

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 241**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**C12N 15/85** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

**G01N 33/564** (2006.01)

**G01N 33/577** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2003 E 10184462 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2383296**

54 Título: **Anticuerpo para el receptor de tirotropina y sus usos**

30 Prioridad:

**29.11.2002 GB 0227964**

**29.01.2003 GB 0302140**

**27.06.2003 GB 0315147**

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

**13.07.2017**

73 Titular/es:

**RSR LIMITED (100.0%)**

**Avenue Park**

**PentwynCardiff CF23 8HE, GB**

72 Inventor/es:

**SANDERS, JANE;**

**FURMANIAK, JADWIGA y**

**SMITH, BERNARD REES**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 624 241 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).

## DESCRIPCION

Anticuerpo para el receptor de tirotropina y sus usos

5 La presente invención se refiere a compañeros de unión (tales como anticuerpos monoclonales o recombinantes) para el receptor de tirotropina (receptor de la TSH o TSHR) y sus usos.

10 La tirotropina u hormona estimulante de la tiroides (TSH) es una hormona pituitaria que juega un papel clave en la regulación de la función de la tiroides. Su liberación es estimulada por la hormona TRH formada en el hipotálamo y la TSH controla la formación y liberación de las importantes hormonas de la tiroides, tiroxina (T4) y triyodotironina (T3). Sobre la base de un mecanismo de retroalimentación, el contenido de hormonas de la tiroides en el suero controla la liberación de la TSH. La formación de T3 y T4 por las células de la tiroides es estimulada por la TSH mediante un procedimiento en donde la TSH liberada por la pituitaria se une al receptor de la TSH de la membrana celular de la tiroides.

15 En la enfermedad de Graves (un trastorno autoinmune común) se forman anticuerpos del receptor de la TSH (TRAb) y estos autoanticuerpos se unen al receptor de la TSH de tal manera que imitan las acciones de la TSH, estimulando la glándula tiroides para producir altos niveles de hormonas de la tiroides. Estos autoanticuerpos se describen como aquellos que tienen actividad estimulante. En algunos pacientes, los autoanticuerpos se unen al receptor de la TSH, pero no estimulan la producción de hormonas de la tiroides y se describen como aquellos que tienen actividad bloqueadora. (J Sanders, Y Oda, SA Roberts, M. Maruyama, J. Furmaniak, B Rees Smith, "Understanding the thyrotropin receptor function-structure relationship", *Endocrinology and Metabolism Clinical*, Ed TF Davies 1997, 11 (3): 451-479; pub Balliere Tindall, Londres).

25 Las mediciones de los anticuerpos del receptor de la TSH son importantes en el diagnóstico y manejo de la enfermedad de Graves y otros trastornos de la tiroides. Actualmente se usan tres tipos de ensayos para medir los anticuerpos del receptor de la TSH:

30 (a) ensayos de unión competitivos que miden la capacidad de los anticuerpos del receptor de la TSH para inhibir la unión de la TSH a preparaciones del receptor de la TSH;

(b) bioensayos que miden la capacidad de los anticuerpos del receptor de la TSH para estimular células que expresan al receptor de la TSH en cultivo; y

35 (c) inmunoprecipitación de preparaciones del receptor de la TSH con anticuerpos del receptor de la TSH.

La medición de los anticuerpos del receptor de la TSH usando tales ensayos se describe en las referencias:

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

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

50 Se ha reconocido durante muchos años que los anticuerpos monoclonales humanos para el receptor de la TSH derivados de linfocitos de pacientes serían reactivos valiosos para comprender la patogénesis de la enfermedad de Graves y para desarrollar nuevos procedimientos de medición de anticuerpos receptores de la TSH, por ejemplo, como sustitutos de la TSH en ensayos de unión competitiva. Además, como los anticuerpos del receptor de la TSH en suero del paciente son usualmente potentes estimuladores de la tiroides (agonistas de la TSH), estimulantes de anticuerpos monoclonales humanos del receptor de la TSH, serían valiosos para aplicaciones *in vivo* cuando el tejido que contiene el receptor de la TSH (por ejemplo, tejido de la tiroides o tejido canceroso de la tiroides) requiriese estimulación. Además, dado que algunos anticuerpos del receptor de la TSH en suero del paciente son potentes antagonistas de la TSH (anticuerpos de bloqueo), los anticuerpos del receptor de la TSH monoclonales humanos que son antagonistas de la TSH serían valiosos para aplicaciones *in vivo* cuando la actividad del tejido que contiene el receptor de la TSH (por ejemplo, tejido de la tiroides o tejido canceroso de la tiroides) requiriera inactivación o hacerse insensible a la TSH, a los anticuerpos del receptor de la TSH o a otros estimuladores.

60 También se ha reconocido que una de las principales ventajas de los anticuerpos del receptor de la TSH monoclonal humana sobre la TSH en tales aplicaciones *in vitro* y/o *in vivo* sería la relativa facilidad con la que pueden manipularse anticuerpos. Por ejemplo, la manipulación de la región de unión al receptor de la TSH de los anticuerpos monoclonales para cambiar sus características, tales como las características biológicas y de afinidad incluyendo su grado de actividad agonista o antagonista de la TSH. Además, los anticuerpos monoclonales tendrán una vida media mucho más larga que la TSH *in vivo* y esto puede tener ventajas considerables en ciertas aplicaciones *in vivo*. Además, la vida media de los anticuerpos puede manipularse fácilmente, por ejemplo, los

fragmentos Fab de un anticuerpo tienen una vida media mucho más corta que la IgG intacta. Estas propiedades generales de los anticuerpos del receptor de la TSH se describen en publicaciones tales como B Rees Smith, SM McLachlan, J Furmaniak; "Autoantibodies to the thyrotropin receptor"; *Endocrine Reviews* 1988; 9: 106-121; B Rees Smith, KJ Dorrington, DS Munro; "The thyroid stimulating properties of long-acting thyroid stimulator  $\gamma$ G-globulin subunits"; *Biochimica et Biophysica Acta* 1969; 192: 277-285; KJ Dorrington, DS Munro; "The long acting thyroid stimulator"; *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1966; 7: 788-806.

Otra ventaja adicional de los anticuerpos del receptor de la TSH monoclonal humana podría estar en su uso para identificar y proporcionar nuevos tipos de sitios de unión a anticuerpos del receptor de la TSH. Por ejemplo, mediante la generación de anticuerpos para las regiones de los anticuerpos del receptor de la TSH monoclonal humana que se unen al receptor de la TSH. Algunos de los anticuerpos antiidiotípicos producidos de esta manera podrían tener potencial como nuevos ligandos para los ensayos de anticuerpos del receptor de la TSH, TSH y compuestos relacionados. También pueden ser agentes eficaces *in vivo* para regular la acción de los anticuerpos del receptor de la TSH, TSH y compuestos relacionados.

Son bien conocidos otros procedimientos para identificar y proporcionar nuevos tipos de sitios de unión a anticuerpos que utilizan anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, mediante el cribado de anticuerpos de las bibliotecas de péptidos aleatorios desplegadas en fagos como lo describen JC Scott y GP Smith; "Searching for peptide ligands with an epitope library"; *Science* 1990; 249(4967): 386-390 and MA Myers, JM Davies, JC Tong, J Whisstock, M Scealy, IR MacKay, MJ Rowley; "Conformational epitopes on the diabetes autoantigen GAD65 identified by peptide phage display and molecular modelling"; *Journal of Immunology* 2000; 165: 3830-3838. También se puede llevar a cabo el cribado de anticuerpos de compuestos no peptídicos y bibliotecas de compuestos no peptídicos. Nuevos tipos de sitios de unión al anticuerpo del receptor de la TSH identificados y proporcionados usando estos procedimientos pueden ser también útiles como nuevos ligandos en ensayos para anticuerpos del receptor de la TSH, TSH y compuestos relacionados. Además, pueden ser agentes eficaces *in vivo* para regular la acción de anticuerpos del receptor de la TSH, TSH y compuestos relacionados. En vista del valor potencial de los anticuerpos del receptor de la TSH monoclonales humanas, se han realizado esfuerzos considerables durante muchos años para producir tales anticuerpos (véase, por ejemplo, B Rees Smith, SM McLachlan, J. Furmaniak, "Autoantibodies to the thyrotropin receptor"; *Endocrine Reviews* 1988; 9: 106-121. Sin embargo, hasta la fecha estos esfuerzos han sido infructuosos (véase, por ejemplo, SM McLachlan, B Rapoport; "Monoclonal, human autoantibodies to the TSH receptor - The Holy Grail and why are we looking for it"; *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996; 81: 3152-3154 y JHW van der Heijden, TWA de Bruin, KAFM Gludemans, J de Kruif, JP Banga, T Logtenberg; "Limitations of the semisynthetic library approach for obtaining human monoclonal autoantibodies to the thyrotropin receptor of Graves' disease"; *Clinical and Experimental Immunology* 1999; 118: 205-212).

Los documentos WO 02/08723 y EP 1078986 divulgan anticuerpos humanos monoclonales orientados al receptor de la TSH humana que inhiben la unión de la TSH al receptor de la TSH y sus usos en inmunoensayos competitivos para la detección de autoanticuerpos del receptor de la TSH. Es un objeto de la presente invención proporcionar un compañero de unión para el receptor de la TSH capaz de interactuar con el receptor de la TSH de una manera comparable a la interacción de autoanticuerpos del receptor de la TSH con el receptor de la TSH, en particular es un objetivo de la presente invención proporcionar anticuerpos monoclonales humanos al receptor de la TSH que exhiben una interacción comparable con los mismos como se observa con los anticuerpos del receptor de la TSH presentes en los sueros de pacientes con enfermedad de Graves de hipertiroidismo y también proporcionar sus preparaciones recombinantes. Las dificultades considerables de producir anticuerpos monoclonales humanos del receptor de la TSH se han superado en la invención descrita en la presente memoria. En particular, se describe la producción exitosa de un anticuerpo monoclonal humano del receptor de la TSH con las características de los autoanticuerpos encontrados en los sueros de pacientes con enfermedad de Graves de hipertiroidismo. El anticuerpo monoclonal del receptor de la TSH humana que hemos producido (descrito aquí como hMAb TSHR1) se une al receptor de la TSH con alta afinidad y de tal manera que pequeñas cantidades del anticuerpo inhiben la unión de la TSH marcada al receptor de la TSH y pequeñas cantidades actúan como potentes estimuladores de la tiroides. Los fragmentos Fab del anticuerpo y las preparaciones de Fab recombinante son estimuladores de la tiroides igualmente eficaces e inhibidores de la unión de la TSH marcada como IgG intacta. Fab monoclonal e l o la IgG intacta se pueden marcar con  $^{125}\text{I}$  o biotina y se muestra que se unen al receptor de la TSH. Dicha unión es inhibida por los autoanticuerpos del receptor de la TSH en sueros de pacientes.

La presente invención proporciona procedimientos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 o 7 a 10; y también proporciona kits de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona un compañero de unión para el receptor de la TSH, cuyo compañero de unión comprende, o se deriva de un anticuerpo monoclonal o recombinante humano, o uno o más de sus fragmentos, reactivos con el receptor de la TSH.

En particular, se proporciona por la presente divulgación un compañero de unión para el receptor de la TSH, cuyo compañero de unión comprende, o se deriva de, un anticuerpo monoclonal humano, o uno o más de sus fragmentos, reactivos con el receptor de la TSH.

En particular, la presente divulgación proporciona un compañero de unión para el receptor de la TSH, cuyo compañero de unión comprende o se deriva de un anticuerpo monoclonal humano o uno o más de sus fragmentos, reactivos con el receptor de la TSH.

- 5 En particular, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal humano, o uno o más de sus fragmentos, reactivo con el receptor de la TSH.

10 En particular, se proporciona por la presente divulgación un anticuerpo recombinante humano, o uno o más de sus fragmentos, reactivos con el receptor de la TSH. Particularmente, la presente invención proporciona uno o más fragmentos de un anticuerpo recombinante humano reactivo con el receptor de la TSH.

15 Un compañero de unión de acuerdo con la presente divulgación y en particular, un anticuerpo monoclonal o recombinante humano reactivo con el receptor de la TSH de acuerdo con la presente invención puede caracterizarse además por su capacidad para inhibir la unión de la TSH al receptor de la TSH y/o su capacidad para estimular el receptor de la TSH, los cuales se ha visto que son comparables a las respectivas propiedades inhibitoras y estimuladoras de los autoanticuerpos del receptor de la TSH presentes en los sueros obtenidos de pacientes con enfermedad de Graves.

20 Más particularmente, un compañero de unión de acuerdo con la presente divulgación, y en particular un anticuerpo monoclonal o recombinante humano de acuerdo con la presente invención, puede caracterizarse por una actividad inhibitora con respecto a la unión de la TSH al receptor de la TSH, de al menos aproximadamente 15 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o más preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o uno o más fragmentos de tal anticuerpo monoclonal o recombinante.

30 Más particularmente, un compañero de unión de acuerdo con la presente divulgación, y en particular un anticuerpo monoclonal o recombinante humano de acuerdo con la presente invención, puede caracterizarse además por una actividad estimuladora con respecto a la producción de cAMP por las células que expresan el receptor de la TSH, de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg o más preferiblemente de al menos aproximadamente 240 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o uno o más fragmentos de tal anticuerpo monoclonal o recombinante.

40 En una realización preferida de la presente invención, un compañero de unión de acuerdo con la presente divulgación, y en particular un anticuerpo monoclonal o recombinante humano de acuerdo con la presente invención, se puede caracterizar por:

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

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

o uno o más fragmentos de tal monoclonal o recombinante anticuerpo.

55 En el caso en que un compañero de unión de acuerdo con la presente divulgación comprende o se deriva de uno o más fragmentos de un anticuerpo monoclonal o recombinante reactivo con el receptor de la TSH, en particular por ejemplo uno o más fragmentos Fab de un anticuerpo monoclonal o recombinante reactivo con el receptor de la TSH, puede ser preferible que tal compañero de unión se pueda caracterizar por una actividad inhibitora con respecto a la unión de la TSH al receptor de la TSH, de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o más preferiblemente de al menos aproximadamente 240 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg.

65 También se puede preferir en el caso en donde un compañero de unión de acuerdo con la presente divulgación comprende o se deriva de uno o más fragmentos de un anticuerpo monoclonal o recombinante reactivo con el

receptor de la TSH, en particular por ejemplo uno o más fragmentos Fab de un anticuerpo monoclonal o recombinante reactivo con el receptor de la TSH, que dicho compañero de unión puede caracterizarse por una actividad estimuladora con respecto a la producción de cAMP por células que expresan el receptor de la TSH, de al menos aproximadamente 50 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 100 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 200 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o más preferiblemente de al menos aproximadamente 400 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg.

Puede ser aún más preferido en el caso en donde un compañero de unión de acuerdo con la presente divulgación comprende o se deriva de uno o más fragmentos de un anticuerpo monoclonal o recombinante reactivo con el receptor de la TSH, en particular por ejemplo uno o más fragmentos Fab de un anticuerpo monoclonal o recombinante reactivo con el receptor de la TSH, que dicha pareja de unión puede caracterizarse por:

(i) una actividad inhibidora con respecto a la unión de la TSH al receptor de la TSH, de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o más preferiblemente de al menos aproximadamente 240 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg; y

(ii) una actividad estimuladora con respecto a la producción de cAMP por células que expresan el receptor de la TSH, de al menos aproximadamente 50 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 100 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 200 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o más preferiblemente de al menos aproximadamente 400 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg.

En un caso preferido, la presente divulgación proporciona un compañero de unión para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal humano), que es capaz de unirse al receptor de la TSH preferiblemente para estimular el receptor de la TSH y que comprende un dominio VH del anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un dominio VH como se muestra en la SEQ ID NO. 1 y un dominio VH que comprende una o más CDR de VH con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO. 2, la SEQ ID NO. 3 y la SEQ ID NO. 4.

En una primera realización de la presente divulgación, se proporciona, por lo tanto, un compañero de unión para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal humano), que es capaz de unirse al receptor de la TSH preferiblemente para estimular al receptor de la TSH y que comprende un dominio VH del anticuerpo como se muestra en la SEQ ID NO. 1.

En una segunda realización de la presente divulgación, se proporciona, por lo tanto, un compañero de unión para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal humano), cuyo compañero de unión es capaz de unirse al receptor de la TSH preferiblemente para estimular al receptor de la TSH que comprende un dominio VH del anticuerpo que comprende una o más CDR de VH con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO. 2, la SEQ ID NO. 3 y la SEQ ID NO. 4.

Se apreciará que un compañero de unión de acuerdo con la presente divulgación puede comprender un dominio VH del anticuerpo sustancialmente como se ha descrito aquí anteriormente en ausencia de un dominio VL del anticuerpo. Se sabe que los dominios de inmunoglobulina individuales, especialmente los dominios VH, son capaces de unirse a antígenos objetivo de una manera específica. Alternativamente, un compañero de unión de acuerdo con la presente divulgación puede comprender un dominio VH del anticuerpo emparejado con un dominio VL del anticuerpo para proporcionar un sitio de unión de anticuerpo que comprende tanto dominios VH como VL para un receptor de la TSH empleando técnicas bien conocidas en la técnica (Biochim. Biophys. Acta, 192 (1969) 277 - 285, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Vol. 89, páginas 10026 - 10030, noviembre de 1992).

En un caso preferido, la presente divulgación, sin embargo, un compañero de unión para el receptor de la TSH, que es capaz de unirse al receptor de la TSH de preferencia para estimular el receptor de la TSH y que comprende:

un dominio VH del anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en:

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

un dominio VL del anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en:

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

Puede ser preferido de acuerdo con la presente divulgación que un compañero de unión sustancialmente como se ha descrito anteriormente incluya un dominio VH del anticuerpo sustancialmente como se ha descrito anteriormente,

emparejado con un dominio VL del anticuerpo sustancialmente como se ha descrito anteriormente aquí para proporcionar un sitio de unión de anticuerpo que comprende tanto dominios VH como VL para el receptor de la TSH, aunque tal como se describe adicionalmente, un dominio VH del anticuerpo, o un dominio VL del anticuerpo, pueden utilizarse independientemente para unirse a un receptor de la TSH. Se apreciará, por lo tanto, que un compañero de unión sustancialmente como se ha descrito anteriormente puede comprender un dominio VH del anticuerpo sustancialmente como se ha descrito anteriormente aquí en ausencia de un dominio VL del anticuerpo. También se apreciará, por tanto, que un compañero de unión sustancialmente como se ha descrito anteriormente puede comprender un dominio VL del anticuerpo sustancialmente como se ha descrito anteriormente aquí en ausencia de un dominio VH del anticuerpo. Alternativamente, un compañero de unión sustancialmente como se ha descrito anteriormente puede comprender un dominio VH del anticuerpo emparejado con un dominio VL del anticuerpo sustancialmente como se ha descrito anteriormente aquí para proporcionar un sitio de unión de anticuerpo que comprende tanto dominios VH como VL para el receptor de la TSH.

Las realizaciones preferidas de acuerdo con la presente divulgación pueden incluir, por tanto, un compañero de unión sustancialmente como se ha descrito anteriormente, que comprende un dominio VH del anticuerpo como se muestra en la SEQ ID NO. 1 emparejado con un dominio VL del anticuerpo como se muestra en la SEQ ID NO. 6 para proporcionar un sitio de unión de anticuerpo, que comprende ambos dominios VH y VL para el receptor de la TSH.

Se contempla además de acuerdo con la presente divulgación que los dominios VH sustancialmente como se ha descrito anteriormente se pueden emparejar con dominios VL distintos de los descritos específicamente en la presente memoria. También se contempla además de acuerdo con la presente divulgación que los dominios VL sustancialmente como se ha descrito anteriormente se pueden emparejar con dominios VH distintos de los descritos específicamente en la presente memoria.

De acuerdo con una realización adicional de la presente divulgación, se proporciona un compañero de unión sustancialmente como se ha descrito anteriormente aquí para el receptor de la TSH, que es capaz de unirse al receptor de la TSH para estimular el receptor de la TSH y que puede comprender:

un dominio VH del anticuerpo que comprende:

un dominio VH que comprende una o más CDR de VH con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO. 2, la SEQ ID NO. 3 y la SEQ ID NO. 4; y/o

un dominio VL del anticuerpo que comprende:

un dominio VL que comprende una o más CDR de VL con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO. 7, la SEQ ID NO. 8 y SEQ ID NO. 9.

Una o más CDR como se ha mencionado anteriormente pueden tomarse de los dominios VH y VL anteriormente descritos y se incorporan en un marco adecuado. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de una o más CDR sustancialmente como se ha descrito anteriormente se puede incorporar en regiones marco de anticuerpos que difieran de hMAb TSHR1 específicamente descritas en la presente divulgación, incorporando dichos anticuerpos una o más CDR y siendo capaces de unirse al receptor de la TSH, preferiblemente para estimular el receptor de la TSH sustancialmente como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, la presente invención puede proporcionar un polipéptido capaz de unirse al receptor de la TSH para estimular el receptor de la TSH sustancialmente como se ha descrito anteriormente y que comprende la conformación estructural primaria de aminoácidos como se representa por una o más de las CDR como se describe específicamente en la presente memoria, opcionalmente junto con otros aminoácidos, los cuales pueden aumentar la afinidad de unión de una o más CDR como se describe aquí para el receptor de la TSH o pueden no jugar sustancialmente ningún papel en afectar las propiedades de unión del polipéptido para el receptor de la TSH.

La presente divulgación también abarca variantes, análogos, derivados y fragmentos del anticuerpo monoclonal humano específico descrito en la presente memoria, dominios VH, CDR y polipéptidos descritos en la presente memoria, variantes, análogos, derivados y fragmentos que conservan la capacidad de interactuar con el receptor de la TSH (tal como por ejemplo para estimular el receptor de la TSH) sustancialmente como se ha descrito anteriormente.

Los términos "variantes", "análogos", "derivados" y "fragmentos" tal como se usan aquí pueden caracterizarse como anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o polipéptidos que retienen esencialmente la misma función o actividad biológica que un anticuerpo monoclonal humano que tiene un dominio VH como se muestra en la SEQ ID NO: 1 y un dominio VL como se muestra en la SEQ ID NO.6 y en particular con respecto a sus propiedades de unión para el receptor de la TSH. De manera adecuada, las variantes, análogos, derivados y fragmentos, y variantes, análogos y derivados de los fragmentos como se describen en el presente documento, tienen una conformación estructural primaria de aminoácidos en la que varios o algunos (tal como 5 a 10, 1 a 5 o 1 a 3) de los residuos de aminoácidos de un anticuerpo monoclonal humano que tiene un dominio VH como se muestra en la SEQ ID NO: 1 y un dominio

VL como se muestra en la SEQ ID NO: 6 se sustituyen, suprimen o añaden, en cualquier combinación. Especialmente preferidas entre estas están las sustituciones silenciosas, adiciones y supresiones que no alteran o alteran sustancialmente la actividad biológica o la función de un anticuerpo monoclonal humano que tiene un dominio VH como se muestra en la SEQ ID NO: 1 y un dominio VL como se muestra en la SEQ ID NO. 6. Se pueden preferir sustituciones conservadoras como se describirá más adelante en mayor detalle.

Más particularmente, las variantes, análogos o derivados de un anticuerpo monoclonal humano que tiene un dominio VH como se muestra en la SEQ ID NO: 1 y un dominio VL como se muestra en la SEQ ID NO: 6 de acuerdo con la presente divulgación pueden ser aquellos en los que uno o más de los residuos de aminoácidos están sustituidos con un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferiblemente un residuo de aminoácido conservado), o aquellos en los que uno o más de los residuos de aminoácidos incluyen un grupo sustituyente o similar. Dichas variantes, derivados y análogos se consideran dentro del alcance de los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas de la presente divulgación.

Más típicamente, variantes, análogos o derivados son aquellos que varían de un anticuerpo monoclonal humano de referencia que tiene un dominio VH como se muestra en la SEQ ID NO. 1 y un dominio VL como se muestra en la SEQ ID NO. 6 por sustituciones conservadoras de aminoácidos. Tales sustituciones son aquellas que sustituyen un aminoácido dado por otro aminoácido de características similares. Típicamente se consideran sustituciones conservadoras las sustituciones, una por otra, entre los aminoácidos alifáticos A, V, L e I; entre los residuos hidroxilo S y T; entre los residuos ácidos D y E; entre los residuos de amida N y Q; entre los residuos básicos K y R; y entre los residuos aromáticos F y Y.

Se apreciará que el término fragmento como se usa aquí en particular se refiere a fragmentos de anticuerpos específicamente como se describe aquí y forma un aspecto importante de la presente divulgación. De esta manera, se puede proporcionar un anticuerpo monoclonal o recombinante humano proporcionado por la presente invención como cualquiera de los siguientes fragmentos: (i) el fragmento Fab que consiste en dominios VL, VH, C<sub>L</sub> y C<sub>H</sub>1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y C<sub>H</sub>1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH; (iv) el fragmento dAb que consiste en un dominio VH; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos; y (vii) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están unidos por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno.

Alternativamente, un anticuerpo monoclonal o recombinante humano de acuerdo con la presente divulgación puede comprender un anticuerpo IgG entero, por lo que el anticuerpo incluye regiones variables y constantes.

La presente divulgación también proporciona un compañero de unión adicional capaz de unirse al receptor de la TSH, que puede competir por la unión al receptor de la TSH con un compañero de unión para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal humano) sustancialmente como se ha descrito anteriormente, donde el compañero de unión adicional no comprende la TSH. Preferiblemente, este compañero de unión adicional puede comprender un anticuerpo adicional que tenga un sitio de unión para una región de epítipo del receptor de la TSH, y que pueda competir por la unión al receptor de la TSH con un compañero de unión por el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal humano) como se ha descrito anteriormente. Un compañero de unión adicional adecuado puede comprender un anticuerpo monoclonal de ratón, que se puede producir preferiblemente de acuerdo con técnicas sustancialmente como se describe en los Ejemplos, empleando la inmunización de ratones con un receptor de la TSH mediante técnicas conocidas en la técnica.

La presente divulgación también puede proporcionar un compañero de unión adicional capaz de unirse al receptor de la TSH, que puede comprender, o se deriva de, un anticuerpo monoclonal o recombinante humano, o uno o más de sus fragmentos, reactivos con el receptor de la TSH. En particular, este compañero de unión adicional puede comprender un anticuerpo adicional que tenga un sitio de unión para una región de epítipo del receptor de la TSH, donde dicho anticuerpo adicional sea capaz de unirse al receptor de la TSH y pueda competir por la unión al receptor de la TSH con un compañero de unión por el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal humano) sustancialmente como se ha descrito anteriormente. Convenientemente, tal compañero de unión adicional puede derivarse de un compañero de unión específico como se describe aquí, hMAb TSHR1, mediante técnicas de mutagénesis adecuadas, tales como mutaciones puntuales o similares, de manera que se obtenga un compañero de unión adicional para el receptor de la TSH que pueda competir con un compañero de unión sustancialmente como se describe aquí (tal como hMAb TSHR1) para la interacción con el receptor de la TSH.

Preferiblemente, un compañero de unión adicional para el receptor de la TSH puede comprender un anticuerpo monoclonal o recombinante y puede caracterizarse por una actividad inhibidora con respecto a la unión de la TSH al receptor de la TSH, de al menos aproximadamente 15 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o más preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o uno o más fragmentos del anticuerpo. También se puede preferir que dicho compañero de unión adicional de acuerdo con la presente invención se pueda caracterizar por una actividad estimuladora con respecto a la

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

También puede ser incluso más preferido que tal compañero de unión adicional de la presente divulgación, se pueda caracterizar por:

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

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

o uno o más de sus fragmentos.

Un anticuerpo monoclonal de ratón preferido que proporciona un compañero de unión adicional de acuerdo con la presente divulgación comprende 9D33 preparado adicionalmente a los Ejemplos y que tiene secuencias de aminoácidos y polinucleótidos como se ilustra en las Figuras 9 a 12 y los listados de secuencia 19 a 38. De acuerdo con la presente divulgación, se proporciona, por lo tanto, un compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal de ratón), que comprende un dominio VH del anticuerpo como se muestra en la SEQ ID NO. 19.

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

Se apreciará que un compañero de unión adicional de acuerdo con la presente divulgación puede comprender un dominio VH del anticuerpo sustancialmente como se ha descrito anteriormente aquí en ausencia de un dominio VL del anticuerpo. Se sabe que los dominios de inmunoglobulina únicos, especialmente los dominios VH, son capaces de unirse a antígenos objetivo de una manera específica. Alternativamente, un compañero de unión adicional de acuerdo con la presente divulgación puede comprender un dominio VH del anticuerpo emparejado con un dominio VL del anticuerpo para proporcionar un sitio de unión de anticuerpo que comprende tanto dominios VH como VL para un receptor de la TSH empleando técnicas bien conocidas en la técnica (Biochim. Acta, 192 (1969) 277 - 285, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Vol. 89, páginas 10026 - 10030, noviembre de 1992).

En un caso preferido, la presente divulgación proporciona, sin embargo, un compañero de unión adicional para el receptor de la TSH, cuya pareja de unión adicional comprende:

un dominio VH del anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en:

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

un dominio VL del anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en:

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

Puede ser preferido de acuerdo con la presente divulgación que un compañero de unión adicional sustancialmente como se ha descrito anteriormente incluya un dominio VH del anticuerpo sustancialmente como se ha descrito anteriormente, emparejado con un dominio VL del anticuerpo sustancialmente como se ha descrito anteriormente aquí para proporcionar un sitio de unión de anticuerpo que comprende tanto VH como VL para el receptor de la TSH, aunque tal como se describe adicionalmente se pueden usar independientemente un dominio VH del anticuerpo, o un dominio VL del anticuerpo, para unirse a un receptor de la TSH. Se apreciará, por lo tanto, que un compañero de unión adicional sustancialmente como se ha descrito anteriormente puede comprender un dominio VH del anticuerpo sustancialmente como se ha descrito anteriormente en la presente divulgación en ausencia de un dominio VL del anticuerpo. También se apreciará, por lo tanto, que un compañero de unión adicional sustancialmente como se ha descrito anteriormente puede comprender un dominio VL del anticuerpo sustancialmente como se ha descrito



anteriormente aquí en ausencia de un dominio VH del anticuerpo. Alternativamente, un compañero de unión adicional sustancialmente como se ha descrito anteriormente puede comprender un dominio VH del anticuerpo emparejado con un dominio VL del anticuerpo sustancialmente como se ha descrito anteriormente aquí para proporcionar un sitio de unión de anticuerpo que comprende tanto dominios VH como VL para el receptor de la TSH.

Las realizaciones preferidas de acuerdo con la presente divulgación pueden incluir, por tanto, un compañero de unión adicional sustancialmente como se ha descrito anteriormente que comprende un dominio VH del anticuerpo como se muestra en la SEQ ID NO. 19 emparejado con un dominio VL del anticuerpo como se muestra en la SEQ ID NO. 24 para proporcionar un sitio de unión de anticuerpo, que comprende ambos dominios VH y VL para el receptor de la TSH.

Se contempla además de acuerdo con la presente divulgación que los dominios VH sustancialmente como se ha descrito anteriormente se pueden emparejar con dominios VL distintos de los descritos específicamente en la presente memoria. También se contempla además de acuerdo con la presente divulgación que los dominios VL sustancialmente como se ha descrito anteriormente se pueden emparejar con dominios VH distintos de los descritos específicamente en la presente memoria.

De acuerdo con una realización adicional de la presente divulgación, se proporciona un compañero de unión adicional sustancialmente como se ha descrito anteriormente aquí para el receptor de la TSH, cuyo compañero de unión adicional es capaz de unirse al receptor de la TSH para inhibir la estimulación del receptor de la TSH y que puede comprender:

un dominio VH del anticuerpo que comprende:

un dominio VH que comprende una o más CDR de VH con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO. 20, la SEQ ID NO. 21 y SEQ ID NO. 22; y/o

un dominio VL del anticuerpo que comprende:

un dominio VL que comprende una o más CDR de VL con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO. 25, la SEQ ID NO. 26 y SEQ ID NO. 27.

Una o más CDR como se ha mencionado anteriormente pueden tomarse de los dominios VH y VL anteriormente descritos y se incorporan en un marco adecuado. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de una o más CDR sustancialmente como se ha descrito anteriormente se puede incorporar en regiones marco de anticuerpos que difieran de 9D33 específicamente descritas en la presente divulgación, incorporando dichos anticuerpos por lo tanto una o más CDR y siendo capaces de unirse al receptor de la TSH. Alternativamente, la presente divulgación puede proporcionar un polipéptido capaz de unirse al receptor de la TSH que comprende la conformación estructural primaria de aminoácidos como se representa por una o más CDR como se describe específicamente en la presente memoria, opcionalmente junto con otros aminoácidos, donde los aminoácidos adicionales pueden mejorar la afinidad de unión de una o más CDR tal como se describe aquí para el receptor de la TSH o puede no jugar sustancialmente ningún papel en afectar las propiedades de unión del polipéptido para el receptor de la TSH.

Se apreciará que el término fragmento como se usa aquí en particular se refiere a fragmentos de anticuerpos específicamente como se describe aquí y forma un aspecto importante de la presente divulgación. De esta manera, se puede proporcionar un compañero de unión adicional de acuerdo con la presente invención como cualquiera de los siguientes fragmentos: (i) el fragmento Fab que consiste en dominios VL, VH, C<sub>L</sub> y C<sub>H1</sub>; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y C<sub>H1</sub>; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH; (iv) el fragmento dAb que consiste en un dominio VH; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos; y (vii) moléculas de Fv de cadena sencilla (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están unidos por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno.

Alternativamente, un anticuerpo monoclonal o recombinante de ratón de acuerdo con la presente divulgación, tal como 9D33, puede comprender un anticuerpo IgG entero, por lo que el anticuerpo incluye regiones variables y constantes.

La presente divulgación también proporciona un polinucleótido que comprende:

(i) una secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO. 10, la SEQ ID NO. 11, la SEQ ID NO. 12, la SEQ ID NO. 13, la SEQ ID NO. 15, la SEQ ID NO. 16, la SEQ ID NO. 17 o la SEQ ID NO. 18, que codifica una secuencia de aminoácidos de un dominio VH, dominio VL, o CDR del anticuerpo, como se muestra en la SEQ ID NO. 1, la SEQ ID NO. 2, la SEQ ID NO. 3, la SEQ ID NO. 4, la SEQ ID NO. 6, la SEQ ID NO. 7, la SEQ ID NO. 8 o la SEQ ID NO. 9;

(ii) una secuencia de nucleótidos que codifica un compañero de unión para el receptor de la TSH (típicamente un

anticuerpo monoclonal humano) sustancialmente como se ha descrito anteriormente, o que codifica una secuencia de aminoácidos de un dominio VH, dominio VL, o CDR del anticuerpo, de un compañero de unión para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal humano) sustancialmente como se ha descrito anteriormente;

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

(iv) una secuencia de nucleótidos que comprende una variación alélica de cualquier secuencia de (i);

10 (v) una secuencia de nucleótidos que comprende un fragmento de cualquiera de las secuencias de (i), (ii), (iii) o (iv) y en particular una secuencia de nucleótidos que comprende un fragmento de cualquiera de las secuencias de (i), (ii), (iii), (iv) o (v) y que codifica un fragmento Fab, un fragmento Fd, un fragmento Fv, un fragmento dAb, una región CDR aislada, fragmentos F(ab')<sub>2</sub> o un fragmento scFv, de un anticuerpo monoclonal humano sustancialmente como se ha descrito anteriormente;

15 (vi) una secuencia de nucleótidos que difiera de cualquier secuencia de (i) debido a mutación, supresión o sustitución de una base nucleotídica y que codifica un compañero de unión para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal humano) sustancialmente como se ha descrito anteriormente, o que codifica una secuencia de aminoácidos de un dominio VH, dominio VL, o CDR del anticuerpo, de un compañero de unión para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal humano) sustancialmente como se ha descrito anteriormente.

También se proporciona por la presente divulgación un polinucleótido que comprende:

25 (i) una secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO. 29, la SEQ ID NO. 30, la SEQ ID NO. 31, la SEQ ID NO. 32, la SEQ ID NO. 34, la SEQ ID NO. 35, la SEQ ID NO. 36 o la SEQ ID NO. 37, que codifica una secuencia de aminoácidos de un dominio VH, dominio VL, o CDR del anticuerpo, como se muestra en la SEQ ID NO. 19, la SEQ ID NO. 20, la SEQ ID NO. 21, la SEQ ID NO. 22, la SEQ ID NO. 24, la SEQ ID NO. 25, la SEQ ID NO. 26 o SEQ ID NO. 27;

30 (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica un compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal de ratón) sustancialmente como se ha descrito anteriormente, o que codifica una secuencia de aminoácidos de un dominio VH del anticuerpo, dominio VL o CDR de otro compañero de unión para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal de ratón) sustancialmente como se ha descrito anteriormente;

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

40 (iv) una secuencia de nucleótidos que comprende una variación alélica de cualquier secuencia de (i);

(v) una secuencia de nucleótidos que comprende un fragmento de cualquiera de las secuencias de (i), (ii), (iii) o (iv) y en particular una secuencia de nucleótidos que comprende un fragmento de cualquiera de las secuencias de (i), (ii), (iii), (iv) o (v) y que codifican un fragmento Fab, un fragmento Fd, un fragmento Fv, un fragmento dAb, una región CDR aislada, fragmentos F(ab')<sub>2</sub> o un fragmento scFv, de un anticuerpo monoclonal de ratón sustancialmente como se ha descrito anteriormente en la presente memoria;

50 (vi) una secuencia de nucleótidos que difiere de cualquier secuencia de (i) debido a mutación, supresión o sustitución de una base nucleotídica y que codifica un compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal de ratón) sustancialmente como se ha descrito anteriormente, o que codifica una secuencia de aminoácidos de un dominio VH, dominio VL, o CDR del anticuerpo, de un compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal de ratón) sustancialmente como se ha descrito anteriormente.

55 Los polinucleótidos variantes de acuerdo con la presente divulgación son adecuadamente idénticos al menos en un 70% en toda su longitud a cualquier secuencia polinucleotídica de (i), los más altamente preferidos son los polinucleótidos que comprenden una región que es al menos 80% idéntica en toda su longitud a cualquier secuencia polinucleotídica de (i), se prefieren particularmente los polinucleótidos idénticos al menos en un 90% en toda su longitud a cualquier secuencia polinucleotídica de (i), y entre estos polinucleótidos particularmente preferidos, se prefieren especialmente aquellos con al menos 95% de identidad.

60 La presente divulgación proporciona además un sistema de vector biológicamente funcional que porta un polinucleótido sustancialmente como se ha descrito anteriormente y que es capaz de introducir el polinucleótido en el genoma de un organismo huésped.

65 La presente divulgación también se refiere a células huésped que se transforman con polinucleótidos de la

divulgación y la producción de compañeros de unión para el receptor de la TSH de la invención por técnicas recombinantes. Las células huésped pueden ser modificadas genéticamente para incorporar polinucleótidos y expresar compañeros de unión para el receptor de la TSH de la presente divulgación.

5 Las secuencias de aminoácidos de hMAb TSHR1, un anticuerpo monoclonal humano de acuerdo con la presente divulgación, y secuencias de nucleótidos que los codifican, las secuencias de aminoácidos de 9D33, un anticuerpo monoclonal de ratón que representa un compañero de unión adicional de acuerdo con la presente divulgación, y secuencias de nucleótidos que los codifican, se muestran en los listados de secuencias como se describen en la presente memoria descriptiva y se pueden asignar como sigue.

10

Para hMAb TSHR1: Secuencias de aminoácidos

SEQ ID NO. 1 VH

15

SEQ ID NO. 2 VH CDRI

SEQ ID NO. 3 VH CDRII

SEQ ID NO. 4 VH CDRIII

20

SEQ ID NO. 5 Cadena pesada variable y región constante adyacente

SEQ ID NO. 6 VL

25

SEQ ID NO. 7 VL CDRI

SEQ ID NO. 8 VL CDRII

SEQ ID NO. 9 VL CDRIII

30

Secuencias de Nucleótidos

SEQ ID NO. 10 VH

35

SEQ ID NO. 11 VH CDRI

SEQ ID NO. 12 VH CDRII

SEQ ID NO. 13 VH CDRIII.

40

SEQ ID NO. 14 cadena pesada variable y región constante adyacente

SEQ ID NO. 15 VL

45

SEQ ID NO. 16 VL CDRI

SEQ ID NO. 17 VL CDRII

SEQ ID NO. 18 VL CDRIII

50

Para 9D33:

Secuencias de aminoácidos

55

SEQ ID NO. 19 VH

SEQ ID NO. 20 VH CDRI

SEQ ID NO. 21 VH CDRII

60

SEQ ID NO. 22 VH CDRIII

SEQ ID NO. 23 cadena pesada variable y región constante adyacente

65

SEQ ID NO. 24 VL

- SEQ ID NO. 25 VL CDRI
- SEQ ID NO. 26 VL CDRII
- 5 SEQ ID NO. 27 VL CDRIII
- SEQ ID NO. 28 cadena ligera variable y región constante adyacente
- Secuencias de nucleótidos
- 10 SEQ ID NO. 29 VH
- SEQ ID NO. 30 VH CDRI
- 15 SEQ ID NO. 31 VH CDRII
- SEQ ID NO. 32 VH CDRIII
- SEQ ID NO. 33 cadena pesada variable y región constante adyacente
- 20 SEQ ID NO. 34 VL
- SEQ ID NO. 35 VL CDRI
- 25 SEQ ID NO. 36 VL CDRII
- SEQ ID NO. 37 VL CDRIII
- SEQ ID NO. 38 cadena ligera variable y región constante adyacente
- 30 Las secuencias anteriores para hMAb TSHR1 también se pueden observar haciendo referencia a las Figuras 4, 5, 6 y 7, en las que:
- La Figura 4 muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de hMAb TSHR1, junto con la región constante adyacente, con la Figura 4a que presenta la secuencia misma de nucleótidos;
- 35 La Figura 4b que presenta la secuencia de nucleótidos anotada con el cebador de PCR, CDRI, CDRII, CDRIII y regiones constantes;
- 40 La Figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de hMAb TSHR1, junto con la región constante adyacente, con la Figura 5a que presenta la secuencia misma de aminoácidos;
- La Figura 5b que presenta la secuencia de aminoácidos anotada con las regiones CDRI, CDRII, CDRIII y constante;
- 45 La Figura 6 muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de hMAb TSHR1, con la Figura 6a que presenta la secuencia misma de nucleótidos;
- La Figura 6b que presenta la secuencia de nucleótidos anotada con el cebador de PCR, las regiones CDRI, CDRII y CDRIII;
- 50 La Figura 7 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de hMAb TSHR1, con la Figura 7a que presenta la secuencia misma de aminoácidos;
- La Figura 7b que presenta la secuencia de aminoácidos anotada con las regiones CDRI, CDRII y CDRIII.
- 55 Se apreciará por lo anterior que para la cadena VH de hMAb TSHR1, las secuencias de nucleótidos de las regiones CDRI, CDRII y CDRIII, como se muestra en la Figura 4b, corresponden a las secuencias VHCDRI, VHCDRII y VHCDRIII mostradas en las SEQ ID Nos. 11, 12 y 13 respectivamente, y que las secuencias de aminoácidos de las regiones CDRI, CDRII y CDRIII, como se muestra en la Figura 5b, corresponden a las secuencias VHCDRI, VHCDRII y VHCDRIII mostradas en las SEQ ID Nos. 2, 3 y 4 respectivamente. También se apreciará a partir de lo anterior que para la cadena VL de hMAb TSHR1, las secuencias de nucleótidos de las regiones CDRI, CDRII y CDRIII, como se muestra en la Figura 6b, corresponden a las secuencias VLCDRI, VLCDRII y VLCDRIII mostradas en las SEQ ID Nos. 16, 17 y 18, respectivamente, y que las secuencias de aminoácidos de las regiones CDRI, CDRII y CDRIII, como se muestra en la Figura 7b, corresponden a las secuencias VLCDRI, VLCDRII y VLCDRIII mostradas en las SEQ ID Nos. 7, 8 y 9 respectivamente.
- 60
- 65

5 El análisis de la estructura cristalina del Fab de hMAb TSHR1 (determinado mediante técnicas conocidas en la técnica) permitió el refinamiento de las secuencias de nucleótidos de HC y LC determinadas usando cebadores de PCR que son degenerados. En particular, se identificó un artefacto de secuenciación de HC para los nucleótidos 115-120. La secuenciación indicó cagctg (transcrita a los aminoácidos His Val), mientras que la estructura cristalina indicó de forma más confiable los aminoácidos Gln Leu (siendo las bases correspondientes cagctg), estando las secuencias refinadas mostradas en las figuras adjuntas y los listados de secuencia. El análisis de la estructura cristalina también permitió el refinamiento de las secuencias de aminoácidos derivadas de HC y LC en particular en la región del cebador degenerado de la PCR. En el caso de la LC, se encontró que aa 2 era Pro por RT-PCR, pero era Thr de la estructura cristalina. En el caso de la HC, se encontró que aa 2 era Met por RT-PCR, pero era Val de la estructura cristalina. De nuevo, estas secuencias refinadas se muestran en las figuras adjuntas y los listados de secuencia.

15 Las secuencias anteriores para 9D33 también se pueden observar haciendo referencia a las Figuras 9, 10, 11 y 12, en las que:

La Figura 9 muestra la secuencia de nucleótidos de cadena pesada 9D33, junto con la región constante adyacente, con la Figura 9a que presenta la secuencia misma de nucleótidos;

20 Figura 9b que presenta la secuencia de nucleótidos anotada con el cebador de PCR, regiones CDRI, CDRII, CDRIII y constante;

La Figura 10 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada 9D33, junto con la región constante adyacente, con la Figura 10a que presenta la secuencia misma de aminoácidos;

25 Figura 10b que presenta la secuencia de aminoácidos anotada con el cebador de PCR, regiones CDRI, CDRII, CDRIII y constante;

La Figura 11 muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera 9D33, con la Figura 11a que presenta la secuencia misma de nucleótidos;

30 La Figura 11b que presenta la secuencia de nucleótidos anotada con el cebador de PCR, regiones CDRI, CDRII, CDRIII y constante;

35 La Figura 12 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera 9D33, con la Figura 12a que presenta la secuencia misma de aminoácidos;

La Figura 12b que presenta la secuencia de aminoácidos anotada con el iniciador de PCR, regiones CDRI, CDRII, CDRIII y constante.

40 Se apreciará por lo anterior que para la cadena VH de 9D33, las secuencias de nucleótidos de las regiones CDRI, CDRII y CDRIII, como se muestra en la Figura 9b, corresponden a las secuencias VHCDRI, VHCDRII y VHCDRIII mostradas en las SEQ ID Nos. 30, 31 y 32 respectivamente, y que las secuencias de aminoácidos de las regiones CDRI, CDRII y CDRIII, como se muestra en la Figura 10b, corresponden a las secuencias VHCDRI, VHCDRII y VHCDRIII mostradas en las SEQ ID Nos. 20, 21 y 22 respectivamente. También se apreciará a partir de lo anterior que para la cadena VL de 9D33 las secuencias de nucleótidos de las regiones CDRI, CDRII y CDRIII como se muestra en la Figura 11b corresponden a las secuencias VLCDRI, VLCDRII y VLCDRIII mostradas en las SEQ ID Nos. 35, 36 y 37, respectivamente, y que las secuencias de aminoácidos de las regiones CDRI, CDRII y CDRIII, como se muestra en la Figura 12b, corresponden a las secuencias VLCDRI, VLCDRII y VLCDRIII mostradas en las SEQ ID Nos. 25, 26 y 27 respectivamente.

50 La presente divulgación también proporciona un procedimiento para proporcionar un anticuerpo monoclonal humano para el receptor de la TSH sustancialmente como se ha descrito anteriormente, procedimiento que comprende:

55 (i) proporcionar una fuente de linfocitos de un sujeto, cuyo sujeto tiene actividad de anticuerpo del receptor de la TSH de más de aproximadamente 0,04 unidades de NIBSC 90/672 por mL de suero con respecto a la inhibición de la unión de la TSH al receptor de la TSH;

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

60 (iii) immortalizar los linfocitos aislados; y

(iv) clonar los linfocitos immortalizados para producir una colonia immortalizada que secreta un anticuerpo monoclonal humano para el receptor de la TSH sustancialmente como se ha descrito anteriormente.

65 Alternativamente, un procedimiento para proporcionar un anticuerpo monoclonal humano para el receptor de la TSH sustancialmente como se ha descrito anteriormente, se puede definir como un procedimiento que comprende:

(i) proporcionar una fuente de linfocitos de un sujeto, cuyo sujeto tiene actividad de anticuerpo del receptor de la TSH de más de aproximadamente 0,1 unidades de NIBSC 90/672 por mL de suero con respecto a la actividad estimuladora de la producción de cAMP por las células que expresan el receptor de la TSH;

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

(iii) inmortalizar los linfocitos aislados; y

(iv) clonar los linfocitos inmortalizados para producir una colonia inmortalizada que secreta un anticuerpo monoclonal humano para el receptor de la TSH sustancialmente como se ha descrito anteriormente.

Preferiblemente, un procedimiento de acuerdo con la presente divulgación comprende aislar linfocitos de sangre periférica, de tejido de la tiroides, de tejido de bazo, de ganglios linfáticos o de médula ósea, más típicamente de sangre periférica. Típicamente, la fuente de linfocitos para su uso en un procedimiento de acuerdo con la presente invención puede caracterizarse adicionalmente por ser obtenida de un sujeto que tiene niveles de anticuerpos del receptor de la TSH en suero superiores a aproximadamente 0,1 unidades de NIBSC 90/672 por mL con respecto a la inhibición de la unión de la TSH al receptor de la TSH, o más típicamente mayor de aproximadamente 0,2 unidades de NIBSC 90/672 por mL con respecto a la inhibición de la unión de la TSH al receptor de la TSH, o más típicamente mayor de aproximadamente 0,3 unidades de NIBSC 90/672 por mL con respecto a la inhibición de la unión de la TSH al receptor de la TSH y preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0,3 a 0,5 unidades de NIBSC 90/672 por mL o mayor con respecto a la inhibición de la unión de la TSH al receptor de la TSH. Alternativamente, o adicionalmente, la fuente de linfocitos para su uso en un procedimiento de acuerdo con la presente divulgación puede caracterizarse además, de manera típica, como obtenida de un sujeto que tiene niveles de anticuerpos del receptor de la TSH en suero de más de aproximadamente 0,2 unidades de NIBSC 90/672 por mL con respecto a la actividad estimuladora de la producción de cAMP por células que expresan el receptor de la TSH, o más típicamente superior a aproximadamente 0,5 unidades de NIBSC 90/672 por mL con respecto a la actividad estimuladora de la producción de cAMP por las células que expresan el receptor de la TSH y preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0,5 a 1,0 unidades de NIBSC 90/672 por mL o mayor con respecto a la actividad estimuladora de la producción de cAMP por las células que expresan el receptor de la TSH. Se apreciará por lo anterior que la respuesta inmune al receptor de la TSH de un sujeto del que se aíslan linfocitos debe estar preferiblemente en una fase muy activa.

Preferiblemente, un procedimiento de acuerdo con la presente divulgación comprende infectar los linfocitos aislados con el virus de Epstein Barr, y adecuadamente los linfocitos así inmortalizados se fusionan con una línea celular de ratón/humana. Adecuadamente, un procedimiento de acuerdo con la presente divulgación comprende además cribar los clones resultantes para anticuerpos del receptor de la TSH, por ejemplo, mediante la inhibición de la unión de la <sup>125</sup>I-TSH al receptor de la TSH en un sistema de ensayo que tiene una sensibilidad de al menos aproximadamente 1 unidad/L de NIBSC 90/672.

La presente divulgación proporciona además un procedimiento de preparación de un anticuerpo recombinante humano, o uno o más de sus fragmentos, al receptor de la TSH, procedimiento que comprende la clonación y expresión de un anticuerpo monoclonal humano para el receptor de la TSH, proporcionado por la presente divulgación mediante un procedimiento sustancialmente como se ha descrito anteriormente, o uno o más fragmentos derivados del mismo.

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

Más particularmente, puede ser preferido que dicho anticuerpo monoclonal o recombinante humano de acuerdo con la presente divulgación, se pueda caracterizar además por una actividad estimuladora con respecto a la producción de cAMP por las células que expresan el receptor de la TSH, de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o más preferiblemente de al menos aproximadamente 240 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o uno o más fragmentos de tal anticuerpo monoclonal o recombinante humano.

En una realización preferida de la presente divulgación, tal anticuerpo monoclonal o recombinante humano de

acuerdo con la presente divulgación, puede caracterizarse por:

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

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

15 o uno o más fragmentos de tal anticuerpo monoclonal o recombinante humano.

También se puede preferir que uno o más fragmentos de un anticuerpo monoclonal o recombinante humano así obtenido de acuerdo con la presente divulgación, en particular por ejemplo uno o más fragmentos Fab de los mismos, puedan caracterizarse por una actividad inhibidora con respecto a TSH de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o más preferiblemente de al menos aproximadamente 240 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg. También se puede preferir que dichos uno o más fragmentos se puedan caracterizar por una actividad estimuladora con respecto a la producción de cAMP por las células que expresan el receptor de la TSH, de al menos aproximadamente 50 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o más preferiblemente de al menos aproximadamente 100 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o más preferiblemente de al menos aproximadamente 200 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o más preferiblemente de al menos aproximadamente 400 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg.

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

35 (i) una actividad inhibidora con respecto a la unión de la TSH al receptor de la TSH, de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o más preferiblemente de al menos aproximadamente 240 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg; y

40 (ii) una actividad estimuladora con respecto a la producción de cAMP por células que expresan el receptor de la TSH, de al menos aproximadamente 50 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o más preferiblemente de al menos aproximadamente 100 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o más preferiblemente de al menos aproximadamente 200 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o más preferiblemente de al menos aproximadamente 400 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg.

45 Un procedimiento sustancialmente como se ha descrito anteriormente puede comprender además una etapa de procedimiento adicional en la que el anticuerpo monoclonal o recombinante humano obtenido se somete a técnicas de procesamiento adicionales adecuadas (tales como técnicas adecuadas de mutagénesis, tales como mutaciones puntuales o similares), con el fin de obtener un compañero de unión adicional para el receptor de la TSH que puede competir con un compañero de unión sustancialmente como se describe aquí (tal como hMAb TSHR1) para la interacción con el receptor de la TSH. Dichas técnicas de procesamiento adicionales son bien conocidas por un experto en la técnica. La presente divulgación proporciona además un compañero de unión adicional al receptor de la TSH obtenido por tales técnicas de procesamiento adicionales.

55 Preferiblemente, tal compañero de unión adicional para el receptor de la TSH puede comprender un anticuerpo monoclonal o recombinante y puede caracterizarse por una actividad inhibidora con respecto a la unión de la TSH al receptor de la TSH, de al menos aproximadamente 15 unidades del estándar internacional NIBSC 90 / 672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o más preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o uno o más de sus fragmentos. También se puede preferir que dicho compañero de unión adicional de acuerdo con la presente invención se pueda caracterizar por una actividad estimuladora con respecto a la producción de cAMP por células que expresan el receptor de la TSH, de al menos aproximadamente 30 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 120 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o más preferiblemente de al menos aproximadamente 240 unidades del estándar internacional NIBSC 90/672 por mg,

estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o uno o más de sus fragmentos.

También puede ser incluso más preferido que tal compañero de unión adicional de la presente divulgación, se pueda caracterizar por:

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

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

20 o uno o más de sus fragmentos.

Un compañero de unión para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) de acuerdo con la presente divulgación puede tener aplicaciones diagnósticas y terapéuticas.

25 Por consiguiente, un compañero de unión para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) de acuerdo con la presente divulgación puede emplearse en procedimientos de cribado para detectar autoanticuerpos para el receptor de la TSH en sueros de pacientes y también en procedimientos de diagnóstico. De esta forma, se puede emplear un compañero de unión para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) de acuerdo con la presente divulgación en lugar de, o además de, competidores descritos hasta ahora para su uso en procedimientos de cribado para detectar autoanticuerpos para el receptor de la TSH y también en procedimientos de diagnóstico. De forma similar, se puede emplear un compañero de unión para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) de acuerdo con la presente divulgación en lugar de, o además de, competidores hasta ahora descritos para uso en kits para uso en la detección de autoanticuerpos para el receptor de la TSH.

35 La presente divulgación también proporciona, por lo tanto, un procedimiento de cribado de autoanticuerpos para el receptor de la TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto que se sospecha que padece, es susceptible a, que tiene o que se recupera de una enfermedad autoinmune asociada con una reacción inmune a un receptor de la TSH, comprendiendo dicho procedimiento:

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

(b) proporcionar uno o más pares de moléculas de unión, en donde una primera molécula de dicho par de unión comprende un compañero de unión o compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) de acuerdo con la presente invención y una segunda molécula de dicho par de unión comprende una región de unión con la que interactúa dicho compañero de unión o compañero de unión adicional;

50 (c) poner en contacto dicha muestra con dichos uno o más pares de moléculas de unión para permitir que dicha segunda molécula de dicho par de unión interactúe ya sea con (i) autoanticuerpos para el receptor de la TSH presentes en dicha muestra, o (ii) dicho compañero de unión o compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano); y

55 (d) controlar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión con dichos autoanticuerpos presentes en dicha muestra, proporcionando de este modo una indicación de la presencia de dichos autoanticuerpos para el receptor de la TSH en dicha muestra.

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

65 Por lo tanto, la presente divulgación proporciona adicionalmente, un procedimiento de cribado de autoanticuerpos para el receptor de la TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto sospechoso de padecer, ser



susceptible a, tener o estar recuperándose de una enfermedad autoinmune asociada con una reacción inmune al receptor de la TSH, comprendiendo dicho procedimiento:

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

(b) proporcionar uno o más pares de moléculas de unión, en donde una primera molécula de dicho par de unión comprende un compañero de unión o compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) de acuerdo con la presente divulgación y una segunda molécula de dicho par de unión comprende una región de unión con la que interactúa dicho compañero de unión o compañero de unión adicional, en donde la interacción de dichas moléculas de unión es tal que un título de autoanticuerpo en dicha muestra que corresponde esencialmente a 0,4 U/L del estándar internacional NIBSC 90/672 es detectable;

(c) poner en contacto dicha muestra con dichos uno o más pares de moléculas de unión para permitir que dicha segunda molécula de dicho par de unión interactúe ya sea con (i) autoanticuerpos para el receptor de la TSH presentes en dicha muestra, o (ii) dicho compañero de unión o compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) de acuerdo con la presente divulgación; y

(d) controlar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión con dichos autoanticuerpos presentes en dicha muestra, proporcionando de este modo una indicación de la presencia de dichos autoanticuerpos para el receptor de la TSH en dicha muestra.

La sensibilidad anterior también se puede lograr en un procedimiento de ensayo o kit de acuerdo con la presente divulgación mediante el uso de un anticuerpo policlonal humano o no humano para el receptor de la TSH, TSH o una o más variantes, análogos, derivados o fragmentos o un compañero de unión para el receptor de la TSH que tiene una afinidad por el receptor de la TSH de  $10^{10}$  molar<sup>-1</sup> o mayor, que generalmente exhibe una afinidad suficiente por el receptor de la TSH de modo que se proporciona un procedimiento o kit de la sensibilidad definida. La preparación de tales anticuerpos policlonales, TSH o una o más variantes, análogos, derivados o fragmentos de los mismos, es bien conocida en la técnica. Por ejemplo, se describen análogos superactivos de la TSH en Nature, Biotechnology, Volumen 14, octubre de 1995, páginas 1257-1263, aunque este artículo no describe el uso de dicha TSH superactiva en un procedimiento o kit tal como lo proporciona ahora la presente divulgación.

Por lo tanto, se proporciona adicionalmente por la presente divulgación un procedimiento de cribado para autoanticuerpos para el receptor de la TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto de quien se sospecha que sufre, que es susceptible a, que tiene o que se recupera de una enfermedad autoinmune asociada con una reacción inmune al receptor de la TSH, comprendiendo dicho procedimiento:

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

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

(c) poner en contacto dicha muestra con dichos uno o más pares de moléculas de unión para permitir que dicha segunda molécula de dicho par de unión interactúe ya sea con (i) autoanticuerpos para el receptor de la TSH presentes en dicha muestra, o (ii) dicho anticuerpo policlonal; y

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

También se proporciona por la presente divulgación un procedimiento de cribado de autoanticuerpos para el receptor de la TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto sospechoso de padecer, susceptible a, que tiene o se recupera de una enfermedad autoinmune asociada con una reacción inmune al receptor de la TSH, comprendiendo dicho procedimiento:

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

(b) proporcionar uno o más pares de moléculas de unión, en donde una primera molécula de dicho par de unión comprende la TSH o una o más variantes, análogos, derivados o fragmentos de los mismos, y una segunda molécula de dicho par de unión comprende una región de unión con la que dicha TSH o una o más variantes, análogos, derivados o fragmentos de los mismos interactúan, en donde la interacción de dichas moléculas de unión es tal que un título de autoanticuerpo en dicha muestra que corresponde esencialmente a 0,4 U/L del estándar internacional NIBSC 90/672 es detectable;

(c) poner en contacto dicha muestra con dichos uno o más pares de moléculas de unión para permitir que dicha segunda molécula de dicho par de unión interactúe ya sea con (i) autoanticuerpos para el receptor de la TSH presente en dicha muestra, o (ii) dicha TSH o una o más variantes, análogos, derivados o fragmentos de los mismos; y

5 (d) controlar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión con dichos autoanticuerpos presentes en dicha muestra, proporcionando de este modo una indicación de la presencia de dichos autoanticuerpos al receptor de la TSH en dicha muestra.

10 También se proporciona adicionalmente un procedimiento de cribado de autoanticuerpos para el receptor de la TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto que se sospecha que padece, es susceptible a, que tiene o que se recupera de una enfermedad autoinmune asociada con una reacción inmune a la TSH, comprendiendo dicho procedimiento:

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

(b) proporcionar uno o más pares de moléculas de unión, en donde una primera molécula de dicho par de unión comprende un compañero de unión para el receptor de la TSH que tiene una afinidad por el receptor de la TSH de  $10^{10}$  molar<sup>-1</sup> o mayor y una segunda molécula de dicho par de unión comprende una región de unión con la que interactúa dicho compañero de unión, en donde la interacción de dichas moléculas de unión es tal que un título de autoanticuerpo en dicha muestra que corresponde esencialmente a 0,4 U/L del estándar internacional NIBSC 90/672 es detectable;

25 (c) poner en contacto dicha muestra con dichos uno o más pares de moléculas de unión para permitir que dicha segunda molécula de dicho par de unión interactúe ya sea con (i) autoanticuerpos para el receptor de la TSH presentes en dicha muestra, o (ii) dicho compañero de unión para la TSH; y

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

También se proporciona por la presente divulgación el uso de un compañero de unión o compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) de acuerdo con la presente divulgación, para detectar autoanticuerpos para el receptor de la TSH en una muestra de fluido corporal obtenido de un sujeto sospechoso de padecer, susceptible a, que tiene o se recupera de una enfermedad autoinmune asociada con una reacción inmune al receptor de la TSH, en donde la interacción de dicho compañero de unión o compañero de unión adicional con el receptor de la TSH es tal que un título de autoanticuerpo en dicha muestra que corresponde esencialmente a 0,4 U/L del estándar internacional NIBSC 90/672 es detectable.

40 También se proporciona el uso de un anticuerpo policlonal humano o no humano para el receptor de la TSH, para detectar autoanticuerpos para el receptor de la TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto que se sospecha que padece, es susceptible a, que tiene o se recupera de una enfermedad autoinmune asociada con una reacción inmune al receptor de la TSH, en donde la interacción de dicho anticuerpo policlonal con el receptor de la TSH es tal que un título de autoanticuerpo en dicha muestra que corresponde esencialmente a 0,4 U/L del estándar internacional NIBSC 90/672 es detectable.

También se proporciona el uso de la TSH o una o más variantes, análogos, derivados o fragmentos de los mismos, para detectar autoanticuerpos para el receptor de la TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto sospechoso de padecer, ser susceptible a, que tiene o se recupera de una enfermedad autoinmune asociada con una reacción inmune al receptor de la TSH, en donde la interacción de dicha TSH o una o más variantes, análogos, derivados o fragmentos de la misma con el receptor de la TSH es tal que un título de autoanticuerpo en dicha muestra que corresponde esencialmente a 0,4 U/L del estándar internacional NIBSC 90/672 es detectable.

Incluso se proporciona además el uso de un compañero de unión para el receptor de la TSH que tiene una afinidad por el receptor de la TSH de  $10^{10}$  molar<sup>-1</sup> o mayor, para detectar autoanticuerpos para el receptor de la TSH en una muestra de fluido corporal obtenido de un sujeto sospechoso de padecer, susceptible a, que tiene o se recupera de una enfermedad autoinmune asociada con una reacción inmune al receptor de la TSH, en donde la interacción de dicho compañero de unión con el receptor de la TSH es tal que un título de autoanticuerpos en dicha muestra esencialmente correspondiente a 0,4 U/L del estándar internacional NIBSC 90/672 es detectable.

60 Se apreciará que las moléculas de unión de uno o más pares de unión pueden ser antígeno-anticuerpo (por ejemplo, [receptor de la TSH o epítipo] - [anticuerpo del receptor de la TSH recombinante o monoclonal]), anticuerpo del receptor de la TSH monoclonal o recombinante-antígeno antiidiotípico o anticuerpo del receptor de la TSH recombinante o monoclonal del elemento novedoso de unión del anticuerpo del receptor de la TSH. Preferiblemente, las moléculas de unión de los pares de unión son antígeno-anticuerpo, a saber, [receptor de la TSH o uno o más epítipos de los mismos] - [anticuerpo del receptor de la TSH recombinante o monoclonal], donde los epítipos

pueden estar "no soportados por otra estructura" o estar presentes en un polipéptido de mayor estructura o similar.

Preferiblemente, la presente divulgación proporciona un procedimiento de cribado para autoanticuerpos para el receptor de la TSH en una muestra de fluido corporal obtenido de un sujeto sospechoso de padecer, ser susceptible a, que tiene o se recupera de una enfermedad autoinmune asociada con una reacción inmune a una TSH, comprendiendo dicho procedimiento:

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

(b) poner en contacto dicha muestra con (i) un receptor de la TSH de longitud completa, o uno o más epítomos de los mismos o un polipéptido que comprende uno o más epítomos de un receptor de la TSH, y (ii) un compañero de unión o compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) de acuerdo con la presente divulgación, en condiciones que permitan la interacción del receptor de la TSH con autoanticuerpos producidos en respuesta al receptor de la TSH, para permitir que dicho receptor de la TSH, o dichos uno o más de sus epítomos o dicho polipéptido, interactúen ya sea con autoanticuerpos para el receptor de la TSH presente en dicha muestra, o con dicho compañero de unión o con otro compañero de unión para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano); y

(c) controlar la interacción de dicho receptor de la TSH, o dichos uno o más de sus epítomos o dicho polipéptido, con dichos autoanticuerpos presentes en dicha muestra, proporcionando así una indicación de la presencia de dichos autoanticuerpos para el receptor de la TSH en dicha muestra.

En ciertas realizaciones, un procedimiento de acuerdo con la presente divulgación también puede emplear uno o más competidores que compiten en la interacción de un anticuerpo policlonal, TSH o una o más variantes, análogos, derivados o fragmentos de los mismos, o un compañero de unión o compañero de unión adicional para el receptor de la TSH sustancialmente como se ha descrito anteriormente en las realizaciones específicas de los procedimientos proporcionados por la presente divulgación y la segunda molécula del par de unión, o el receptor de la TSH, o uno o más de sus epítomos o el polipéptido. Dichos competidores pueden comprender TSH, o uno o más anticuerpos monoclonales reactivos con el receptor de la TSH, tales como anticuerpos monoclonales de ratón reactivos con el receptor de la TSH.

Preferiblemente, un procedimiento de acuerdo con la presente divulgación, como se ha mencionado anteriormente, comprende además proporcionar medios de etiquetado para un compañero de unión o compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) de acuerdo con la presente divulgación y donde uno o más competidores apropiados como se describió anteriormente, medios de etiquetado adecuados que incluyen etiquetas enzimáticas, etiquetas isotópicas, etiquetas quimioluminiscentes, etiquetas fluorescentes, colorantes y similares.

La presente divulgación también proporciona un kit para cribar autoanticuerpos para el receptor de la TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto que se sospecha que padece, es susceptible a, que tiene o que se recupera de una enfermedad autoinmune asociada con una reacción inmune a una TSH, comprendiendo dicho kit:

(a) uno o más pares de moléculas de unión, en donde una primera molécula de dicho par de unión comprende un compañero de unión o compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) de acuerdo con la presente divulgación y una segunda molécula de dicho par de unión comprende una región de unión con la que interactúa dicho compañero de unión o compañero de unión adicional;

(b) medios para poner en contacto dicha muestra de fluido corporal de dicho sujeto con dichos uno o más pares de moléculas de unión de manera que permita que dicha segunda molécula de dicho par de unión interactúe ya sea con (i) autoanticuerpos para el receptor de la TSH presente en dicha muestra, o (ii) dicho compañero de unión o compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano); y

(c) medios para controlar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión con dichos autoanticuerpos presentes en dicha muestra, proporcionando de este modo una indicación de la presencia de dichos autoanticuerpos al receptor de la TSH en dicha muestra.

La presente divulgación también proporciona un kit para el cribado de autoanticuerpos para el receptor de la TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto que se sospecha que padece, es susceptible a, que tiene o que se recupera de una enfermedad autoinmune asociada con una reacción inmune al receptor de la TSH, comprendiendo dicho kit:

(a) uno o más pares de moléculas de unión, en donde una primera molécula de dicho par de unión comprende un compañero de unión o compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) de acuerdo con la presente divulgación y una segunda molécula de dicho par

de unión comprende una región de unión con la que interactúa dicho compañero de unión o compañero de unión adicional, en donde la interacción de dichas moléculas de unión es tal que un título de autoanticuerpo en dicha muestra que corresponde esencialmente a 0,4 U/L del estándar internacional NIBSC 90/672 es detectable;

5 (b) medios para poner en contacto dicha muestra de fluido corporal de dicho sujeto con dichos uno o más pares de moléculas de unión de manera que permita que dicha segunda molécula de dicho par de unión interactúe ya sea con (i) autoanticuerpos para el receptor de la TSH presente en dicha muestra, o (ii) dicho compañero de unión o compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) de acuerdo con la presente divulgación; y

10 (c) medios para controlar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión con dichos autoanticuerpos presentes en dicha muestra, proporcionando de este modo una indicación de la presencia de dichos autoanticuerpos al receptor de la TSH en dicha muestra.

15 También se proporciona un kit para cribar autoanticuerpos para el receptor de la TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto que se sospecha que padece, es susceptible a, que tiene o que se recupera de una enfermedad autoinmune asociada con una reacción inmune al receptor de la TSH, comprendiendo dicho kit:

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

25 (b) medios para poner en contacto dicha muestra de fluido corporal de dicho sujeto con dichos uno o más pares de moléculas de unión de manera que permita que dicha segunda molécula de dicho par de unión interactúe ya sea con (i) autoanticuerpos para el receptor de la TSH presente en dicha muestra, o (ii) dicho anticuerpo policlonal; y

30 (c) medios para controlar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión con dichos autoanticuerpos presentes en dicha muestra, proporcionando de este modo una indicación de la presencia de dichos autoanticuerpos al receptor de la TSH en dicha muestra.

35 También se proporciona un kit para cribado de autoanticuerpos para el receptor de la TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto que se sospecha que sufre de, es susceptible a, que tiene o que se recupera de una enfermedad autoinmune asociada con una reacción inmune al receptor de la TSH, comprendiendo dicho kit:

40 (a) uno o más pares de moléculas de unión, en donde una primera molécula de dicho par de unión comprende la TSH o una o más variantes, análogos, derivados o fragmentos de los mismos, y una segunda molécula de dicho par de unión comprende una región de unión con la que dicha TSH o una o más variantes, análogos, derivados o fragmentos de los mismos interactúa, en donde la interacción de dichas moléculas de unión es tal que un título de autoanticuerpo en dicha muestra que corresponde esencialmente a 0,4 U/L del estándar internacional NIBSC 90/672 es detectable;

45 (b) medios para poner en contacto dicha muestra de fluido corporal de dicho sujeto con dichos uno o más pares de moléculas de unión de manera que permita que dicha segunda molécula de dicho par de unión interactúe ya sea con (i) autoanticuerpos para el receptor de la TSH presente en dicha muestra, o (ii) TSH o una o más variantes, análogos, derivados o fragmentos de los mismos; y

50 (c) medios para controlar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión con dichos autoanticuerpos presentes en dicha muestra, proporcionando de este modo una indicación de la presencia de dichos autoanticuerpos al receptor de la TSH en dicha muestra.

55 También se proporciona un kit para cribar autoanticuerpos para el receptor de la TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto que se sospecha que padece, es susceptible a, que tiene o que se recupera de una enfermedad autoinmune asociada con una reacción inmune al receptor de la TSH, comprendiendo dicho kit:

60 (a) uno o más pares de moléculas de unión, en donde una primera molécula de dicho par de unión comprende un compañero de unión para el receptor de la TSH que tiene una afinidad por el receptor de la TSH de  $10^{10}$  molar<sup>-1</sup> o mayor y una segunda molécula de dicho par de unión comprende una región de unión con la cual interactúa dicho compañero de unión, en donde la interacción de dichas moléculas de unión es tal que un título de autoanticuerpo en dicha muestra que corresponde esencialmente a 0,4 U/L del estándar internacional NIBSC 90/672 es detectable;

65 (b) medios para poner en contacto dicha muestra de fluido corporal de dicho sujeto con dichos uno o más pares de moléculas de unión de manera que permita que dicha segunda molécula de dicho par de unión interactúe ya sea con (i) autoanticuerpos para el receptor de la TSH presente en dicha muestra, o (ii) dicho compañero de unión para el receptor de la TSH; y

(c) medios para controlar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión con dichos autoanticuerpos presentes en dicha muestra, proporcionando de este modo una indicación de la presencia de dichos autoanticuerpos al receptor de la TSH en dicha muestra.

5 Se apreciará que las moléculas de unión de uno o más pares de unión pueden ser antígeno-anticuerpo (por ejemplo, [receptor de la TSH o epítipo] - [anticuerpo del receptor de la TSH recombinante o monoclonal]), anticuerpo del receptor de la TSH monoclonal o recombinante-antígeno antiidiotípico o anticuerpo del receptor de la TSH recombinante o monoclonal del elemento novedoso de unión del anticuerpo del receptor de la TSH. Preferiblemente, 10 las moléculas de unión de los pares de unión son antígeno-anticuerpo, a saber, [receptor de la TSH o uno o más epítipos de los mismos] - [anticuerpo del receptor de la TSH recombinante o monoclonal], donde los epítipos pueden estar "no soportados por otra estructura" o estar presentes en un polipéptido de mayor estructura o similar.

15 La presente divulgación proporciona preferiblemente un kit para cribado de autoanticuerpos para el receptor de la TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto sospechoso de padecer, ser susceptible a, que tiene o se recupera de una enfermedad autoinmune asociada con una reacción inmune al receptor de la TSH, comprendiendo dicho kit:

20 (a) un receptor de la TSH de longitud completa, o uno o más de sus epítipos o un polipéptido que comprende uno o más epítipos del receptor de la TSH;

(b) un compañero de unión o un compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) de acuerdo con la presente divulgación;

25 (c) medios para poner en contacto dicha muestra de fluido corporal de dicho sujeto, dicho receptor de la TSH, o dichos uno o más de sus epítipos o dicho polipéptido, y dicho compañero de unión o compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano), en condiciones que permitan la interacción del receptor de la TSH con los autoanticuerpos producidos en respuesta al receptor de la TSH, para permitir que dicho receptor de la TSH, o dichos uno o más de sus epítipos o dicho polipéptido, interactúen ya sea con autoanticuerpos para un receptor de la TSH presente en dicha muestra, o dicho compañero 30 de unión o compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano); y

35 (d) medios para controlar la interacción de dicho receptor de la TSH, o dichos uno o más de sus epítipos o dicho polipéptido, con dichos autoanticuerpos presentes en dicha muestra, proporcionando así una indicación de la presencia de dichos autoanticuerpos al receptor de la TSH en dicha muestra.

40 En ciertas realizaciones, un kit de acuerdo con la presente divulgación puede comprender además uno o más competidores que compiten en la interacción de un anticuerpo policlonal, TSH o una o más variantes, análogos, derivados o fragmentos de los mismos, o un compañero de unión o compañero de unión adicional para el receptor de la TSH, como se ha definido anteriormente, y la segunda molécula del par de unión, o el receptor de la TSH, o uno o más de sus epítipos o el polipéptido. Dichos competidores pueden comprender TSH, o uno o más anticuerpos monoclonales reactivos con el receptor de la TSH, tales como anticuerpos monoclonales de ratón reactivos con el receptor de la TSH.

45 De manera adecuada, un kit como se ha mencionado anteriormente comprende además medios de etiquetado para un compañero de unión o un compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) de acuerdo con la presente divulgación y, cuando corresponda, uno o más competidores como se describió anteriormente, medios de etiquetado adecuados que son sustancialmente como se 50 ha descrito anteriormente.

55 En presencia de autoanticuerpos para el receptor de la TSH, disminuirá la unión del receptor de la TSH a un compañero de unión para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) en un procedimiento o kit como se ha descrito anteriormente.

60 Un compañero de unión o un compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) de acuerdo con la presente divulgación también se puede emplear en procedimientos de ensayo y kits sustancialmente como se describió anteriormente para la TSH y ligandos relacionados.

65 La presente divulgación también proporciona, por lo tanto, un procedimiento para ensayar TSH y ligandos relacionados, comprendiendo dicho procedimiento:

(a) proporcionar una muestra sospechosa de contener o que contiene TSH o ligandos relacionados;

(b) proporcionar uno o más pares de moléculas de unión, en donde una primera molécula de dicho par de unión

comprende un compañero de unión o compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) de acuerdo con la presente divulgación y una segunda molécula de dicho par de unión comprende una región de unión con la que interactúa dicho compañero de unión o compañero de unión adicional;

5 (c) poner en contacto dicha muestra con dichos uno o más pares de moléculas de unión de manera que permita que dicha segunda molécula de dicho par de unión interactúe ya sea con (i) TSH o ligandos relacionados presentes en dicha muestra, o (ii) dicho compañero de unión o compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano); y

10 (d) controlar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión con TSH o ligandos relacionados presentes en dicha muestra, proporcionando así una indicación de la presencia de la TSH o ligandos relacionados en dicha muestra.

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

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

25 (b) medios para poner en contacto una muestra sospechosa de contener o que contiene TSH o ligandos relacionados con dichos uno o más pares de moléculas de unión de manera que permita que dicha segunda molécula de dicho par de unión interactúe ya sea con (i) TSH o ligandos relacionados presentes en dicha muestra, o (ii) dicho compañero de unión o compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano); y

30 (c) medios para controlar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión con TSH o ligandos relacionados presentes en dicha muestra, proporcionando así una indicación de la presencia de la TSH o ligandos relacionados en dicha muestra.

35 La presente divulgación también proporciona además un procedimiento para identificar un compañero de unión adicional para el receptor de la TSH, que es capaz de unirse al receptor de la TSH y que compite por la unión al receptor de la TSH con un compañero de unión para el receptor de la TSH sustancialmente como se ha descrito anteriormente, cuyo compañero de unión adicional no comprende la TSH, procedimiento que comprende:

40 (a) proporcionar uno o más pares de moléculas de unión, en donde una primera molécula de dicho par de unión comprende un compañero de unión para el receptor de la TSH sustancialmente como se ha descrito anteriormente y una segunda molécula de dicho par de unión comprende una región de unión con la que dicho par de unión interactúa;

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

50 (c) poner en contacto dicha molécula de unión adicional de (b) con dichos uno o más pares de moléculas de unión de (a) para permitir que dicha segunda molécula de dicho par de unión de (a) interactúe ya sea con (i) dicha molécula de unión adicional de (b), o (ii) dicha primera molécula de dicho par de unión (a); y

55 (d) controlar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión de (a) con dicha molécula de unión adicional de (b), y evaluar de este modo si dicha molécula de unión adicional de (b) compite por la unión al receptor de la TSH con dicha primera molécula de dicho par de unión de (a).

60 La presente divulgación también proporciona un kit para identificar un compañero de unión adicional para el receptor de la TSH, que es más capaz de unirse al receptor de la TSH y que compite por la unión al receptor de la TSH con un compañero de unión para el receptor de la TSH sustancialmente como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, cuyo compañero de unión adicional no comprende la TSH, donde el kit comprende:

(a) uno o más pares de moléculas de unión, en donde una primera molécula de dicho par de unión comprende un compañero de unión para el receptor de la TSH sustancialmente como se ha descrito anteriormente y una segunda molécula de dicho par de unión comprende una región de unión con la que interactúa dicho compañero de unión;

65 (b) medios para poner en contacto dichos uno o más pares de moléculas de unión de (a) con una molécula de unión adicional a ensayar como un potencial compañero de unión adicional para el receptor de la TSH que compite por la

unión al receptor de la TSH con dicha primera molécula de dicho par de unión (a), para permitir que dicha segunda molécula de dicho par de unión de (a) interactúe ya sea con (i) dicha molécula de unión adicional, o (ii) dicha primera molécula de dicho par de unión de (a); y

- 5 (c) medios para controlar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión de (a) con dicha molécula de unión adicional y, de este modo, evaluar si dicha molécula de unión adicional compite por la unión al receptor de la TSH con dicha primera molécula de dicho par de unión de (a).

10 Una aplicación adicional de un compañero de unión o de un compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) de acuerdo con la presente divulgación es su uso para identificar y proporcionar nuevos tipos de sitios de unión a anticuerpos del receptor de la TSH. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona además un procedimiento para identificar una o más regiones del epítipo del receptor de la TSH, cuyo procedimiento comprende poner en contacto un compañero de unión o un compañero de unión adicional con el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) sustancialmente como se ha descrito anteriormente con un receptor de la TSH de longitud completa, o uno o más fragmentos de los mismos, para permitir la interacción de dicho compañero de unión o compañero de unión adicional para el receptor de la TSH con dicho receptor de la TSH de longitud completa o dichos uno o más de sus fragmentos e identificar los aminoácidos de dicho receptor de la TSH de longitud completa, o dichos uno o más de sus fragmentos, con los que interactúa dicho compañero de unión o compañero de unión adicional. De manera adecuada, se analiza la interacción de la pareja de unión o compañero de unión adicional con fragmentos seleccionados del receptor de la TSH y del receptor de la TSH de longitud completa, con el fin de identificar los aminoácidos del receptor de la TSH con los que interactúa la pareja de unión.

25 Además, la presente divulgación permite la generación de anticuerpos para las regiones de un anticuerpo del receptor de la TSH monoclonal de acuerdo con la presente divulgación que se unen al receptor de la TSH. Tales anticuerpos antiidiotípicos producidos de esta forma podrían tener potencial como nuevos ligandos para ensayos de autoanticuerpos del receptor de la TSH, TSH y compuestos relacionados. También pueden ser agentes eficaces *in vivo* para regular la acción de autoanticuerpos del receptor de la TSH, TSH y compuestos relacionados. Por lo tanto, la presente invención proporciona, uno o más anticuerpos antiidiotípicos generados para regiones de unión de un compañero de unión o compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) sustancialmente como se ha descrito anteriormente y su preparación se describe adicionalmente por los Ejemplos.

35 Otros procedimientos de identificación y para proporcionar nuevos tipos de sitios de unión a anticuerpos que utilizan anticuerpos monoclonales son bien conocidos. Por ejemplo, mediante el cribado de anticuerpos de las bibliotecas de péptidos aleatorios presentados en fagos como se describe por JC Scott y GP Smith; "Searching for peptide ligands with an epitope library"; Science 1990; 249(4967): 386-390 y MA Myers, JM Davies, JC Tong, J Whisstock, M Scealy, IR MacKay, MJ Rowley; "Conformational epitopes on the diabetes autoantigen GAD65 identified by peptide phage display and molecular modelling"; Journal of Immunology 2000; 165: 3830-3838. También se puede llevar a cabo el cribado de anticuerpos de compuestos no peptídicos y bibliotecas de compuestos no peptídicos.

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

45 Una pareja de unión para el receptor de la TSH o un compañero de unión adicional (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) de acuerdo con la presente divulgación sustancialmente como se ha descrito anteriormente también puede utilizarse de manera útil en terapia. Por lo tanto, también se proporcionan procedimientos de tratamiento de la presente divulgación que comprenden la administración de un compañero de unión o compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) sustancialmente como se ha descrito anteriormente, composiciones farmacéuticas que comprenden un compañero de unión o compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) sustancialmente como se ha descrito anteriormente (junto con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables para los mismos), y el uso de un compañero de unión o un compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) sustancialmente como se ha descrito anteriormente en la fabricación de un medicamento o composición.

60 Un compañero de unión para el receptor de la TSH, en particular un anticuerpo monoclonal humano para el receptor de la TSH derivado de linfocitos de pacientes de acuerdo con la presente divulgación, es un reactivo valioso para comprender la patogénesis de la enfermedad de Graves y para desarrollar nuevos procedimientos de medición de los autoanticuerpos del receptor de la TSH, por ejemplo, como sustitutos de la TSH en ensayos de unión competitiva sustancialmente como se ha descrito anteriormente. Además, un compañero estimulante de la unión de acuerdo con la presente invención tiene aplicaciones *in vivo* cuando el tejido que contiene el receptor de la TSH (por ejemplo, tejido de la tiroides o tejido canceroso de tiroides) requiere estimulación. La presente divulgación proporciona, por lo

tanto, un medicamento o composición para su uso en la estimulación del tejido de la tiroides y/o tejido que contiene el receptor de la TSH. En particular, se puede emplear en oncología un compañero estimulante de la unión para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) de acuerdo con la presente divulgación, y en particular para uso en el diagnóstico, tratamiento y tratamiento del cáncer de tiroides.

Alternativamente, un compañero de unión o compañero de unión adicional para el receptor de la TSH de acuerdo con la presente divulgación puede ser un potente antagonista de la TSH o del autoanticuerpo (anticuerpo de bloqueo) y tal anticuerpo de bloqueo del receptor de la TSH de acuerdo con la presente divulgación es valioso para aplicaciones *in vivo* cuando la actividad del tejido que contiene el receptor de la TSH (por ejemplo, tejido de la tiroides o tejido del cáncer de tiroides) requiere inactivación o que no responda a la TSH, a autoanticuerpos del receptor de la TSH u otros estimuladores.

También se proporciona en combinación, un compañero de unión o compañero de unión adicional para el receptor de la TSH sustancialmente como se ha descrito anteriormente, junto con uno o más agentes adicionales capaces de inactivar o volver insensible el tejido que contiene un receptor de la TSH, a TSH, autoanticuerpos del receptor de la TSH u otros estimuladores. Típicamente, uno o más agentes adicionales actúan independientemente del receptor de la TSH.

Una aplicación terapéutica particular en la que la unión de autoanticuerpos del receptor de la TSH requiere inactivación o inhibición está en el tratamiento de la enfermedad de los tejidos retro orbitales del ojo asociados con la autoinmunidad al receptor de la TSH y el uso de un anticuerpo bloqueante que interactúa con el receptor de la TSH, tal como 9D33, para inhibir la unión del autoanticuerpo del receptor de la TSH, tiene por lo tanto una utilidad terapéutica importante en el tratamiento de dicha enfermedad. El tratamiento de la enfermedad autoinmune que requiere la inhibición de la unión del autoanticuerpo del receptor de la TSH, tal como la enfermedad discutida anteriormente de los tejidos retro orbitales del ojo asociados con la autoinmunidad al receptor de la TSH, puede emplear alternativamente un anticuerpo antiidiotípico a un compañero de unión o compañero de unión adicional como el proporcionado por la presente invención, y tales anticuerpos antiidiotípicos forman un aspecto adicional de la presente divulgación como se describe aquí y detalles adicionales de preparación de los mismos se proporcionan mediante los Ejemplos.

Más específicamente, por lo tanto, la presente divulgación proporciona el uso en el tratamiento de la enfermedad de los tejidos retro orbitales del ojo asociados con la autoinmunidad al receptor de la TSH, de un compañero de unión adicional al receptor de la TSH, donde el compañero de unión adicional inhibe sustancialmente la unión al receptor de la TSH de un compañero de unión al receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) sustancialmente como se ha descrito anteriormente. La presente divulgación proporciona además el uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de los tejidos retro orbitales del ojo asociados con la activación y/o estimulación del receptor de la TSH, de un compañero de unión adicional al receptor de la TSH, donde el compañero de unión adicional inhibe sustancialmente la unión al receptor de la TSH de un compañero de unión para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) sustancialmente como se ha descrito anteriormente. También se proporciona un procedimiento para tratar la enfermedad de los tejidos retro orbitales del ojo asociados con la autoinmunidad al receptor de la TSH, procedimiento que comprende administrar a un paciente que sufre de, o es susceptible a padecer dicha enfermedad, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compañero de unión adicional para el receptor de la TSH, donde el compañero de unión adicional inhibe sustancialmente la unión al receptor de la TSH de un compañero de unión para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) sustancialmente como se ha descrito anteriormente. Un compañero de unión adicional para uso en estas realizaciones de la presente invención comprende preferiblemente un anticuerpo de bloqueo que puede inhibir sustancialmente la unión de un compañero de unión proporcionado por la presente invención y por lo tanto la unión del autoanticuerpo del receptor de la TSH, al receptor de la TSH, y dicho anticuerpo preferido puede comprender 9D33 como se describe en la presente memoria.

La presente divulgación también proporciona el uso de un anticuerpo antiidiotípico generado para una región de unión de un compañero de unión o compañero de unión adicional de acuerdo con la presente divulgación, en el tratamiento de la enfermedad de los tejidos retro orbitales del ojo asociados con autoinmunidad al receptor de la TSH. La presente divulgación proporciona además el uso de un anticuerpo antiidiotípico generado para una región de unión de un compañero de unión o compañero de unión adicional de acuerdo con la presente divulgación, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de los tejidos retro orbitales del ojo asociada con la activación y/o estimulación del receptor de la TSH. También se proporciona un procedimiento para tratar la enfermedad de los tejidos retro orbitales del ojo asociados con la autoinmunidad al receptor de la TSH, procedimiento que comprende la administración a un paciente que sufre, o es susceptible a dicha enfermedad, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo antiidiotípico generado para una región de unión de un compañero de unión o de un compañero de unión adicional de acuerdo con la presente divulgación.

Una de las principales ventajas de un anticuerpo monoclonal como el proporcionado por la presente divulgación sobre la TSH en tales aplicaciones *in vitro* y/o *in vivo* es la relativa facilidad con la que tales anticuerpos pueden manipularse. Por ejemplo, la manipulación de la región de unión al receptor de la TSH de un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente divulgación con el fin de cambiar sus características, tales como afinidad y



características biológicas, incluyendo el grado de actividad agonista o antagonista de la TSH. También, los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la presente divulgación tienen una semivida mucho más larga que la TSH *in vivo* y esto puede tener ventajas considerables en aplicaciones *in vivo*. Además, la vida media de los anticuerpos puede manipularse, por ejemplo, los fragmentos Fab de anticuerpo tienen una vida media mucho más corta que la IgG intacta.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente divulgación incluyen aquellas adecuadas para administración oral, parenteral y tópica, aunque la vía más adecuada dependerá en general del estado de un paciente y de la enfermedad específica que se esté tratando. La cantidad exacta de un compañero de unión o de un compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) sustancialmente como se ha descrito anteriormente aquí para ser administrado a un paciente será responsabilidad de un médico tratante, aunque la dosis empleada dependerá de una serie de factores, incluyendo la edad y el sexo del paciente, la enfermedad específica que se está tratando y la vía de administración sustancialmente como se ha descrito anteriormente.

Además, la presente divulgación proporciona un procedimiento para estimular el tejido de la tiroides y/o tejido que contiene un receptor de la TSH, procedimiento que comprende administrar a un paciente que necesita tal estimulación una cantidad diagnóstica o terapéuticamente eficaz de un compañero de unión o compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) sustancialmente como se ha descrito anteriormente.

La presente divulgación también proporciona en combinación, un compañero de unión para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) sustancialmente como se ha descrito anteriormente, junto con uno o más agentes capaces de estimular el tejido de la tiroides y/o tejido que contiene un receptor de la TSH, para uso simultáneo, separado o secuencial en la estimulación del tejido de la tiroides, y/o tejido que contiene un receptor de la TSH. Preferiblemente, uno o más agentes adicionales comprenden TSH humana recombinante y/o una o más variantes, análogos, derivados o fragmentos de los mismos, o variantes, análogos o derivados de tales fragmentos. Alternativamente, uno o más agentes adicionales pueden actuar independientemente de la unión al receptor de la TSH.

Un compañero de unión para el receptor de la TSH o compañero de unión adicional (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) de acuerdo con la presente divulgación también se puede emplear como una fuente de reemplazo para suero de un paciente que se requiere que contenga un anticuerpo o anticuerpos del receptor de la TSH para uso en kits comerciales. Además, se puede proporcionar un compañero de unión o un compañero de unión adicional para el receptor de la TSH (típicamente un anticuerpo monoclonal o recombinante humano) de acuerdo con la presente divulgación en una preparación que se requiere que contenga una concentración definida de anticuerpo o anticuerpos del receptor de la TSH y de esta manera se puede proporcionar una preparación con una actividad definida, tal como actividad estimuladora, con respecto al receptor de la TSH. Opcionalmente, dicha preparación puede comprender además uno o más anticuerpos monoclonales humanos adicionales, tales como anticuerpos monoclonales para GAD, TPO o similares.

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

**COMPAÑERO DE UNIÓN PARA UN RECEPTOR DE LA TSH**, describe una molécula que tiene una especificidad de unión para el receptor de la TSH. Un compañero de unión tal como se describe en el presente documento puede ser derivado naturalmente o producido total o parcialmente sintéticamente. Dicho compañero de unión tiene un dominio o región que se une específicamente a, y es, por lo tanto, complementario a una o más regiones del epítipo del receptor de la TSH. En particular, un compañero de unión tal como se describe aquí puede ser un anticuerpo monoclonal o recombinante para el receptor de la TSH, y más particularmente puede ser un anticuerpo monoclonal o recombinante humano para el receptor de la TSH.

**DOMINIO C** designa una región de secuencia de aminoácidos relativamente constante en moléculas de anticuerpo.

**CDR** designa regiones determinantes de la complementariedad que están presentes tanto en cadenas pesadas como ligeras de moléculas de anticuerpo y representan regiones de mayor variabilidad de secuencias. Las CDR representan aproximadamente 15 a 20% de los dominios variables y representan sitios de unión al antígeno de un anticuerpo.

**FR** designa regiones marco y representan el resto de los dominios ligeros variables y dominios pesados variables no presentes en las CDR.

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

La CÉLULA HUÉSPED es una célula que ha sido transformada o transfectada, o es capaz de transformación o transfección por una secuencia exógena de polinucleótidos.

5 IDENTIDAD, como es conocido en la técnica, es la relación entre dos o más secuencias de polipéptidos, o dos o más secuencias de polinucleótidos, según se determina por comparación de las secuencias.

LC denota una cadena ligera de una molécula de anticuerpo.

10 NIBSC 90/672 es un estándar internacional para el anticuerpo estimulante de la tiroides. El estándar internacional para la actividad estimulante de la tiroides consiste en un lote de ampollas que contienen proteínas plasmáticas liofilizadas de un solo paciente humano con altos autoanticuerpos del receptor de la TSH. La preparación se ha evaluado en un estudio colaborativo internacional y se ha demostrado que posee tanto actividad estimulante de la tiroides como actividad de unión al receptor de la tiroides. En la cuadragésima sexta reunión celebrada en 1995, el Comité de Expertos en Normalización Biológica de la OMS estableció la preparación codificada 90/672 como el estándar internacional para el anticuerpo estimulante de la tiroides. Cada ampolla contiene un residuo liofilizado de 1,0 mL de una solución que contiene regulador de fosfato 0,02 M, proteínas de plasma humano dializado y 0,1 Unidades Internacionales (100 mili-Unidades Internacionales) por ampolla por definición.

20 La ESTIMULACIÓN DE UN RECEPTOR DE LA TSH mediante un anticuerpo monoclonal humano como se describe en el presente documento denota su capacidad para unirse a un receptor de la TSH y, de este modo, efectuar, por ejemplo, la producción de AMP cíclico como resultado de dicha unión al receptor de la TSH. Tal estimulación es análoga a las respuestas observadas en la unión de la TSH, o autoanticuerpos del receptor de la TSH, al receptor de la TSH y de esta manera un anticuerpo monoclonal humano como se describe en la presente proporciona esencialmente las mismas o similares respuestas de unión como se observa con TSH o con autoanticuerpos del receptor de la TSH, uniéndose a un receptor de la TSH.

DOMINIO V designa una región de secuencia de aminoácidos altamente variable en moléculas de anticuerpo.

30 DOMINIO VH designa regiones o dominios variables en cadenas pesadas de moléculas de anticuerpo.

DOMINIO VL designa regiones o dominios variables en cadenas ligeras de moléculas de anticuerpo.

35 La presente invención se ilustrará ahora mediante las siguientes figuras y ejemplos, que no limitan el alcance de la invención de ninguna manera.

## Ejemplos

### Materiales y procedimientos

40 Aislamiento de linfocitos y clonación de autoanticuerpos del receptor de la TSH monoclonal humana

Se obtuvo sangre de un paciente con enfermedad de Graves y diabetes mellitus tipo 1 que tenía altos niveles de autoanticuerpos en suero para el receptor de la TSH (TRAb). Se obtuvo la aprobación del Comité de Ética para los estudios. Se aislaron linfocitos de sangre periférica en Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Chalfont St. Giles, HP8 4SP, RU) a partir de una muestra de sangre de 20 mL y luego se infectaron con el virus Epstein Barr (EBV) (European Collection of Cell Cultures - ECACC, Porton Down, SP4 0JG, Reino Unido) y se cultivaron en capas alimentadoras de macrófagos de ratón como se describió anteriormente (N Hayakawa, LDKE Premawardhana, M Powell, M Masuda, C Arnold, J Sanders, M Evans, S Chen, JC Jaume, S Baekkeskov, B Rees Smith, J Furmaniak, "Isolation and characterization of human monoclonal autoantibodies to glutamic acid decarboxylase"; *Autoimmunity* 2002; 35: 343-355. Los linfocitos B inmortalizados con EBV se fusionaron a continuación con la línea celular híbrida de ratón/humano K6H6/B5 (WL Carroll, K Thilemans, J. Dillely, R Levy, "Mouse x human heterohybridomas as fusion partners with human B cell tumors"; *Journal of Immunological Methods* 1986; 89: 61-72) y se clonaron dos veces limitando la dilución a 5 células/pozo y un tiempo final a 1/2 célula/pozo para obtener una única colonia (BJ Bolton, NK Spurr. "B-lymphocytes" en: RI Freshney, MG Freshney (eds). *Culture of immortalized cells*. Wiley-Liss, New York 1996, 283 - 297). Los pozos originales y los siguientes clones se cribaron para el autoanticuerpo del receptor de la TSH mediante la inhibición de la unión de <sup>125</sup>I-TSH al receptor de la TSH solubilizada (véase más adelante). Los clones individuales que producen autoanticuerpos del receptor de la TSH se cultivaron en matraces de cultivo de tejidos.

60 Producción, purificación y etiquetado de preparaciones de anticuerpos monoclonales del receptor de la TSH

Se produjeron MAb del receptor de la TSH de ratón como se describió anteriormente (Y Oda, J Sanders, M Evans, A Kiddie, A Munkley, C James, T Richards, J. Wills, J. Furmaniak, B Rees Smith; "Epitope analysis of the human thyrotropin (TSH) receptor using monoclonal antibodies", *Thyroid* 2000; 10: 1051-1059) y también se prepararon a partir de ratones inmunizados con ADNc del TSHR de longitud completa clonado en pcDNA3.1 (UA Hasan, AM Abai,

DR Harper, BW Wren, WJW Morrow, "Nucleic acid immunization: Concepts and techniques associated with third generation vaccines", *Journal of Immunological Methods* 1999, 229: 1-22).

5 Las IgG se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo de tejidos usando cromatografía de afinidad en Prosep A (Millipore RU Ltd., Watford, WD18 8YH, RU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se evaluó a pureza mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (PAGE).

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

15 Las preparaciones de IgG purificadas se trataron con mercuripapaina (Sigma-Aldrich) a una relación enzima/proteína entre 1:10 y 1:100 (dependiendo del anticuerpo monoclonal particular) y se pasaron a través de una columna Prosep A para eliminar cualquier IgG intacta o fragmento Fc de la preparación de Fab (Y Oda, J Sanders, S Roberts, M Maruyama, R Kato, M Perez, VB Petersen, N Wedlock, J. Furmaniak, B Rees Smith, "Binding characteristics of antibodies to the TSH receptor"; *Journal of Molecular Endocrinology* 1998; 20: 233-244). La IgG intacta fue indetectable por SDS-PAGE en las preparaciones de Fab. Las preparaciones de IgG y Fab de los anticuerpos monoclonales se marcaron con <sup>125</sup>I como se describió anteriormente (Y Oda, J Sanders, S Roberts, M Maruyama, R Kato, M Pérez, VB Petersen, N Wedlock, J. Furmaniak, B Rees Smith; "Binding characteristics of antibodies to the TSH receptor"; *Journal of Molecular Endocrinology*; 1998; 20: 233-244). Las preparaciones de IgG se marcaron con biotina-hidracida (Pierce Rockford, IL61105, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron cristales de fragmentos Fab del autoanticuerpo monoclonal humano del receptor de la TSH y se determinó su estructura cristalina usando técnicas estándar.

25 Pacientes

30 Se estudiaron sueros de pacientes con enfermedad de Graves de diferente duración de la enfermedad. Los sueros de los pacientes estudiados mostraron inhibición de la unión de la TSH marcada con <sup>125</sup>I al receptor de la TSH (véase más adelante). Además, se estudiaron los sueros de 2 pacientes con enfermedad de Addison (A1 y A2) y altos niveles de autoanticuerpos para 21-OH (113 y 1970 unidades por mL, kit RSR) y sueros de 2 pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (D1 y D2) con altos niveles de GAD<sub>65</sub> (3700 y 37,5 unidades por mL, kit RSR). Se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes para el estudio. También se estudiaron los sueros de donantes de sangre sanos (adquiridos a través de Golden West Biologicals, Vista, CA 92083, EE.UU.). La primera preparación estándar internacional de TRAb (90/672) se obtuvo del National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC; Potters Bar, EN6 3QH, RU).

Inhibición de la unión de MAb de la <sup>125</sup>I-TSH y <sup>125</sup>I-TSHR de ratón al receptor de la TSH

40 Los ensayos de inhibición de unión se llevaron a cabo usando tubos recubiertos con receptor de la TSH como se describió anteriormente (J Sanders, Y Oda, S Roberts, A Kiddie, T Richards, J. Bolton, V McGrath, S Walters, D. Jaskolski, J Furmaniak, B Rees Smith, "The interaction of TSH receptor autoantibodies with <sup>125</sup>I-labeled TSH receptor"; *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999; 84: 3797-3802) (reactivos de RSR Ltd.). Brevemente, se incubaron 100 µL de muestra (sobrenadante de cultivo de tejidos, fragmento de IgG o Fab purificado, suero de paciente o estándares NIBSC 90/672) en tubos recubiertos con receptor de la TSH a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación suave. Después de la aspiración, los tubos se lavaron dos veces con 1 mL de regulador de ensayo (NaCl 50 mmol/L, Tris-HCl 10 mmol/L a pH 7,8, Triton X-100 al 0,1%) antes de la adición de 100 µL de <sup>125</sup>I-TSH o <sup>125</sup>I-MAb (5 x 10<sup>4</sup> cpm) e incubación a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Los tubos se lavaron entonces dos veces con 1 mL de regulador de ensayo, se aspiraron y se contaron en un contador gamma.

La inhibición de la unión se calculó como:

$$55 \quad 100 \times \frac{1 - \text{cpm enlazado en presencia de material de prueba}}{\text{cpm enlazado en presencia de material de control}}$$

Los materiales de control utilizados fueron medio de cultivo, una combinación de sueros de donantes de sangre sanos o bien como se indica.

60 Análisis de las actividades estimulantes de la tiroides

65 La capacidad de las preparaciones de autoanticuerpos monoclonales y los sueros de pacientes para estimular la producción de AMP cíclico (o cAMP) en células CHO que expresan el receptor de hTSH (aproximadamente 50.000 receptores por célula) (Y Oda, J Sanders, S Roberts, M Maruyama, R Kato, M Pérez, VB Petersen, N Wedlock, J. Furmaniak, B Rees Smith, "Binding characteristics of antibodies to the TSH receptor"; *Journal of Molecular*

Endocrinology 1998; 20: 233-244) se llevaron a cabo de acuerdo con el procedimiento de R Latif, P Graves, TF Davies; "Oligomerization of the human thyrotropin receptor"; Journal of Biological Chemistry 2001; 276: 45217-45224. En resumen, las células CHO se sembraron en placas de 96 pozos (30.000 células por pozo) y se incubaron durante 24 horas en DMEM (Invitrogen Ltd., Paisley PA4 9RF, RU) que contenía suero de ternero fetal al 10%. El cultivo se continuó entonces en DMEM sin suero fetal de ternera durante 24 horas más. El DMEM se retiró y se añadieron TSH, IgG, Fab y suero de ensayo (100 µL diluidos en solución de sales reguladas de Hank libre de NaCl que contenía 1 g/L de glucosa, 20 mmol/L de HEPES, 222 mmol/L de sacarosa, 15 g/L de albúmina de suero bovino (BSA) y 0,5 mmol/L de 3 isobutil-1-metil xantina pH 7,4) y se incubó durante 1 hora a 37°C. Después de la eliminación de las soluciones de ensayo, las células se lisaron y se ensayaron para determinar el AMP cíclico usando un sistema de inmunoensayo enzimático Biotrak de Amersham Biosciences; Chalfont St. Giles, HP8 4SP, Reino Unido. En algunos experimentos, se evaluó la capacidad de los sueros de pacientes y los anticuerpos monoclonales de ratón para el TSHR para inhibir la actividad estimulante de la TSH o hMAb TSHR1. Esto se realizó comparando (a) los efectos estimulantes de la TSH o hMAb TSHR1 solo con (b) los efectos estimulantes de la TSH o hMAb TSHR1 en presencia de sueros de pacientes o anticuerpo monoclonal de ratón.

#### Análisis genético de la región variable

El ARN total se preparó a partir de  $1 \times 10^7$  células de un clon productor de autoanticuerpos del receptor de la TSH utilizando el procedimiento ácido de fenol guanidina (P Chomczynski, N Sacchi; "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction"; Analytical Biochemistry 1987; 162: 156-159) y ARNm preparado usando perlas magnéticas oligo dT (DynaL Biotech Ltd., Wirral, CH62 3QL, RU). Las reacciones de RT-PCR se realizaron usando reactivos de Invitrogen Ltd., Paisley PA4 9RF, Reino Unido.

Los cebadores oligonucleótidos de hebra de sentido se diseñaron utilizando las secuencias recomendadas por la base de datos V-base del Consejo de Investigación Médica ([www.mrc-cpe.cam.ac.uk](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk)). Los cebadores antisentido específicos para la cadena pesada de IgG1 humana y la cadena ligera lambda se basaron en las secuencias de ADN que codifican la región constante. Tanto los cebadores sentido como antisentido incluyeron secuencias adicionales del sitio de endonucleasa de restricción 5' para facilitar la clonación de productos de PCR. Las reacciones de RT-PCR de la cadena ligera lambda y cadena pesada de IgG1 se realizaron usando el panel completo de cebadores apropiados. Todos los cebadores fueron sintetizados por Invitrogen Ltd. La reacción de RT tuvo lugar a 50°C durante 10 minutos seguida inmediatamente por 40 ciclos de PCR (15 segundos 94°C, 30 segundos a 55°C, 30 segundos a 72°C). Los productos de RT-PCR se clonaron en pUC18 y se preparó ADN utilizando el kit Wizard de Promega RU Ltd.; Southampton SO16 7NS, Reino Unido y se secuenció por el procedimiento de Sanger-Coulson (F Sanger, S Nicklen, AR Coulson, "DNA sequencing with chain terminating inhibitors", Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1977; 74: 5463-5467). Las secuencias de la región V se compararon con las secuencias disponibles de genes de Ig humana usando Ig blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/igblast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/igblast.cgi)).

#### Ensayo de inmunoprecipitación (IPA)

El ADNc que codifica el receptor de la TSH de longitud completa se colocó después del promotor T7 en pYES2 (Invitrogen) y se usó en un sistema TnT *in vitro* (Promega RU Ltd.) para producir un receptor de la TSH marcado con <sup>35</sup>S-metionina tal como se describió anteriormente (L Prentice, J Sanders, M Perez, R Kato, J Sawicka, Y Oda, D Jaskolski, J Furmaniak, B Rees Smith; "Thyrotropin (TSH) receptor autoantibodies do not appear to bind to the TSH receptor produced in an *in vitro* transcription/translation system"; Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1997; 82: 1288-1292). En resumen, se añadieron 50 µL del receptor de la TSH marcado con <sup>35</sup>S (25.000 - 30.000 cpm) diluido en HSB (150 mmol/L de Tris-HCl pH 8,3, 200 mmol/L de NaCl y 10 mg/mL de albúmina de suero bovino con Tween 20 al 1%) para duplicar las alícuotas de 50 µL de la muestra de ensayo diluida y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Los complejos inmunes se precipitaron después por adición de proteína A-sefaraosa (Sigma-Aldrich) y se hizo el recuento en un contador de centelleo.

#### Preparaciones de receptores de la TSH y transferencia de Western

Se expresó el receptor de la TSH humana de longitud completa en células CHO-K1, se extrajo con Triton X-100 al 1% y se purificó mediante cromatografía de afinidad de anticuerpo monoclonal del receptor de la TSH como se describió anteriormente (Y Oda, J Sanders, M Evans, A Kiddie, A Munkley, C James, T Richards, J. Wills, J. Furmaniak, B Rees Smith, "Epitope analysis of the human thyrotropin (TSH) receptor using monoclonal antibodies"; Thyroid 2000; 10: 1051-1059).

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

#### Análisis de epítomos utilizando péptidos receptores de la TSH

Veintiséis péptidos cada uno de 25 aa de largo que cubren todo el dominio extracelular del receptor de la TSH humana fueron amablemente proporcionados por el Dr. J Morris (JC Morris, ER Bergert, DJ McCormick, "Structure-function studies of the human thyrotropin receptor. Inhibition of binding of labeled thyrotropin (TSH) by synthetic human TSH receptor peptides"; Journal of Biological Chemistry 1993; 268: 10900-10905). Un péptido humano 21-OH (C1, SSSRVPYKDRARLPL) que se une a un MAb M21-OH5 (S Chen, J Sawicka, L Prentice, JF Sanders, H Tanaka, V Petersen, C Betterle, M Volpato, S Roberts, M Powell, B Rees Smith, J Furmaniak, "Analysis of autoantibody epitopes on steroid 21-hydroxylase using a panel of monoclonal antibodies"; Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1998; 83: 2977-2986) se usó como control positivo y un anticuerpo monoclonal humano para GAD<sub>65</sub> (N Hayakawa, LDKE Premawardhana, M Powell, M Masuda, C Arnold, J Sanders, M Evans, S Chen, JC Jaume, S Baekkeskov, B Rees Smith, J Furmaniak; "Isolation and characterization of human monoclonal autoantibodies to glutamic acid decarboxylase"; Autoimmunity 2002; 35: 343-355) se usó como control negativo. El ELISA del péptido se llevó a cabo como se describió anteriormente (Y Oda, J Sanders, M Evans, A Kiddie, A Munkley, C James, T Richards, J Wills, J Furmaniak, B Rees Smith; "Epitope analysis of the human thyrotropin (TSH) receptor using monoclonal antibodies"; Thyroid 2000; 10: 1051-1059).

Interacción de preparaciones de autoanticuerpos de TSHR monoclonales con el receptor de la TSH recubierto sobre tubos de plástico o pozos de placas de ELISA

(a) autoanticuerpo marcado con <sup>125</sup>I

Se incubaron muestras de ensayo que incluían sueros de pacientes (100 µL) en tubos recubiertos con receptor de la TSH (RSR Ltd.) a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación suave. Después de la aspiración, los tubos se lavaron dos veces con 1 mL de regulador de ensayo antes de la adición de 100 µL de preparación de autoanticuerpos marcados (30.000 cpm) e incubación a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Los tubos se lavaron entonces dos veces con 1 mL de regulador de ensayo, se aspiraron y se contaron en un contador gamma. La inhibición de la unión de autoanticuerpos marcados con <sup>125</sup>I se calculó usando la fórmula como para la inhibición de la unión de la TSH (véase más arriba).

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

Se usó el procedimiento descrito anteriormente (J Bolton, J Sanders, Y Oda, C Chapman, R Konno, J. Furmaniak y B Rees Smith, "Measurement of thyroid-stimulating hormone receptor autoantibodies by ELISA; Clinical Chemistry, 1999; 45: 2285-2287). En forma resumida, se incubaron muestras de ensayo incluyendo sueros de pacientes (75 µL) en pozos de placas de ELISA recubiertos con receptor de la TSH (RSR Ltd.) durante 2 horas con agitación (200 agitaciones por minuto) en un agitador de placas de ELISA. Se retiraron luego las muestras de ensayo y se lavaron los pozos y una vez con regulador de ensayo. Se añadieron luego autoanticuerpo monoclonal del receptor de la TSH marcado con biotina (1 ng en 100 µL) o TSH porcina marcada con biotina (RSR Ltd.; 5 ng en 100 µL) y se continuó la incubación durante 25 minutos a temperatura ambiente sin agitación. Los pozos se lavaron una vez, se añadieron 100 µL de estreptavidina-peroxidasa (RSR Ltd., 10 ng en 100 µL) y se continuó la incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente sin agitación. Los pozos se lavaron luego 3 veces, se añadió sustrato de peroxidasa tetrametil bencidina (RSR Ltd.; 100 µL). Después de la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente sin agitar, se añadieron 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M para detener la reacción del sustrato y se leyó la absorbancia de cada pozo a 450 nm en un lector de placas de ELISA. La inhibición de la unión de MAb o TSH biotinilados se expresó como un índice calculado como:

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

Análisis de Scatchard del anticuerpo monoclonal que se une a tubos recubiertos con receptor de la TSH

Se incubaron IgG o Fab sin marcar en 50 µL de regulador de ensayo y 50 µL de IgG de hMAb o Fab marcado con <sup>125</sup>I (30.000 cpm en regulador de ensayo) durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave, se lavó dos veces con 1 mL de regulador de ensayo y se contó en un contador gamma. Se graficó la concentración de IgG o Fab unida vs unida/libre (G Scatchard, "The attraction of proteins for small molecules and ions"; Annals of the New York Academy of Sciences 1949; 51: 660-672) para derivar las constantes de asociación.

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

Se incubaron muestras de ensayo que incluían sueros de pacientes (100 µL) y receptor de la TSH solubilizado en detergente (20 µL) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron partes alícuotas duplicadas de 50 µL de la mezcla de incubación a tubos de plástico (Nunc Maxisorp) que se habían recubierto con un autoanticuerpo Fab del receptor de la TSH monoclonal (200 µL de 10 µg/mL durante la noche a 4°C seguido de lavado y posterior recubrimiento). Después de la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave, se lavaron los tubos, se añadieron 100 µL (40.000 cpm) de anticuerpo monoclonal 4E31 del extremo terminal C del receptor de la TSH marcado con <sup>125</sup>I (J Sanders, Y Oda, A Kiddie, T Richards, J Bolton, V McGrath, S Walters,

D Jaskolski, J Furmaniak, B Rees Smith; "The interaction of TSH receptor autoantibodies with <sup>125</sup>I-labelled TSH receptor"; Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1999; 84: 3797-3802), y continuó la incubación durante 1 hora más con agitación suave. Después se lavaron los tubos y se hizo el recuento de <sup>125</sup>I.

#### 5 Clonación y expresión del Fab hMAb TSHR1 recombinante en *E. coli*

Se cortó el producto de RT-PCR de cadena pesada de hMAb TSHR1 (véase la sección Análisis de genes de región variable) con endonucleasas de restricción XhoI y SpeI y se cortó el producto de PCR de cadena ligera de hMAb TSHR1 con endonucleasas de restricción SacI y XbaI y tanto los ADNc de cadenas pesada como ligera clonados en el vector Immuzap H/L (Stratagene Europe, Ámsterdam, Países Bajos) (I Matthews, G Sims, S Ledwidge, D Stott, D. Beeson, N. Willcox, A Vincent, "Antibodies to acetylcholine receptor in parous women with myasthenia: evidence for immunization by fetal antigen"; Laboratory Investigation 2002; 82: 1-11) bajo el control del promotor lacZ. El ADN de plásmido se preparó usando el kit de purificación de plásmido Qiagen midi (Qiagen Ltd., Crawley, RH10 9AX, RU) y se confirmó la presencia de los ADNc de cadena pesada y ligera de hMAb TSHR1 por secuenciación usando el procedimiento de Sanger-Coulson (F Sanger, S Nicklen, AR Coulsen, "DNA sequencing with chain terminating inhibitors"; Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 1977; 74: 5463-5467). El ADN plasmídico se transformó en 2 cepas de *E. coli* diferentes (a) XL1-Blue MRF' (Stratagene) y (b) HB2151 (Amersham Biosciences) y se desarrolló durante una noche a 37°C en ampicilina LB (Triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, 100 µg/mL de concentración final de ampicilina) en placas de agar (15 g/L de agar). Los cultivos previos (una colonia en 3 mL de ampicilina LB + 1% de glucosa) se desarrollaron durante la noche a 37°C con agitación. La producción de Fab recombinante se inhibe en presencia de glucosa. Los cultivos previos después de la incubación durante la noche se diluyeron 1/100 (0,5 mL en 50 mL de ampicilina LB) y se desarrollaron a 37°C hasta que la DO<sub>600</sub> estaba entre 0,4 y 0,6. Estos cultivos se colocaron a 30°C con agitación durante 20 minutos. A continuación, se añadió isopropilo-β (IPTG) hasta una concentración final de 1 mmol/L y se continuó la incubación de los cultivos durante la noche (16 horas) a 30°C con agitación. Los cultivos se centrifugaron luego a 3000 rpm durante 30 minutos a 4°C y se recuperaron los sobrenadantes de cultivo y los sedimentos. Se resuspendieron los sedimentos en 1 mL de regulador TES helado (Tris-HCl 0,2 mol/L pH 8,0, 0,5 mol/L de EDTA y 0,5 mol/L de sacarosa) mediante agitación tipo vórtice. Se añadieron 1,5 mL más de regulador TES enfriado con hielo diluido 5x en H<sub>2</sub>O, se sometió de nuevo la mezcla a agitación tipo vórtice y se incubó sobre hielo durante 30 minutos, luego se centrifugó nuevamente para producir un segundo sobrenadante o fracción periplásmica (PF). Se filtraron el sobrenadante de cultivo y PF a través de un filtro de 0,45 µm y se dializaron durante la noche en 10 mmol/L de Tris, pH 7,5, 50 mmol/L de NaCl. También se prepararon sobrenadante de cultivo o PF de las células XL1-Blue MRF' y HB2151 no transformadas y XL1-Blue MRF' transformadas con el plásmido hMAb TSHR1 (XL1-Blue MRF'/hMAb TSHR1) y HB2151 transformadas con el plásmido hMAb TSHR1 (HB2151/hMAb TSHR1) cultivadas con glucosa sin IPTG, es decir, no inducidas. Se ensayaron los sobrenadantes de cultivo y PF para (a) su capacidad para inhibir la unión de la TSH al TSHR, (b) su capacidad para estimular la producción de AMP cíclico en células CHO que expresan TSHR, y (c) la concentración total de Fab recombinante mediante radioinmunoensayo. En este ensayo, se incubaron calibradores y materiales de ensayo incluyendo sobrenadantes de cultivo y PF (100 µL por duplicado) diluidos en regulador de ensayo (50 mmol/L de NaCl, 10 mmol/L de Tris-HCl pH 7,8, Triton X-100 al 0,1%) 1 hora a temperatura ambiente en tubos de plástico recubiertos con anti-IgG humana de cabra específica de Fab (de Sigma Aldrich, Poole, BH12 4QH, RU). Después se lavaron los tubos con regulador de ensayo (2 x 1 mL) y se añadieron 100 µL de hMAb TSHR1 Fab marcado con <sup>125</sup>I (30.000 cpm) seguido de incubación a temperatura ambiente. Después de 1 hora, los tubos se lavaron de nuevo (2 x 1 mL) y se hizo el recuento de <sup>125</sup>I. Los recuentos unidos se graficaron contra la concentración de Fab (hibridoma producido hMAb TSHR1 Fab) en los calibradores (5-500 ng/mL) y la concentración de Fab recombinante en los diversos materiales de ensayo se leyó a partir de esta curva de calibración. El límite de detección para este ensayo fue de 5 - 10 ng/mL de Fab.

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

El Fab 4B4 recombinante (4B4 se describe en detalle por N Hayakawa, LDK Premawardhana, M Powell, M Masuda, C Arnold, J Sanders, M Evans, S Chen, JC Jaume, S Baekkeskov, B Rees Smith, J Furmaniak. Isolation and characterization of human monoclonal antibodies to glutamic acid decarboxylase. Autoimmunity 2002 volumen 35 páginas 343-355) y Fab híbridos recombinantes se produjeron clonando el respectivo HC y LC en el vector Immuzap H/L y se expresaron en células HB2151 como se describe para hMAb TSHR1 Fab recombinante. Los sobrenadantes de cultivo y la fracción periplásmica se ensayaron en cuanto a su capacidad para (a) inhibir la unión de la TSH al TSHR (b) para estimular la producción de AMP cíclico en células CHO que expresan el TSHR y (c) para la concentración de Fab recombinante total como se ha descrito anteriormente. Además, se evaluó la actividad de GAD-Ab como se describe a continuación.

#### 60 Medición de la actividad de GAD Ab Fab recombinante en sobrenadantes de cultivo y fracciones periplásmicas

Se utilizó un ensayo basado en la capacidad de la preparación de GAD Ab Fab para inhibir la unión de GAD marcado con <sup>125</sup>I (de RSR Ltd., Cardiff, CF23 8HE, RU) al anticuerpo monoclonal humano para GAD (4B4). En el ensayo, las muestras de ensayo diluidas en regulador de ensayo GAD Ab (150 mmol/L de NaCl, 50 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0, 1% v/v de Tween 20, 1 g/L de albúmina de suero bovino y 0,5 g/L de NaN<sub>3</sub>) se incubaron (50 µL por

duplicado con GAD marcado con  $^{125}\text{I}$  (30.000 cpm en 50  $\mu\text{L}$  de regulador de ensayo de GAD Ab) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de IgG 4B4 (0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en regulador de ensayo GAD Ab) y se continuó la incubación durante 24 horas a temperatura ambiente. Se añadió a continuación la proteína A en fase sólida (50  $\mu\text{L}$  en regulador de ensayo GAD Ab, de RSR Ltd.) para precipitar complejos de GAD marcado con IgG- $^{125}\text{I}$  (la proteína A no reacciona con complejos de Fab y GAD marcado con  $^{125}\text{I}$ ). Después de dejar que la reacción con la proteína A prosiguiera durante 1 hora a temperatura ambiente, los precipitados se sedimentaron por centrifugación (1500 g durante 30 minutos a 4°C), se lavó con 1 mL de regulador de ensayo GAD Ab y se hizo el recuento de  $^{125}\text{I}$ . La unión de GAD marcado con  $^{125}\text{I}$  en ausencia de IgG 4B4, fue de 4-5% del cpm total añadido.

#### 10 Producción de anticuerpos antiidiotípicos para hMAb TSHR1

Se inmunizaron ratones BALB/c de 6-8 semanas de edad en forma intraperitoneal con 50  $\mu\text{g}$  de hMAb TSHR1 Fab en adyuvante completo de Freund seguido de una segunda inyección con 50  $\mu\text{g}$  de hMAb TSHR1 Fab en adyuvante incompleto de Freund después de 25 días y una inyección adicional de 50  $\mu\text{g}$  de hMAb TSHR1 Fab 4 días antes de la extracción del bazo. Las células de bazo de ratones positivos para anticuerpos (véase más adelante) se fusionaron con una línea celular de mieloma de ratón y anticuerpos monoclonales aislados como anteriormente para los MAb del TSHR. Los niveles de anticuerpo antiidiotípico en los sueros de ratón y los pozos de cultivo celular se midieron mediante la inhibición de la unión de  $^{125}\text{I}$ -hMAb TSHR1 Fab a tubos recubiertos con TSHR. En particular, se incubaron alícuotas duplicadas de 60  $\mu\text{L}$  de la muestra de ensayo (diluidas en regulador de ensayo: 50 mmol/L de NaCl, 10 mmol/L de Tris-HCl pH 7,8, Triton X-100 al 0,1%) con 60  $\mu\text{L}$  de  $^{125}\text{I}$ -hMAb TSHR1 Fab (30.000 cpm diluidos en regulador de ensayo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se transfirieron 100  $\mu\text{L}$  de la mezcla a tubos recubiertos con TSHR por duplicado (RSR Ltd.) con 20  $\mu\text{L}$  de regulador de partida (véase más arriba) y se continuó la incubación durante otras dos horas a temperatura ambiente con agitación. Los tubos se lavaron a continuación con 2 x 1 mL de regulador de ensayo y se hizo el recuento de  $^{125}\text{I}$ . La presencia de anticuerpos antiidiotípicos reactivos con hMAb TSHR1 fue evidente por la capacidad de las muestras de ensayo para inhibir la unión del hMAb TSHR1 Fab marcado a los tubos recubiertos con TSHR.

#### Resultados

Se sembraron linfocitos ( $30 \times 10^6$ ) obtenidos a partir de 20 mL de sangre del paciente a razón de  $1 \times 10^6$  por pozo en una placa de 48 pozos con 200  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de EBV en capas alimentadoras de macrófagos de ratón. El día 11 después de la infección con EBV, se controlaron los sobrenadantes en cuanto a la inhibición de la unión de  $^{125}\text{I}$ -TSH. Se encontró que un pozo era positivo para la inhibición de la unión, los niveles de inhibición aumentaron a más del 90% de inhibición el día 16 y se mantuvo en ese nivel hasta el día 24, después de lo cual disminuyeron. Los cultivos se expandieron y se fusionaron con células K6H6/B5 el día 21, 23, 26 y 27 después de la infección por EBV; en total se llevaron a cabo 7 experimentos de fusión. Cada fusión se sembró en placa a través de 3 placas de 96 pozos (es decir, 21 placas en total) y se obtuvo un pozo que produce en forma estable anticuerpos con actividad inhibidora de unión de  $^{125}\text{I}$ -TSH. Esto fue seguido por 3 rondas de nueva clonación para producir un solo clon que produce un anticuerpo monoclonal humano que inhibía la unión de la TSH marcada al receptor de la TSH. Este autoanticuerpo del receptor de la TSH monoclonal humano se denominó hMAb TSHR1 y era de la subclase IgG1 con una cadena ligera lambda.

La capacidad de diferentes concentraciones de hMAb TSHR1 IgG y Fab para inhibir la unión de la TSH marcada al receptor de la TSH se muestra en la Figura 1. Como puede observarse en la Figura 1, tan poco como 1 ng/mL de estas preparaciones inhibieron la unión de la TSH obteniéndose una inhibición mayor al 90% con 1.000 ng/mL. TSMAb TSHR1 IgG y Fab también estimularon la producción de AMP cíclico en células CHO transfectadas con el receptor de la TSH como se muestra en la Figura 2. Tan poco como 1 ng/mL de hMAb TSHR1 IgG o Fab causó estimulación fuerte de AMP cíclico. Se observaron niveles similares de estimulación con 0,1ng/mL de la TSH de porcino y 10 ng/mL de la TSH humana. La comparación de la capacidad del suero del donante original de linfocitos (tomado al mismo tiempo que la muestra de sangre para el aislamiento de linfocitos) para inhibir la unión de la TSH marcada al receptor de la TSH y estimular la producción de AMP cíclico en células CHO transfectadas con receptor de la TSH se muestra en la Figura 3. La inhibición de la unión de la TSH se pudo detectar con suero diluido 500 veces mientras que la estimulación de AMP cíclico pudo ser detectada con suero diluido 5.000 veces.

hMAb TSHR1 IgG marcada con  $^{125}\text{I}$  unida a tubos recubiertos con receptor de la TSH y el análisis de Scatchard indicó una constante de asociación de  $5 \times 10^{10}$  molar $^{-1}$ . Esta unión fue inhibida por los sueros de pacientes con enfermedad de Graves que tenían autoanticuerpos del receptor de la TSH (detectable por inhibición de la unión de la TSH marcada) (Tabla 1). hMAb TSHR1 Fab marcado con  $^{125}\text{I}$  se unió también a tubos recubiertos con receptor de la TSH (constante de asociación por análisis de Scatchard =  $4,5 \times 10^{10}$  molar $^{-1}$ ) y esta unión fue inhibida por sueros de Graves positivos de autoanticuerpos del receptor de la TSH (Tabla 2). Además, las preparaciones solubilizadas con detergente eran capaces de unirse a tubos de plástico recubiertos con hMAb TSHR1 y esta unión podría ser inhibida por sueros que contenían autoanticuerpos del receptor de la TSH (Tabla 3).

Como se muestra en la Tabla 4, hMAb TSHR1-biotina unido a placas de ELISA revestidas con receptor de la TSH y la unión se inhibió mediante la preparación de referencia internacional NIBSC 90/672 y el suero de pacientes con enfermedad de Graves. La inhibición de la unión no se observó por los sueros de donantes de sangre sanos. La

Figura 3a muestra una representación gráfica de una comparación entre un ensayo para autoanticuerpos de TSHR basado en hMAb TSHR1-biotina y ensayos anteriores. La sensibilidad del ensayo basado en hMAb TSHR1-biotina es claramente superior de acuerdo con la concentración del estándar internacional NIBSC 90/672 detectable. Esto se confirmó en un estudio de sueros de 72 pacientes con enfermedad de Graves mostrada en la Figura 3b. Los sueros de donantes de sangre sanos (n = 100) y los sueros de sujetos con enfermedades no de la tiroides (n = 43) produjeron respectivamente valores de hasta 10% de inhibición de la unión de hMAb TSHR1 y hasta 11% de inhibición de unión a TSH en este estudio.

hMAb TSHR1 IgG no reaccionó con preparaciones del receptor de la TSH de longitud completa en análisis de transferencia Western ni reaccionó bien con receptor de la TSH de longitud completa marcado con <sup>35</sup>S en el ensayo de inmunoprecipitación ni en el ELISA de péptido del receptor de la TSH. Esta falta de reactividad indica que hMAb TSHR1 reacciona con epítomos conformacionales en lugar de lineales en el receptor de la TSH.

El análisis secuencial de los genes que codifican para hMAb TSHR1 indicó que los genes de la región V de cadena pesada eran de la familia VH5, el gen D de la familia D6-13 y el gen J de la familia JH5 y para la cadena ligera la región del gen V es de la línea germinal VL1-11 y la región del gen J es de la línea germinal JL3b. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de cadena pesada se muestran en las Figuras 4 y 5 respectivamente y las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de cadena ligera se muestran en las Figuras 6 y 7, respectivamente. Estas secuencias son un refinamiento de las secuencias de nucleótidos de HC y LC determinadas usando cebadores de PCR que son degenerados. En particular, se identificó un artefacto de secuenciación de HC para los nucleótidos 115-120. La secuenciación indicó cagctg (transcrita a los aminoácidos His Val) mientras que la estructura cristalina indicó de forma más confiable los aminoácidos Gln Leu (siendo las bases correspondientes cagctg). El análisis de la estructura cristalina también permitió el refinamiento de las secuencias de aminoácidos derivadas de HC y LC en particular en la región del cebador de la PCR degenerada. En el caso del LC, se encontró que el aminoácido 2 era Pro por RT-PCR pero era Thr a partir de la estructura cristalina. En el caso del HC se encontró que el aminoácido 2 era Met por RT-PCR pero era Val a partir de la estructura cristalina.

La comparación de las actividades de las preparaciones de hMAb TSHR1 IgG y el estándar internacional para autoanticuerpos del receptor de la TSH en términos de inhibición de la unión de la TSH marcada se muestran en la Tabla 5. Esto permitió estimar una actividad específica de hMAb TSHR1 IgG como 138 unidades de NIBSC 90/672 por mg de proteína cuando los ensayos se realizaron en suero y 163 unidades por mg cuando los ensayos se realizaron en regulador de ensayo (media de los 2 valores = 150 unidades/mg). Las preparaciones de hMAb TSHR1 Fab fueron 288 y 309 unidades por mg en suero y regulador de ensayo respectivamente (media de los 2 valores = 300 unidades/mg). La Tabla 6 muestra un análisis similar del suero del donante de linfocitos y de la IgG del suero del donante. Como puede verse, el suero del donante contiene una media de 0,38 unidades/mL de NIBSC 90/672 (0,36 y 0,4 en suero y regulador de ensayo, respectivamente) y la IgG de suero del donante tiene una actividad específica media de 0,059 unidades por mg de proteína. Estos resultados se resumen en la Tabla 7 y la comparación con la actividad específica de hMAb TSHR1 IgG (150 unidades/mg) indica que el anticuerpo monoclonal IgG es 2.500 veces más activo que el IgG de suero de donante de linfocitos en términos de inhibición de la unión a TSH.

La evaluación inicial de las actividades de las diversas preparaciones de IgG y suero en términos de estimulación de AMP cíclico en células CHO transfectadas con el receptor de la TSH se muestran también en la Tabla 7. La estimulación del ensayo de AMP cíclico se caracteriza por considerable en el ensayo y entre la variabilidad del ensayo. Esto se refiere a varios factores que incluyen la variación en el número y la calidad de las células inicialmente sembradas en las placas de 96 pozos y la variación en la velocidad de crecimiento de las células sembradas durante las subsiguientes 48 horas. En consecuencia, los ensayos de hMAb TSHR1 IgG y Fab, suero del donante de linfocitos y suero de IgG y NIBSC 90/672 se llevaron a cabo repetidamente y los resultados se resumen en la Tabla 8. La actividad específica de la hMAb TSHR1 IgG fue de 318 unidades por mg en el ensayo de estimulación en comparación con 0,1 unidades por mg para la IgG de suero del donante de linfocitos, es decir, la IgG de anticuerpo monoclonal era aproximadamente 3.000 veces tan activa como la IgG de suero del donante en términos de estimulación de la producción de AMP cíclico. Este valor está en un acuerdo razonable con el valor de 2.500 veces observado para la inhibición de las mediciones de unión a la TSH (véase más arriba y las Tablas 5 y 6). La Tabla 9 muestra un análisis adicional de los efectos estimuladores del receptor de la TSH de hMAb TSHR1 IgG y Fab y de la IgG de suero del donante de linfocitos.

Los efectos de la TSH porcina y de hMAb TSHR1 IgG en la estimulación de la producción de AMP cíclico en células CHO que expresan el receptor de la TSH fueron aditivos como puede verse en los resultados mostrados en la Tabla 10.

Los resultados típicos observados en la estimulación del ensayo de AMP cíclico con la preparación de referencia NIBSC 90/672 se muestran en la Tabla 11.

Las Tablas 12 y 13 muestran los efectos de los diversos sobrenadantes de cultivo de *E. coli* en términos de inhibición de la unión de la TSH marcada y estimulación de la producción de AMP cíclico respectivamente. Transformado (con el plásmido hMAb TSHR1) y los cultivos inducidos por IPTG de ambas cepas de *E. coli* produjeron cantidades suficientes de hMAb TSHR Fab recombinante para actuar como potentes inhibidores de la



unión a la TSH (Tabla 12) y potentes estimuladores de la producción de AMP cíclico (Tabla 13). Los sobrenadantes de cultivo de control (a partir de células no transformadas y células transformadas, pero no inducidas) no produjeron niveles detectables de actividad de inhibición de unión (Tabla 12) o de estimulación (Tabla 13).

5 En otros experimentos de control, se analizó un anticuerpo humano Fab recombinante producido por clonación y expresión de HC y LC de un anticuerpo monoclonal humano contra GAD (4B4). Los ensayos de sobrenadantes de cultivo y fracciones periplásmicas indicaron que el Fab 4B4 recombinante no tenía inhibición detectable de la actividad de unión a TSH (Tablas 14 y 15) o actividad estimulante del TSHR (Tablas 16 y 17). Además, los Fab híbridos que consisten en (a) hMAb TSHR1 HC y 4B4 LC (b) hMAb TSHR1 LC y 4B4 HC no mostraron interacción con el TSHR en ninguno de los dos ensayos (Tablas 14-17). Los ensayos para la actividad de Ab de GAD en estas diversas preparaciones de Fab recombinante sólo fueron capaces de detectar la expresión de Ab de GAD en células transformadas con 4B4 HC y 4B4 LC (Tablas 18 y 19). hMAb TSHR1 Fab recombinante no mostró actividad de Ab de GAD detectable ni tampoco los híbridos de Fab recombinantes que consistían en mezclas de 4B4 y hMAb TSHR1 HC y LC (Tablas 18 y 19).

15 La capacidad de hMAb TSHR1 para estimular la producción de AMP cíclico en células CHO transfectadas con el TSHR fue inhibida por sueros de pacientes que contenían autoanticuerpos de TSHR que actuaban como antagonistas de la TSH (Figura 8). Además, un anticuerpo monoclonal de ratón para el TSHR (9D33) fue capaz de bloquear las actividades estimulantes de hMAb TSHR1 (Tabla 20), mientras que otro MAb de ratón del TSHR (2B4) fue ineficaz (Tabla 20). Sin embargo, 2B4 fue capaz de bloquear las actividades estimulantes de la TSH como 9D33 (Tabla 21). La Tabla 22 muestra la capacidad de 2B4 y 9D33 para inhibir la unión de la TSH marcada con <sup>125</sup>I y hMAb TSHR1 marcada con <sup>125</sup>I a los tubos de plástico del TSHR. 9D33 fue capaz de inhibir la unión de la TSH marcada y la unión de hMAb TSHR1 marcado muy eficazmente (más del 50% de inhibición a razón de 10 µg/mL). 2B4 era un inhibidor efectivo de la unión de la TSH marcada al TSHR (más del 80% de inhibición a razón de 1 µg/mL), pero tenía sólo un efecto menor sobre la unión de hMAb TSHR1 (11% de inhibición a razón de 1 µg/mL) o sobre la unión 9D33 (22% de inhibición a razón de 1 µg/mL). La unión del 9D33 marcado a los tubos recubiertos con TSHR fue inhibida por sueros de pacientes con enfermedad de Graves que contenían autoanticuerpos TSHR (como la medida por inhibición de la unión de la TSH marcada al TSHR) mientras que los sueros de donantes de sangre sanos y sueros de pacientes con otras enfermedades autoinmunes tenían poco o ningún efecto (Tabla 23). La unión de 9D33 marcada al TSHR fue inhibida por autoanticuerpos de TSHR con propiedades agonistas o antagonistas de la TSH (Tabla 24) y por el estándar internacional NIBSC 90/672 (Tabla 25). El análisis de Scatchard indicó que 9D33 y 2B4 tenían afinidades de  $2 \times 10^{10}$  molar<sup>-1</sup> y  $1 \times 10^{10}$  molar<sup>-1</sup> respectivamente para receptores de la TSH recubiertos sobre tubos de plástico.

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

40 En general, nuestro análisis indica que el autoanticuerpo monoclonal humano hMAb TSHR1, la unión del receptor de la TSH y las características de estimulación de la tiroides de los anticuerpos del receptor de la TSH en el suero del donante de linfocitos. Como se ha detallado anteriormente, el anticuerpo monoclonal también fue producido como una preparación de Fab recombinante.

#### 45 Conclusiones

50 (a) Hemos producido un autoanticuerpo monoclonal humano para el receptor de la TSH que tiene propiedades similares al autoanticuerpo del receptor de la TSH en el suero del paciente donante. El anticuerpo monoclonal también fue producido como una preparación de Fab recombinante.

(b) El anticuerpo monoclonal IgG y Fab y las preparaciones de Fab recombinantes son potentes estimuladores de la tiroides e inhibidores efectivos de la unión de la TSH marcada al receptor de la TSH.

55 (c) La unión de las preparaciones de MAb IgG y Fab marcadas al receptor de la TSH se inhibe por sueros positivos para el autoanticuerpo del receptor de la TSH de pacientes con enfermedad de Graves, pero no por sueros de donantes de sangre sanos o sueros de pacientes con otras enfermedades autoinmunes. Los sistemas de ensayo para autoanticuerpos de TSHR basados en la inhibición de la unión de hMAb TSHR1 marcado al receptor de la TSH son más sensibles que otros ensayos descritos hasta ahora.

60 (d) Autoanticuerpos del receptor de la TSH que actúan como antagonistas de la TSH así como autoanticuerpos del receptor de la TSH que actúan como agonistas de la TSH inhiben la unión de hMAb TSHR1 marcado al receptor de la TSH.

65 (e) Las preparaciones de hMAb TSHR1 recubiertas sobre tubos de plástico unen el receptor de la TSH y esta unión se inhibe por los autoanticuerpos del receptor de la TSH en diferentes sueros de pacientes.

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

5 (g) Se han producido anticuerpos policlonales y monoclonales de ratón para hMAb TSHR1 que se unen a hMAb TSHR1 de tal manera que impiden su unión al receptor de la TSH. Estos anticuerpos antiidiotípicos compiten por lo tanto con el TSHR por hMAb TSHR1 y como tales pueden ser alternativas útiles al TSHR en aplicaciones en las que se requiere un compañero de unión para autoanticuerpos de TSHR.

10 (h) Estos resultados indican que se puede usar hMAb TSHR1 y/o sus derivados y/o sus competidores como sustituto de la TSH en

(i) ensayos para autoanticuerpos del receptor de la TSH, TSH y ligandos relacionados

15 (ii) diversas aplicaciones *in vivo* que implican la provisión de actividades antagonistas de la TSH o antagonistas de la TSH.

(iii) identificación y suministro de nuevos tipos de sitios de unión al autoanticuerpos del receptor de la TSH.

20 **Tabla 1. Efecto de sueros de pacientes en la unión de hMAb TSHR1 IgG marcada con <sup>125</sup>I al receptor de la TSH y comparación con el efecto sobre la unión de la TSH marcada con <sup>125</sup>I al receptor de la TSH**

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

G1-G11 son sueros de pacientes con una historia de enfermedad de Graves.

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

G10 y G11 tienen niveles altos de actividad estimuladora de la tiroides.

G10 es el suero del donante de linfocitos.

/10, /20 etc. indica factor de dilución en una combinación de sueros de donantes de sangre sanos.

N1-N10 son sueros de donantes de sangre sanos.

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

A1 y A2 son de pacientes con enfermedad de Addison (positivo para autoanticuerpos esteroideos de 21-hidroxilasa).

En presencia de la combinación de sueros de donantes sanos de sangre, aproximadamente el 25% de MAb IgG marcado con <sup>125</sup>I se unió a los tubos recubiertos con TSHR.

5 **Tabla 2. Efecto de sueros de pacientes en la unión de hMAb TSHR1 marcado con <sup>125</sup>I al receptor de la TSH y comparación con el efecto sobre la unión de la TSH marcada con <sup>125</sup>I al receptor de la TSH**

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

**Tabla 3. Unión del TSHR a tubos de plástico recubiertos con hMAb TSHR 1 Fab e inhibición de la unión al TSHR por sueros que contienen autoanticuerpos de TSHR**

Material de ensayo	cpm unido <sup>1</sup>
Suero A sano de donante de sangre	8406
Suero B de donante sano de sangre	8430
Suero 1 positivo para autoanticuerpo de TSHR	1527
Suero 2 positivo para autoanticuerpo de TSHR	1131
Suero 3 positivo para autoanticuerpo de TSHR	1199

1 TSHR unido fue detectado utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón marcado con <sup>125</sup>I para el terminal C de TSHR; cpm total = 39.000 por tubo.

10

**Tabla 4. Efecto de las muestras de suero de pacientes sobre la unión de hMAb TSHR1 marcado con biotina y TSH marcada con biotina a pozos de placas de ELISA recubiertos con TSHR**

	hMAb TSHR1 biotina		TSH biotina	
	DO <sub>450</sub>	% de Inhibición	DO <sub>450</sub>	% Inhibición
Combinación de HBD	1,852	0	1,778	0
Combinación de HBD más 1U/mL	1,46	21	1,489	16
Combinación de HBD más 2U/mL	1,168	37	1,304	27
Combinación de HBD más 4U/mL	0,792	57	0,947	47
Combinación de HBD más 8U/mL	0,539	71	0,492	72
Combinación de HBD más 40U/mL	0,118	94	0,233	87
Suero P1	1,415	24	1,397	21
Suero P2	1,264	32	1,256	29
Suero P3	0,558	70	0,408	77
Suero P4	0,763	59	0,907	49
Suero P5	1,047	43	-	
Suero P6	0,843	55	-	
Suero P7	1,429	23	-	
HBD 1	1,745	6	1,713	4
HBD 2	1,807	2	-	
HBD 3	1,779	4	1,626	9
HBD 4	1,821	2	-	
HBD 5	1,841	1	1,660	7
HBD 6	1,762	5	1,777	0
HBD 7	1,799	3	1,767	1
HBD 8	1,783	4	1,703	4

ES 2 624 241 T3

HBD 9	1,792	3	1,669	3
HBD = Suero de donante sano de sangre				
U/mL son unidades de NIBSC 90/672				
P1-P7 son sueros de pacientes con enfermedad de Graves				

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

Muestra	Muestras diluidas en suero <sup>1</sup>				Muestras diluidas en regulador de ensayo			
	% inhibición	unidades /L	unidades/mg	unidades promedio/mg	% inhibición	unidades /L	unidades /mg	unidades promedio/mg
NIBSC 90/672								
0,125 unidades/L					2			
0,25 unidades/L					4			
0,5 unidades/L					11			
1,0 unidades/L	15				19			
2,0 unidades/L	28				38			
4,0 unidades/L	48				64			
8,0 unidades/L	69				83			
40,0 unidades/L	95				94			
hMAb TSHR1 IgG								
0 ng/mL	1				0			
0,3 ng/mL	1				2			
1 ng/mL	3				3			
3 ng/mL	7				10	0,46		
10 ng/mL	21	1,48	148		33	1,73	173	
30 ng/mL	46	3,9	130	138	70	4,8	160	163
100 ng/mL	81	13,5	135		92	15,6	156	
300 ng/mL	92				95	>40		
hMAb TSHR1 Fab								
0,3 ng/mL	5				-2			
1 ng/mL	5				1			
3 ng/mL	16	1,05	351		16	0,8	265	

ES 2 624 241 T3

10 ng/mL	36	2,77	277		52	2,9	291	309
30 ng/mL	69	8,0	267	288	86	9,6	372	
100 ng/mL	89	23,7	237		92	16,9		
300 ng/mL	93				94			
2G4 IgG <sup>2</sup>								
0,3 ng/mL	2				-3			
3 ng/mL	1				-6			
30 ng/mL	0				-5			
300 ng/mL	3				-4			
2G4 Fab2								
0,3 ng/mL	4				-5			
3 ng/mL	4				-6			
30 ng/mL	1				-5			
300 ng/mL	2				-6			
<sup>1</sup> Combinación de suero de donante sano de sangre, 14,9% de cpm total unido a la TSHR en presencia de solamente esta combinación de suero, 14,7% del cpm total unido a la TSHR en presencia de regulador únicamente,								
<sup>2</sup> G4 es un anticuerpo monoclonal humano para peroxidasa de tiroides.								

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

Muestra	Muestras diluidas en suero <sup>1</sup>				Muestras diluidas en regulador de ensayo			
	% inhibición	unidades/L <sup>2</sup>	unidades /mg o unidades/mL en suero no diluido)	Unidades promedio/mg o (unidades/mL)	% inhibición	unidades/L <sup>2</sup>	unidades /mg o unidades/mL en suero no diluido)	Unidades promedio/mg o (unidades/mL)
Suero del donante								
diluido 1000x	6				10			
diluido 300x	18	1,2	(0,36)		28	1,3	(0,39)	
diluido 100x	42	3,2	(0,32)	(0,36)	62	3,9	(0,39)	(0,40)
diluido 30x	78	11,3	(0,39)		91	13,5	(0,41)	
diluido 10x	93	34			95	>40		
IgG en suero del donante								
0 mg/mL	0	0			0			
0,01 mg/mL	7				19	0,87		

0,03 mg/mL	23	1,6	0,053		37	1,9	0,063	
0,1 mg/mL	57	5,1	0,051	0,054	78	6,4	0,064	0,063
0,3 mg/mL	85	17	0,057		93	19	0,063	
1 mg/mL	96	43			96	>40		
Suero combinado de donante sano de sangre								
diluido 1000x	0				3			
diluido 100x	1				4			
diluido 10x	1				11			
IgG en suero combinado de donante sano de sangre								
0,01 mg/mL	2				2			

0,1 mg/mL	1					5		
1 mg/mL	3					7		

<sup>1</sup>Combinación de sueros de donante sano de sangre, 14,7% de cpm total unido al TSHR en presencia de esta combinación de suero únicamente, 16,3% de cpm total unido al TSHR en presencia de suero únicamente.

<sup>2</sup>Unidades mostradas son para la preparación de referencia de autoanticuerpo de TSHR, NIBSC 90/672 internacional.



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

Preparación	Inhibición de los ensayos de unión de TSH		Estimulación del ensayo de AMP cíclico	
	Unidades/mg <sup>1,2</sup>	Unidades/nmol <sup>1,2</sup>	Unidades/mg <sup>1</sup>	Unidades/nmol <sup>1</sup>
hMAb TSHR1 IgG	150	22	180	26
hMAb TSHR1 Fab	300	15	700	35
Suero de donante IgG	0,059	0,009	0,33	0,048
Suero de donante unidades/mL	0	1.8		

<sup>1</sup>Unidades mostradas son NIBSC 90/672.

<sup>2</sup>Los valores son un promedio de los resultados obtenidos en suero y en regulador de ensayo (véase Tablas 5 y 6)

**Tabla 8. Sumario de actividades específicas de hMAb TSHR1 y suero de donante de linfocitos e IgG en suero determinado en varios estímulos de ensayos de AMP cíclico**

Preparación	Unidades promedio por mg	Número de determinaciones	Desviación estándar
hMAb TSHR1 IgG	318	16	189
hMAb TSHR1 Fab	492	10	184
Suero de donante IgG	0,10	10	0,08
Suero de donante unidades/mL	0,9	4	0,6

**Tabla 9. Otros análisis de los efectos de hMAb TSHR1 IgG y Fab e IgG en suero de donante de linfocitos en el ensayo de estimulación de AMP cíclico**

Muestra	Promedio de AMP cíclico por pozo (pmoles)	Número de determinaciones	Desviación estándar
hMAb TSHR1 IgG			
0ng/mL	0,96	6	0,048
0.3ng/mL	1,25	6	0,12
1ng/mL	1,84	6	0,16
3ng/mL	3,4	5	0,37
10ng/mL	6,6	5	0,62
hMAb TSHR1 Fab			
0ng/mL	0,60	6	0,068
0.3ng/mL	1,11	6	0,11
1ng/mL	1,99	6	0,39
3ng/mL	4,9	6	0,44
10ng/mL	10,6	6	0,86
Control humano MAb (2G4) <sup>1</sup>			
IgG 0 ng/mL	0,72	11	0,19
IgG 10 ng/mL	0,61	11	0,16
Fab 10 ng/mL	0,61	4	0,044
IgG en suero de donante de linfocitos			
3mg/mL	1,67	6	0,38
10mg/mL	4,20	6	0,93
30mg/mL	6,22	6	0,73
IgG en suero combinado de donante sano de sangre			
30mg/mL	0,38	6	0,10

<sup>1</sup>2G4 es un autoanticuerpo humano monoclonal para peroxidasa de tiroides

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

Experimento 1		Experimento 2	
Muestra	AMP <sup>1</sup> cíclico (pmoles por pozo)	Muestra	AMP <sup>1</sup> cíclico (pmoles por pozo)
A Regulador solamente	0,57	A Regulador solamente	0,42
B TSH porcino 0,1ng/mL	1,07	B TSH porcino 0,05ng/mL	1,07
C hMAb TSHR1 1ng/mL	1,41	C hMAb TSHR1 0,5 ng/mL	0,92
B más C	2,08	B más C	1,92

<sup>1</sup> Los valores mostrados son promedios que concuerdan estrechamente con la determinación por duplicado.

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

Muestra	Promedio de AMP cíclico por pozo (pmoles)	Número de determinaciones	Desviación estándar
Regulador solamente	0,60	6	0,068
0,1 unidades/L	1,09	6	0,085
0,3 unidades/L	1,49	5	0,11
1,0 unidades/L	3,52	5	0,46
3,0 unidades/L	8,16	6	1,39

Tabla 12. Inhibición de la unión de <sup>125</sup>I-TSH a tubos recubiertos con TSHR mediante hMAb TSHR1 Fab recombinante expresado en 2 diferentes cepas de *E. coli* (células XL1-Blue MRF<sup>+</sup> y HB2151)

Muestra	Dilución de sobrenadante del cultivo <sup>2</sup>	% de unión	% de inhibición <sup>3</sup>
Ensayo con regulador solamente <sup>1</sup>		12,1	0
Sobrenadante de cultivo celular XL1-Blue MRF <sup>+</sup> no transformado	4x		3,9
	8x	11,5	4,5
	16x	11,9	1,5
	32x	11,9	1,5
	64x	11,9	1,0
	128x	12,1	-0,5
Sobrenadante de cultivo celular XL1-Blue MRF <sup>+</sup> transformado pero no inducido	4x	11,5	5,0
	8x	11,6	4,2
	16x	11,8	2,2
	32x	11,1	8,4
	64x	11,7	3,4
	128x	11,1	8,0
Sobrenadante de cultivo celular XL1-Blue MRF <sup>+</sup> transformado e inducido	4x	1,5	87,4
	8x	2,3	81,3
	16x	4,7	60,9
	32x	7,2	40,2
	64x	8,9	26,4
	128x	10,3	14,8
Sobrenadante de cultivo celular HB2151 no transformado	x4	11,2	7,3
	x8	11,1	8,1
	x16	10,9	9,7
	x32	10,8	10,2
	x64	10,8	10,2
	x128	10,6	12,3
Sobrenadante de cultivo celular HB2151 transformado	4x	10,7	11,6
	8x	10,5	13,3
	16x	10,6	11,8
	32x	10,7	11,4
	64x	10,9	9,6
	128x	10,6	11,8

Sobrenadante de cultivo celular HB2151 transformado e inducido	4x	1,0	92,0
	8x	1,0	91,4
	16x	1,3	89,0
	32x	2,2	82,0
	64x	4,3	64,1
	128x	6,7	44,8

<sup>1</sup>Regulador de ensayo = 50mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl pH 7,8

<sup>2</sup> Todas las diluciones se hicieron en el regulador del ensayo

<sup>3</sup> la inhibición de unión se calculó utilizando la fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - [A/B \times 100]$$

en donde A = unión en presencia de la muestra de ensayo

B = unión en presencia del regulador de ensayo

**Tabla 13. Estimulación de la producción de cAMP en células CHO transfectadas con el TSHR por hMAb TSHR1 Fab expresado en 2 diferentes cepas de *E. coli* (células XL1-Blue MRF' y HB2151)**

Muestra	Dilución del sobrenadante de cultivo <sup>2</sup>	pmol/pozo de células	Promedio	x basal <sup>3</sup>
Regulador de ensayo solamente <sup>1</sup>		0,54	0,49	1
		0,44		
Sobrenadante de cultivo celular XL1-Blue MRF' no transformado	10x	0,32	0,33	0,68
		0,35		
Sobrenadante de cultivo celular XL1-Blue MRF' transformado pero no inducido	10x	0,52	0,62	1,3
		0,73		
	50x	0,50	0,49	0,99
Sobrenadante de cultivo celular XL1-Blue MRF' transformado e inducido	10x	>6,4	>6,4	>13,1
		>6,4		
	50x	3,5	3,6	7,3
		3,6		
Sobrenadante de cultivo celular HB2151 no transformado	10x	0,39	0,37	0,76
		0,35		
Sobrenadante de cultivo celular HB2151 transformado pero no inducido	10x	0,29	0,37	0,76
		0,45		
	50x	0,37	0,37	0,76
		0,37		
	10x	>6,4	>6,4	>13,1
		>6,4		
	50x	>6,4	>6,4	>13,1
>6,4				

<sup>1</sup> Regulador de ensayo = Solución salina regulada de Hanks (Libre de NaCl) que contiene 1 g/L de glucosa, 20 mmol/L HEPES, 222 mmol/L sacarosa, 15 g/L albúmina de suero bovino (BSA) y 0,5 mmol/L 2 isobutil-1-metil xantina pH 7,4

<sup>2</sup> Diluciones en el regulador de ensayo

<sup>3</sup> Basal = cAMP producido en presencia de regulador de ensayo únicamente

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

ENSAYOS DE LAS FRACCIONES PERIPLASMÁTICAS			
Muestra de ensayo	Fración Periplasmática (PF) dilución y (concentración total de Fab en PF no diluido)	% de unión de <sup>125</sup> I-TSH	% de inhibición <sup>1</sup>

ES 2 624 241 T3

Regulador de ensayo únicamente		11,5	0
Células no transformadas	4x	11,8	-2,7
	8x (nd)	11,8	-2,7
	16x	12,2	-5,9
Células transformadas pero no inducidas con hMAb TSHR1 HC/LC	4x	1,6	86 <sup>a</sup>
	8x (177 ng/mL)	3,6	68
	16x	6,4	45
Células transformadas e inducidas con hMAb TSHR1 HC/LC	4x	0,95	92
	8x (364 ng/mL)	1,4	88
	16x	2,7	77
Células transformadas pero no inducidas con hMAb TSHR1 HC/4B4 LC	4x	12,0	-3,9
	8x (nd)	12,1	-4,8
	16x	12,4	-7,8
Células transformadas e inducidas con hMAb TSHR1 HC/4B4 LC	4x	11,4	0,9
	8x (83 ng/mL)	11,8	-2,1
	16x	11,7	-1,8
Células transformadas pero no inducidas con 4B4 HC/hMAb TSHR1 LC	4x	11,9	-3,5
	8x (nd)	12,2	-6,1
	16x	12,4	-7,8
Células transformadas e inducidas con 4B4 HC/hMAb TSHR1 LC	4x	11,8	-2,8
	8x (850 ng/mL)	11,2	3,1
	16x	11,9	-3,2
Células transformadas pero no inducidas con 4B4 HC/LC	4x	12,1	-5,4
	8x (nd)	12,0	-4,0
	16x	12,1	-4,8
Células transformadas e inducidas de 4B4 HC/LC	4x	11,7	-1,2
	8x (265 ng/mL)	11,7	-1,4
	16x	12,0	-4,2

<sup>1</sup> La inhibición de unión se calculó utilizando la fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - [A/B \times 100]$$

en donde A = % de unión de <sup>125</sup>I-TSH en presencia de la muestra de ensayo.

B = % de unión de <sup>125</sup>I-TSH en presencia del regulador de ensayo

<sup>a</sup> La detección de la actividad de TSHR Ab en las células no inducidas se debió a la actividad constitutiva del promotor produciendo niveles bajos de expresión de Fab en ausencia de IPTG.

nd = no detectable

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

ENSAYOS DE SOBRENADANTES DE CULTIVO				
Muestra de ensayo	Dilución del sobrenadante de cultivo y (concentración total de Fab en el sobrenadante diluido)		% de unión de <sup>125</sup> I-TSH	% de inhibición <sup>1</sup>
Regulador de ensayo únicamente			11,1	0
Células no transformadas	4x	(nd)	11,8	-6,5
	8x		13,1	-18
	16x		11,1	-0,3
Células transformadas pero no inducidas con hMAb TSHR1 HC/LC	4x	(nd)	10,8	2,1
	8x		12,1	-9,8
	16x		11,9	-8,1
Células transformadas e inducidas con hMAb TSHR1 HC/LC	4x	(421 ng/mL)	1,1	91
	8x		1,2	90
	16x		1,1	90
Células transformadas pero no inducidas con hMAb TSHR1 HC/4B4 LC	4x	(nd)	11,8	-7,0
	8x		12,5	-13,0
	16x		12,0	-1,3
Células transformadas e inducidas con hMAb TSHR1 HC/4B4 LC	4x	(262 ng/mL)	10,8	2,7
	8x		11,1	-0,4
	16x		11,3	-2,6
Células transformadas pero no inducidas con 4B4 HC/hMAb TSHR1 LC	4x	(nd)	11,9	-7,4
	8x		12,7	-15
	16x		11,8	-7,0
Células transformadas e inducidas con 4B4 HC/hMAb TSHR1 LC	4x	(84 ng/mL)	10,5	4,8
	8x		10,8	2,4
	16x		11,2	-0,9
Células transformadas pero no inducidas con 4B4 HC/LC	4x	(nd)	11,9	-7,5
	8x		12,6	-14
	16x		12,0	-9,0
Células transformadas e inducidas con 4B4 HC/LC	4x	(522 ng/mL)	10,5	-4,7
	8x		11,0	0,7
	16x		11,0	0,5

<sup>1</sup> Véase pie de página de la Tabla 14

nd = no detectable

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

ENSAYOS DE SOBRENADANTES DE CULTIVO
-------------------------------------

ES 2 624 241 T3

Muestra de ensayo <sup>1</sup>	Dilución <sup>2</sup> de sobrenadantes de cultivo y (concentración total de Fab en sobrenadantes no diluidos)	pmol de AMP cíclico/pozo de células	Promedio pmol AMP cíclico	Estimulación <sup>3</sup> x basal
Regulador de ensayo <sup>1</sup> únicamente		0,35 0,25 0,33	0,31	1
Células no transformadas	10x (nd)	0,51 0,67 0,48	0,55	1,8
Células transformadas pero no inducidas con hMAb TSHR1 HC/LC	10x (nd)	0,84 1,80 2,13	1,59	5,1a
Células transformadas e inducidas con hMAb TSHR1 HC/LC	10x (421 ng/mL)	>6,4 >6,4 >6,4	>6,4	>20
Células transformadas pero no inducidas con hMAb TSHR1 HC/4B4 LC	10x (nd)	0,55 0,63 0,58	0,59	1,9
Células transformadas e inducidas con hMAb TSHR1 HC/4B4 LC	10x (262 ng/mL)	0,47 0,47 0,52	0,48	1,6
Células transformadas pero no inducidas con 4B4 HC/hMAb TSHR1 LC	10x (nd)	0,65 0,59 0,60	0,61	2,0
Células transformadas e inducidas con 4B4 HC/hMAb TSHR1 LC	10x (84 ng/mL)	0,51 0,37 0,38	0,42	1,4
Células transformadas pero no inducidas con 4B4 HC/LC	10x (nd)	0,65 0,73 0,64	0,67	2,2
Células transformadas e inducidas con 4B4 HC/LC	10x (522 ng/mL)	0,55 0,41 0,35	0,44	1,4

<sup>1</sup>Regulador de ensayo: solución salina regulada de Hanks' (Libre de NaCl) que contiene 1 g/L glucosa, 20 mmol/L HEPES, 222 mmol/L de sacarosa, 15 g/L de albúmina de suero bovino (BSA) y 0,5 mmol/L de 2 isobutil-1-metil xantina pH 7,4

<sup>2</sup>Diluciones del regulador de ensayo

<sup>3</sup>Basal = producción de AMP cíclico en presencia de regulador de ensayo únicamente

<sup>a</sup>La detección de la actividad de estimulación de AMP cíclico en las células no inducidas se debió a la actividad constitutiva del promotor que produce niveles bajos de expresión de Fab en ausencia de IPTG. No se detectaron niveles de Fab recombinante total (límite de detección = 5-10 ng/mL) en donde el ensayo de estimulación de AMP cíclico puede detectar una cantidad tan pequeña como 0,3 ng/mL de hMAb TSHR1 Fab.  
nd = no detectable

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

Ensayo de fracciones periplasmáticas				
Muestra de ensayo	Dilución <sup>2</sup> de la fracción periplasmática (PF) y (concentración total de Fab en la PF no diluido)	pmol AMP cíclico/pozo de células	Promedio de AMP cíclico pmol/pozo de células	Estimulación <sup>3</sup> de x basal
Regulador de ensayo <sup>1</sup> únicamente		0,35 0,25 0,33	0,31	1
Células no transformadas	10x (nd)	0,31 0,22	0,29	0,9
Células transformadas pero no inducidas con hMAb TSHR1 HC/LC	10x (177 ng/mL)	0,35 >6,4 >6,4	>6,4	>20,6 <sup>a</sup>
Células transformadas e inducidas con hMAb TSHR1 HC/LC	10x (364 ng/mL)	>6,4 >6,4	>6,4	>20,6
Células transformadas pero no inducidas con hMAb TSHR1 HC/4B4 LC	10x (nd)	- 0,40 0,33	0,35	1,1
Células transformadas e inducidas con hMAb TSHR1 HC/4B4 LC	10x (83 ng/mL)	0,33 0,31 0,41	0,34	1,1
Células transformadas pero no inducidas con 4B4 HC/hMAb TSHR1 LC	10x (nd)	0,29 0,31 0,29	0,30	1,0

Células transformadas e inducidas con 4B4 HC/hMAb TSHR1 LC	10x (850 ng/mL)	0,23 0,25 0,24	0,24	0,8
Células transformadas pero no inducidas con 4B4 HC/LC	10x (nd)	0,33 0,35 0,29	0,32	1,0
Células transformadas e inducidas con 4B4 HC/LC	10x (265 ng/mL)	0,40 0,38 0,32	0,37	1,2
hMAb TSHR1 IgG 1 ng/ml (hibridoma producido)		2,0 2,0 2,0	2,0	6,4

nd = no detectable; <sup>1,2,3</sup>véase pie de página de la Tabla 16

<sup>a</sup>La detección de la actividad de TSHR Ab en las células no inducidas se debió a la actividad constitutiva del promotor que producía bajos niveles de expresión en ausencia de IPTG.

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

Ensayo de las fracciones periplasmáticas				
Muestra de ensayo con adición de IgG 4B4 y <sup>125</sup> I-GAD	Dilución de la fracción periplasmática (PF) y (concentración total de Fab en la PF no diluida)		% de unión de <sup>125</sup> I-GAD	% de inhibición <sub>1</sub>
Regulador de ensayo GAD Ab			28	0
4B4F(ab') <sub>2</sub> 1 µg/ml (hibridoma 0,1 µg/ml producido) 0,01 µg/ml 0,001 µg/ml			5,5	80
			12	57
			24	14
			29	-3,9
Células no transformadas	4x		27	0,9
	8x	(nd)	28	-1,7
	16x		29	-6,3
Células no transformadas pero no inducidas con hMAb TSHR1 HC/LC	4x		28	-2,6
	8x	(177 ng/mL)	28	-0,5
	16x		28	-0,8
Células no transformadas e inducidas con hMAb TSHR1 HC/	4x		27	0,7
	8x	(364 ng/mL)	27	1,4
	16x		29	-4,2



Células no transformadas e inducidas con hMAb TSHR1 HC/4B4 LC	4x		28	-1,1
	8x	(nd)	28	-0,2
	16x		27	1,1
Células transformadas e inducidas con hMAb TSHR1 HC/4B4 LC	4x		28	-1,4
	8x	(83 ng/mL)	28	-0,7
	16x		28	-2,4
Células transformadas pero no inducidas con 4B4 HC/hMAb TSHR1 LC	4x		28	-2,9
	8x	(nd)	28	-3,2
	16x		28	-3,1
Células transformadas e inducidas con 4B4 HC/hMAb TSHR1 LC	4x		27	1,7
	8x	(850 ng/mL)	28	-0,2
	16x		28	-1,0
Células transformadas pero no inducidas con 4B4 HC/LC	4x		29	-4,4
	8x	(nd)	28	-1,5
	16x		27	1,7
Células transformadas e inducidas con 4B4 HC/LC	4x		21	23,2
	8x	(265 ng/mL)	24	12,5
	16x		26	5,6

<sup>1</sup>La inhibición of unión se calculó utilizando la fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - [A/B \times 100]$$

en donde A = unión de <sup>125</sup>I-GAD en presencia de la muestra de ensayo

B = unión de <sup>125</sup>I-GAD en presencia del regulador de ensayo. nd = no detectable

**Tabla 19. Inhibición de la unión de IgG 4B4 (un hibridoma de MA b humano producido para GAD) a <sup>125</sup>I-GAD por hMAb TSHR1 Fab recombinante, Fab 4B4 recombinante y Fab híbridos recombinantes (HC y LC mezclados de los dos Fab). Expresión en células HB2151 de *E. coli***

Ensayos de sobrenadantes de cultivo				
Muestra de ensayo con adición de 4B4 IgG and <sup>125</sup> I-GAD	Dilución del sobrenadante del cultivo y (concentración total de Fab en sobrenadante diluido)	% de unión de <sup>125</sup> I-GAD	% inhibición <sup>1</sup>	
Regulador de ensayo		26	0	
4B4F(ab') <sub>2</sub> 1 µg/ml		5,2	80	
(hibridoma 0,1 µg/ml		11	58	
producido) 0,01 µg/ml		22	15	
0,001 µg/ml		28	-5,2	
Células no transformadas HB2151	4x		28	-5,5
	8x	(nd)	29	-9,1
	16x		28	-6,3

Células transformadas pero no inducidas con hMAb TSHR1	4x□		28	-7,0
	8x	(nd)	29	-9,5
	16x		28	-5,2
Células transformadas e inducidas con hMAb TSHR1 HC/LC	4x□		28	-7,0
	8x	(421 ng/mL)	28	-6,4
	16x		28	-5,6
Células transformadas pero no inducidas con hMAb TSHR1 HC/4B4 LC	4x□		29	-9,0
	8x	(nd)	29	-7,9
	16x		28	-7,6
Células transformadas e inducidas con hMAb TSHR1 HC/4B4 LC	4x□		27	-2,2
	8x	(262 ng/mL)	28	-5,5
	16x		28	-5,1
Células transformadas pero no inducidas con 4B4 HC/hMAb TSHR1 LC	4x		28	-4,4
	8x	(nd)	28	-7,0
	16x		28	-5,5
Células transformadas e inducidas con 4B4 HC/hMAb TSHR1 LC	4x□		27	-2,0
	8x	(84 ng/mL)	28	-5,7
	16x		27	-2,5
Células transformadas pero no inducidas con 4B4 HC/LC	4x□		28	-4,8
	8x	(nd)	28	-4,8
	16x		27	-1,7
Células transformadas e inducidas con 4B4 HC/LC	4x□		11	59
	8x	(522 ng/mL)	14	46
	16x		17	34
<sup>1</sup> véase pie de página de la Tabla 18 nd = no detectable				

**Tabla 20. Efectos de anticuerpos monoclonales de ratón para el TSHR en la estimulación inducida por hMAb TSHR1 de la producción de AMP cíclico en células CHO que expresan al TSHR**

Muestra de ensayo <sup>1</sup>	pmol de AMP cíclico/pozo de células	Promedio de pmol AMP cíclico/pozo de células	DE	Estimulación <sup>2</sup> x basal
hMAb TSHR1 Fab 5 ng/mL más: -				
(a) Regulador	3,252			
(b) de ensayo <sup>1</sup>	2,418	2,835	-	3,9
	-			
(b) 2G2 <sup>3</sup>	4,278	3,595	0,496	4,9
	3,392			
	3,116			

ES 2 624 241 T3

(c) 2B4 <sup>4</sup>	3,320	2,939	0,286	4,0
	2,632			
	2,864			
(d) 9D33 <sup>4</sup>	0,506	0,443	0,047	0,61
	0,394			
	0,428			
Regulador de ensayo solo <sup>1</sup>	0,696	0,727	0,02	1
	0,742			
	0,742			
2G2 solo <sup>3</sup>	0,252	0,311	0,051	0,43
	0,306			
	0,376			
2B4 solo <sup>4</sup>	0,298	0,331	0,033	0,46
	0,318			
	0,376			
9D33 solo <sup>4</sup>	0,280	0,313	0,025	0,43
	0,318			
	0,340			
<p><sup>1</sup>Todas las diluciones se hicieron con el regulador de ensayo (solución salina regulada de Hanks (libre de NaCl) que contiene 1 g/L glucosa, 20 mmol/L de HEPES, 222 mmol/L de sacarosa, 15 g/L de albúmina de suero bovino (BSA) y 0,5 mmol/L de 2-isobutil-1-metil xantina pH 7,4)</p> <p><sup>2</sup>Basal = producción de AMP cíclico en presencia del regulador de ensayo únicamente.</p> <p><sup>3</sup>2G2 es un anticuerpo monoclonal de ratón para tiroglobulina (100 µg/mL de preparación de IgG)</p> <p><sup>4</sup>2B4 y 9D33 son anticuerpos monoclonales de ratón para el TSHR (100 µg/mL de preparaciones de IgG)</p>				

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

Muestra de ensayo <sup>1</sup>	pmol AMP cíclico/pozo de células	promedio pmol de AMP cíclico/pozo de células	SD	Estimulación <sup>2</sup> x basal
pTSH 0,5 ng/mL más: -				
(a) Regulador de ensayo <sup>1</sup>	4,016	3,91	0,91	11,5
	2,746			
	4,960			
(b) 2B4 <sup>4</sup>	0,878	0,78	0,07	2,3
	0,710			
	0,742			
(c) 9D33 <sup>4</sup>	0,436	0,43	0,01	1,3
	0,436			
	0,410			

Regulador de ensayo únicamente <sup>1</sup>	0,384	0,34	0,03	1
	0,318			
	0,318			
2B4 solo <sup>4</sup>	0,446	0,49	0,04	1,4
	0,486			
	0,552			
9D33 solo <sup>4</sup>	0,332	0,33	0,02	0,97
	0,362			
	0,304			

<sup>1,2,4</sup> Véase pie de página de la Tabla 20. En un experimento separado se mostró que un MAb de ratón de control para tiroglobulina (2G2 IgG 100 µg/mL) no tiene efecto sobre la estimulación de pTSH (0,5 ng/mL) de la producción de AMP cíclico (pTSH más regulador de ensayo = 12,7 x basal; pTSH más 2G2 = 11,7 x basal)

**Tabla 22. Inhibición de diversos MAb de unión de <sup>125</sup>I-TSH, <sup>125</sup>I-hMAb TSHR1 o <sup>125</sup>I-9D33 a tubos recubiertos con TSHR**

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

<sup>1</sup> Todas las diluciones se hicieron en una combinación de sueros de donantes sanos de sangre (HBD combinado)

<sup>2</sup> La inhibición de unión se calculó utilizando la fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - [A/B \times 100]$$

en donde A = % de unión en presencia de la muestra de ensayo.

B = % de unión en presencia de combinación de HBD

El MAb de ratón de control para tiroglobulina (2G2 0,001-100 µg/mL) no tuvo efecto sobre la unión de TSH marcada, hMAb TSHR1 o 9D33.

Tabla 23. Efecto de sueros de pacientes sobre la unión de <sup>125</sup>I-9D33 y la unión de <sup>125</sup>I-TSH a tubos recubiertos con TSHR

Ensayo de suero <sup>1</sup>	<sup>125</sup> I-9D33 unido (% total de recuentos adicionados)	Inhibición de unión <sup>2</sup> de <sup>125</sup> I-9D33 (%) <sup>2</sup>	Inhibición de unión de <sup>125</sup> I-TSH (%) <sup>2</sup>
Combinación de HBD	11	0	0
G1	2,2	79	90
G2	4,3	74	59
G3	3,2	69	78
G4	5,8	45	50
G5	4,0	62	78
G6	5,1	67	51
G7	5,9	44	74
G8	2,6	75	82
G9	2,0	81	90
G10	5,5	48	62
G11	3,1	62	59
G12	4,0	43	51
G13	6,0	50	59
G14	5,3	71	80
G15	3,1	77	98
G16	2,4	80	93
G17	2,1	84	94
G18	1,7	73	83
G19	2,9	80	94
G20	2,1	71	80
A1	10	1,9	0
A2	10	2,3	0
D1	11	0	0
D2	10	4,5	0
N1	12	-15	6,7
N2	7,9	25	4,1
N3	11	0	6,3
N4	11	-5,0	6,5
N5	9,1	14	6,3
N6	11	-2,1	7,2
N7	14	-37	-1,4
N8	11	-2,1	5,9
N9	12	-9,8	6,7

<sup>1</sup>Combinación de HBD = combinación de sueros de donantes sanos de sangre

G1-G20 son sueros de pacientes con la enfermedad de Graves □

D1 y D2 son pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (positiva for autoanticuerpos para ácido glutámico descarboxilasa)

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

N1-N9 son donantes sanos de sangre individuales □

<sup>2</sup>La inhibición de unión se calculó utilizando la fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - [A/B \times 100]$$

en donde A = % de unión en presencia de la muestra de ensayo.

B = % de unión en presencia de una combinación de sueros de donantes sanos de sangre

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

Muestra de ensayo y dilución <sup>1</sup>	125I-9D33 unido (% total de recuentos adicionados)	Inhibición de unión de <sup>125</sup> I-9D33 (%) <sup>2</sup>
Combinación de HBD	11	0
Suero A 1:320	6,4	39
1:160	4,7	55
1:80	3,3	69
1:40	2,8	73
1:20	2,4	77
1:10	2,0	82
Suero B 1:320	9,1	13
1:160	8,3	21
1:80	6,4	39
1:40	4,9	53
1:24	3,8	64
1:10	2,5	76
Suero C 1:320	9,7	7,6
1:160	8,9	15
1:80	8,0	24
1:40	6,3	40
1:20	5,1	51
1:10	3,7	65
Suero D 1:320	9,4	11
1:160	8,2	22
1:80	7,2	32
1:40	5,2	51
1:20	4,3	59
1:10	3,3	69

<sup>1</sup>Combinación de HBD = combinación de sueros de donantes sanos de sangre, Los sueros del ensayo se diluyeron en esta combinación, los sueros A y B tienen actividad antagonista de TSH, los sueros C D tienen actividad agonista de TSH

<sup>2</sup> La inhibición de unión se calculó con la fórmula utilizada en la Tabla 23

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

Concentración de 90/6721	<sup>125</sup> I-9D33 unido (% total de recuentos adicionados)	Inhibición de unión <sup>2</sup> de <sup>125</sup> I-9D33 (%)	Inhibición de unión <sup>2</sup> de <sup>125</sup> I-TSH (%)
40 U/L	4,1	72	92
8 U/L	7,1	52	68
2 U/L	11	28	23
1 U/L	13	10	12
0 U/L	15	0	0

<sup>1</sup>90/672 diluido en una combinación de sueros de donantes sanos de sangre

<sup>2</sup>La inhibición de unión se calculó con la fórmula usada en la Tabla 23

Tabla 26. Inhibición de la unión de <sup>125</sup>I-hMAb TSHR1 Fab a tubos recubiertos con TSHR por anticuerpos antiidiotípicos hMAb TSHR1 policlonales en sueros de ratones inmunizados con hMAb TSHR1 Fab

Muestra de ensayo	Dilución <sup>1</sup> de la muestra de ensayo	% de inhibición <sup>2</sup> de unión de <sup>125</sup> I-hMAb TSHR1 Fab a el TSHR
Regulador de ensayo		0

Sueros de un ratón inmunizado con hMAb TSHR1 Fab	1:100.000	1,3
	1:50.000	7,9
	1:10.000	49,8
	1:5.000	73,0
	1:1.000	94,8
Suero de ratón no inmunizado	1:500	-0,8

<sup>1</sup>Muestras de ensayo diluidas en el regulador de ensayo. La unión en presencia de regulador de ensayo fue de 43%

<sup>2</sup>La inhibición of unión se calculó utilizando la fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - [A/B \times 100]$$

en donde A = % de unión de <sup>125</sup>I-hMAb TSHR1 Fab en presencia de muestra de ensayo.

B = % de unión de <sup>125</sup>I-hMAb TSHR1 Fab en presencia de regulador de ensayo

**Tabla 27. Inhibición de la unión de <sup>125</sup>I-hMAb TSHR1 Fab a tubos recubiertos con TSHR por un anticuerpo antidiotípico monoclonal de ratón IgG 7E51**

Muestra de ensayo	% de unión de <sup>125</sup> I-hMAb TSHR1 Fab a el TSHR	% de inhibición <sup>1</sup> de unión de <sup>125</sup> I-hMAb TSHR1 Fab
Regulador de ensayo solo	16,3	0
7E51 IgG diluido en regulador de ensayo	1 µg/mL	14,5
	10 µg/mL	6,4
	100 µg/mL	1,7
Véase pie de página de la Tabla 26		

5

Listado de secuencias

- <110> RSR Limitada
- 10 <120> Compañeros de unión para el receptor de tirotrópina y sus usos
- <130> P452347WO
- 15 <150> GB 0227964.4
- <151> 2002-11-29
- 20 <150> GB 0302140.9
- <151> 2003-01-29
- <150> GB 0315147.9
- 25 <151> 2003-06-27
- <160> 38
- 30 <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 121
- 35 <212> PRT

ES 2 624 241 T3

<213> humano

<400> 1

5

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

<210> 2

10 <211> 5

<212> PRT

<213> humano

15

<400> 2

Ser Tyr Trp Ile Asn

20

1

5

<210> 3

<211> 17

25

<212> PRT

<213> humano

30 <400> 3

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

Gly

<210> 4



ES 2 624 241 T3

<211> 12  
<212> PRT  
5 <213> humano  
<400> 4  
10 Leu Glu Pro Gly Tyr Ser Ser Thr Trp Ser Val Asn  
1 5 10  
<210> 5  
<211> 131  
15 <212> PRT  
<213> humano  
20 <400> 5  
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
1 5 10  
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Arg Gly Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30  
Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Leu Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45  
Gly Arg Ile Asp Pro Thr Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe  
50 55 60  
Lys Gly His Val Thr Val Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Gly Met Tyr Tyr Cys  
85 90  
Ala Arg Leu Glu Pro Gly Tyr Ser Ser Thr Trp Ser Val Asn Trp Gly  
100 105 110  
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
115 120 125  
Val Phe Pro  
130  
25 <210> 6  
<211> 111  
30 <212> PRT  
<213> humano  
<400> 6  
35

ES 2 624 241 T3

Leu Thr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Arg Gln  
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Asn Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn  
20 25 30

Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Tyr Asp Asp Gln Leu Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Arg Gly Leu Gln  
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Thr Ser Trp Asp Asp Ser Leu  
85 90 95

Asp Ser Gln Leu Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

<210> 7

5 <211> 13

<212> PRT

<213> humano

10 <400> 7

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

15 <210> 8

<211> 7

<212> PRT

20 <213> humano

<400> 8

Tyr Asp Asp Gln Leu Pro Ser  
1 5

25 <210> 9

<211> 11

30 <212> PRT

<213> humano

35 <400> 9

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

ES 2 624 241 T3

<210> 10  
 <211> 363  
 5 <212> ADN  
 <213> humano  
 <400> 10  
 10 **caaatgcāgc** tggcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60  
 tcctgtaggg gttctggata caggtttacc agctactgga tcaactgggt gcgccagctg 120  
 cccgggaaag gcctagagtg gatgggcagg attgatccta ctgactctta taccaactac 180  
 agtccatcct tcaaaggcca cgtcaccgtc tcagctgaca agtccatcaa cactgcctac 240  
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accggcatgt attactgtgc gaggctcgaa 300  
 ccgggctata gcagcacctg gtccgtaaāt tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360  
**tca** 363  
 <210> 11  
 15 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> humano  
 20 <400> 11  
 agctactgga tcaac 15  
 25 <210> 12  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 30 <213> human  
 <400> 12  
 35 aggattgac tctactgact ttataccaac tacagtccat cctcaaagg c 51  
 <210> 13  
 <211> 36  
 40 <212> ADN  
 <213> human  
 <400> 13  
 ctcgaaccgg gctatagcag cacctgtcc gtaaat 36  
 50 <210> 14  
 <211> 394  
 <212> ADN

ES 2 624 241 T3

<213> human  
 <400> 14  
 5 caaatgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60  
 tcctgtaggg gttctggata caggtttacc agctactgga tcaactgggt gcgccagctg 120  
 cccgggaaag gcctagagtg gatgggcagg attgatccta ctgactctta taccaactac 180  
 agtccatcct tcaaaggcca cgtcaccgtc tcagctgaca agtccatcaa cactgcctac 240  
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accggcatgt attactgtgc gaggctcgaa 300  
 ccgggctata gcagcacctg gtccgtaaat tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360  
 tcagcctcca ccaagggcc atcggctctc cccc 394

10 <210> 15  
 <211> 333  
 <212> ADN  
 15 <213> humano  
 <400> 15  
 ctgcctgtgc tgactcagcc accctcgggtg tctggagccc ccaggcagag ggtcaccatc 60  
 tcctgttctg gaaacagctc caacatcgga aataatgctg taaactggta ccagcagctc 120  
 ccaggaaagg ctcccaaact cctcatttat tatgatgatc aactgccctc aggggtctct 180  
 gaccgattct ctggctccag gtctggcacc tccgcctccc tggccatccg tgggctccag 240  
 tctgaggatg aggctgatta ttactgtaca tcatgggatg acagcctgga tagtcaactg 300  
 20 ttcggcggag ggaccaggct gaccgtccta ggt 333

<210> 16  
 <211> 39  
 25 <212> ADN  
 <213> humano  
 30 <400> 16  
 tctggaaaca gctccaacat cggaaataat gctgtaaac 39

<210> 17  
 35 <211> 21  
 <212> ADN  
 40 <213> humano  
 <400> 17  
 45 tatgatgatc aactgccctc a 21

ES 2 624 241 T3

<210> 18  
 <211> 33  
 5 <212> ADN  
 <213> humano  
 <400> 18  
 10 acatcatggg atgacagcct ggatagtaa ctg 33  
 <210> 19  
 15 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> ratón  
 20 <400> 19

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

<210> 20  
 <211> 5  
 30 <212> PRT  
 <213> ratón  
 35 <400> 20

Thr Tyr Trp Met His  
 1 5  
 <210> 21

ES 2 624 241 T3

<211> 17  
<212> PRT  
5 <213> ratón  
<400> 21  
10 **Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys**  
**1 5 10 15**  
**Gly**  
15 <210> 22  
<211> 10  
<212> PRT  
20 <213> ratón  
<400> 22  
25 **Asn Tyr Gly Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr**  
**1 5 10**  
30 <210> 23  
<211> 124  
<212> PRT  
<213> ratón  
<400> 23  
35 **Asp Val Gln Ile Gln Gln Pro Gly Thr Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala**  
**1 5 10 15**

ES 2 624 241 T3

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

<210> 24

5 <211> 106

<212> PRT

<213> ratón

10

<400> 24

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

15 <210> 25

<211> 10

ES 2 624 241 T3

<212> PRT

<213> ratón

5 <400> 25

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

<210> 26

10

<211> 7

<212> PRT

15 <213> ratón

<400> 26

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser  
1 5

20

<210> 27

<211> 9

25 <212> PRT

<213> ratón

<400> 27

30

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
1 5

<210> 28

35 <211> 110

<212> PRT

<213> ratón

40

<400> 28



ES 2 624 241 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 29

5 <211> 357

<212> ADN

<213> ratón

10

<400> 29

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

15 <210> 30

<211> 15

<212> ADN

20

<213> ratón

<400> 30

25 acctactgga tgcac 15

<210> 31

<211> 51

30

<212> ADN

ES 2 624 241 T3

<213> ratón  
 <400> 31  
 5 gagattgac cttctgatag ttatactaac tataatcaaa agttcaaggg c 51  
 <210> 32  
 10 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> ratón  
 15 <400> 32  
 aactacggta gtggctacta cttgactac 30  
 20 <210> 33  
 <211> 373  
 <212> ADN  
 25 <213> ratón  
 <400> 33  
 gacgtccaga tccagcagcc tgggactgag cttgtgaagc ctggggcttc agtgagactg 60  
 tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc acctactgga tgcactgggt gaagcagagg 120  
 cctggacaag gccttgagtg gatcggagag attgatcctt ctgatagtta tactaactat 180  
 aatcaaaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240  
 atgcacctca gcagcctgac atctgaggac tctgCGgtct attactgttc aagaaactac 300  
 ggtagtggct actactttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctcctcagcc 360  
 30 aaaacaacac ccc 373  
 <210> 34  
 <211> 318  
 35 <212> ADN  
 <213> ratón  
 40 <400> 34  
 ggcgttgaga tgacacagtc gccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60  
 atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgcact ggtaccagca gaagtcaggc 120  
 acctccccca aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcgc 180  
 ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcaaa tcagcagcat ggagactgaa 240  
 gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtagtaacc cgtggacggt cggtggaggc 300  
 accaaactgg aaatcaaa 318

ES 2 624 241 T3

<210> 35  
 <211> 318  
 5 <212> ADN  
 <213> ratón  
 <400> 35  
 10 agtgccagct caagtgaag ttacatgcac 30  
 <210> 36  
 15 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> ratón  
 20 <400> 36  
 gacacatcca aactggcttc t 21  
 25 <210> 37  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 30 <213> ratón  
 <400> 37  
 35 cagcagtgga gtagtaacct gtggacg 27  
 <210> 38  
 <211> 331  
 40 <212> ADN  
 <213> ratón  
 45 <400> 38  
**ggcgttgaga tgacacagtc gccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60**  
**atgacctgca gtgccagctc aagtgaagt tacatgcact ggtaccagca gaagtcaggc 120**  
**acctcccca aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcgc 180**  
**ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagcagcat ggagactgaa 240**  
**gatgctgcca cttattactg ccagcagtggt agtagtaacc cgtggacggt cggtggaggc 300**  
**accaaactgg aatcaaacg gctgatgctg c 331**

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de cribado para autoanticuerpos para el receptor de la TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto sospechoso de padecer de, que es susceptible a, que tiene o se recupera de, una enfermedad autoinmune asociada con una reacción inmune al receptor de TSH, comprendiendo dicho procedimiento:
- 5
- (a) Proporcionar uno o más pares de moléculas de unión, en las que una primera molécula de dicho par de unión comprende un anticuerpo monoclonal o recombinante humano, o uno o más fragmentos del mismo, reactivo con el receptor de TSH, o un anticuerpo adicional o fragmento del mismo para el receptor de TSH que compite por la unión
- 10 al receptor de TSH con dicho anticuerpo monoclonal o recombinante humano o fragmento del mismo, en en el que dicha primera molécula se **caracteriza** por una actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH marcada con <sup>125</sup>I al receptor de TSH determinado utilizando tubos recubiertos con receptor de TSH de al menos 15 unidades de estándar internacional NIBSC 90/672 por mg; y una segunda molécula de dicho par de unión es un receptor de TSH de longitud completa, uno o más epítomos de un receptor de TSH o un polipéptido que comprende uno o más epítomos de un receptor de TSH;
- 15
- (b) poner en contacto dicha muestra con dichos uno o más pares de moléculas de unión para permitir que dicha segunda molécula de dicho par de unión interactúe bien con (i) autoanticuerpos para el receptor de la TSH presente en dicha muestra, o (ii) con dicho anticuerpo monoclonal o recombinante humano o uno o más fragmentos del mismo, o dicho anticuerpo adicional o fragmento del mismo para el receptor de la TSH, y
- 20
- (c) controlar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión con dichos anticuerpos presentes en dicha muestra, proporcionando así una indicación de la presencia de dichos autoanticuerpos para el receptor de la TSH en dicha muestra.
- 25
2. Un procedimiento *in vitro* para ensayar TSH y ligandos relacionados, comprendiendo dicho procedimiento:
- (a) proporcionar una muestra sospechosa de contener, o que contenga TSH o ligandos relacionados;
- 30
- (b) proporcionar uno o más pares de moléculas de unión, en el que una primera molécula de dicho par de unión comprende un anticuerpo monoclonal o recombinante humano o uno o más de sus fragmentos, reactivo con el receptor de TSH, o un anticuerpo adicional o fragmento del mismo para el receptor de la TSH y que compite por la unión al receptor de TSH con dicho anticuerpo monoclonal o recombinante humano o fragmento del mismo, en en el que dicha primera molécula se **caracteriza por** una actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH marcada con <sup>125</sup>I al receptor de TSH determinado usando tubos recubiertos con receptor de TSH de al menos 15 unidades de estándar internacional NIBSC 90/672 por mg; y una segunda molécula de dicho par de unión es un receptor de TSH de longitud completa, uno o más epítomos de un receptor de TSH o un polipéptido que comprende uno o más epítomos de un receptor de TSH;
- 35
- (c) poner en contacto dicha muestra con dichos uno o más pares de moléculas de unión para permitir que dicha segunda molécula de dicho par de unión interactúe ya sea con (i) TSH o ligandos relacionados presentes en dicha muestra, o (ii) dicho anticuerpo monoclonal o recombinante humano, o uno o más fragmentos del mismo, o dicho anticuerpo adicional o fragmentos del mismo para el receptor de TSH y;
- 40
- (d) controlar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión con TSH o ligandos relacionados presentes en dicha muestra, proporcionando así una indicación de la presencia de TSH o ligandos relacionados en dicha muestra.
- 45
3. Un kit para cribar autoanticuerpos para el receptor de TSH en una muestra de fluido corporal obtenida de un sujeto sospechoso de sufrir de, ser susceptible a, que tiene o se recupera de una enfermedad autoinmune asociada con una reacción inmune al receptor de TSH, comprendiendo dicho kit:
- 50
- (a) uno o más pares de moléculas de unión, en en el que una primera molécula de dicho par de unión comprende un anticuerpo monoclonal o recombinante humano o uno o más fragmentos del mismo, reactivo con el receptor de TSH, o un anticuerpo adicional o fragmento del mismo para el receptor de TSH y que compite por la unión al receptor de TSH con dicho anticuerpo monoclonal o recombinante humano o fragmento del mismo, en en el que dicha primera molécula se **caracteriza por** una actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH marcada con <sup>125</sup>I al receptor de TSH determinada usando tubos recubiertos con receptor de TSH de al menos 15 unidades de estándar internacional NIBSC 90/672 por mg; y una segunda molécula de dicho par de unión es un receptor de TSH de longitud completa, uno o más epítomos de un receptor de TSH o un polipéptido que comprende uno o más epítomos de un receptor de TSH;
- 55
- (b) medios para poner en contacto dicha muestra de fluido corporal de dicho sujeto, con dichos uno o más pares de moléculas de unión para permitir que dicha segunda molécula de dicho par de unión interactúe ya sea con (i) autoanticuerpos para el receptor de la TSH presente en dicha muestra, o (ii) dicho anticuerpo monoclonal o recombinante, o uno o más fragmentos del mismo, o dicho anticuerpo adicional o fragmento del mismo para el
- 60
- 65

receptor de TSH; y

(c) medios para controlar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión con dichos autoanticuerpos presentes en dicha muestra, proporcionando de este modo una indicación de la presencia de dichos autoanticuerpos al receptor de la TSH en dicha muestra.

4. Un kit de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la primera molécula de dicho par de unión comprende un anticuerpo monoclonal o recombinante humano para el receptor de TSH o fragmento del mismo, que tiene una afinidad por el receptor de TSH de  $10^{10}$  molar<sup>-1</sup> o mayor.

5. Un kit para ensayar TSH o ligandos relacionados, comprendiendo dicho kit:

(a) uno o más pares de moléculas de unión, en el que una primera molécula de dicho par de unión comprende un anticuerpo monoclonal humano o uno o más fragmentos del mismo, reactivos con el receptor de TSH, o un anticuerpo adicional o un fragmento del mismo, para el receptor de TSH y que compite por la unión al receptor de TSH con dicho anticuerpo monoclonal o recombinante humano o fragmento del mismo en el que dicha primera molécula se **caracteriza** por una actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH marcada con <sup>125</sup>I al receptor de TSH determinada usando tubos recubiertos con receptor de TSH de al menos 15 unidades de estándar internacional NIBSC 90/672 por mg; y una segunda molécula de dicho par de unión es un receptor de TSH de longitud completa, uno o más epítomos de un receptor de TSH o un polipéptido que comprende uno o más epítomos de un receptor de TSH;

(b) medios para poner en contacto una muestra sospechosa de contener o que contiene TSH o ligandos relacionados con dichos uno o más pares de moléculas de unión para permitir que dicha segunda molécula de dicho par de unión interactúe ya sea con (i) TSH o ligandos relacionados presentes en dicha muestra, o (ii) anticuerpo monoclonal o recombinante humano, o uno o más fragmentos de los mismos, o dicho anticuerpo adicional o fragmentos de los mismos para el receptor de TSH y;

(c) medios para controlar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión con TSH o ligandos relacionados presentes en dicha muestra, proporcionando así una indicación de la presencia de TSH o ligandos relacionados en dicha muestra.

6. Un kit para identificar un anticuerpo adicional o fragmento del mismo para el receptor de TSH, cuyo anticuerpo adicional o fragmento del mismo es capaz de unirse al receptor de TSH y que compite por la unión al receptor de TSH con un anticuerpo monoclonal o recombinante humano o uno o más fragmentos de los mismos, reactivos con el receptor de TSH, en el que dicho kit comprende:

(a) uno o más pares de moléculas de unión, en el que una primera molécula de dicho par de unión comprende un anticuerpo monoclonal o recombinante humano o fragmento del mismo para el receptor de TSH, en el que dicha primera molécula se **caracteriza** por una actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH marcada con <sup>125</sup>I al receptor de TSH determinado usando tubos recubiertos con receptor de TSH de al menos 15 unidades de estándar internacional NIBSC 90/672 por mg; y una segunda molécula de dicho par de unión es un receptor de TSH de longitud completa, uno o más epítomos de un receptor de TSH o un polipéptido que comprende uno o más epítomos de un receptor de TSH;

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

(c) medios para controlar la interacción de dicha segunda molécula de dicho par de unión de (a) con dicha molécula de unión adicional y, de este modo, evaluar si dicha molécula de unión adicional compite por la unión al receptor de TSH con dicha primera molécula de dicho par de unión de (a).

7. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 o un kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que el anticuerpo monoclonal o recombinante humano o uno o más de sus fragmentos se **caracteriza** por una actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH marcada con <sup>125</sup>I al receptor de TSH determinado usando tubos recubiertos con receptor de TSH, de al menos 30 unidades de estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o en el que la actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH marcada con <sup>125</sup>I al receptor de TSH es de al menos 120 unidades de estándar internacional NIBSC 90/672 por mg.

8. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 o un kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que el anticuerpo monoclonal o recombinante humano o uno o más de sus fragmentos se **caracteriza** por una actividad estimuladora con respecto a la producción de cAMP por células CHO que expresan aproximadamente 50.000 receptores de TSH humanos por célula de al menos 30 unidades de

estándar internacional NIBSC 90/672 por mg, o en el que la actividad estimuladora con respecto a la producción de cAMP por células CHO que expresan aproximadamente 50.000 receptores de TSH por célula es de al menos 240 unidades de estándar internacional NIBSC estándar 90/672 por mg.

5 9. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 o un kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que el anticuerpo monoclonal o recombinante humano o uno o más de sus fragmentos se **caracteriza** por:

10 (a) una actividad inhibidora con respecto a la unión de TSH marcada con <sup>125</sup>I al receptor de TSH, determinada usando tubos recubiertos con receptor de TSH, de al menos 30 unidades de estándar internacional NIBSC 90/672 por mg; y

15 (b) una actividad estimuladora con respecto a la producción de cAMP por células CHO que expresan aproximadamente 50.000 receptores de TSH humanos por célula de al menos 50 unidades de estándar internacional NIBSC 90/672 por mg.

20 10. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 o un kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 5 o 6, en el que el anticuerpo adicional o fragmento del mismo comprende las características definidas para el anticuerpo monoclonal o recombinante humano en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 5 a 6.

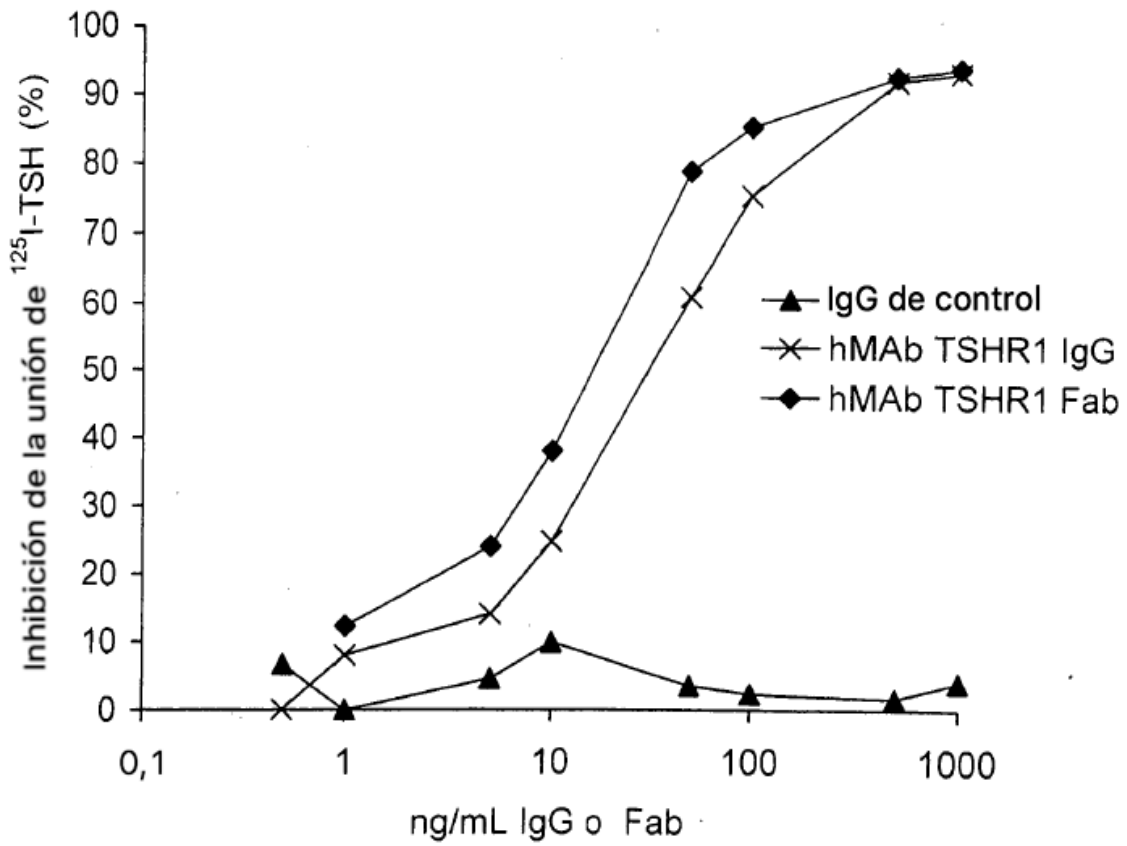


Figura 1 Inhibición de la unión de TSH marcada a tubos recubiertos con TSHR por hMAb TSHR1 IgG y Fab. La IgG de control era un autoanticuerpo monoclonal humano para GAD<sub>65</sub>

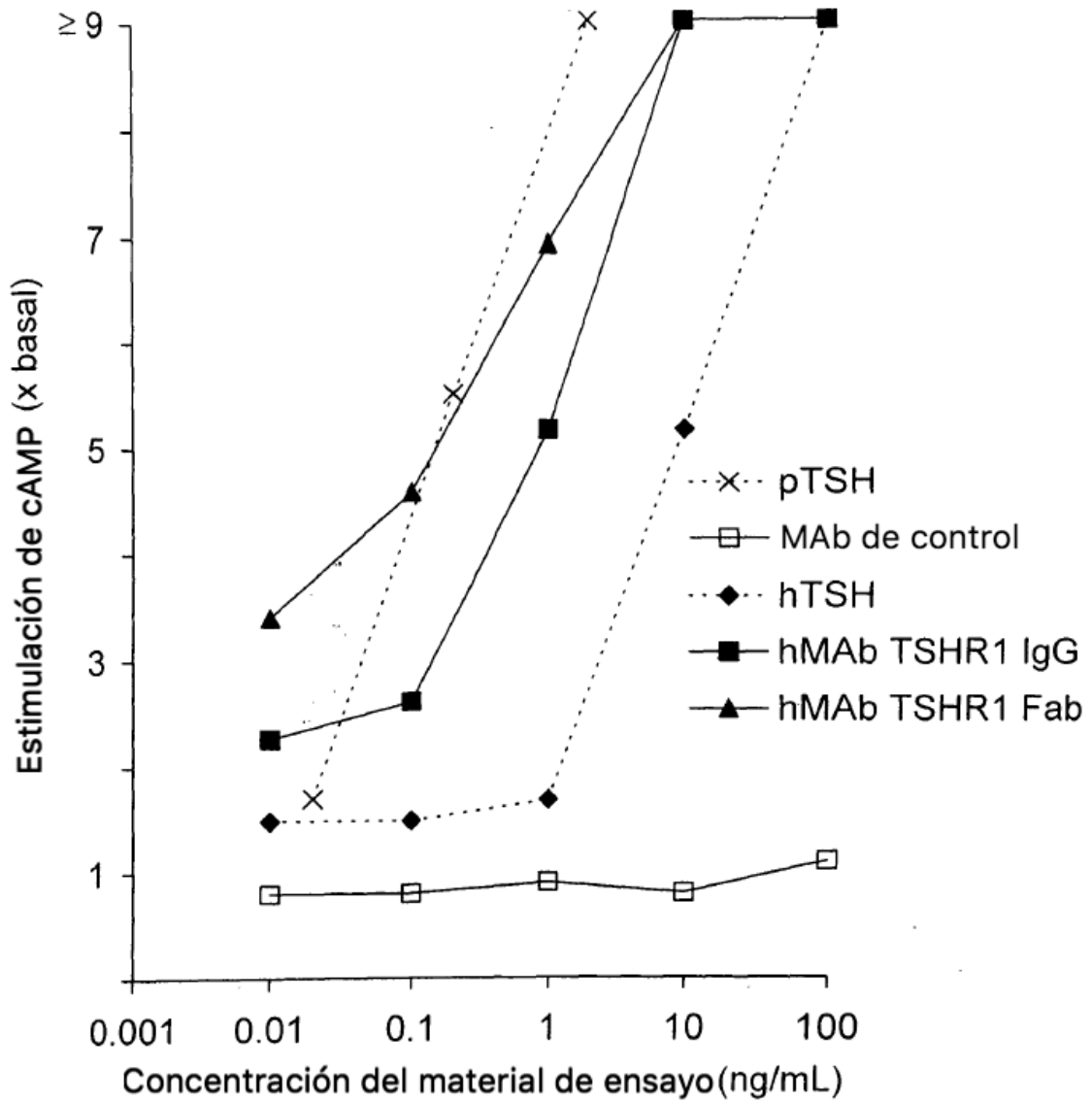
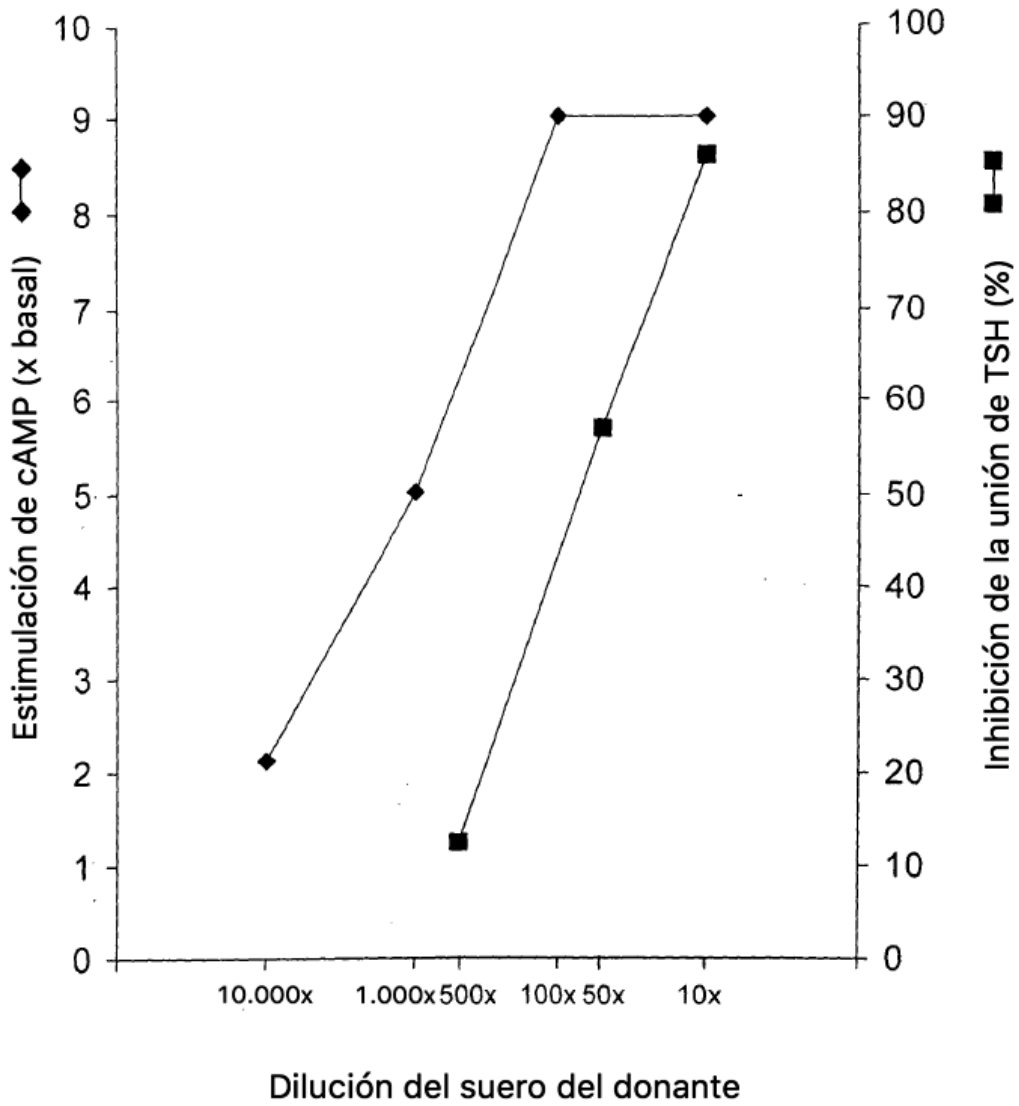


Figura 2. Actividad de estimulación de la tiroides de hMAb TSHR1 IgG y Fab, TSH de porcino (70 unidades/mg; pTSH), TSH humana recombinante (6,7 unidades/mg; hTSH) y anticuerpo monoclonal de control (MAb: un autoanticuerpo monoclonal humano para peroxidasa de tiroides (2G4)). Basal = cMAP producida en presencia únicamente de solución salina regulada de Hanks libre de NaCl





**Figura 3** Efecto del suero del donante de linfocitos sobre la inhibición de la unión de TSH al TSHR y sobre la estimulación de AMP cíclico en células CHO transfectadas con TSHR. En el caso del ensayo de inhibición de la unión se diluyó el suero en una combinación de sueros del donante sano de sangre. Para el ensayo de estimulación, se diluyó el suero en solución salina regulada de Hanks libre de NaCl. Los sueros de donantes sanos de sangre (n = 3) produjeron respuestas en el intervalo de 1,1-1,3 x basal

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

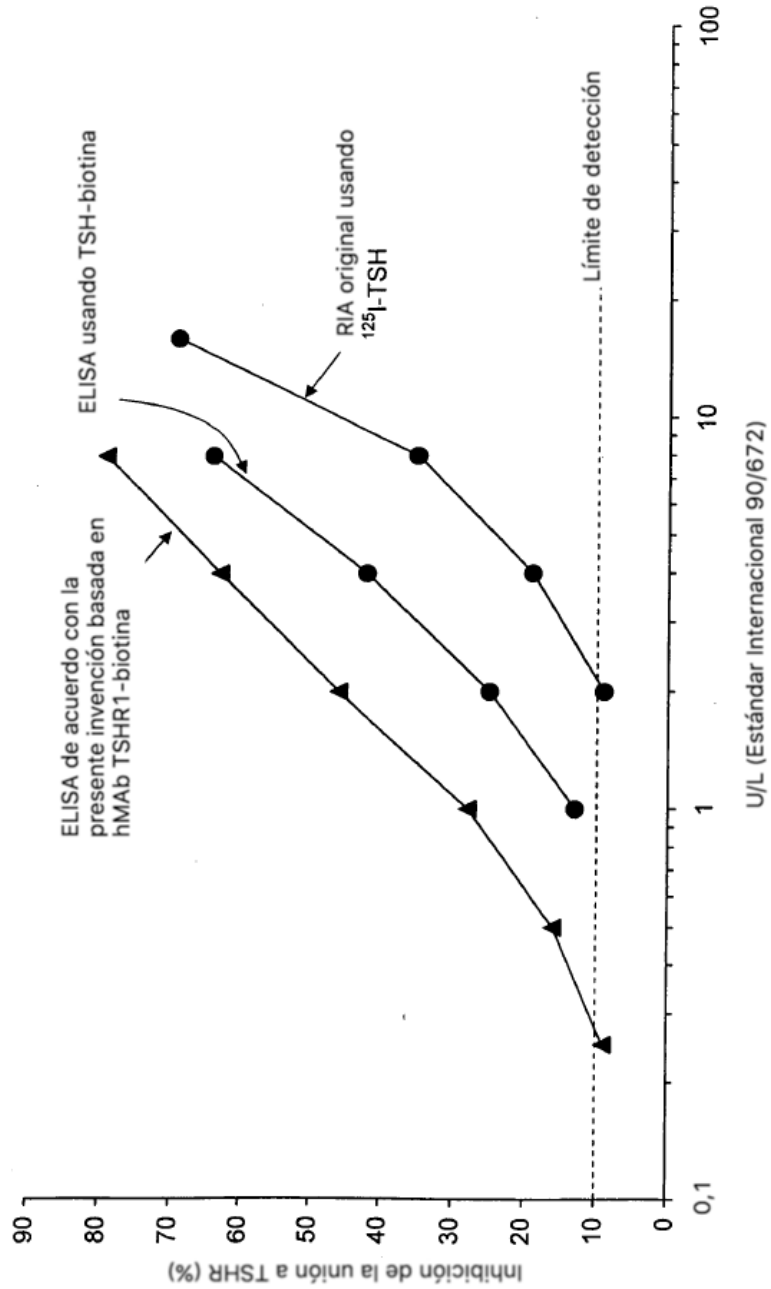


Figura 3b Comparación de un ELISA para autoanticuerpos de TSHR de acuerdo con la presente invención y un ELISA basado en TSH-biotina descrito por: J Bolton, J Sanders, Y Oda, C Chapman, R Konno, J Furmaniak, B Rees Smith. "Measurement of thyroid-stimulating hormone receptor autoantibodies by ELISA."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

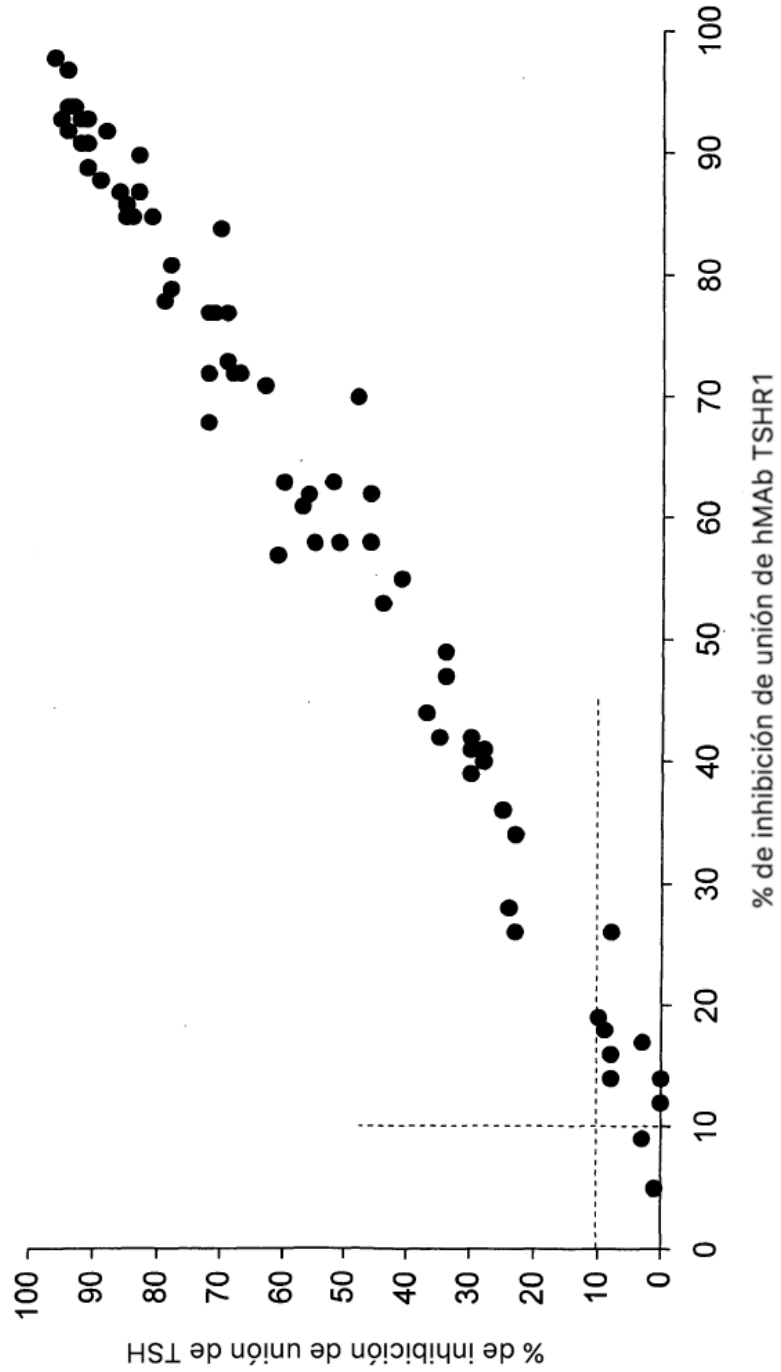


Figura 4 Secuencia de nucleótidos de la región V, D y J de cadena pesada de hMAb TSHR1

Figura 4a

caaatgcagctggtgcagctctggagcagaggtgaaaaagcccggggagtc  
tctgaagatctcctgtaggggttctggatacaggtttaccagctactgga  
tcaactgggtgcgccagctgcccgggaaaggcctagagtggtatgggcagg  
attgatcctactgactcttataccaactacagtccatccttcaaaggcca  
cgtcaccgtctcagctgacaagtccatcaacactgctacctgcagtgga  
gcagcctgaaggcctcggacaccggcatgtattactgtgcgaggctcgaa  
ccgggctatagcagcacctggtccgtaaattggggccagggaaaccctggt  
caccgtctcctcagcctccaccaagggcccatcggtcttcccc

Figura 4b

caaatgcagctggtgcagctctggagcagaggtgaaaaagcccggggagtc 50  
 Cebador de PCR  
 tctgaagatctcctgtaggggttctggatacaggtttacc**agctactgga** 100  
 CDR I  
**teaact**gggtgcgccagctgcccggaaggcctagagtggatggc**agg** 150  
 CDR II  
**attgatcctactgactcttataccaactacagtecatccttcaaaggcca** 200  
 cgtcaccgtctcagctgacaagtcacatcaacactgcctacctgcagtgga 250  
 gcagcctgaaggcctcggacaccggcatgtattactgtgcgagg**ctcgaa** 300  
 CDR III  
**ccgggtatagcagcacctggccgtaaat**tggggccaggaaccctggt 350  
 región constante  
 caccgtctcctcag**ccctccaccaagggcccatcggtcttcccc** 394

Figura 5 Secuencia de aminoácidos de la región V, D y J de cadena pesada de HMAb TSHR1

Figura 5a

QVQLVQSGAEVKKKPGESLKISCRGSGYRFTSYWINWVRQLPGKGLEWMGR  
 IDPTDSYTNYSFSGHVTVSADKSIINTAYLQWSSLKASDTGMYICARLE  
 PGYSSTWSVNWGQGLVTVSSASTKGPSVFP

Figura 5b

QVQLVQSGAEVKKKPGESLKISCRGSGYRFTSYWINWVRQLPGKGLEWMGR	50
CDR I	
EDPTDSYTNYSFSGHVTVSADKSIINTAYLQWSSLKASDTGMYICARLE	100
CDR II	
PGYSSTWSVNWGQGLVTVSSASTKGPSVFP	131
CDR III	
región constante	

Figura 6 Secuencia de ADN de cadena ligera de hMAb TSHR1

Figura 6a

ctgcctgtgctgactcagccaccctcgggtgtctggagccccaggcagag  
 ggtcaccatctcctgttctggaaacagctccaacatcggaaataatgctg  
 taaactggtaccagcagctcccaggaaaggctcccaaactcctcatttat  
 tatgatgatcaactgcctcaggggtctctgaccgattctctggctccag  
 gtctggcacctccgcctcctggccatccgtgggctccagtctgaggatg  
 aggctgattattactgtacatcatgggatgacagcctggatagtcaactg  
 ttcggcggaggaccaggctgaccgtcctaggt

Figura 6b

ctgcctgtgctgactcagccaccctcgggtgtctggagccccaggcagag	50
<b>Cebador de PCR</b>	
ggtcaccatctcctgttctggaaacagctccaacatcggaaataatgctg	100
<b>CDR I</b>	
taaactggtaccagcagctcccaggaaaggctcccaaactcctcatttat	150
tatgatgatcaactgcctcaggggtctctgaccgattctctggctccag	200
<b>CDR II</b>	
gtctggcacctccgcctcctggccatccgtgggctccagtctgaggatg	250
aggctgattattactgtacatcatgggatgacagcctggatagtcaactg	300
<b>CDR III</b>	
ttcggcggaggaccaggctgaccgtcctaggt	333

Figura 7 Secuencia de proteína de cadena ligera de hMAb TSHR1

Figura 7a

LTVLTQPPSVSGAPRQRVTISCSGNSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIY  
 YDDQLPSGVSDRFGSRSGTSASLAIRGLQSEDEADYYCTSWDDSLDSQL  
 FGGGTRLTVLG

Figura 7b

LTVLTQPPSVSGAPRQRVTISCS	SGNSSNIGNNAVN	WYQQLPGKAPKLLIY	50
	CDR I		
YDDQLPS	GVSDRFGSRSGTSASLAIRGLQSEADYYC	TSWDDSLDSQL	100
CDR II		CDR III	
FGGGTRLTVLG			111



Figura 8 Efectos de los sueros de 2 pacientes (T1 y T2 con actividad de antagonista de TSH) en la producción de AMP cíclico en células CHO transfectadas con el TSHR por pTSH (0,5 ng/mL) y hMAb TSHR1 IgG (10 ng/mL) y Fab (5 ng/mL)

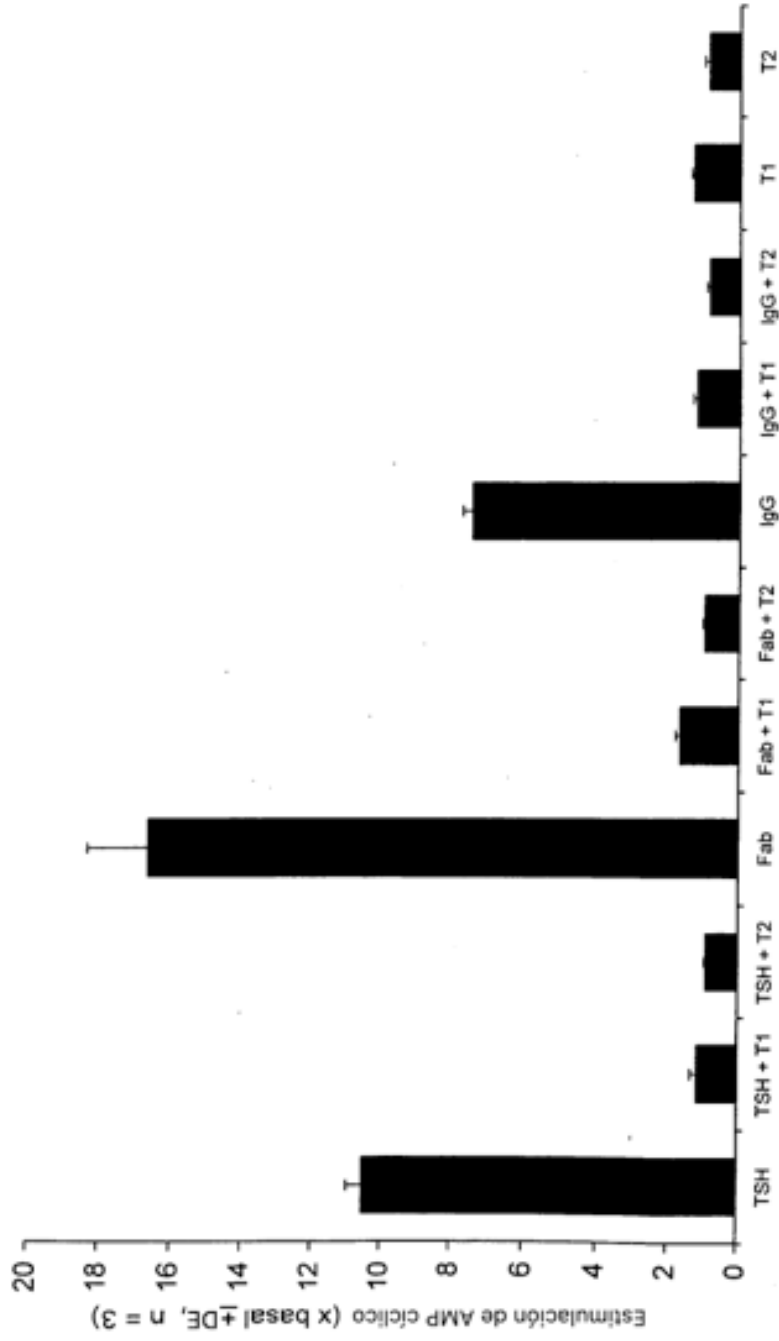


Figura 9 Secuencia de nucleótidos de cadena pesada 9D33

Figura 9a

gacgtccagatccagcagcctgggactgagcttgtgaagcctggggcttc  
agtgagactgtcctgcaaggcttctggctacacctcaccacctactgga  
tgactgggtgaagcagaggcctggacaaggccttgagtggatcggagag  
attgatccttctgatagttataactaactataatcaaaagttcaagggcaa  
ggccacattgactgtagacaaatcctccagcacagcctacatgcacctca  
gcagcctgacatctgaggactctgcggtctattactgttcaagaaactac  
ggtagtggctactactttgactactggggccaaggcaccactctcacagt  
ctcctcagccaaaacaacacccc

Figura 9b

gacgtccagatccagcagcctgggactgagcttgtgaagcctggggcttc 50  
 cebador de PCR

agtgagactgtcctgcaaggcttctggctacaccttcaccacctactgga 100  
 CDR I

tgcactgggtgaagcagaggcctggacaaggccttgagtggatcggaag 150  
 CDR II

attgatccttctgatagttataactataatcaaagtccaagggc 200  
 aa

ggccacattgactgtagacaaatcctccagcacagcctacatgcacctca 250

gcagcctgacatctgaggactctgcggtctattactgttcaagaactac 300  
 CDR III

ggtagtggctactacttgactactggggccaaggcaccactctcacagt 350

ctctcagccaaaacaacacccc 373  
 región constante

Figura 10 Secuencia de aminoácidos de cadena pesada 9D33

Figura 10a

DVQIQQPGTELVKPGASVRLSCKASGYTFTTYWMHWVKQRPGQGLEWIGE

IDPSDSYTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCSRNY

GSGYYFDYWGQGTTLTVSSAKTTP

Figura 10b

DVQIQQPGTELVKPGASVRLSCKASGYTF	<b>TYWMH</b>	WVKQRPGQGLEWIGE	50
Cebador de PCR	CDRT		
<b>IDPSDSYTNYNQKFKG</b>	KATLTVDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCSR	<b>NY</b>	100
CDR II		CDR III	
<b>GSGYYFDY</b>	WGQGTTLTVSS	<b>AKTTP</b>	124
	región constante		

Figura 11 Secuencia de nucleótidos de cadena ligera 9D33

Figura 11a

ggcgttgagatgacacagtcgccagcaatcatgtctgcatctccagggga  
 gaaggtcaccatgacctgcagtgccagctcaagtgtaagttacatgcaact  
 ggtaccagcagaagtcaggcacctccccaaaagatggatttatgacaca  
 tccaaactggcttctggagtcctgctcgcttcagtggcagtgggctctgg  
 gacctttactctctcacaatcagcagcatggagactgaagatgctgcca  
 ctattactgccagcagtgagtagtaaccctggacgttcggtggagggc  
 accaaactggaaatcaaacggctgatgctgc

Figura 11b

ggcgttgagatgacacagtcgccagcaatcatgtctgcatctccagggga	50
Cebador de PCR	
gaaggtcaccatgacctgcagtgccagctcaagtgtaagttacatgcaact	100
CDR I	
ggtaccagcagaagtcaggcacctccccaaaagatggatttatgacaca	150
CDR II	
tccaaactggcttctggagtcctgctcgcttcagtggcagtgggctctgg	200
gacctttactctctcacaatcagcagcatggagactgaagatgctgcca	250
CDR III	
cttattactgcagcagtgagtagtaaccctggacgttcggtggagggc	300
accaaactggaaatcaaacggctgatgctgc	331
región constante	

Figura 12 Secuencia de aminoácidos de cadena ligera 9D33

Figura 12a

GVEMTQSPAIMSASPGEKVTMTC**SASSSVSYMH**WYQKSGTSPKRWIYDT  
 SKLASGVPARFSGSGSGTSSYSLT**ISSMETEDAATYYCQQWSSNPWT**FGGG  
 TKLEIKRLML

Figura 12b

GVEMTQSPAIMSASPGEKVTMTC <b>SASSSVSYMH</b> WYQKSGTSPKRWIY <b>DT</b>	50
Cebador de PCR	
	CDR I
<b>SKLAS</b> GVPARFSGSGSGTSSYSLT <b>ISSMETEDAATYYC</b> <b>QQWSSNPWT</b> FGGG	100
CDR II	CDR III
TKLEIK <b>RLML</b>	110
región constante	