSHR y de los epítomos asociados con enfermedades autoinmunitarias. El mapeo de los epítomos conformacionales en el TSHR reconocido por KSAb1 y KSAb2 puede realizarse por exploración de bibliotecas de péptidos al azar con fagos junto con mutagénesis (20). Esto ayudará a la caracterización de los epítomos asociados con estimulación tiroidea en el TSHR y sus modos de señalización intracelular. Un entendimiento de estos eventos de señalización también puede ser importante para las complicaciones de la enfermedad de Grave tales como TAO y mixedema pretibial. Finalmente, la generación de anticuerpos anti-idiotópicos contra KSAb1 y KSAb2, para identificar clonotipos individuales de especificidades de anticuerpos anti-TSHR presentes en pacientes con enfermedad de Grave puede permitir realizar estudios en el futuro para correlacionar su respuesta con el tratamiento y por tanto adaptar terapias adecuadas a pacientes individuales con riesgo de reincidencia.

Tabla 1: Actividades en suero de anticuerpos estimulantes del tiroides y niveles de tirosina en ratones BALB/c inmunizados con adenovirus que contenían la subunidad A del TSHR, medidos una semana después de la segunda inmunización. Once animales (68 %) fueron hipertiroides (mostrado en negrita).

Ratón	AMPc (pmol/ml) (1 semana después de la 2ª inmunización)	TT4 (µg/ml)
1	3,8	100
2	2,0	66
3	0,8	100

(continuación)

Ratón	AMPc (pmol/ml) (1 semana después de la 2ª inmunización)	TT4 (µg/ml)
4	1,2	81
5	16,6	134
6	59,2	56
7	1,9	89
8	4,0	213
9	37,3	237
10	2,0	84
11	6,1	101
12	18,1	107
13	1,9	138
14	1,5	148
15	1,4	63
16	1,8	60
Ratones control BALB/c		
17	0,6	44
18	0,5	62
19	0,5	60
20	0,8	59

Tabla 2: Secuencias de aminoácidos y de nucleótidos mostradas en las figuras:

	Aminoácidos de KSAb1	Aminoácidos de KSAb2	Nucleótidos de KSAb1	Nucleótidos de KSAb2
Cadena pesada CDR1	8, 9	8	44, 45	44
Cadena pesada CDR2	10	30, 31	46	61, 62
Cadena pesada CDR3	11	11	47	47
Cadena ligera CDR1	12	32	48	63
Cadena ligera CDR2	13	33	49	64
Cadena ligera CDR3	14	34	50	65
Cadena pesada Fab	15, 16, 17, 18	35, 36, 37	51, 52, 53, 54	66, 67, 68, 69
Cadena ligera Fab	19	38	55	70
Dominio V de cadena pesada	20, 21, 22, 23	39, 40	56, 57, 58, 59	71, 72
Dominio V de cadena ligera	24	41	60	73
scFv	25, 26, 27, 28	42, 43		
Conector scFv	29	29		

Tabla 3: Secuencias

Cadena pesada del mAb9 (KSAb1)

	CDR1	CDR2	CDR3
mAb9Vh1			
Secuencia de aminoácidos	AYTMN	LINPYNGGTNNQEFEG	RDWDYFDY
Secuencia de nucleótidos	gcctacaccatgaac	cttattaatccttacaatggtggtactaatacaccaggagttcgagggc	agggactgggactactttgactac
mAb9Vh2			
Secuencia de aminoácidos	AYTMN	LINPYNGGTNNQEFEG	RDWDYFDY
Secuencia de nucleótidos	gcctacaccatgaac	cttattaatccttacaatggtggtactaatacaccaggagttcgagggc	agggactgggactactttgactac
mAb9Vh3			
Secuencia de aminoácidos	AYTMD	LINPYNGGTNNQEFEG	RDWDYFDY
Secuencia de nucleótidos	gcctacaccatggac	cttattaatccttacaatggtggtactaatacaccaggagttcgagggc	agggactgggactactttgactac
mAb9Vh4			
Secuencia de aminoácidos	AYTMN	LINPYNGGTNNQEFEG	RDWDYFDY
Secuencia de nucleótidos	gcctacaccatgaac	cttattaatccttacaatggtggtactaatacaccaggagttcgagggc	agggactgggactactttgactac

	Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de Fab	Secuencia de nucleótidos de cadena pesada de Fab
mAb9Vh1	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYFSFAYTMNWV KQSHGKNLEWIGLINPYNGGTNNQEFEGKATLTVNK SSNTAFMELLSTSDDSAVVYCARRDWDYFDYWGQGT TLTVSSAKTTTPSVYPLAPGCGDTTGSSTVLGCLVKG YFPESVTVTNWNSGSLSSSVHTFPALLQSGLYTMSSSV	GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCT GGAGCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCAT TCTCTGCCCTACACCATGAACCTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAA AGAACCTTGAGTGGATTGACTTATTATCCTTACAATGGTGG

	TVPSTWPSQIVTCSVAHPASSTKVDDKKIETRC	TACTAACTACAACCAGGAGTTCGAGGGCAAGGCCACTTTAACT GTAAACAAGTCATCCAACACAGCCTTCATGGAGCTCCTCAGTC TGACATCTGACGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCGAGAAGGA CTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAAGCACCACTCTCACA GTCTCCTCAGCCAAAACAACACCCCATCAGTCTATCCACTGG CCCCTGGGTGTGAGATACAACTGGTTCTCCGTGACTCTGGG ATGCCTGGTCAAAGGGTACTTCCCTGAGTCAGTGTGACTGTGACT TGAAACTCTGGATCCCTGTCCAGCAGTGTGCACACCTTCCCAG CTCTCCTGCAGTCTGGACTCTACACTATGAGCAGCTCAGTGAC TGTCCTCCAGCACCTGGCCAAAGTCAGACCGTCACCTGCAGC GTTGCTCACCCAGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAAATT GAGACGCGTTGT
mAb9Vh2	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFAYTMNWV KQSHGKNLEWIGLINPYNGGTNYNQEFEGKATLTVVK SSNTAFMELLSLTSDDSAVYYCARRDWDYFDYWGQGT TLTVSSAKITPPSVYPLAPGCGDITGSSVTLGCLVKG YFPESVTVTNWNGSLSSSVHTFPALLQSGLYTMSSSV TVPSTWPSQIVTCSVAHPASSTKVDDKKIETRC	GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCT GGAGCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGTTACTCAT TCTTTGCCATACCATGAACCTGGTGAAGCAGAGCCATGGAA AGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACAAATGGTGG TACTAACTACAACAGGAGTTCGAGGGCAAGGCCACTTTAACT GTAAACAAGTCATCCAACACAGCCTTCATGGAGCTCCTCAGTC TGACATCTGACGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCGAGAAGGA CTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAAGCACCACTCTCACA GTCTCCTCAGCCAAAACAACACCCCATCAGTCTATCCACTGG CCCCTGGGTGTGAGATACAACTGGTTCTCCGTGACTCTGGG ATGCCTGGTCAAAGGGTACTTCCCTGAGTCAGTGTGACTGTGACT TGAAACTCTGGATCCCTGTCCAGCAGTGTGCACACCTTCCCAG CTCTCCTGCAGTCTGGACTCTACACTATGAGCAGCTCAGTGAC TGTCCTCCAGCACCTGGCCAAAGTCAGACCGTCACCTGCAGC GTTGCTCACCCAGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAAATT GAGACGCGTTGT
mAb9Vh3	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFAYTMNWV KQSHGKNLEWIGLINPYNGGTNYNQEFEGKATLTVVK SSNTAFMELLSLTSDDSAVYYCARRDWDYFDYWGQGT TLTVSSAKITPPSVYPLAPGCGDITGSSVTLGCLVKG YFPESVTVTNWNGSLSSSVHTFPALLQSGLYTMSSSV	GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCT GGAGCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGTTACTCAT TCTCTGCCATACCATGAGTGGTGAAGCAGAGCCATGGAA AGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACAAATGGTGG TACTAACTACAACAGGAGTTCGAGGGCAAGGCCACTTTAACT GTAAACAAGTCATCCAACACAGCCTTCATGGAGCTCCTCAGTC TGACATCTGACGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCGAGAAGGA CTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAAGCACCACTCTCACA GTCTCCTCAGCCAAAACAACACCCCATCAGTCTATCCACTGG CCCCTGGGTGTGAGATACAACTGGTTCTCCGTGACTCTGGG ATGCCTGGTCAAAGGGTACTTCCCTGAGTCAGTGTGACTGTGACT TGAAACTCTGGATCCCTGTCCAGCAGTGTGCACACCTTCCCAG CTCTCCTGCAGTCTGGACTCTACACTATGAGCAGCTCAGTGAC TGTCCTCCAGCACCTGGCCAAAGTCAGACCGTCACCTGCAGC GTTGCTCACCCAGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAAATT GAGACGCGTTGT

	TVPSTWPSQTVTCSVAHPASSTKVDDKKIETRC	TACTAACTACAACACAGGAGTTCGAGGGCAAGGCCACTTTAACT GTAACAAGTCATCCAACACAGCCTTCATGGAGCTCCTCAGTC TGACATCTGACGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCGAGAAGGGA CTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACA GTCTCCTCAGCCAAAACAACACCCCCCATCAGTCTATCCACTGG CCCCGGGTGGAGATACAACTGGTTCTCCGTGACTCTGGG ATGCCTGGTCAAGGGCTACTTCCCTGAGTCAGTGAAGTGA TGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCAGTGTGCACACCTTCCCAG CTCTCCTGCAGTCTGGACTCTACACTATGAGCAGCTCAGTGAC TGTCCTCCAGCACCTGGCCAAAGTCAGACCGTCACCTGCAGC GTTGCTCACCCAGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAAGAAAATT GAGACGCGTTGT
mAb9Vh4	EVOLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFSAITMNV KOSHGNLEWIGLINPYNGGTNNQEFEGKATLTVNK SSNTAFMELLSLTSDGSVYVCARRDWDYFDYWGQGT TLTVSSAKTTPPSVYPLAPGCGDTTGSSTVLGCLVKG YFPESVTVTNWNSGSLSSVHTFPALLQSGLYTMSSSV TVPSTWPSQTVTCSVAHPASSTKVDDKKIETRC	GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCT GGAGCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGCTTCTGGTTACTCAT TCTCTGCCATACCATGAACCTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAA AGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACAAATGGTGG TACTAACTACAACAGGAGTTCGAGGGCAAGGCCACTTTAACT GTAACAAGTTCATCCAACACAGCCTTCATGGAGCTCCTCAGTC TGACATCTGACGGCTCTGCAGTCTATTACTGTGCGAGAAGGGA CTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACA GTCTCCTCAGCCAAAACAACACCCCCCATCAGTCTATCCACTGG CCCCGGGTGGAGATACAACTGGTTCTCCGTGACTCTGGG ATGCCTGGTCAAGGGCTACTTCCCTGAGTCAGTGAAGTGA TGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCAGTGTGCACACCTTCCCAG CTCTCCTGCAGTCTGGACTCTACACTATGAGCAGCTCAGTGAC TGTCCTCCAGCACCTGGCCAAAGTCAGACCGTCACCTGCAGC GTTGCTCACCCAGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAAGAAAATT GAGACGCGTTGT

	Secuencia de aminoácidos de la región variable	Secuencia de nucleótidos de la región variable
mAb9Vh1	EVOLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFSAITMNV	GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCT

	KQSHGKNLEWIGLINPYNGGTNYNQEFEGKATLTVNK SSNTAFMELLSLTSDDSAVYYCARRDWDYFDYWGQGT TLTVSS	GGAGCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCAT TCTCTGCCTACACCATGAACCTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAA AGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACAATGGTGG TACTAACTACAACAGGAGTTCGAGGCAAGGCCACTTTAACT GTAAACAAGTCATCCAACACAGCCTTCATGGAGCTCCTCAGTC TGACATCTGACGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCGAGAAAGGA CTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAAGGCACCACTCTCACA GTCTCCTCA
mAb9Vh2	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFFAYTMNWV KQSHGKNLEWIGLINPYNGGTNYNQEFEGKATLTVNK SSNTAFMELLSLTSDDSAVYYCARRDWDYFDYWGQGT TLTVSS	GAGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCT GGAGCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCAT TCTTGCCTACACCATGAACCTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAA AGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACAATGGTGG TACTAACTACAACAGGAGTTCGAGGCAAGGCCACTTTAACT GTAAACAAGTCATCCAACACAGCCTTCATGGAGCTCCTCAGTC TGACATCTGACGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCGAGAAAGGA CTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAAGGCACCACTCTCACA GTCTCCTCA
mAb9Vh3	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFSAYTMDWV KQSHGKNLEWIGLINPYNGGTNYNQEFEGKATLTVNK SSNTAFMELLSLTSDDSAVYYCARRDWDYFDYWGQGT TLTVSS	GAGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCT GGAGCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCAT TCTCTGCCTACACCATGAGCTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAA AGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACAATGGTGG TACTAACTACAACAGGAGTTCGAGGCAAGGCCACTTTAACT GTAAACAAGTCATCCAACACAGCCTTCATGGAGCTCCTCAGTC TGACATCTGACGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCGAGAAAGGA CTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAAGGCACCACTCTCACA GTCTCCTCA
mAb9Vh4	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFSAYTMNWV KQSHGKNLEWIGLINPYNGGTNYNQEFEGKATLTVNK SSNTAFMELLSLTSDGSVYYCARRDWDYFDYWGQGT TLTVSS	GAGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCT GGAGCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCAT TCTCTGCCTACACCATGAACCTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAA AGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACAATGGTGG TACTAACTACAACAGGAGTTCGAGGCAAGGCCACTTTAACT GTAAACAAGTCATCCAACACAGCCTTCATGGAGCTCCTCAGTC TGACATCTGACGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCGAGAAAGGA CTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAAGGCACCACTCTCACA GTCTCCTCA

	TGACATCTGACGGCTCTGCAGTCTATTAATCTGTGCGAGAAGGGA CTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACA GTCTCCTCA
--	---

Pág.

Cadena ligera (KSAb1) del mAb9

mAb9V _k 4		CDR1	CDR2	CDR3
Secuencia de aminoácidos	KASQNVGTFVA	SASNRYT		ROYSSYPYT
Secuencia de nucleótidos	aagggccagtcagaatgtgggtactttttagcc	tgggcatcccaatcgggtacact		cggcaatatagcagctatccgtacacg

mAb9V _k 4	Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de Fab DIVMTSQKFMSTSVGDRVSIICKASQNVGTFVAWYQQ KPGQSPKLLVYSASNRYTGVDPDRFTGSGSGTDFTLTIIN NMQSEDLADYFCRQYSSYPYTFGGGKLEIKRADAAPT VSIFFPSSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWIKIVG SERQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTLTKEYERHN SYTCEATHKTSTSPIVKSFNRETTC	Secuencia de nucleótidos de cadena ligera de Fab GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTTCATGTCCACATCAG TAGGAGACAGGGTCAGCATCATTTGCAAGCCAGTCAGAAATG TGGGTACTTTTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATC TCCTAAACTACTGGTTACTCGGCATCCAATCGGTACACTGGA GTCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCA CTCTACCATCAACAATATGCAGTCTGAAGACCTGGCAGATTA TTTCTGCCGGCAATATAGCAGCTATCCGTACACGTTTCGGAGGG GGGACCAAGCTAGAAATAAACCGGGCTGATGCTGCACCAACT GTAATCCATCTTCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACAATCTGGAG GTGCCTCAGTCGTGCTTCTTGAACAACCTTACCCCAAGA CATCAATGTCAAGTGGAAAGATTGTGGCAGTGAACGACAAA TGGCGTCTGACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAGACAG CACCTACAGCATGAGCAGCACCTCACGTTGACCAAGGACGA GTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAA GACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAG ACGCGTTGT
----------------------	---	--

	Secuencia de aminoácidos de la región variable	Secuencia de nucleótidos de la región variable
--	--	--

mAb9V _{k4}	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSIICKASQNVGTFVAWYQQ KPGQSPKLLVYSASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTIIN NMQSEDLADYFCRQYSSYPYTFGGGTKLEI	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAAATTTCATGTCCACATCAG TAGGAGACAGGGTCAGCATCATTTGCAAGGCCAGTCAGAAATG TGGGTACTTTTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATC TCCTAAACTACTGGTTTACTCGGCATCCAATCGGTACACTGGA GTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCA CTCTCACCATCAACAAATATGCAGTCTGAAGACCTGGCAGATTA TTTCTGCCGGCAATATAGCAGCTATCCGTACACGTTCCGGAGGG GGGACCAAGCTAGAAATA
---------------------	---	--

Secuencias ScFv (ligera – conector – pesada)
GGGGSGGGSGGGGS – PÉPTIDO CONECTOR

con Vh1

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSIICKASQNVGTFVAWYQQKPGQSPKLLVYSASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTIINMQSEDLADYFCRQYSSYPYTFGGGTKLEI
IGGGSGGGSGGGSEVQLQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFFAYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGTNYNQEFEGKATLTVNKSSNTAFMELLSLTSD
DSAVYYCARRDWDYFDYWGQGTTLTVSS

GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCATTTGCAAGGCCAGTCAGAAAT
GTGGGTACTTTTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCTAAACTACTGGTTTACTCGGCATCCAATCGGTACACTG
GAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGACAGATTTCACCTCACCATCAACAATATGCAGTCTGAAGACCTGGCAGA
TTATTTCTGCCGGCAATATAGCAGCTATCCGTACACGTTCCGGAGGGGACCAAGCTAGAAATAGGGGGGGGGGAGTGGGGG
GGGGGGGAGTGGGGGGGGGAGTGAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATGAAGA
TATCCTGCAAGGCTTCTGTTACTCATTTCTGCTACACCATGAAGTGGTGAAGCAGAGCCATGGAAGAACCTTGAGTGGAT
TGGACTTATTAATCCTTACAATGGTGTACTAATAACAGGAGTTCGAGGGCAAGGCCACTTTAACTGTAAACAAGTCATCC
AACACAGCCTTCAATGAGCTCCTCAGTCTGACATCTGACGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCGAGAAGGGACTGGGACTACTTTG
ACTACTGGGGCCAAGGCACCACCTCTCACAGTCTCCTCA

con Vh2

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSIICKASQNVGTFVAWYQQKPGQSPKLLVYSASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTIINMQSEDLADYFCRQYSSYPYTFGGGTKLEI
IGGGSGGGSGGGSEVQLQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFFAYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGTNYNQEFEGKATLTVNKSSNTAFMELLSLTSD
DSAVYYCARRDWDYFDYWGQGTTLTVSS

GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCATTTGCAAGGCCAGTCAGAAT
 GTGGGTACTTTTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACAGGACAATCTCTAAACTACTGTTTACTCGGCATCCAATCGGTACACTG
 GAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAACAATATGCAGTCTGAAGACCTGGCAGA
 TTATTTCTGCCGCAATATAGCAGCTATCCGTACACGTTCCGAGGGGACCAAGCTAGAAATAGGGGGGGGGAGTGGGG
 GGGGGGAGTGGGGGGGGGAGTGAGTCCAGTCCACAGTCTGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATGAAGA
 TATCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTTCTTGCCTACACCATGAACCTGGTGAAAGCAGCCATGGAAGAACCTTGAGTGGAT
 TGGACTTATTAATCCTTACAATGGTGGTACTAACTACAACGAGAGTTCGAGGGCAAGGCCACTTTAACTGTAAACAAGTCATCC
 AACACAGCCTTCATGGAGCTCCTCAGTCTGACATCTGACGACTCTGCAAGTCTATTACTGTGCGAGAAAGGACTGGGACTACTTTG
 ACTACTGGGGCCAAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

con Vh3

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSIICKASQNVGTFVAVYQQKPGQSPKLLVYSASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTINNMQSEDLADYFCRQYSSYPYTFGGGTKLE
 IGGGGSGGGSGGGSEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYFSFAYTMDWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGTNYNQEFEGKATLTVNKSNTAFMELLISLTSD
 DSAVYYCARRDWDYFDYWGQGTTITVSS

GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCATTTGCAAGGCCAGTCAGAAT
 GTGGGTACTTTTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACAGGACAATCTCTAAACTACTGTTTACTCGGCATCCAATCGGTACACTG
 GAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAACAATATGCAGTCTGAAGACCTGGCAGA
 TTATTTCTGCCGCAATATAGCAGCTATCCGTACACGTTCCGAGGGGACCAAGCTAGAAATAGGGGGGGGGAGTGGGG
 GGGGGGAGTGGGGGGGGGAGTGAGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATGAAGA
 TATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTTCTCTGCCCTACACCATGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAGAACCTTGAGTGGAT
 TGGACTTATTAATCCTTACAATGGTGGTACTAACTACAACGAGAGTTCGAGGGCAAGGCCACTTTAACTGTAAACAAGTCATCC
 AACACAGCCTTCATGGAGCTCCTCAGTCTGACATCTGACGACTCTGCAAGTCTATTACTGTGCGAGAAAGGACTGGGACTACTTTG
 ACTACTGGGGCCAAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

con Vh4

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSIICKASQNVGTFVAVYQQKPGQSPKLLVYSASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTINNMQSEDLADYFCRQYSSYPYTFGGGTKLE
 IGGGGSGGGSGGGSEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYFSFAYTMWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGTNYNQEFEGKATLTVNKSNTAFMELLISLTSD
 GSAVYYCARRDWDYFDYWGQGTTITVSS

GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCATTTGCAAGGCCAGTCAGAAT
 GTGGGTACTTTTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACAGGACAATCTCTAAACTACTGTTTACTCGGCATCCAATCGGTACACTG

GAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCTCACTCTCACCATCAACAATATGCAGTCTGAAGACCTGGCAGA
 TTATTTCTGCCGGCAATATAGCAGCTATCCGTACACGTTTCGGAGGGGGACCAAGCTAGAAATAGGGGGGGGGAGTGGGGG
 GGGGGGAGTGGGGGGGGGAGTGAGGTCAGCTGCAACAGCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATGAAGA
 TATCCTGCAAGGCTTCTGTTACTCTGTTACTCTGCTACACCATGAACCTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAACCTTGAAGTGGAT
 TGGACTTATTAAATCCTTACAATGGTGGTACTAATAACAACGAGGAGTTCGAGGGCAAGGCCACTTTAACTGTAAACAAGTCATCC
 AACACAGCCTTCAATGGAGCTCCTCAGTCTGACGCTCTGCAAGTCTATTACTGTGCGAAGGAGGACTGGGACTACTTTG
 ACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCCTCA

Cadena pesada (KSAb2) del mAb17

	CDR1	CDR2	CDR3
Mab17Vh1			
Secuencia de aminoácidos	AYTMN	LINPYNGGTNYNQKFED	RDWDYFDY
Secuencia de nucleótidos	gcctacacccatgaac	cttattaatccatacaaatggtggtactagctacaaccagaagttcgaggac	agggactgggactactttgactac
Mab17Vh2			
Secuencia de aminoácidos	AYTMN	LINPYNGGTNYNQKFED	RDWDYFDY
Secuencia de nucleótidos	gcctacacccatgaac	cttattaatccatacaaatggtggtactaactacaaccagaagttcgaggac	agggactgggactactttgactac
Mab17Vh3			
Secuencia de aminoácidos	AYTMN	LINPYNGGTNYNQKFED	RDWDYFDY
Secuencia de nucleótidos	gcctacacccatgaac	cttattaatccatacaaatggtggtactaactacaaccagaagttcgaggac	agggactgggactactttgactac
Mab17Vh4			
Secuencia de aminoácidos	AYTMN	LINPYNGGTNYNQKFED	RDWDYFDY
Secuencia de nucleótidos	gcctacacccatgaac	cttattaatccatacaaatggtggtactaactacaaccagaagttcgaggac	agggactgggactactttgactac
Mab17Vh4			
Secuencia de aminoácidos	AYTMN	LINPYNGGTNYNQKFED	RDWDYFDY
Secuencia de nucleótidos	gcctacacccatgaac	cttattaatccatacaaatggtggtactaactacaaccagaagttcgaggac	agggactgggactactttgactac

	Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de Fab	Secuencia de nucleótidos de cadena pesada de Fab
mAb17Vh1	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSTAYTMNWV KQTHGKNLEWIGLINPYNGGTSYNQKFKEDKATLTVDK SSNTAYMDLLSLTSEDSAVYYCARRDWDYFDYWGQGT TLTVSSAKTTAPAVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKG YFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPVAVLQSDLYTLSSSV TVTSSWPSQSITCNVAHPASSITKVDKKIETRC	GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCT GGAGCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCAT TCACTGCCTACACCATGAACCTGGGTGAAGCAGACCCATGGAA AGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCATACAATGGTGG TACTAGCTACAACAGAAAGTTTCGAGGACAAGGCCACATTAAAC TGTTGACAAAGTCATCCACACAGCCTACATGGACCTCCTCAGT CTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTATTGTGCAAGAAGGG ACTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAAGCACCACTCTCAC AGTCTCCTCAGCCAAACAAACAGCCCCAGCGGTCTATCCACTG GCCCCGTGTGTGGAGATACGACTGGCTCCTCGGTGACTCTAG GATGCTGGTCAAGGGTTATTTCCTTGAGCCAGTGACCTTGAC CTGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGTGGTGTGCACACCTTCCCA GCTGTCTGCACTGAGTCTGACCTCTACACCTCAGCAGCTCAGTGA CTGTAACTCTGAGCACCTGGCCCCAGCCAGTCCATCACCTGCAA TGTGGCCCCACCCGGCAAGCAGACCCAAAGGTGGACAAGAAAT TGAGACGCGTTGT
mAb17Vh2	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSTAYTMNWV KQTHGKNLEWIGLINPYNGGTSYNQKFKEDKATLTVDK SSNTAYMDLLSLTSEDSAVYYCARRDWDYFDYWGQGT TLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKG YFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPVAVLQSDLYTLSSSV TVTSSWPSQSITCNVAHPASSITKVDKKIETRC	GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCT GGAGCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCAT TCACTGCCTACACCATGAACCTGGGTGAAGCAGACCCATGGAA AGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACAATGGTGG TACTAACTACAACAGAAAGTTTCGAGGACAAGGCCACATTAAAC TGTCGACAAAGTCATCCACACAGCCTACATGGACCTCCTCAGT CTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTATTGTGCAAGAAGGG ACTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAAGCACCACTCTCAC AGTCTCCTCAGCCAAACAAACAGCCCCATCGGTCTATCCACTG GCCCCGTGTGTGGAGATACAACCTGGCTCCTCGGTGACTCTAG GATGCTGGTCAAGGGTTATTTCCTTGAGCCAGTGACCTTGAC CTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGTGGTGTGCACACCTTCCCA GCTGTCTGCAGTCTGACCTCTACACCTCAGCAGCTCAGTGA CTGTAACTCTGAGCACCTGGCCCCAGCCAGTCCATCACCTGCAA

		TGTGGCCACCCGGCAAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAT TGAGACGGTTGT
mAb17Vh3	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTAYTMNWV KQTHGKNLEWIGLINPYNGGTNYNQKFEDKATLTVDK SSNTAYMDLLSLTSEDSAVYYCARRDWDYFDYWGQGT TLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKG YFPEPVTLTWNSSGLSSGVHT	GAGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCT GGAGCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCAT TCACTGCCTACACCATGAAGTGGTGAAGCAGACCCATGGAA AGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAAATCCTTACAATGGTGG TACTAACTACAACCAAGAAAGTTCGAGGACAAGGCCACATTAAC TGTCGACAAGTCATCCAAACAGCCTACATGGACCTCCTCAGT CTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTATTGTGCAAGAGGG ACTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAAGGCCACCTCTCAC AGTCTCCTCAGCCAAACAAACAGCCCATCGGTCTATCCACTG GCCCCTGTGTGGAGATACAACTGGCTCCTCGGTGACTCTAG GATGCTGGTCAAGGGTTATTTCCCTGAGCCAGTGACCTTGAC CTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGTGGTGTGCACACC
mAb17Vh4	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTAYTMNWV KQTHGKNLEWIGLINPYNGGTNYNQKFEDKATLTVDK SSNTAYMDLLSLTSEDSAVYYCARRDWDYFDYWGQGT TLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKG YFPEPVTLTWNSSGLSSGVHT	GAGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCT GGAGCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCAT TCACTGCCTACACCATGAAGTGGTGAAGCAGACCCATGGAA AGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAAATCCTTACAATGGTGG TACTAACTACAACCAAGAAAGTTCGAGGACAAGGCCACATTAAC TGTCGACAAGTCATCCAAACAGCCTACATGGACCTCCTCAGT CTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTATTGTGCAAGAGGG ACTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAAGGCCACCTCTCAC AGTCTCCTCAGCCAAACAAACAGCCCATCGGTCTATCCACTG GCCCCTGTGTGGAGATACAACTGGCTCCTCGGTGACTCTAG GATGCTGGTCAAGGGTTATTTCCCTGAGCCAGTGACCTTGAC CTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGTGGTGTGCACACC

		Secuencia de nucleótidos de la región variable
mAb17Vh1	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTAYTMNWV KQTHGKNLEWIGLINPYNGGTNYNQKFEDKATLTVDK SSNTAYMDLLSLTSEDSAVYYCARRDWDYFDYWGQGT	GAGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCT GGAGCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCAT TCACTGCCTACACCATGAAGTGGTGAAGCAGACCCATGGAA

	TLTVSS	AGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCATACAATGGTGG TACTAGCTACAACCAAGATTCTGAGGACAAGGCCACATTAAAC TGTTGACAAAGTCATCCAACACAGCCTACATGGACCTCCTCAGT CTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTATTGTGCAAGAGGG ACTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCAC AGTCTCCTCA
mAb17Vh2	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTAYTMNWV KQTHGKNLEWIGLINPYNGGTNYNQKFEDKATLTVDK SSNTAYMDLLSLTSEDSAVYYCARRDWDYFDYWGQGT TLTVSS	GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCT GGAGCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCAT TCACTGCCTACACCATGAACCTGGGTGAAGCAGACCCATGGAA AGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACAATGGTGG TACTAACTACAACCAAGATTCTGAGGACAAGGCCACATTAAAC TGTCGACAAAGTCATCCAACACAGCCTACATGGACCTCCTCAGT CTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTATTGTGCAAGAGGG ACTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCAC AGTCTCCTCA
mAb17Vh3	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTAYTMNWV KQTHGKNLEWIGLINPYNGGTNYNQKFEDKATLTVDK SSNTAYMDLLSLTSEDSAVYYCARRDWDYFDYWGQGT TLTVSS	GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCT GGAGCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCAT TCACTGCCTACACCATGAACCTGGGTGAAGCAGACCCATGGAA AGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACAATGGTGG TACTAACTACAACCAAGATTCTGAGGACAAGGCCACATTAAAC TGTCGACAAAGTCATCCAACACAGCCTACATGGACCTCCTCAGT CTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTATTGTGCAAGAGGG ACTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCAC AGTCTCCTCA
mAb17Vh4	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTAYTMNWV KQTHGKNLEWIGLINPYNGGTNYNQKFEDKATLTVDK SSNTAYMDLLSLTSEDSAVYYCARRDWDYFDYWGQGT TLTVSS	GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCT GGAGCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCAT TCACTGCCTACACCATGAACCTGGGTGAAGCAGACCCATGGAA AGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACAATGGTGG TACTAACTACAACCAAGATTCTGAGGACAAGGCCACATTAAAC TGTCGACAAAGTCATCCAACACAGCCTACATGGACCTCCTCAGT CTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTATTGTGCAAGAGGG ACTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCAC AGTCTCCTCA

	AGTCTCCTCA
--	------------

Cadena ligera (KSAb2) del mAb17

Mab17V _{k4}		CDR1	CDR2	CDR3
Secuencia de aminoácidos	KASQNVGTALA			
Secuencia de nucleótidos	aagggcagtcagaatgtgggtactgcttagcc	SASNRNT	tcggcatccaatcggaacact	QYSSYPYT
				cagcaatatagcagctatccttacacg

	Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de Fab	Secuencia de nucleótidos de cadena ligera de Fab
mAb17V k4	DVWMTQSQKFLSTAGDRVSI SCKASQNVGTALAWYQQ KPGQSPKLLIYSASNRNTGVDPDRFTGRGFGTDFTLTIS NMQSEDLADYFCQQYSSYPYTFGGTRLEIKRADAAPT VSIFFPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDG SERQNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLTITKDEYERHN SYTCEATHKISTSPIVKSFNRNETRC	GACGTTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCTGTCCACATCAG CAGGAGACAGGGTCAGCATCTCCTGCAAGGCCAGTCAGAAATG TGGGTACTGCTTTAGCCTGGTATCAACAGAAACCCAGGACAATC TCCTAAACTTTTGATTACTCGGCATCCAAATCGGAACAACCTGGA GTCCCTGATCGCTTACAGCAGCAGGGGATTTGGGACAGATTTC CTCTACCATCAGCAATATGAGCTATCTGAAGACCTGGCAGATTA TTTCTGCCAGCAATATAGCAGCTATCTTACACGTTCTGGAGGG GGGACCAGGCTGGAAATAAAGCGGGCTGATGCTGCCACCAACT GTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAATCTGGAG GTGCCTCAGTCGTGCTTCTTGAAACAACTTCTACCCCAAGA CATCAATGTCAAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAA TGGCGTCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAGACAG CACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGA GTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAA GACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAG ACGCGTTGT

	Secuencia de aminoácidos de la región variable	Secuencia de nucleótidos de la región variable
mAb17V	DVWMTQSQKFLSTAGDRVSI SCKASQNVGTALAWYQQ	GACGTTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCTGTCCACATCAG

k4	KPGQSPKLLIYSASNRNTGVDPDRFTGRGFGTDFTLTIIS NMQSEDLADYFCQQYSSYPYTFGGGTRLEI	CAGGAGACAGGGTCAGCATCTCCTGCAAGGCCAGTCAGAAATG TGGGTACTGCTTTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAAGGACAATC TCCTAAAACCTTTTGATTTACTCGGCATCCAATCGGAACACTGGA GTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGGGGATTTGGGACAGATTTC CTCTACCATCAGCAATATGCAGTCTGAAGACCTGGCAGATT TTTCTGCCAGCAATATAGCAGCTATCCTTACACGTTCCGGAGGG GGGACCAGGCTGGAAATA
----	--	---

Secuencias ScFv (ligera – conector – pesada)
GGGGGGGGGGGGGS – PÉPTIDO CONECTOR

con Vh1
DVVMTQSQKFLSTSAGDRVSI SCKASQNVGTALAWYQQKPGQSPKLLIYSASNRNTGVDPDRFTGRGFGTDFTLTIISNMQSEDLADYFCQQYSSYPYTFGGGTRLE
IGGGGGGGGGGGGGSEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTAYTMNWVKQTHGKNLEWIGLINPYNGGTSYNQKFEDKATLITVDKSSNTAYMDLLSLTSE
DSAVYYCARRDWDYFDYWGQGTTLLTVSS

GACGTTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCTGTCCACATCAGCAGGAGACAGGGTCAGCATCTCCTGCAAGGCCAGTCAGAAAT
GTGGGTACTGCTTTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAAGGACAATCTCCTAACTTTTGATTACTCGGCATCCAATCGGAACACTG
GAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGGGGATTTGGGACAGATTTCACCTCACCATCAGCAATATGCAGTCTGAAGACCTGGCAGA
TTATTCTGCCAGCAATATAGCAGCTATCCTTACACGTTCCGGAGGGGACCAGGCTGGAAATAGGGGGGGGGGAGTGGGGG
GGGGGGGAGTGGGGGGGGGGAGTGAAGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGTGTGAAGCCTGGAGCTTCAATGAAGA
TATCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCAGTGCCTACACCATGAACCTGGGTGAAGCAGACCCATGGAAGAACCTTGAGTGGAT
TGGACTTATTAATCCATACAAATGGTGGTACTAGCTACAACCAAGAGTTCGAGGACAAAGGCCACATTAACTGTTGACAAGTCATCC
AACACAGCCTACATGGACCTCCTCAGTCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTATTGTGCAAGAGGACTGGGACTACTTTG
ACTACTGGGGCCAAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

con Vh2
DVVMTQSQKFLSTSAGDRVSI SCKASQNVGTALAWYQQKPGQSPKLLIYSASNRNTGVDPDRFTGRGFGTDFTLTIISNMQSEDLADYFCQQYSSYPYTFGGGTRLE
IGGGGGGGGGGGGGSEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTAYTMNWVKQTHGKNLEWIGLINPYNGGTSYNQKFEDKATLITVDKSSNTAYMDLLSLTSE
DSAVYYCARRDWDYFDYWGQGTTLLTVSS

GACGTTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCTGTCCACATCAGCAGGACAGGTCAGCATCTCTGCAAGGCCAGTCAGAAT
 GTGGTACTGCTTTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTTTTGATTACTCGGCATCCAATCGGAACACTG
 GAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGGGGATTGGGACAGATTCTCACTCAGCAATATGCAGTCTGAAGACCTGGCAGA
 TTATTTCTGCCAGCAATATAGCAGTATCCTTACACGTTCCGAGGGGACCAGGCTGGAAATAGGGGGGGGGAGTGGGG
 GGGGGGAGTGGGGGGGGGAGTGAGGTCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATGAAGA
 TATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCACTGCTACACCATGAAGTGAAGCAGACCCATGGAAGAACCTTGAGTGGAT
 TGGACTTATTAATCCTTACAATGGTGGTACTAACTACAACCAAGTTCGAGGACAAAGGCCACATTAACTGTCGACAAAGTCATCC
 AACACAGCCTACATGGACCTCCTCAGTCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTATTGTGCAAGAAGGACTGGGACTACTTTG
 ACTACTGGGGCCAAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

con Vh3

DVVMTQSQKFLSTSAGDRVSI SCKASQNVGTALAWYQQKPGQSPKLLIYSASNRNTGVPDRFTGRGFGTDFTLTISNMQSEDLADYFCQQYSSYPYTFGGTRLE
 IGGGGGGGGGGGGSEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTAYTMNWVKQTHGKNLEWIGLINPYNGGTNYNQKFEDKATLTVDKSSNTAYMDLLSLTSE
 DSAVYYCARRDWDYFDYWGGQTTLTVSS

GACGTTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCTGTCCACATCAGCAGGACAGGTCAGCATCTCTGCAAGGCCAGTCAGAAT
 GTGGTACTGCTTTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTTTTGATTACTCGGCATCCAATCGGAACACTG
 GAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGGGGATTGGGACAGATTCTCACTCAGCAATATGCAGTCTGAAGACCTGGCAGA
 TTATTTCTGCCAGCAATATAGCAGTATCCTTACACGTTCCGAGGGGACCAGGCTGGAAATAGGGGGGGGGAGTGGGG
 GGGGGGAGTGGGGGGGGGAGTGAGGTCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATGAAGA
 TATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCACTGCTACACCATGAAGTGAAGCAGACCCATGGAAGAACCTTGAGTGGAT
 TGGACTTATTAATCCTTACAATGGTGGTACTAACTACAACCAAGTTCGAGGACAAAGGCCACATTAACTGTCGACAAAGTCATCC
 AACACAGCCTACATGGACCTCCTCAGTCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTATTGTGCAAGAAGGACTGGGACTACTTTG
 ACTACTGGGGCCAAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

con Vh4

DVVMTQSQKFLSTSAGDRVSI SCKASQNVGTALAWYQQKPGQSPKLLIYSASNRNTGVPDRFTGRGFGTDFTLTISNMQSEDLADYFCQQYSSYPYTFGGTRLE
 IGGGGGGGGGGGGSEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTAYTMNWVKQTHGKNLEWIGLINPYNGGTNYNQKFEDKATLTVDKSSNTAYMDLLSLTSE
 DSAVYYCARRDWDYFDYWGGQTTLTVSS

GACGTTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCTGTCCACATCAGCAGGACAGGTCAGCATCTCTGCAAGGCCAGTCAGAAT
 GTGGTACTGCTTTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTTTTGATTACTCGGCATCCAATCGGAACACTG
 GAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGGGGATTGGGACAGATTCTCACTCTCAGCATCAGCAATATGCAGTCTGAAGACCTGGCAGA

TTATTTCTGCCAGCAATATAGCAGCTATCCTTACACGTTCTGGAGGGGGACCAAGGCTGGAAATAGGGGGGGGGAGTGGGGG
GGGGGGGAGTGGGGGGGGGAGTGAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATGAAGA
TATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGCCCTACACCATGAACCTGGGTGAAGCAGACCCATGGAAAGAACCTTGAGTGGAT
TGGACTTATTAAATCCTTACAAATGGTGGTACTAATAACAACCAGAAAGTTCGAGGACAAAGGCCACATTAACTGTGACACAAGTCATCC
AACACAGCCTACATGGACCTCCTCAGTCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTATTGTGCAAGAAGGACTGGGACTACTTTG
ACTACTGGGGCCAAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

Referencias

1. Rao, P.V., P.F. Watson., A.P. Weetman., G. Carayanniotis, y J. P. Banga. 2003. Contrasting activities of thyrotropin receptor antibodies in experimental models of Graves' disease induced by injection of transfected fibroblasts or deoxyribonucleic acid vaccination. *Endocrinol.* 144: 260-266.
2. Muehlberg, T., J. A. Gilbert., P. V. Rao., A. M. McGregor, y J.P. Banga. 2004. Dynamics of thyroid stimulating and blocking antibodies to the thyrotropin receptor in a murine model of Graves' disease. *Endocrinol.* 145: 1539-1545.
3. Chen, C.R., P. Pichurin., Y. Nagayama., F. Latrofa., B. Rapoport, y S.M. McLachlan. 2003. The thyrotropin receptor autoantigen in Graves' disease is the culprit as well as the victim. *J. Clin. Invest.* 111: 1897-1904.
4. Chen, C.R., P. Pichurin., G. D. Chazenbalk., H. Aliesky., Y. Nagayama., S.M. McLachlan, y B. Rapoport. 2004. Low dose immunization with adenovirus expressing the thyroid stimulating hormone receptor A-subunit deviates the antibody response toward that of autoantibodies in human Graves' disease. *Endocrinol.* 145: 228-233.
5. Metcalfe, R., N. Jordan., P.F. Watson., S. Gullu., M. Wiltshire., M. Crisp., C. Evans., A.P. Weetman, y M. Ludgate. 2002. Demonstration of immunoglobulin G, A and E autoantibodies to the human thyrotropin receptor using flow cytometry. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 1754-1761.
6. Harlow, E., y D. Lane. 1988. *Antibodies: A Laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press.
7. Johnstone, A., y R. Thorpe. 1987. Radiolabelling techniques. In *Immunochimistry in Practice*, 2ª Edición. Johnstone, A., y Thorpe, R. eds. Blackwell Scientific Publications, pág. 113.
8. Kasagi, K., J. Konishi, Y. Iida., K. Ikekuko., T. Mori., K. Kuma, y K. Torizuka. 1992. A new *in vitro* assay for thyroid stimulator using cultured thyroid cells: Effect of sodium chloride on adenosine 3', 5'-monophosphate increase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 54: 108-114.
9. Nicholson, L.B., H. Vase., P. Graves., M. Nilsson., J. Molne., G. C. Huang., N. G. Morgenthaler., T.F. Davies, A. M. McGregor, y J.P. Banga. 1996. Monoclonal antibodies to the human TSH receptor; epitope mapping and binding to the native receptor on the basolateral plasma membrane of thyroid follicular cells. *J. Mol. Endocrinol.* 16: 159-170.
10. McLachlan, S.M. y B. Rapoport. 2004. Thyroid stimulating monoclonal antibodies: overcoming the road blocks and the way forward. *Clin. Endocrinol.* 61: 10-18.
11. Sanders, J., J. Jeffreys., H. Depraetere., M. Evans., T. Richards., A. Kiddie., K. Bretton., L.D.K.E. Premawardhana., D.Y. Chirgadze., R. Nunez Miguel., T.L. Blundell., J. Furmaniak, y B. Rees Smith. 2004. Characteristics of a human monoclonal autoantibody to the thyrotropin receptor: sequence structure and function. *Thyroid* 14: 560-570.
12. Costagliola, S., M. Bonomi., N. Morgenthaler., J. Van Durme., V. Panneels., S. Refetoff, y G. Vassart. 2004. Delineation of the discontinuous conformational epitope of a monoclonal antibody displaying full *in vitro* and *in vivo* thyrotropin activity. *Mol. Endocrinol.* 18: 3020-3034.
13. Pomerance M, Abdullah HB, Kamerji S, Correze C, Blondeau JP. 2000. Thyroid stimulating hormone and cyclic AMP activate p38 mitogen-activated protein kinase cascade. *J. Biol. Chem.* 275: 40539-40546.
14. Noh JY, Hamada N, Inoue Y, Abe Y, Ito K y K. Ito 2000. Thyroid-stimulating antibody is related to Graves' ophthalmopathy, but thyroglobulin-binding inhibitor immunoglobulin is related to hyperthyroidism in patients with Graves' disease. *Thyroid* 10: 809-813.
15. Costagliola S, Many M-C, Denef JF, Pohlenz J, Refetoff S y G Vassart. 2000. Genetic immunization of outbred mice with thyrotropin receptor cDNA provides a model of Graves' disease. *J Clin Invest.* 105: 803-811.
16. Denef, J.F., S. Haumont., C. Cornette, y M. F. Van der Hove. 1996. Iodine induced thyroid inhibition and cell necrosis: two consequences of the same free-radical mediated mechanism. *Mol. Cell Endocrinol.* 121: 101-103.
17. Riou, C., H. Tonoli., F. Bernier-Valentin., R. Rabilloud., P. Fontlupt, y B. Rousser. 1999. Susceptibility of differentiated thyrocytes in primary culture to undergo apoptosis after exposure to hydrogen peroxide: relation with the level of expression of apoptosis regulatory proteins, Bcl-2 and Bax. *Endocrinol.* 140: 1990-1997.
18. Ando, T., R. Latif., A. Pritsher., T. Moran., Y. Nagayama, y T.F. Davies. 2002. A monoclonal thyroid stimulating antibody. *J. Clin. Invest.* 110: 1667-1674.
19. Ando, T., R. Latif, y T.F. Davies. 2004. Concentration dependent regulation of thyrotropin receptor function by thyroid stimulating antibody. *J. Clin. Invest.* 113: 1589-1595.
20. Dromey, J. A., Weenink, S.M., G.H. Peters., J. Endl., P.J. Tighe., I. Todd, y M.R. Christie. 2004. Mapping of epitopes for autoantibodies to the type 1 diabetes autoantigen IA-2 by peptide phage display and molecular modeling: overlap of antibody and T cell determinants. *J. Immunol.* 172: 4084-4090.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Kings College London

<120> Anticuerpo

<130> P520113PCT

<150> GB 0606276.4

<151> 29-03-2006
 <150> GB 0607376.1
 <151> 12-04-2006
 5 <160> 66
 <170> PatentIn versión 3.4
 10 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 1
 Ala Tyr Thr Met Asn
 1 5
 20 <210> 2
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 2
 Ala Tyr Thr Met Asp
 1 5
 30 <210> 3
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3
 Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Glu Phe Glu
 1 5 10 15
 35 Gly
 <210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 40 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4
 Arg Asp Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr
 1 5
 45 <210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 50 <400> 5
 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Phe Val Ala
 1 5 10
 55 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT

	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 6	
5		Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr 1 5
	<210> 7	
	<211> 9	
	<212> PRT	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 7	
15		Arg Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr 1 5
	<210> 8	
	<211> 218	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 8	

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Ala Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Glu Phe
 50 55 60
 Glu Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asn Lys Ser Ser Asn Thr Ala Phe
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Asp Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Thr Pro Ser Val Tyr Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Thr Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp
 180 185 190
 Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Thr Arg Cys
 210 215

<210> 9
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Phe Ala Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Glu Phe
 50 55 60
 Glu Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asn Lys Ser Ser Asn Thr Ala Phe
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Asp Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Thr Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp
 180 185 190
 Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Thr Arg Cys
 210 215

<210> 10
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 10

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Ala Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Glu Phe
 50 55 60
 Glu Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asn Lys Ser Ser Asn Thr Ala Phe
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Asp Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Thr Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp
 180 185 190
 Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Arg Lys Leu Arg Arg Val Val Lys Gly Glu Phe Cys Arg
 210 215 220
 Tyr Pro
 225

<210> 11
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Ala Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Glu Phe
 50 55 60
 Glu Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asn Lys Ser Ser Asn Thr Ala Phe
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Asp Gly Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Asp Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Thr Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp
 180 185 190
 Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Thr Arg Cys
 210 215

<210> 12
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 12

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Ile Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Phe
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Val
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Met Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Arg Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
 100 105 110
 Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
 115 120 125
 Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
 130 135 140
 Asn Val Lys Trp Lys Ile Val Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
 145 150 155 160
 Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
 180 185 190
 Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Asn Glu Thr Arg Cys
 210 215

<210> 13
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 13

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

<210> 14
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Phe Ala Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Glu Phe
50 55 60
Glu Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asn Lys Ser Ser Asn Thr Ala Phe
65 70 75 80
Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg Asp Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110
Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 117
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 15

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

<210> 16
<211> 117
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 16

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

<210> 17
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 17

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

<210> 18

<211> 238
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 18

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Ile Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Phe
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Val
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Met Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Arg Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser
 115 120 125
 Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys
 130 135 140
 Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Ala Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln
 145 150 155 160
 Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn
 165 170 175
 Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Glu Phe Glu Gly Lys Ala Thr Leu Thr
 180 185 190
 Val Asn Lys Ser Ser Asn Thr Ala Phe Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr
 195 200 205
 Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp Trp Asp Tyr
 210 215 220
 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 225 230 235

<210> 19
 <211> 238

10

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 19

5

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1      5      10
Asp Arg Val Ser Ile Ile Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Phe
20     25     30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Val
35     40     45
Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50     55     60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Met Gln Ser
65     70     75     80
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Arg Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr
85     90     95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gly Gly Gly Gly Ser Gly
100    105    110
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser
115    120    125
Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys
130    135    140
Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Phe Ala Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln
145    150    155    160
Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn
165    170    175
Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Glu Phe Glu Gly Lys Ala Thr Leu Thr
180    185    190
Val Asn Lys Ser Ser Asn Thr Ala Phe Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr
195    200    205
Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp Trp Asp Tyr
210    215    220
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
225    230    235

```

<210> 20
<211> 238
<212> PRT

10

<213> *Homo sapiens*

<400> 20

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Ile Ile Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Phe
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Met Gln Ser
65 70 75 80
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Arg Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gly Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser
115 120 125
Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys
130 135 140
Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Ala Tyr Thr Met Asp Trp Val Lys Gln
145 150 155 160
Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn
165 170 175
Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Glu Phe Glu Gly Lys Ala Thr Leu Thr
180 185 190
Val Asn Lys Ser Ser Asn Thr Ala Phe Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr
195 200 205
Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp Trp Asp Tyr
210 215 220
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
225 230 235

5

<210> 21
<211> 238
<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 21

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1      5      10      15
Asp Arg Val Ser Ile Ile Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Phe
20     25     30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Val
35     40     45
Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50     55     60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Met Gln Ser
65     70     75     80
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Arg Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr
85     90     95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gly Gly Gly Gly Ser Gly
100    105    110
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser
115    120    125
Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys
130    135    140
Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Ala Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln
145    150    155    160
Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn
165    170    175
Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Glu Phe Glu Gly Lys Ala Thr Leu Thr
180    185    190
Val Asn Lys Ser Ser Asn Thr Ala Phe Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr
195    200    205
Ser Asp Gly Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp Trp Asp Tyr
210    215    220
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
225    230    235

```

5

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

10

<213> *Homo sapiens*

<400> 22

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

5 <210> 23
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 23

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

Asp

15 <210> 24
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 24

Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Glu
1 5 10 15

Asp

25 <210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 25

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

30 <210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 26

Ser Ala Ser Asn Arg Asn Thr
1 5

40 <210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 27

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

50 <210> 28
<211> 218

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 28

5

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr
20 25 30
Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Thr His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Glu Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Asp Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg Asp Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110
Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ala Val Tyr Pro Leu
115 120 125
Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175
Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp
180 185 190
Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr
195 200 205
Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Thr Arg Cys
210 215

<210> 29
<211> 218
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 29

10

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Thr His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Glu Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Asp Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Asp Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp
 180 185 190
 Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Thr Arg Cys
 210 215

<210> 30
 <211> 169
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 30

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

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Thr His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Asp Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr
165

<210> 31
<211> 216
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 31

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Leu Ser Thr Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Asn Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Arg Gly Phe Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Met Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
 100 105 110
 Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
 115 120 125
 Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
 130 135 140
 Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
 145 150 155 160
 Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
 180 185 190
 Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Asn Glu Thr Arg Cys
 210 215

<210> 32
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 32

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

5

<210> 33
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 33

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

<210> 34
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 34

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

<210> 35

<211> 238
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 35

```

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Leu Ser Thr Ser Ala Gly
 1          5          10          15

Asp Arg Val Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
 20          25          30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35          40          45

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

Arg Gly Phe Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Met Gln Ser
 65          70          75          80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr
 85          90          95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Gly Gly Gly Gly Ser Gly
100          105          110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser
115          120          125

Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys
130          135          140

Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln
145          150          155          160

Thr His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn
165          170          175

Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Asp Lys Ala Thr Leu Thr
180          185          190

Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Asp Leu Leu Ser Leu Thr
195          200          205

Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp Trp Asp Tyr
210          215          220

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
225          230          235

```

10 <210> 36

<211> 238
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 36

```

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Leu Ser Thr Ser Ala Gly
 1          5          10          15

Asp Arg Val Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
          20          25          30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
          35          40          45

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

Arg Gly Phe Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Met Gln Ser
 65          70          75          80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr
          85          90          95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Gly Gly Gly Gly Ser Gly
          100          105          110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser
          115          120          125

Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys
          130          135          140

Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln
          145          150          155          160

Thr His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn
          165          170          175

Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Asp Lys Ala Thr Leu Thr
          180          185          190

Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Asp Leu Leu Ser Leu Thr
          195          200          205

Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp Trp Asp Tyr
          210          215          220

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
          225          230          235

```

<210> 37
 <211> 15

10

<212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 5 <400> 37
 gcctacacca tgaac 15

 10 <210> 38
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 15 <400> 38
 gcctacacca tggac 15

 20 <210> 39
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 25 <400> 39
 cttattaatc cttacaatgg tggactaac tacaaccagg agttcgaggg c 51

 30 <210> 40
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 35 <400> 40
 agggactggg actacttga ctac 24

 40 <210> 41
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 45 <400> 41
 aaggccagtc agaatgtggg tacttttga gcc 33

 50 <210> 42
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 55 <400> 42
 tcggcatcca atcgggtacac t 21

 60 <210> 43
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 65 <400> 43
 cggcaatata gcagctatcc gtacacg 27

 70 <210> 44
 <211> 654
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 75 <400> 44

gagggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggagcttc aatgaagata 60
 tcctgcaagg cttctggtta ctcatctctt gcctacacca tgaactgggt gaagcagagc 120
 catggaaaga accttgagt gattggactt attaatacctt acaatgggtg tactaactac 180
 aaccaggagt tcgagggcaa ggccacttta actgtaaaca agtcatccaa cacagccttc 240
 atggagctcc tcagtctgac atctgacgac tctgcagtct attactgtgc gagaagggac 300
 tgggactact ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc agccaaaaca 360
 acaaccccat cagtctatcc actggcccct ggggtgtggag atacaactgg ttcctccgtg 420
 actctgggat gcctggtcaa gggctacttc cctgagtcag tgactgtgac ttggaactct 480
 ggatccctgt ccagcagtgt gcacaccttc ccagctctcc tgcagtctgg actctacact 540
 atgagcagct cagtactgt cccctccagc acctggccaa gtcagaccgt cacctgcagc 600
 gttgctcacc cagccagcag caccaagggtg gacaagaaaa ttgagacgcg ttgt 654

<210> 45
 <211> 654
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 45

gagggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggagcttc aatgaagata 60
 tcctgcaagg cttctggtta ctcatctctt gcctacacca tgaactgggt gaagcagagc 120
 catggaaaga accttgagt gattggactt attaatacctt acaatgggtg tactaactac 180
 aaccaggagt tcgagggcaa ggccacttta actgtaaaca agtcatccaa cacagccttc 240
 atggagctcc tcagtctgac atctgacgac tctgcagtct attactgtgc gagaagggac 300
 tgggactact ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc agccaaaaca 360
 acaccccat cagtctatcc actggcccct ggggtgtggag atacaactgg ttcctccgtg 420
 actctgggat gcctggtcaa gggctacttc cctgagtcag tgactgtgac ttggaactct 480
 ggatccctgt ccagcagtgt gcacaccttc ccagctctcc tgcagtctgg actctacact 540
 atgagcagct cagtactgt cccctccagc acctggccaa gtcagaccgt cacctgcagc 600
 gttgctcacc cagccagcag caccaagggtg gacaagaaaa ttgagacgcg ttgt 654

<210> 46
 <211> 679
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 46

gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggagcttc aatgaagata 60
 tcctgcaagg cttctgggta ctcattctct gcctacacca tggactgggt gaagcagagc 120
 catggaaaga accttgagtg gattggactt attaatcctt acaatggtgg tactaactac 180
 aaccaggagt tcgagggcaa ggccacttta actgtaaaca agtcatccaa cacagccttc 240
 atggagctcc tcagtctgac atctgacgac tctgcagtct attactgtgc gagaagggac 300
 tgggactact ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc agccaaaaca 360
 acaccccat cagtctatcc actggcccct ggggtgtggag atacaactgg ttcctccgtg 420
 actctgggat gcctgggtaa gggctacttc cctgagtcag tgactgtgac ttggaactct 480
 ggatccctgt ccagcagtgt gcacaccttc ccagctctcc tgcagtctgg actctacact 540
 atgagcagct cagtgactgt cccctccagc acctggccaa gtcagaccgt cacctgcagc 600
 gttgctcacc cagccagcag caccaagggt gacagaaaat tgagacgcgt tgtcaagggc 660
 gaattctgca gatatccat 679

<210> 47
 <211> 654
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 47

gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggagcttc aatgaagata 60
 tcctgcaagg cttctgggta ctcattctct gcctacacca tgaactgggt gaagcagagc 120
 catggaaaga accttgagtg gattggactt attaatcctt acaatggtgg tactaactac 180
 aaccaggagt tcgagggcaa ggccacttta actgtaaaca agtcatccaa cacagccttc 240
 atggagctcc tcagtctgac atctgacggc tctgcagtct attactgtgc gagaagggac 300
 tgggactact ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc agccaaaaca 360
 acaccccat cagtctatcc actggcccct ggggtgtggag atacaactgg ttcctccgtg 420
 actctgggat gcctgggtaa gggctacttc cctgagtcag tgactgtgac ttggaactct 480
 ggatccctgt ccagcagtgt gcacaccttc ccagctctcc tgcagtctgg actctacact 540
 atgagcagct cagtgactgt cccctccagc acctggccaa gtcagaccgt cacctgcagc 600
 gttgctcacc cagccagcag caccaagggt gacaagaaaa ttgagacgcg ttgt 654

<210> 48
 <211> 648
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 48

gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
atcatttgca aggccagtc gaattgtgggt actttttag cctgggtatca acagaaacca 120
ggacaatctc ctaaaactact ggtttactcg gcatccaatc ggtacactgg agtccctgat 180
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcaacaa tatgcagtct 240

gaagacctgg cagattatct ctgccggcaa tatagcagct atccgtacac gtgcggaggg 300
gggaccaagc tagaaataaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca 360
tccagtggagc agttaacatc tggagggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac 420
cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gttggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg 480
aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcacg 540
ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca 600
tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgaga cgcgttgt 648

<210> 49
<211> 351
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 49

gaggccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggagcttc aatgaagata 60
tcctgcaagg ctcttggtta ctattctct gcctacacca tgaactgggt gaagcagagc 120
catggaaaga accttgagt gattggactt attaatacctt acaatgggtg tactaactac 180
aaccaggagt tcgagggcaa ggccacttta actgtaaaca agtcatccaa cacagccttc 240
atggagctcc tcagtctgac atctgacgac tctgcagtct attactgtgc gagaagggac 300
tgggactact ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc a 351

<210> 50
<211> 351
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 50

gaggccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggagcttc aatgaagata 60
tcctgcaagg ctcttggtta ctattcttt gcctacacca tgaactgggt gaagcagagc 120
catggaaaga accttgagt gattggactt attaatacctt acaatgggtg tactaactac 180
aaccaggagt tcgagggcaa ggccacttta actgtaaaca agtcatccaa cacagccttc 240
atggagctcc tcagtctgac atctgacgac tctgcagtct attactgtgc gagaagggac 300
tgggactact ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc a 351

<210> 51
<211> 351
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 51

gagggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggagcttc aatgaagata 60
tcctgcaagg cttctgggta ctcattctct gcctacacca tggactgggt gaagcagagc 120
catggaaaga accttgagt gattggactt attaatacctt acaatgggtg tactaactac 180
aaccaggagt tcgagggcaa ggccacttta actgtaaaca agtcatccaa cacagccttc 240

atggagctcc tcagtctgac atctgacgac tctgcagtct attactgtgc gagaagggac 300
tgggactact ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc a 351

<210> 52
<211> 351
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 52

gagggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggagcttc aatgaagata 60
tcctgcaagg cttctgggta ctcattctct gcctacacca tgaactgggt gaagcagagc 120
catggaaaga accttgagt gattggactt attaatacctt acaatgggtg tactaactac 180
aaccaggagt tcgagggcaa ggccacttta actgtaaaca agtcatccaa cacagccttc 240
atggagctcc tcagtctgac atctgacggc tctgcagtct attactgtgc gagaagggac 300
tgggactact ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc a 351

<210> 53
<211> 318
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 53

gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
atcatttgca aggccagtc gaatgtgggt actttttag cctggtatca acagaaacca 120
ggacaatctc ctaaactact ggtttactcg gcatccaatc ggtacactgg agtccttgat 180
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcaacaa tatgcagtct 240
gaagacctgg cagattattt ctgccggcaa tatagcagct atccgtacac gttcggaggg 300
gggaccaagc tagaaata 318

<210> 54
<211> 51
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 54
cttattaatc cataaatgg tggtagtagc tacaaccaga agttcgagga c 51

<210> 55
<211> 51
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 55
cttattaatc cttacaatgg tggtagtaac tacaaccaga agttcgagga c 51

ES 2 482 145 T3

<210> 56
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 56
 aaggccagtc agaatgtggg tactgcttta gcc 33
 10
 <210> 57
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 57
 tcggcatcca atcggaacac t 21
 20
 <210> 58
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 58
 cagcaatata gcagctatcc ttacacg 27
 30
 <210> 59
 <211> 654
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <400> 59
 gagggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggagcttc aatgaagata 60
 tcctgcaagg cttctggtta ctcattcact gcctacacca tgaactgggt gaagcagacc 120
 catggaaaga accttgagtg gattggactt attaatccat acaatggtgg tactagctac 180
 aaccagaagt tcgaggacaa ggccacatta actgttgaca agtcatccaa cacagcctac 240
 atggacctcc tcagtctgac atctgaggac tctgcagtct attattgtgc aagaagggac 300
 tgggactact ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc agccaaaaca 360
 acagccccag cggctctatcc actggccccct gtgtgtggag atacgactgg ctccctcggtg 420
 actctaggat gcctgggtcaa gggttatttc cctgagccag tgaccttgac ctggaactct 480
 ggatccctgt ccagtgggtgt gcacaccttc ccagctgtcc tgcagtctga cctctacacc 540
 ctcagcagct cagtgactgt aacctcgagc acctggccca gccagtccat cacctgcaat 600
 gtggcccacc cggcaagcag caccaagggtg gacaagaaaa ttgagacgcg ttgt 654
 40
 <210> 60
 <211> 654
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 60

gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggagcttc aatgaagata 60
 tcctgcaagg cttctgggta ctcatcact gcctacacca tgaactgggt gaagcagacc 120
 catggaaaga accttgagt gattggactt attaatcctt acaatggtgg tactaactac 180
 aaccagaagt tcgaggacaa ggccacatta actgtcgaca agtcatccaa cacagcctac 240
 atggacctcc tcagtctgac atctgaggac tctgcagtct attattgtgc aagaagggac 300
 tgggactact ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc agccaaaaca 360
 acagcccat cggtctatcc actggcccct gtgtgtggag atacaactgg ctctcgggtg 420
 actctaggat gcctgggtcaa gggttatttc cctgagccag tgaccttgac ctggaactct 480
 ggatccctgt ccagtgggtg gcacaccttc ccagctgtcc tgcagtctga cctctacacc 540
 ctcagcagct cagtactgt aacctcgagc acctggccca gccagtccat cacctgcaat 600
 gtggcccacc cggcaagcag caccaaggtg gacaagaaaa ttgagacgcg ttgt 654

<210> 61
 <211> 507
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 61

gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggagcttc aatgaagata 60
 tcctgcaagg cttctgggta ctcatcact gcctacacca tgaactgggt gaagcagacc 120
 catggaaaga accttgagt gattggactt attaatcctt acaatggtgg tactaactac 180
 aaccagaagt tcgaggacaa ggccacatta actgtcgaca agtcatccaa cacagcctac 240
 atggacctcc tcagtctgac atctgaggac tctgcagtct attattgtgc aagaagggac 300
 tgggactact ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc agccaaaaca 360
 acagcccat cggtctatcc actggcccct gtgtgtggag atacaactgg ctctcgggtg 420
 actctaggat gcctgggtcaa gggttatttc cctgagccag tgaccttgac ctggaactct 480
 ggatccctgt ccagtgggtg gcacacc 507

<210> 62
 <211> 507
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 62

gagggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggagcttc aatgaagata 60
 tcctgcaagg cttctgggta ctcatcact gcctacacca tgaactgggt gaagcagacc 120
 catggaaaga accttgagt gattggactt attaatacctt acaatgggtg tactaactac 180
 aaccagaagt tcgaggacaa ggccacatta actgtcgaca agtcatccaa cacagcctac 240
 atggacctcc tcagtctgac atctgaggac tctgcagtct attattgtgc aagaagggac 300
 tgggactact ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcttc agccaaaaca 360
 acagcccat cggtctatcc actggccct gtgtgtggag atacaactgg ctccctcggg 420
 actctaggat gcctgggtaa gggttatttc cctgagccag tgaccttgac ctggaactct 480
 ggatccctgt ccagtgggtg gcacacc 507

<210> 63
 <211> 648
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 63

gacgttgatga tgaccagtc tcaaaaattc ctgtccacat cagcaggaga cagggtcagc 60
 atctcctgca aggccagtca gaatgtgggt actgctttag cctgggtatca acagaaacca 120
 ggacaatctc ctaaaacttt gatttactcg gcattcaatc ggaacactgg agtccctgat 180
 cgcttcacag gcaggggatt tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tatgcagtct 240
 gaagacctgg cagattatct ctgccagcaa tatagcagct atccttacac gtccggaggg 300
 gggaccaggc tggaaataaa gcgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca 360
 tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac 420
 cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgctctg 480
 aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcacg 540
 ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca 600
 tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgaga cgcgttgt 648

<210> 64
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 64

gagggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggagcttc aatgaagata 60
 tcctgcaagg cttctgggta ctcatcact gcctacacca tgaactgggt gaagcagacc 120
 catggaaaga accttgagt gattggactt attaatacctt acaatgggtg tactagctac 180
 aaccagaagt tcgaggacaa ggccacatta actgttgaca agtcatccaa cacagcctac 240
 atggacctcc tcagtctgac atctgaggac tctgcagtct attattgtgc aagaagggac 300
 tgggactact ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcttc a 351

<210> 65
 <211> 351

<212> *ADN*
<213> *Homo sapiens*

<400> 65

5

gagggtccagc	tgcaacagtc	tggacctgag	ctggtgaagc	ctggagcttc	aatgaagata	60
tcctgcaagg	cttctgggta	ctcattcact	gcctacacca	tgaactgggt	gaagcagacc	120
catggaaaga	accttgagtg	gattggactt	attaatcctt	acaatgggtg	tactaactac	180
aaccagaagt	tcgaggacaa	ggccacatta	actgtcgaca	agtcattcaa	cacagcctac	240
atggacctcc	tcagtctgac	atctgaggac	tctgcagtct	attattgtgc	aagaagggac	300
tgggactact	ttgactactg	gggccaaggc	accactctca	cagtctcctc	a	351

<210> 66
<211> 318
<212> *ADN*
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 66

gacgttgtga	tgacccagtc	tcaaaaattc	ctgtccacat	cagcaggaga	cagggtcagc	60
atctcctgca	aggccagtca	gaatgtgggt	actgctttag	cctgggtatca	acagaaacca	120
ggacaatctc	ctaaactttt	gattttactcg	gcattccaatc	ggaacactgg	agtccttgat	180
cgcttcacag	gcaggggatt	tgggacagat	ttcactctca	ccatcagcaa	tatgcagtct	240
gaagacctgg	cagattatct	ctgccagcaa	tatagcagct	atccttacac	gttcggaggg	300
gggaccaggc	tggaata					318

15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une a y puede antagonizar el TSHR humano, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una primera CDR que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 8 o 9; una segunda CDR que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 10, 30 o 31; y una tercera CDR que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 11; y que comprende una región de cadena ligera que comprende una primera CDR que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 12 o 32; una segunda CDR que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 13 o 33; y una tercera CDR que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 14 o 34.
2. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la región variable de cadena pesada tiene una homología de al menos 85 % con una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias mostradas en las figuras 20, 21, 22, 23, 39 y 40 y/o en el que la región variable de cadena ligera tiene una homología de al menos 85 % con una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias mostradas en las figuras 24 y 41.
3. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la región variable de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias mostradas en las figuras 20, 21, 22, 23, 39 y 40 y/o en el que la región variable de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias mostradas en las figuras 24 y 41.
4. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que anticuerpo está humanizado.
5. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que anticuerpo es una IgG.
6. Un hibridoma que tiene el número de acceso ECACC 06032901 o 06032902.
7. Un anticuerpo producido por un hibridoma de acuerdo la reivindicación 6.
8. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y 7, conjugado con yodo radioactivo o con una toxina.
9. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 7 y 8.
10. Un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 7 y 8.
11. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 10, que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de al menos 85 % con una secuencia de cadena pesada seleccionada de las secuencias mostradas en las figuras:
51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 66, 67, 68, 69, 71, 72; y
una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de al menos 85 % con una secuencia de cadena ligera seleccionada de las secuencias mostradas en las figuras: 55, 60, 70 y 73.
12. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 10 u 11.
13. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 12.
14. Un procedimiento de producción de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 7 u 8 que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 13 o un hibridoma de acuerdo con la reivindicación 6 en condiciones que permitan la expresión del anticuerpo y aislar el anticuerpo del cultivo.
15. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 7 u 8 para su uso en terapia.
16. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 7 u 8 para su uso en el diagnóstico o tratamiento del cáncer.
17. Un kit para analizar la presencia de anticuerpos anti-TSHR en una muestra, que comprende un soporte al que se unen las moléculas del TSHR y anticuerpos marcados de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 7 u 8.
18. Un procedimiento de análisis para detectar la presencia de anticuerpos anti-TSHR, que comprende:
a) proporcionar un soporte al que se unan de los TSHR;
b) aplicar al soporte anticuerpos marcados de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 7 u 8;
c) aplicar al soporte una muestra de ensayo; y
d) analizar el desplazamiento de los anticuerpos.

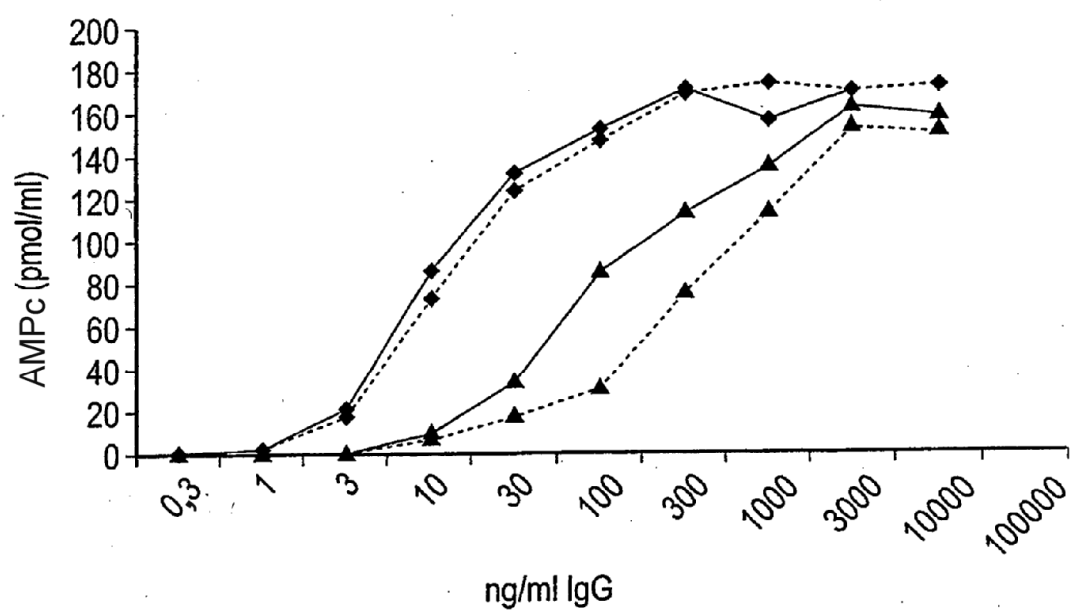


Fig. 1A

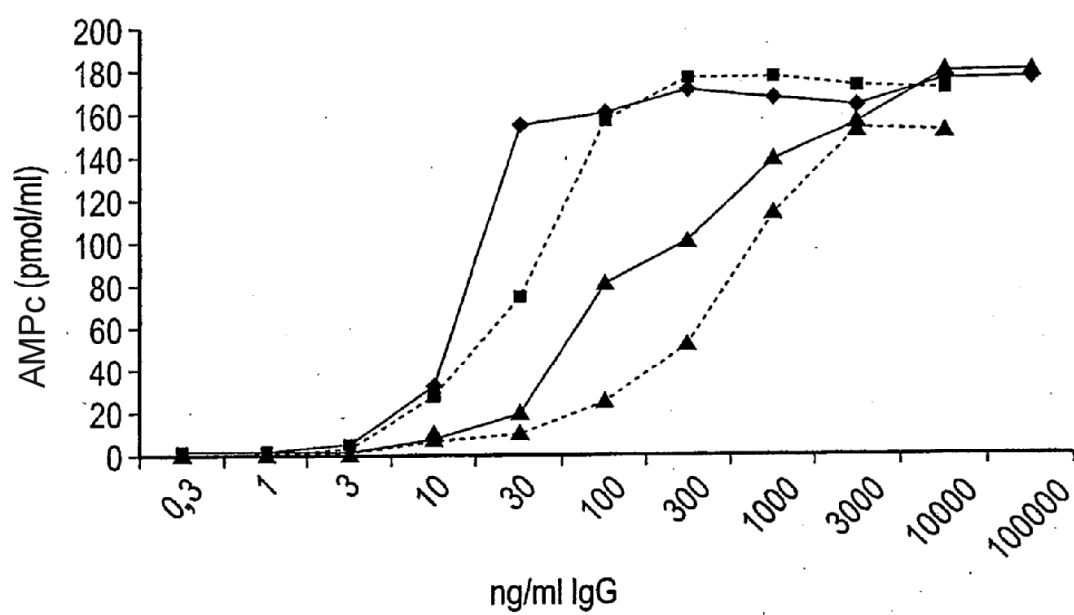


Fig. 1B

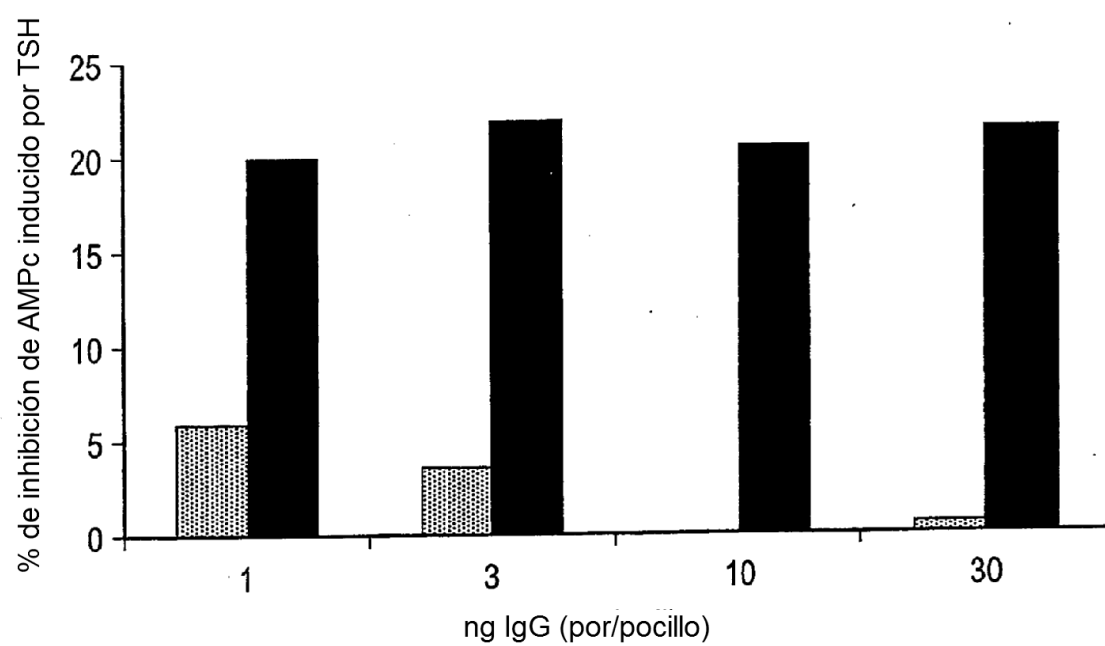


Fig. 2

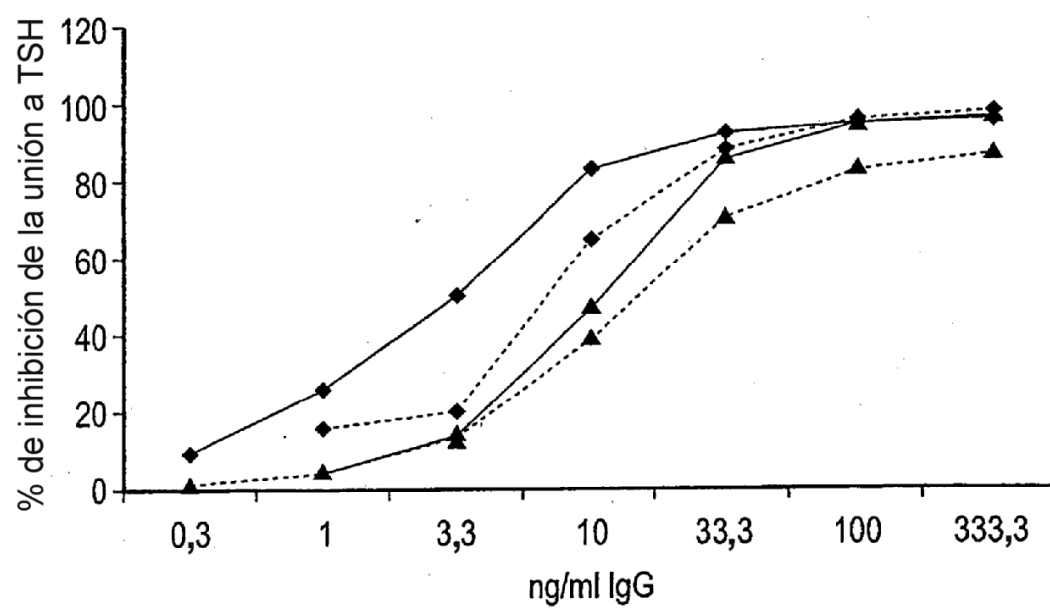


Fig. 3

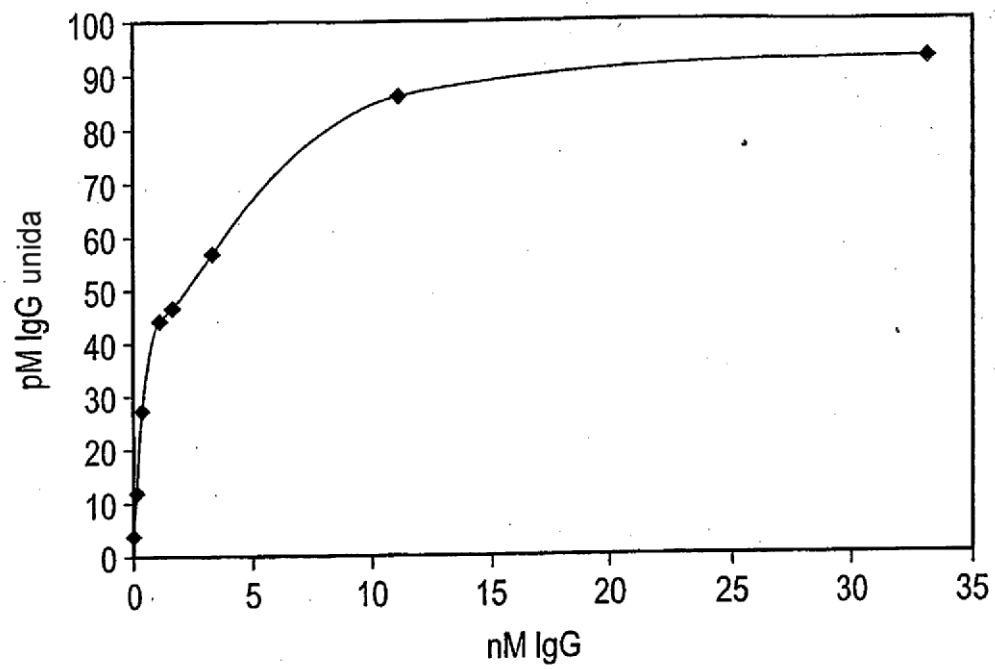


Fig. 4A

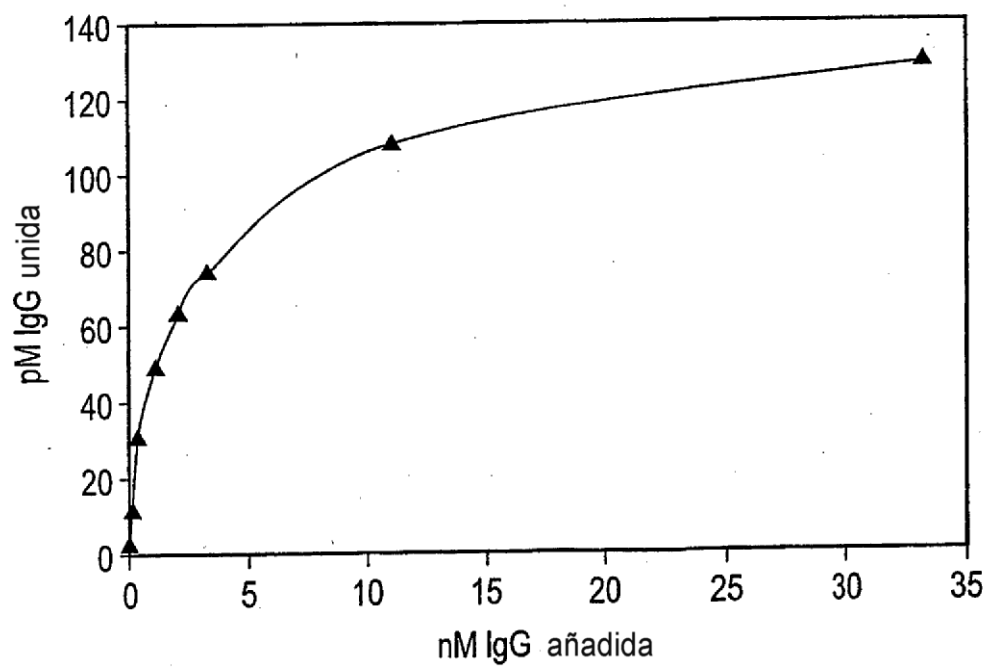


Fig. 4B

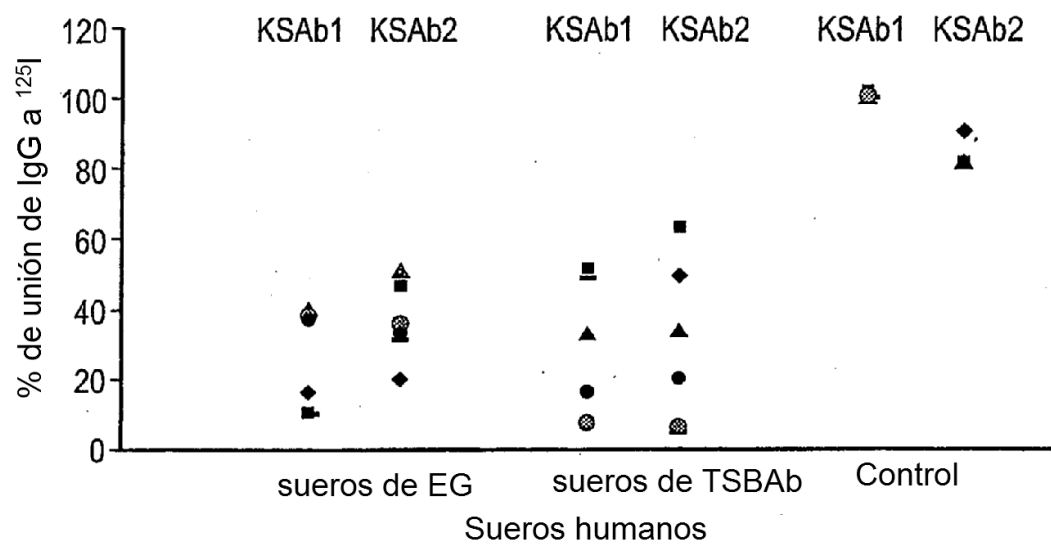


Fig. 5A

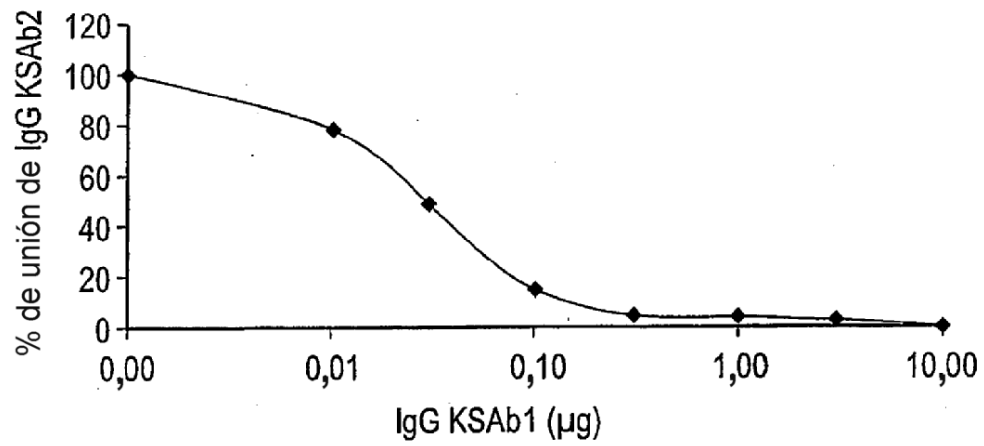


Fig. 5B

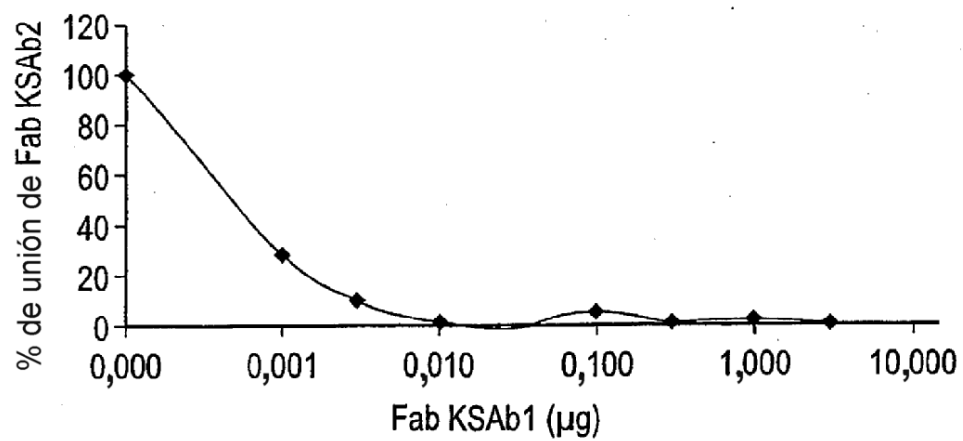


Fig. 5C

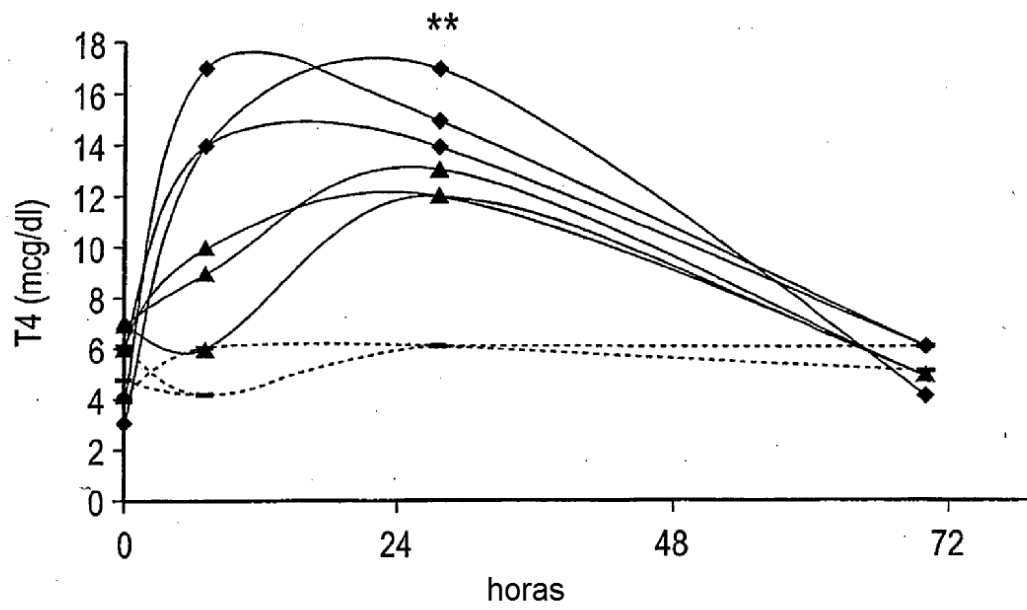


Fig. 6A

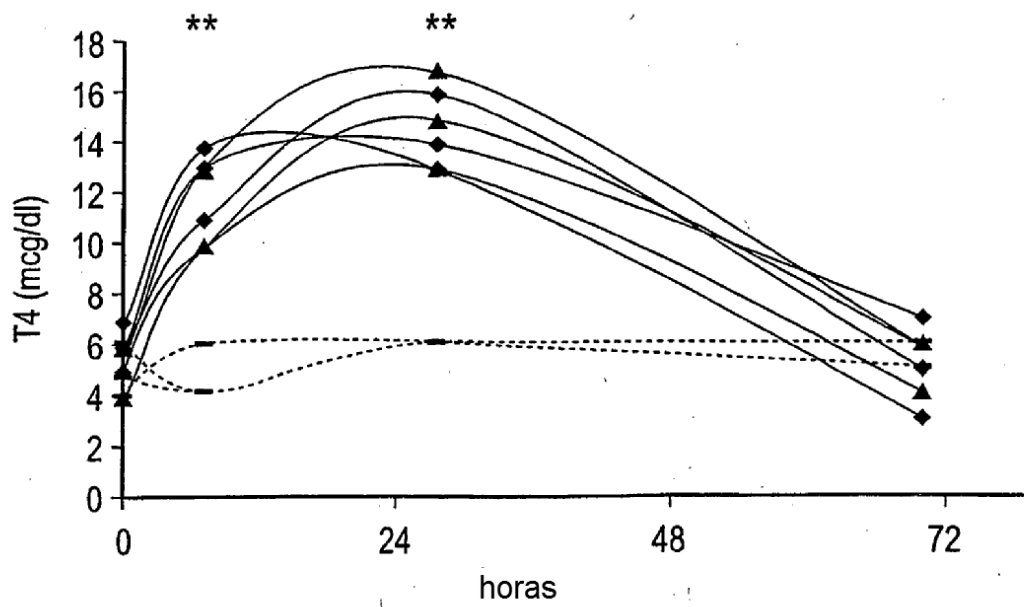


Fig. 6B

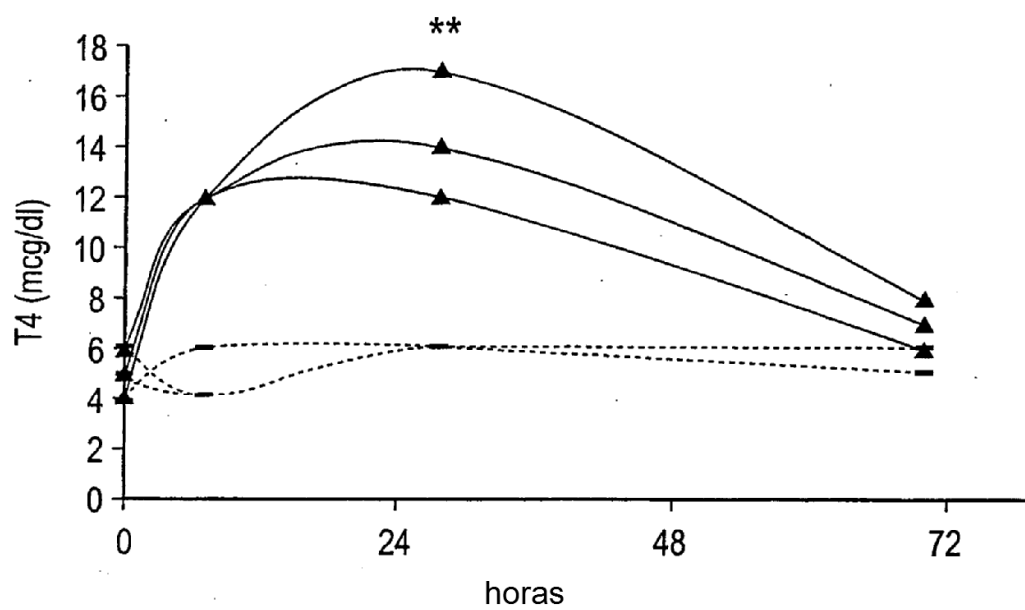


Fig. 6C

Figura 7

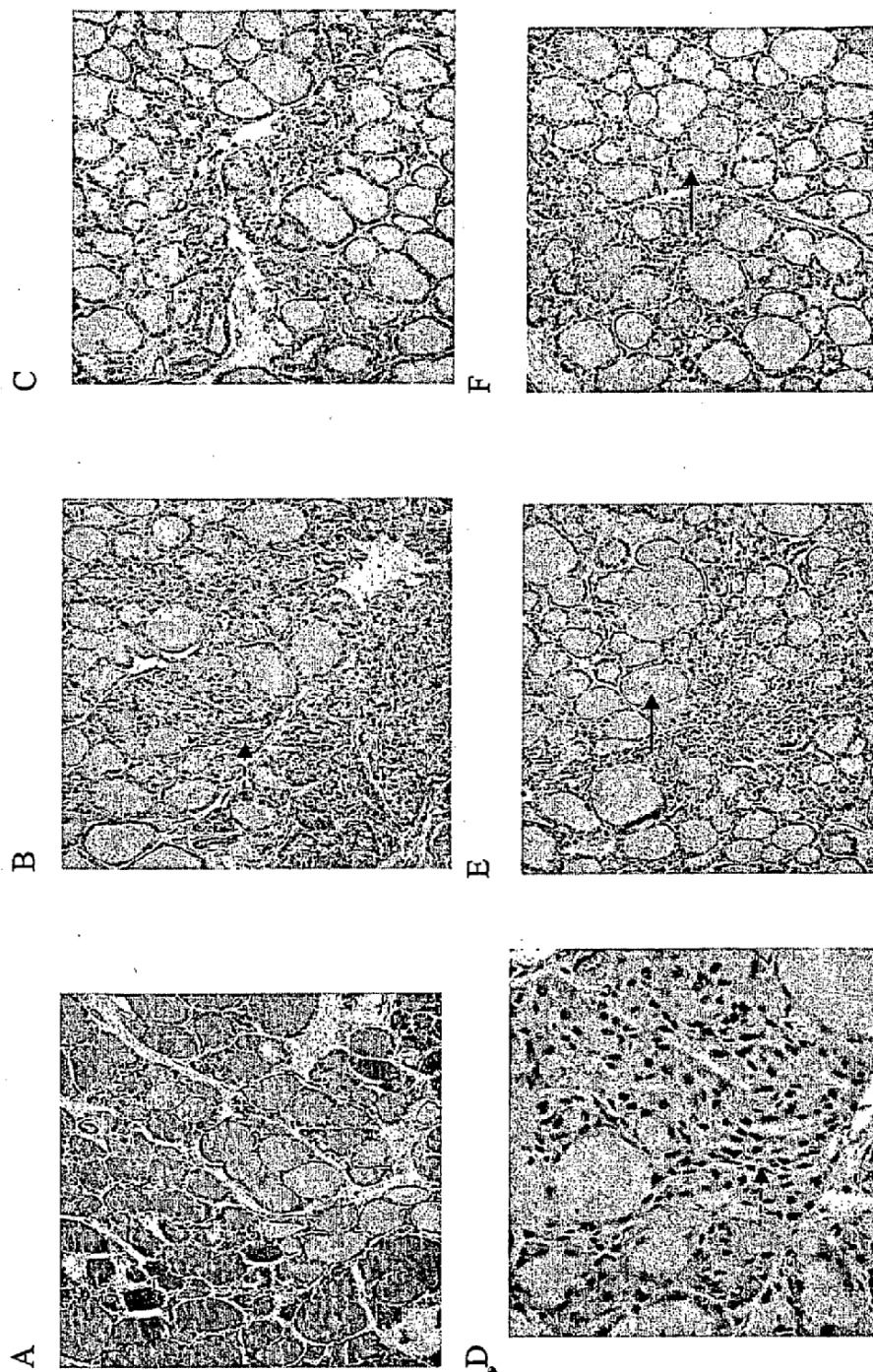


Figura 8

AYTMN

Figura 9

AYTMD

Figura 10

LINPYNGGTNYNQEFEG

Figura 11

RDWDYFDY

Figura 12

KASQNVGTFVA

Figura 13

SASNRYT

Figura 14

RQYSSYPYT

Figura 15

**EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFSA YTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNG
GTNYNQEFEGKATLTVNKSSNTAFMELLSLTSDDSAVYYCARRDWDYFDYWGQGT
TLTVSSAKTTTPSVYPLAPGCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPESVTVTWNSGSLSSSVHT
FPALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCVAHPASSTKVDKKIETRC**

Figura 16

**EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFSA YTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNG
GTNYNQEFEGKATLTVNKSSNTAFMELLSLTSDDSAVYYCARRDWDYFDYWGQGT
TLTVSSAKTTTPSVYPLAPGCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPESVTVTWNSGSLSSSVHT
FPALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCVAHPASSTKVDKKIETRC**

Figura 17

**EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFSA YTMDWVKQSHGKNLEWIGLINPYNG
GTNYNQEFEGKATLTVNKSSNTAFMELLSLTSDDSAVYYCARRDWDYFDYWGQGT
TLTVSSAKTTTPSVYPLAPGCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPESVTVTWNSGSLSSSVHT
FPALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCVAHPASSTKVDRKLRRVVKGEFCRYP**

Figura 18

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFSAAYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNG
GTNYNQEFEGKATLTVNKSSNTAFMELLSLTSDGSAVYYCARRDWDYFDYWGQGT
TLTVSSAKTTPPSVYPLAPGCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPESVTVTWNSGSLSSSVHT
FPALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTKVDDKKIETRC

Figura 19

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSIICKASQNVGTFVAWYQQKPGQSPKLLVYSASNRYT
GVPDRFTGSGSGTDFTLTINNMQSEDLADYFCRQYSSYPYTFGGGKLEIKRADAAP
TVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIVGSERQNGVLNSWTDQDSKD
STYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKSTSTPIVKSFNRRNETRC

Figura 20

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFSAAYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNG
GTNYNQEFEGKATLTVNKSSNTAFMELLSLTSDDSAVYYCARRDWDYFDYWGQGT
TLTVSS

Figura 21

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFSAAYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNG
GTNYNQEFEGKATLTVNKSSNTAFMELLSLTSDDSAVYYCARRDWDYFDYWGQGT
TLTVSS

Figura 22

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFSAAYTMDWVKQSHGKNLEWIGLINPYNG
GTNYNQEFEGKATLTVNKSSNTAFMELLSLTSDDSAVYYCARRDWDYFDYWGQGT
TLTVSS

Figura 23

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFSAAYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNG
GTNYNQEFEGKATLTVNKSSNTAFMELLSLTSDGSAVYYCARRDWDYFDYWGQGT
TLTVSS

Figura 24

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSIICKASQNVGTFVAWYQQKPGQSPKLLVYSASNRYT
GVPDRFTGSGSGTDFTLTINNMQSEDLADYFCRQYSSYPYTFGGGKLEI

Figura 25

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSIICKASQNVGTFVAWYQQKPGQSPKLLVYSASNRYT
GVPDRFTGSGSGTDFTLTINNMQSEDLADYFCRQYSSYPYTFGGGKLEIGGGGSGG
GGSGGGGSEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFSAAYTMNWVKQSHGKNLEWI
GLINPYNGGTNYNQEFEGKATLTVNKSSNTAFMELLSLTSDDSAVYYCARRDWDYF
DYWGQGTTTLTVSS

Figura 26

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSIICKASQNVGTFVAWYQQKPGQSPKLLVYSASNRYT
GVPDRFTGSGSGTDFTLTINNMQSEDLADYFCRQYSSYPYTFGGGTKLEIGGGGSGG
GGSGGGGSEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFAYTMNWVKQSHGKNLEWI
GLINPYNGGTNYNQEFEGKATLTVNKSSNTAFMELLSLTSDDSAVYYCARRDWDYF
DYWGQGTTTLTVSS

Figura 27

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSIICKASQNVGTFVAWYQQKPGQSPKLLVYSASNRYT
GVPDRFTGSGSGTDFTLTINNMQSEDLADYFCRQYSSYPYTFGGGTKLEIGGGGSGG
GGSGGGGSEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFSAYTMNWVKQSHGKNLEWI
GLINPYNGGTNYNQEFEGKATLTVNKSSNTAFMELLSLTSDDSAVYYCARRDWDYF
DYWGQGTTTLTVSS

Figura 28

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSIICKASQNVGTFVAWYQQKPGQSPKLLVYSASNRYT
GVPDRFTGSGSGTDFTLTINNMQSEDLADYFCRQYSSYPYTFGGGTKLEIGGGGSGG
GGSGGGGSEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFSAYTMNWVKQSHGKNLEWI
GLINPYNGGTNYNQEFEGKATLTVNKSSNTAFMELLSLTSDGSAVYYCARRDWDYF
DYWGQGTTTLTVSS

Figura 29

GGGGSGGGGSGGGGS

Figura 30

LINPYNGGTSYNQKFED

Figura 31

LINPYNGGTNYNQKFED

Figura 32

KASQNVGTALA

Figura 33

SASNRNT

Figura 34

QQYSSYPYT

Figura 35

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTAYTMNWVKQTHGKNLEWIGLINPYNG
GTSYNQKFEDKATLTVDKSSNTAYMDLLSLTSEDSAVYYCARRDWDYFDYWGQGT
TLTVSSAKTTAPAVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVH
TFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIETRC

Figura 36

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTAYTMNWVKQTHGKNLEWIGLINPYNG
GTNYNQKFEDKATLTVDKSSNTAYMDLLSLTSEDSAVYYCARRDWDYFDYWGQG
TTLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVH
TFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIETRC

Figura 37

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTAYTMNWVKQTHGKNLEWIGLINPYNG
GTNYNQKFEDKATLTVDKSSNTAYMDLLSLTSEDSAVYYCARRDWDYFDYWGQG
TTLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVH
T

Figura 38

DVVMTQSQKFLSTSAGDRVSISCKASQNVGTALAWYQQKPGQSPKLLIYSASNRNT
GVPDRFTGRGFGTDFTLTISNMQSEDLADYFCQQYSSYPYTFGGGTRLEIKRADAAAP
TVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPKDIIVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKD
STYSMSSTLTLTKEDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNERNETRC

Figura 39

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTAYTMNWVKQTHGKNLEWIGLINPYNG
GTSYNQKFEDKATLTVDKSSNTAYMDLLSLTSEDSAVYYCARRDWDYFDYWGQGT
TLTVSS

Figura 40

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTAYTMNWVKQTHGKNLEWIGLINPYNG
GTNYNQKFEDKATLTVDKSSNTAYMDLLSLTSEDSAVYYCARRDWDYFDYWGQG
TTLTVSS

Figura 41

DVVMTQSQKFLSTSAGDRVSISCKASQNVGTALAWYQQKPGQSPKLLIYSASNRNT
GVPDRFTGRGFGTDFTLTISNMQSEDLADYFCQQYSSYPYTFGGGTRLEI

Figura 42

DVVMTQSQKFLSTSAGDRVSISCKASQNVGTALAWYQQKPGQSPKLLIYSASNRNT
GVPDRFTGRGFGTDFTLTISNMQSEDLADYFCQQYSSYPYTFGGGTRLEIGGGGSGG
GGSGGGGSEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSTAYTMNWVKQTHGKNLEW
IGLINPYNGGTSYNQKFEDKATLTVDKSSNTAYMDLLSLTSEDSAVYYCARRDWDY
FDYWGQGTTTLTVSS

Figura 43

DVVMTQSQKFLSTSAGDRVSISCKASQNVGTALAWYQQKPGQSPKLLIYSASNRNT
GVPDRFTGRGFGTDFTLTISNMQSEDLADYFCQQYSSYPYTFGGGTRLEIGGGGSGG
GGSGGGGSEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSTAYTMNWVKQTHGKNLEW
IGLINPYNGGTNYNQKFEDKATLTVDKSSNTAYMDLLSLTSEDSAVYYCARRDWDY
FDYWGQGTTTLTVSS

Figura 44

gcctacaccatgaac

Figura 45

gcctacaccatggac

Figura 46

cttattaatccttacaatggtggtactaactacaaccaggagttcgagggc

Figura 47

agggactgggactactttgactac

Figura 48

aaggccagtcagaatgtgggtactttgtagcc

Figura 49

tcggcatccaatcgtacact

Figura 50

cggcaatatagcagctatccgtacacg

Figura 51

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATG
 AAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCTCTGCCTACACCATGAACTGGG
 TGAAGCAGAGCCATGGAAAGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACA
 ATGGTGGTACTAACTACAACCAGGAGTTCGAGGGCAAGGCCACTTTAACTGTAA
 ACAAGTCATCCAACACAGCCTTCATGGAGCTCCTCAGTCTGACATCTGACGACTC
 TGCAGTCTATTACTGTGCGAGAAGGGACTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAA
 GGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACAACACCCCCATCAGTCTATCCAC
 TGGCCCCTGGGTGTGGAGATACAACCTGGTTCCTCCGTGACTCTGGGATGCCTGGT
 CAAGGGCTACTTCCCTGAGTCAGTGAAGTGTGACTTGGAACTCTGGATCCCTGTCC
 AGCAGTGTGCACACCTTCCCAGCTCTCCTGCAGTCTGGACTCTACACTATGAGCA
 GCTCAGTGAAGTGTCCCTCCAGCACCTGGCCAAGTCAGACCGTCACCTGCAGCGT
 TGCTCACCCAGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGAGACGCGTTGT

Figura 52

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATG
 AAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCTTTGCCTACACCATGAACTGGG
 TGAAGCAGAGCCATGGAAAGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACA
 ATGGTGGTACTAACTACAACCAGGAGTTCGAGGGCAAGGCCACTTTAACTGTAA
 ACAAGTCATCCAACACAGCCTTCATGGAGCTCCTCAGTCTGACATCTGACGACTC
 TGCAGTCTATTACTGTGCGAGAAGGGACTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAA
 GGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACAACACCCCCATCAGTCTATCCAC
 TGGCCCCTGGGTGTGGAGATACAACCTGGTTCCTCCGTGACTCTGGGATGCCTGGT
 CAAGGGCTACTTCCCTGAGTCAGTGAAGTGTGACTTGGAACTCTGGATCCCTGTCC
 AGCAGTGTGCACACCTTCCCAGCTCTCCTGCAGTCTGGACTCTACACTATGAGCA
 GCTCAGTGAAGTGTCCCTCCAGCACCTGGCCAAGTCAGACCGTCACCTGCAGCGT
 TGCTCACCCAGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGAGACGCGTTGT

Figura 53

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATG
 AAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCTCTGCCTACACCATGGACTGGG
 TGAAGCAGAGCCATGGAAAGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACA
 ATGGTGGTACTAACTACAACCAGGAGTTCGAGGGCAAGGCCACTTTAACTGTAA
 ACAAGTCATCCAACACAGCCTTCATGGAGCTCCTCAGTCTGACATCTGACGACTC
 TGCAGTCTATTACTGTGCGAGAAGGGACTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAA
 GGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACAACACCCCCATCAGTCTATCCAC
 TGGCCCCTGGGTGTGGAGATACAACCTGGTTCCTCCGTGACTCTGGGATGCCTGGT
 CAAGGGCTACTTCCCTGAGTCAGTGAAGTGTGACTTGGAACTCTGGATCCCTGTCC
 AGCAGTGTGCACACCTTCCCAGCTCTCCTGCAGTCTGGACTCTACACTATGAGCA
 GCTCAGTGAAGTGTCCCTCCAGCACCTGGCCAAGTCAGACCGTCACCTGCAGCGT
 TGCTCACCCAGCCAGCAGCACCAAGGTGGACA:GAAAATTGAGACGCGTTGTCAA
 GGGCGAATTCTGCAGATATCCAT

Figura 54

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATG
 AAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCTCTGCCTACACCATGAACTGGG
 TGAAGCAGAGCCATGGAAAGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACA
 ATGGTGGTACTAACTACAACCAGGAGTTCGAGGGCAAGGCCACTTTAACTGTAA
 ACAAGTCATCCAACACAGCCTTCATGGAGCTCCTCAGTCTGACATCTGACGGCTC
 TGCAGTCTATTACTGTGCGAGAAGGGACTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAA
 GGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACAACACCCCCATCAGTCTATCCAC
 TGGCCCCCTGGGTGTGGAGATACTGGTTCCCTCCGTGACTCTGGGATGCCTGGT
 CAAGGGCTACTTCCCTGAGTCAGTGAAGTGTGACTTGGAACTCTGGATCCCTGTCC
 AGCAGTGTGCACACCTTCCCAGCTCTCCTGCAGTCTGGACTCTACACTATGAGCA
 GCTCAGTGAAGTGTCCCTCCAGCACCTGGCCAAGTCAGACCGTCACCTGCAGCGT
 TGCTACCCAGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGAGACGCGTTGT

Figura 55

GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCTGTCCACATCAGTAGGAGACAGG
 GTCAGCATCATTTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTTTTGTAGCCTGGTATC
 AACAGAAACCAGGACAATCTCCTAACTACTGGTTTACTCGGCATCCAATCGGTA
 CACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC
 ACCATCAACAATATGCAGTCTGAAGACCTGGCAGATTATTTCTGCCGGCAATATA
 GCAGCTATCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTAGAAATAAAACGGGGCTG
 ATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGG
 AGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTC
 AAGTGGAAGATTGTTGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACT
 GATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCTCACGTTGACC
 AAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACA
 TCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGACGCGTTGT

Figura 56

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATG
 AAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCTCTGCCTACACCATGAACTGGG
 TGAAGCAGAGCCATGGAAAGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACA
 ATGGTGGTACTAACTACAACCAGGAGTTCGAGGGCAAGGCCACTTTAACTGTAA
 ACAAGTCATCCAACACAGCCTTCATGGAGCTCCTCAGTCTGACATCTGACGACTC
 TGCAGTCTATTACTGTGCGAGAAGGGACTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAA
 GGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

Figura 57

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATG
 AAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCTTGCCTACACCATGAACTGGG
 TGAAGCAGAGCCATGGAAAGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACA
 ATGGTGGTACTAACTACAACCAGGAGTTCGAGGGCAAGGCCACTTTAACTGTAA
 ACAAGTCATCCAACACAGCCTTCATGGAGCTCCTCAGTCTGACATCTGACGACTC
 TGCAGTCTATTACTGTGCGAGAAGGGACTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAA
 GGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

Figura 58

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATG
AAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCTCTGCCTACACCATGGACTGGG
TGAAGCAGAGCCATGGAAAGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACA
ATGGTGGTACTAACTACAACCAGGAGTTCGAGGGCAAGGCCACTTTAACTGTAA
ACAAGTCATCCAACACAGCCTTCATGGAGCTCCTCAGTCTGACATCTGACGACTC
TGCAGTCTATTACTGTGCGAGAAGGGACTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAA
GGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

Figura 59

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATG
AAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCTCTGCCTACACCATGAACTGGG
TGAAGCAGAGCCATGGAAAGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACA
ATGGTGGTACTAACTACAACCAGGAGTTCGAGGGCAAGGCCACTTTAACTGTAA
ACAAGTCATCCAACACAGCCTTCATGGAGCTCCTCAGTCTGACATCTGACGGCTC
TGCAGTCTATTACTGTGCGAGAAGGGACTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAA
GGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

Figura 60

GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGG
GTCAGCATCATTTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTTTTGTAGCCTGGTATC
AACAGAAACCAGGACAATCTCCTAACTACTGGTTTACTCGGCATCCAATCGGTA
CACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC
ACCATCAACAATATGCAGTCTGAAGACCTGGCAGATTATTTCTGCCGGCAATATA
GCAGCTATCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTAGAAATA

Figura 61

cttattaatccatacaatggtggtactagctacaaccagaagttcgaggac

Figura 62

cttattaatccttacaatggtggtactaactacaaccagaagttcgaggac

Figura 63

aaggccagtcagaatgtgggtactgctttagec

Figura 64

tcggcatccaatcgaacact

Figura 65

cagcaatatagcagctatccttacag

Figura 66

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATG
 AAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGCCTACACCATGAACTGGG
 TGAAGCAGACCCATGGAAAGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCATACA
 ATGGTGGTACTAGCTACAACCAGAAGTTCGAGGACAAGGCCACATTAAGTGTG
 ACAAGTCATCCAACACAGCCTACATGGACCTCCTCAGTCTGACATCTGAGGACTC
 TGCAGTCTATTATTGTGCAAGAAGGGACTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAA
 GGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACAACAGCCCCAGCGGTCTATCCAC
 TGGCCCCCTGTGTGTGGAGATACGACTGGCTCCTCGGTGACTCTAGGATGCCTGGT
 CAAGGGTTATTTCCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCC
 AGTGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTCTACACCCTCAGCA
 GCTCAGTGACTGTAACCTCGAGCACCTGGCCCAGCCAGTCCATCACCTGCAATGT
 GGCCACCCGGCAAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGAGACGCGTTGT

Figura 67

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATG
 AAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGCCTACACCATGAACTGGG
 TGAAGCAGACCCATGGAAAGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACAA
 TGGTGGTACTAACTACAACCAGAAGTTCGAGGACAAGGCCACATTAAGTGTGA
 CAAGTCATCCAACACAGCCTACATGGACCTCCTCAGTCTGACATCTGAGGACTCT
 GCAGTCTATTATTGTGCAAGAAGGGACTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAAG
 GCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACAACAGCCCCATCGGTCTATCCACT
 GGCCCCCTGTGTGTGGAGATACAACCTGGCTCCTCGGTGACTCTAGGATGCCTGGTC
 AAGGGTTATTTCCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCA
 GTGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTCTACACCCTCAGCAG
 CTCAGTGACTGTAACCTCGAGCACCTGGCCCAGCCAGTCCATCACCTGCAATGTG
 GCCCACCCGGCAAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGAGACGCGTTGT

Figura 68

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATG
 AAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGCCTACACCATGAACTGGG
 TGAAGCAGACCCATGGAAAGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACAA
 TGGTGGTACTAACTACAACCAGAAGTTCGAGGACAAGGCCACATTAAGTGTGA
 CAAGTCATCCAACACAGCCTACATGGACCTCCTCAGTCTGACATCTGAGGACTCT
 GCAGTCTATTATTGTGCAAGAAGGGACTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAAG
 GCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACAACAGCCCCATCGGTCTATCCACT
 GGCCCCCTGTGTGTGGAGATACAACCTGGCTCCTCGGTGACTCTAGGATGCCTGGTC
 AAGGGTTATTTCCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCA
 GTGGTGTGCACACC

Figura 69

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATG
 AAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGCCTACACCATGAACTGGG
 TGAAGCAGACCCATGGAAAGAACCCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACAA
 TGGTGGTACTAACTACAACCAGAAGTTCGAGGACAAGGCCACATTAAGTGTGCA
 CAAGTCATCCAACACAGCCTACATGGACCTCCTCAGTCTGACATCTGAGGACTCT
 GCAGTCTATTATTGTGCAAGAAGGGACTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAG
 GCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACAACAGCCCCATCGGTCTATCCACT
 GGCCCCGTGTGTGTGGAGATACTGGCTCCTCGGTGACTCTAGGATGCCTGGTC
 AAGGGTTATTTCCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAAGTCTGGATCCCTGTCCA
 GTGGTGTGCACACC

Figura 70

GACGTTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCCTGTCCACATCAGCAGGAGACAGG
 GTCAGCATCTCCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTGCTTTAGCCTGGTATC
 AACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTTTTGATTTACTCGGCATCCAATCGGAA
 CACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGGGGATTTGGGACAGATTTCACTCTC
 ACCATCAGCAATATGCAGTCTGAAGACCTGGCAGATTATTTCTGCCAGCAATATA
 GCAGCTATCCTTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAGGCTGGAAATAAAGCGGGCTG
 ATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGG
 AGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTC
 AAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACT
 GATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACC
 AAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACA
 TCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGACGCGTTGT

Figura 71

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATG
 AAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGCCTACACCATGAACTGGG
 TGAAGCAGACCCATGGAAAGAACCCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCATACA
 ATGGTGGTACTAGCTACAACCAGAAGTTCGAGGACAAGGCCACATTAAGTGTG
 ACAAGTCATCCAACACAGCCTACATGGACCTCCTCAGTCTGACATCTGAGGACTC
 TGCAGTCTATTATTGTGCAAGAAGGGACTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAA
 GGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

Figura 72

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATG
 AAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGCCTACACCATGAACTGGG
 TGAAGCAGACCCATGGAAAGAACCCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACAA
 TGGTGGTACTAACTACAACCAGAAGTTCGAGGACAAGGCCACATTAAGTGTGCA
 CAAGTCATCCAACACAGCCTACATGGACCTCCTCAGTCTGACATCTGAGGACTCT
 GCAGTCTATTATTGTGCAAGAAGGGACTGGGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAG
 GCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

Figura 73

GACGTTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCCTGTCCACATCAGCAGGAGACAGG
GTCAGCATCTCCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTGCTTTAGCCTGGTATC
AACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTTTTGATTTACTCGGCATCCAATCGGAA
CACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGGGGATTTGGGACAGATTTCACTCTC
ACCATCAGCAATATGCAGTCTGAAGACCTGGCAGATTATTTCTGCCAGCAATATA
GCAGCTATCCTTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAGGCTGGAAATA

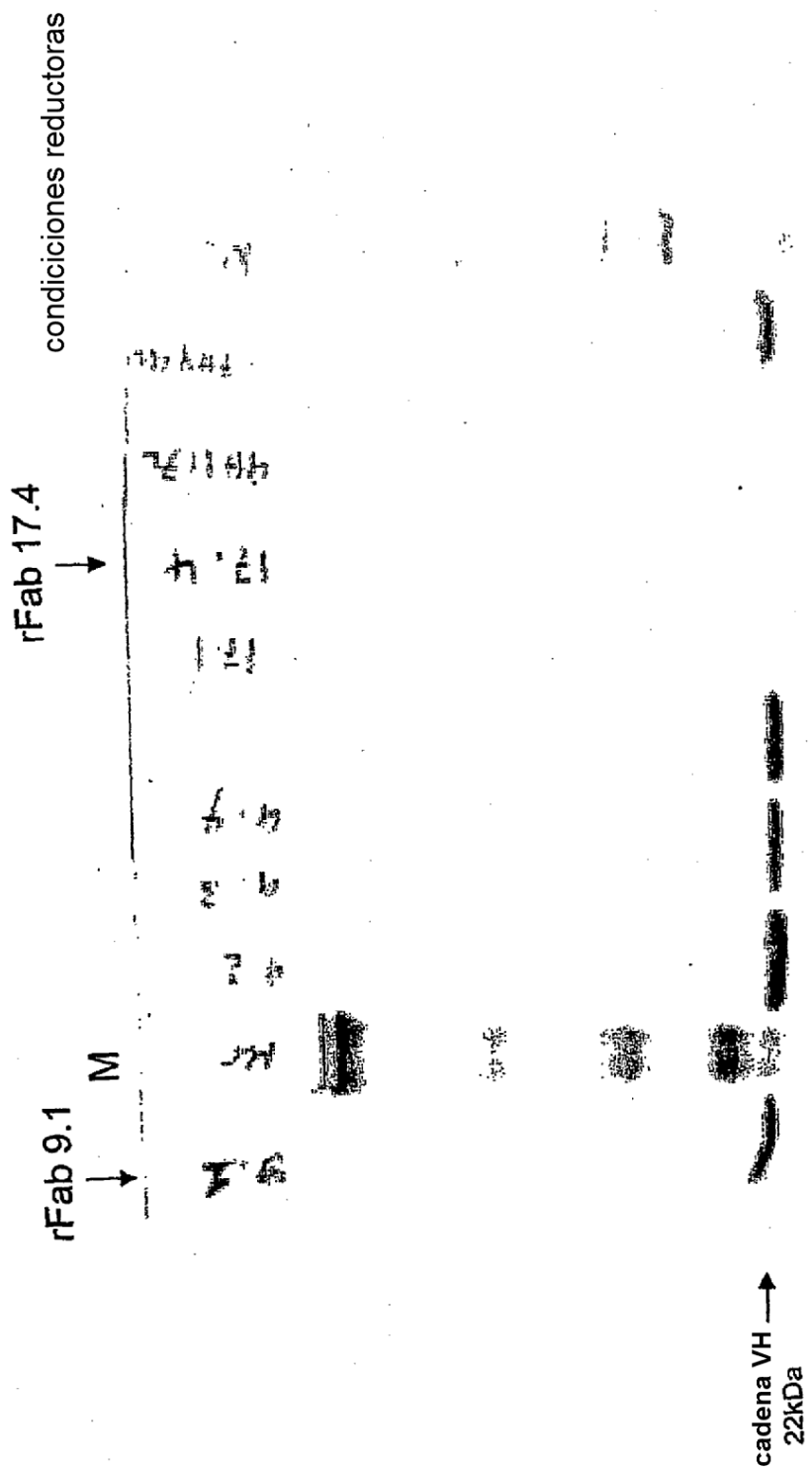


FIGURA 74

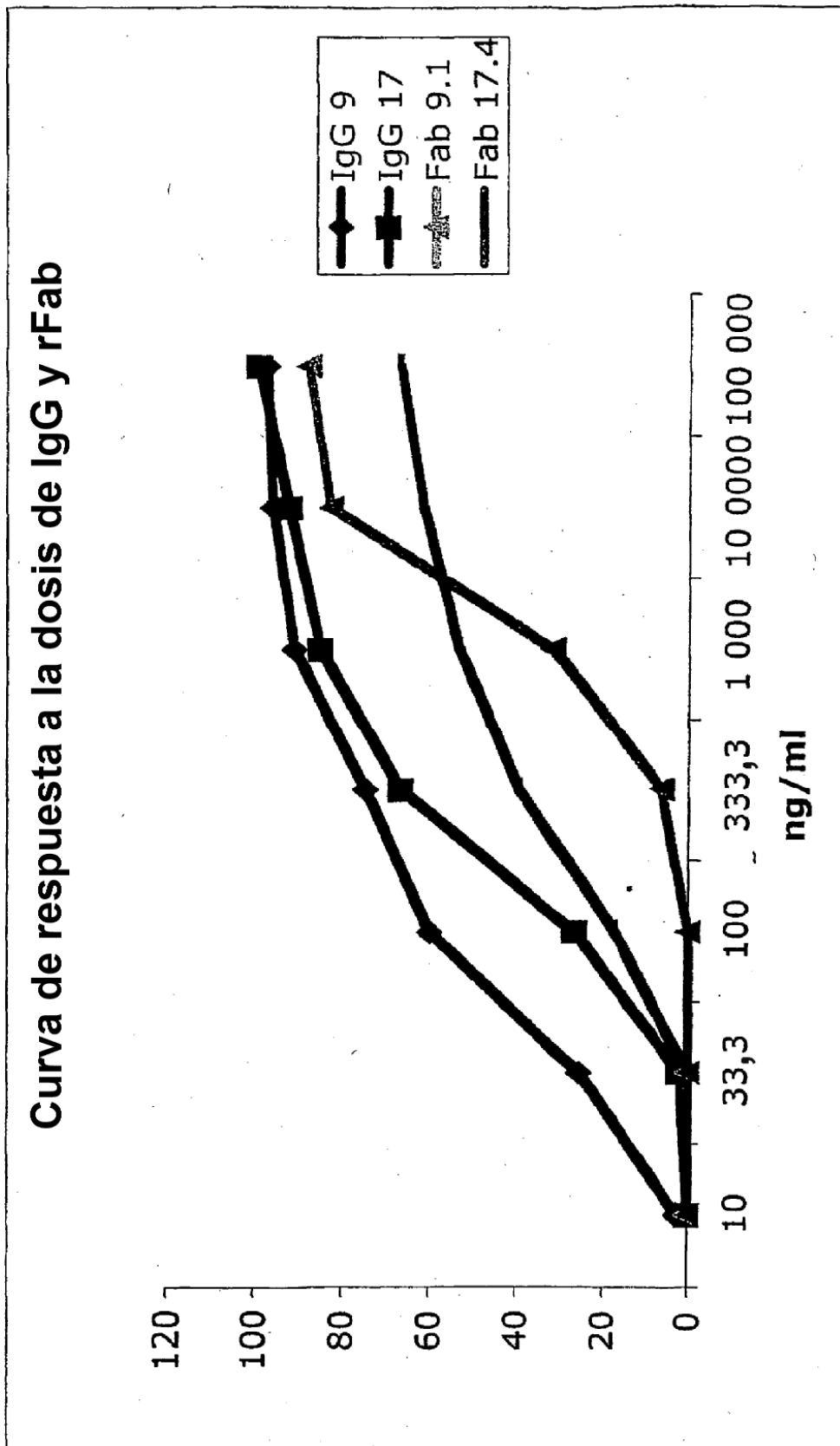


FIGURA 75

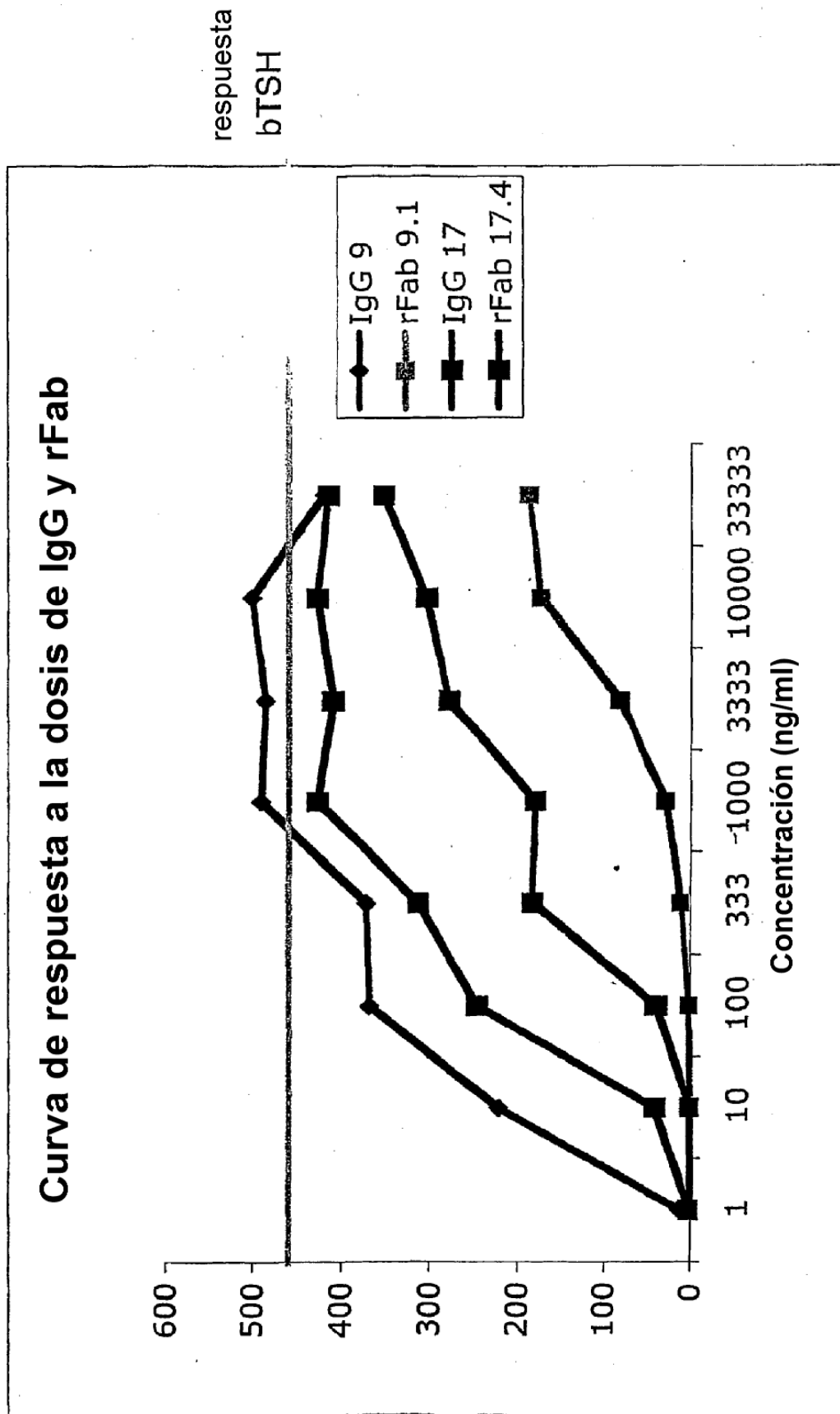


FIGURA 76

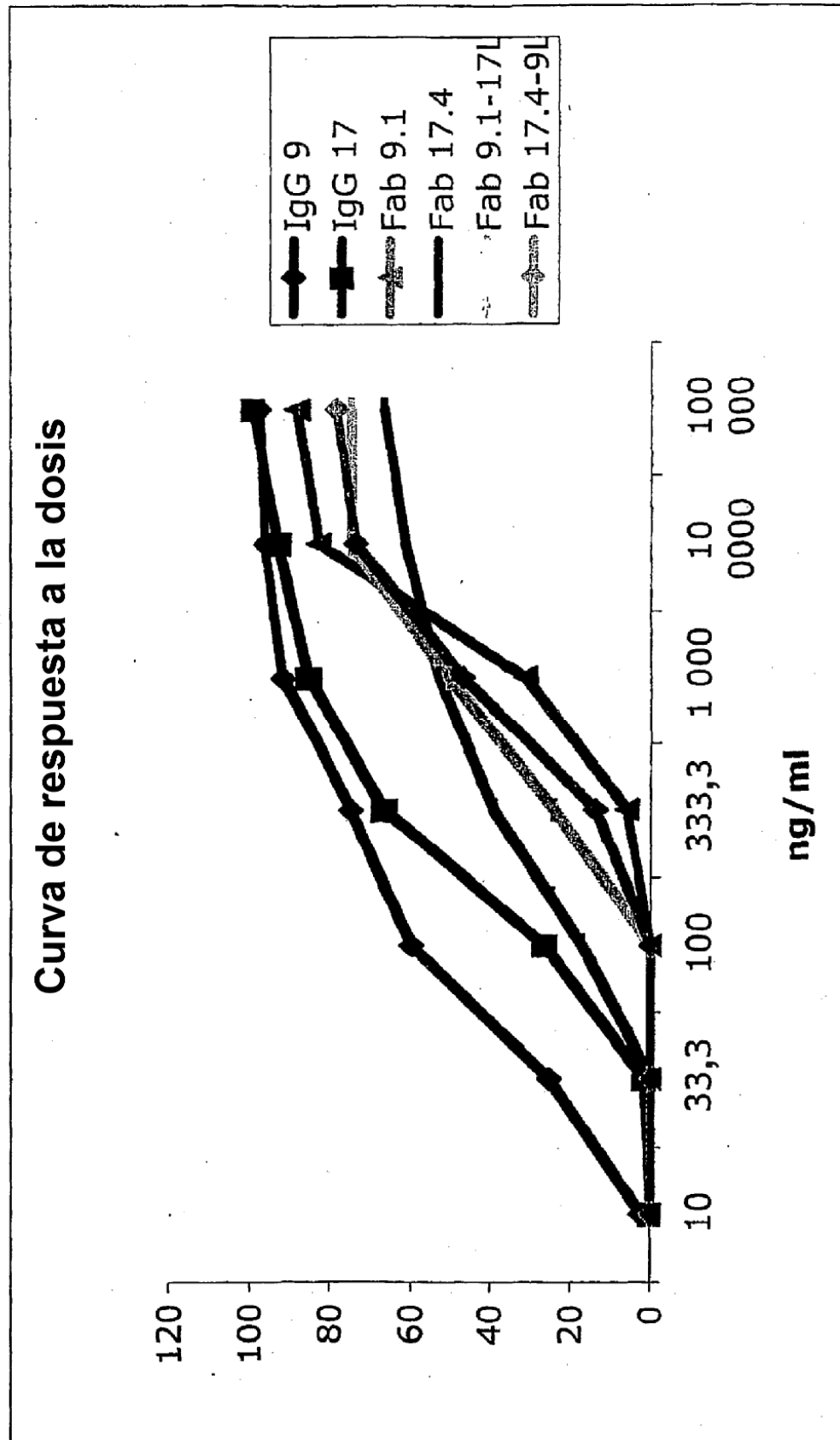


FIGURA 77

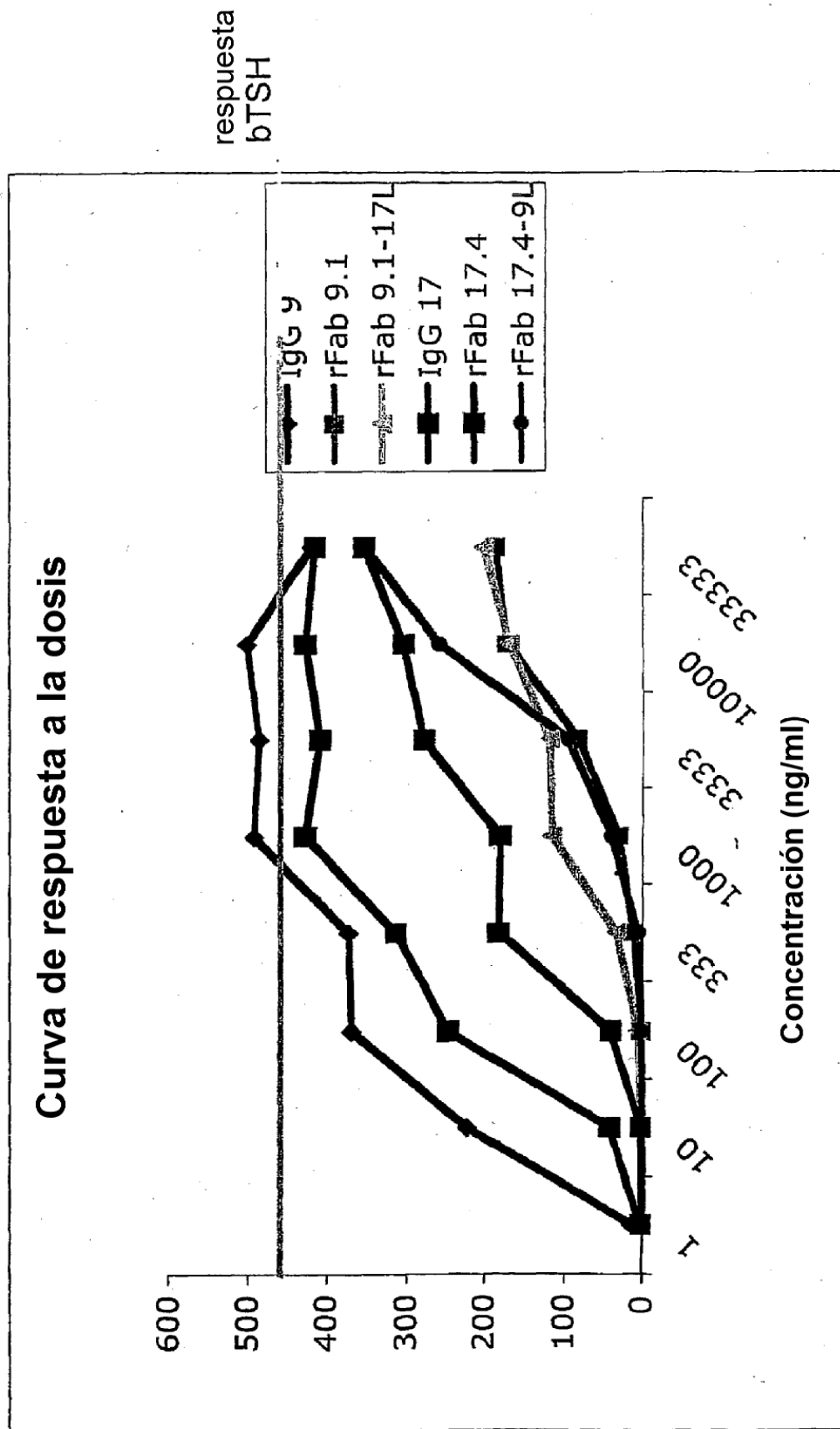


FIGURA 78

FIGURA 79