

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5117853号
(P5117853)

(45) 発行日 平成25年1月16日(2013.1.16)

(24) 登録日 平成24年10月26日(2012.10.26)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C O 7 K 14/72	(2006.01)	C O 7 K 14/72	
C 1 2 N 1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21	

請求項の数 28 (全 140 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-525337 (P2007-525337)
 (86) (22) 出願日 平成17年8月3日(2005.8.3)
 (65) 公表番号 特表2008-515387 (P2008-515387A)
 (43) 公表日 平成20年5月15日(2008.5.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2005/003040
 (87) 国際公開番号 W02006/016121
 (87) 国際公開日 平成18年2月16日(2006.2.16)
 審査請求日 平成20年6月17日(2008.6.17)
 (31) 優先権主張番号 0418181.4
 (32) 優先日 平成16年8月13日(2004.8.13)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 507044468
 アールエスアール リミテッド
 イギリス国, カーディフ シーエフ23
 8エイチイー, ペントウィン, アヴェニュー
 ー・パーク (番地なし)
 (74) 代理人 100070150
 弁理士 伊東 忠彦
 (74) 代理人 100091214
 弁理士 大貫 進介
 (74) 代理人 100107766
 弁理士 伊東 忠重

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 甲状腺刺激ホルモンレセプター試料、該甲状腺刺激ホルモンレセプターの結合部位、抗体及び該結合部位とのホルモンの相互作用、およびそれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも1つの点突然変異を含む変異型TSHR試料であって、完全長のヒトTSHRのアミノ酸255に対応する位置の少なくともアミノ酸Argが、負に帯電したアミノ酸残基に点突然変異され、それによって、該変異型TSHR試料は、差別的に患者の血清の刺激型TSHR自己抗体、患者の血清の遮断型TSHR自己抗体及びTSHと相互作用し、(i)該完全長のヒトTSHRのアミノ酸255に対応する位置でArgの変異が基準TSHR試料に存在しないことを除いて、該変異型TSHR試料のアミノ酸配列と対応するアミノ酸配列を有する該基準TSHR試料と相互作用する患者の血清の刺激型TSHR自己抗体の刺激作用と比較した場合、該変異型TSHR試料と相互作用する、該患者の血清の刺激型TSHR自己抗体の刺激作用は、実質的に減少されるか、又は本質的に消失され、(ii)該基準TSHR試料と相互作用するTSHの刺激作用と比較すると、該変異型TSHR試料と相互作用する場合のTSHの刺激作用は基本的に影響されず、(iii)該基準TSHR試料と相互作用する患者の血清の遮断型TSHR自己抗体の遮断作用と比較すると、該変異型TSHR試料と相互作用する患者の血清の遮断型TSHR自己抗体の遮断効果は、基本的に影響されないか又は上昇し、それによって、該変異型TSHR試料は、スクリーニングされる体液のサンプル中、患者の血清の刺激型TSHR自己抗体、患者の血清の遮断型TSHR自己抗体及びTSHの差別的スクリーニング及び識別に対して効果的であることを特徴とする変異型TSHR試料。

【請求項2】

前記完全長のヒトTSHRのアミノ酸255に対応する位置で少なくともアミノ酸Argが、Aspに点突然変異されることを特徴とする請求項1に記載の変異型TSHR試料。

【請求項3】

少なくとも1つの点突然変異を含む変異型TSHR試料であって、完全長のヒトTSHRのアミノ酸255に対応する位置の少なくともアミノ酸Argが、該変異型TSHR試料でAspに突然変異し、それによって、該変異型TSHR試料は、差別的に患者の血清の刺激型TSHR自己抗体、患者の血清の遮断型TSHR自己抗体及びTSHと相互作用し、(i)該完全長のヒトTSHRのアミノ酸255に対応する位置でArgの変異が基準TSHR試料に存在しないことを除いて、該変異型TSHR試料のアミノ酸配列と対応するアミノ酸配列を有する該基準TSHR試料と相互作用する患者の血清の刺激型TSHR自己抗体の刺激作用と比較した場合、該変異型TSHR試料と相互作用する、患者の血清の刺激型TSHR自己抗体の刺激作用は、実質的に減少されるか、又は本質的に消失され、(ii)該基準TSHR試料と相互作用するTSHの刺激作用と比較すると、該変異型TSHR試料と相互作用する場合のTSHの刺激作用は基本的に影響されず、(iii)該基準TSHR試料と相互作用する患者の血清の遮断型TSHR自己抗体の遮断作用と比較すると、該変異型TSHR試料と相互作用する患者の血清の遮断型TSHR自己抗体の遮断効果は、基本的に影響されないか又は上昇し、それによって、該変異型TSHR試料は、スクリーニングされる体液のサンプル中、患者の血清の刺激型TSHR自己抗体、患者の血清の遮断型TSHR自己抗体及びTSHの差別的スクリーニング及び識別に対して効果的であることを特徴とする変異型TSHR試料。

10

20

【請求項4】

前記変異型TSHR試料は、変異した完全長のヒトTSHRであることを特徴とする請求項1乃至3のいずれか一項に記載の変異型TSHR試料。

【請求項5】

前記変異型TSHR試料は、ヒトTSHRの変異した断片であることを特徴とする請求項1乃至3のいずれか一項に記載の変異型TSHR試料。

【請求項6】

前記変異型TSHR試料は、患者の血清の刺激型TSHR自己抗体、患者の血清の遮断型TSHR自己抗体及びTSHで、前記変異型TSHR試料の差別的な相互作用を増強する、アミノ酸の突然変異をさらに含むことを特徴とする請求項1乃至5のいずれか一項に記載の変異型TSHR試料。

30

【請求項7】

前記変異型TSHR試料は、前記変異型TSHR試料の生物学的活性又は機能を変えないかあるいは実質的に変化する、サイレント置換、付加又は削除を表す、アミノ酸の突然変異をさらに含むことを特徴とする請求項1乃至5のいずれか一項に記載の変異型TSHR試料。

【請求項8】

TSHRに対する免疫反応に関連した自己免疫疾患であるか、該疾患の疑いがあるか、該疾患症状を有しているか、あるいは該疾患から回復したと思われる被験者から得られるサンプル中の刺激型TSHR自己抗体、遮断型TSHR自己抗体及びTSHの差別的スクリーニング及び識別での請求項1乃至7のいずれか一項に記載の変異型TSHR試料の使用。

40

【請求項9】

TSHRに対する免疫反応に関連した自己免疫疾患であるか、該疾患の疑いがあるか、該疾患症状を有しているか、あるいは該疾患から回復したと思われる被験者から得られる体液サンプルに存在する、刺激型TSHR自己抗体、遮断型TSHR自己抗体及びTSHと前記変異型TSHR試料との差別的な相互作用をモニタリング可能な検出手段を伴うことを特徴とする、請求項1乃至7のいずれか一項に記載の変異型TSHR試料からなるキット。

50

【請求項 10】

T S H R に対する免疫反応に関連した自己免疫疾患であるか、該疾患の疑いがあるか、該疾患症状を有しているか、あるいは該疾患から回復したと思われる被験者から得られる体液サンプルの刺激型 T S H R 自己抗体、遮断型 T S H R 自己抗体及び T S H の差別的なスクリーニングのための方法であって、該方法は、被験者から得られる体液のサンプルで T S H R に反応して生成される、刺激型 T S H R 自己抗体、遮断型 T S H R 自己抗体及び T S H と差別的に相互作用し、且つ、検出する、請求項 1 乃至 7 のいずれか一項に記載の変異型 T S H R 試料を活用することを特徴とする方法。

【請求項 11】

T S H R に対する免疫反応と関連する自己免疫疾患の治療に対して効果的な、少なくとも一つの治療薬の治療上の有効量を伴う組み合わせの請求項 9 に記載のキット。

10

【請求項 12】

薬学的に受け入れられるキャリア、希釈剤または賦形剤を伴う、請求項 1 乃至 7 のいずれか一項に記載の変異型 T S H R 試料からなる医薬品組成物。

【請求項 13】

治療で使用するための請求項 1 乃至 7 のいずれか一項に記載の変異型 T S H R 試料。

【請求項 14】

グレース病の治療のための薬剤の製造に使用するための請求項 1 乃至 7 のいずれか一項に記載の変異型 T S H R 試料。

【請求項 15】

グレース病の目の徴候の治療のための薬剤の製造に使用するための請求項 1 乃至 7 のいずれか一項に記載の変異型 T S H R 試料。

20

【請求項 16】

(i) 請求項 1 乃至 7 のいずれか一項に記載の変異型 T S H R 試料をエンコードするヌクレオチド配列；
からなるポリヌクレオチド。

【請求項 17】

請求項 16 に記載のポリヌクレオチドを有し、宿主細胞のゲノムに対してポリヌクレオチドを導入可能な、生物学的に機能的なベクターシステム。

【請求項 18】

請求項 16 に記載のポリヌクレオチドの 1 つ以上、又は請求項 17 のベクターシステムで形質転換されるか又はトランスフェクションされる宿主細胞。

30

【請求項 19】

請求項 1 乃至 7 のいずれか一項に記載の変異型 T S H R 試料を調製するための方法であって、該方法は、

(i) 請求項 18 に記載の宿主細胞の提供；

(i i) 当該宿主細胞の成長；及び

(i i i) 当該成長した宿主細胞からの本発明による変異型 T S H R 試料の回収を含むことを特徴とする方法。

【請求項 20】

体液のサンプル中の刺激型 T S H R 自己抗体、遮断型 T S H R 自己抗体及び T S H の差別的スクリーニング及び識別に対して使用できる変異型 T S H R 試料を識別する方法であって、該方法は、 T S H R の潜在的に相互作用している領域の識別と、該 T S H R のための結合パートナーと相互作用するそれらの能力によってさらに識別できる、そこに存在するアミノ酸残基の識別を含み、候補であるアミノ酸は、一つ以上の患者の血清の刺激型 T S H R 自己抗体、患者の血清の遮断型 T S H R 自己抗体および T S H と T S H R との相互作用に必要とされるアミノ酸であり、さらに、当該候補となるアミノ酸の点突然変異の実行を含み、さらに、変異型 T S H R 試料が結合パートナーと生じた相互作用のモニタリングを含み、変異型 T S H R の少なくとも一つの刺激型 T S H R 自己抗体、遮断型 T S H R 自己抗体及び T S H との結果として相互作用の阻害で生じる点突然変異を識別し、

40

50

前記変異型 T S H R 試料が刺激型 T S H R 自己抗体、遮断型 T S H R 自己抗体および T S H と差別的に相互作用するように、点突然変異がヒト T S H R の完全長のアミノ酸 2 5 5 に対応する位置に存在するアミノ酸 A r g において実行され、前記アミノ酸 A r g は、負に帯電したアミノ酸残基に選択的に点突然変異されることを特徴とする方法。

【請求項 2 1】

T S H R の 1 つ以上の刺激型 T S H R 自己抗体、遮断型 T S H R 自己抗体および T S H との相互作用において必要とされるアミノ酸残基を識別する方法であって、該識別方法は、T S H R の潜在的に相互作用している領域の識別と、T S H R のための結合パートナーと相互作用するそれらの能力によってさらに識別できる、そこに存在するアミノ酸残基の識別を含み、候補であるアミノ酸は、一つ以上の刺激型 T S H R 自己抗体、遮断型 T S H R 自己抗体および T S H と T S H R との相互作用に必要とされるアミノ酸であり、さらに、この方法は、当該候補となるアミノ酸の点突然変異の実行を含み、さらに、変異型 T S H R 試料が結合パートナーと生じた相互作用のモニタリングを含み、T S H R と 1 つ以上の刺激型 T S H R 自己抗体、遮断型 T S H R 自己抗体および T S H とのそれぞれの相互作用において必要とされる、重要なアミノ酸を識別し、

10

前記変異型 T S H R 試料が刺激型 T S H R 自己抗体、遮断型 T S H R 自己抗体および T S H と差別的に相互作用するように、点突然変異がヒト T S H R の完全長のアミノ酸 2 5 5 に対応する位置に存在するアミノ酸 A r g において実行され、前記アミノ酸 A r g は、負に帯電したアミノ酸残基に選択的に点突然変異されることを特徴とする方法。

20

【請求項 2 2】

1 つ以上の刺激型 T S H R 自己抗体、遮断型 T S H R 自己抗体および T S H と T S H R の形態に必要なアミノ酸残基の相互作用を可能にするように、T S H R の形態に必要なアミノ酸残基を識別する方法であって、該識別方法は、T S H R の潜在的に相互作用している領域の識別と、T S H R のための結合パートナーと相互作用するそれらの能力によってさらに識別できる、そこに存在するアミノ酸残基の識別を含み、候補であるアミノ酸は、一つ以上の刺激型 T S H R 自己抗体、遮断型 T S H R 自己抗体および T S H と T S H R との相互作用に必要とされるアミノ酸であり、さらに、当該候補となるアミノ酸の点突然変異の実行を含み、さらに、変異型 T S H R 試料が結合パートナーと生じた相互作用のモニタリングを含み、T S H R と 1 つ以上の刺激型 T S H R 自己抗体、遮断型 T S H R 自己抗体および T S H とのそれぞれの相互作用が可能となるように、T S H R の形態において必要とされる、重要なアミノ酸を識別し、

30

前記変異型 T S H R 試料が刺激型 T S H R 自己抗体、遮断型 T S H R 自己抗体および T S H と差別的に相互作用するように、点突然変異がヒト T S H R の完全長のアミノ酸 2 5 5 に対応する位置に存在するアミノ酸 A r g において実行され、前記アミノ酸 A r g は、負に帯電したアミノ酸残基に選択的に点突然変異されることを特徴とする方法。

【請求項 2 3】

前記ヒト T S H R の完全長のアミノ酸 2 5 5 に対応する位置に存在する、少なくともアミノ酸 A r g は、選択的に、負に電荷されたアミノ酸残基へと点突然変異されることを特徴とする請求項 2 0 乃至 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 2 4】

前記負に帯電したアミノ酸は A s p であることを特徴とする請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

スクリーニングされる体液サンプルで 1 つ以上の患者の血清の刺激型 T S H R 自己抗体、患者の血清の遮断型自己抗体及び T S H の差別的スクリーニングのための、完全長ヒト T S H R のアミノ酸 2 5 5 に対応する位置で変異したアミノ酸残基を有する変異型 T S H R 試料の使用であって、

前記アミノ酸 2 5 5 は、前記変異型 T S H R 試料が刺激型 T S H R 自己抗体、遮断型 T

50

S H R 自己抗体および T S H と差別的に相互作用するように、負に帯電したアミノ酸残基に選択的に点突然変異されている、使用。

【請求項 26】

体液のサンプルに存在しないか、存在する、刺激型 T S H R 自己抗体の識別において、完全長ヒト T S H R のアミノ酸 255 に対応する位置で変異した変異型アミノ酸残基を有する変異型 T S H R 試料の使用であって、

前記アミノ酸 255 は、前記変異型 T S H R 試料が刺激型 T S H R 自己抗体、遮断型 T S H R 自己抗体および T S H と差別的に相互作用するように、負に帯電したアミノ酸残基に選択的に点突然変異されている、使用。

【請求項 27】

スクリーニングされる体液のサンプルにおいて、1つ以上の患者の血清の刺激型 T S H R 自己抗体、患者の血清の遮断型 T S H R 自己抗体及び T S H の差別的スクリーニングのために、ヒト T S H R の完全長のアミノ酸 255 に対応する位置で変異した A s p を有する変異型 T S H R 試料の使用。

【請求項 28】

体液のサンプル中の刺激型 T S H R 自己抗体の有無の識別で、ヒト T S H R の完全長のアミノ酸 255 に対応する位置で変異した A s p を有する変異型 T S H R 試料の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、甲状腺刺激ホルモンレセプター (T S H R) の試料に関し、特に、変異型甲状腺刺激ホルモンレセプター (T S H R) の試料、抗体及びそれらとのホルモンの相互作用、それらの使用、それらを提供する方法、T S H R 抗体を識別するためのエピトープ領域及び結合部位、並びに、それらの複合体に関する。

【背景技術】

【0002】

甲状腺刺激ホルモン (thyrotropin or thyroid stimulating hormone (TSH)) は、甲状腺の機能を調整することにおいて重要な役割を果たす下垂体ホルモンである。その放出は、視床下部で形成されるホルモン T R H によって刺激され、重要な甲状腺ホルモン、チロキシン (T 4) 及びトリヨードサイロニン (T 3) の形成及び放出を制御する。フィードバック・メカニズムを基礎として、血清の甲状腺ホルモン含有量は、T S H の放出を制御する。甲状腺細胞による T 3 及び T 4 の形成は、下垂体によって放出される T S H が甲状腺細胞膜の T S H R と結合する手順によって、T S H によって促進される。

【0003】

我々は、T S H R の強力な甲状腺刺激物として作用する、T S H R に対するヒトモノクローナル抗体を特許文献 1 に記載した。このモノクローナル抗体 (h M A b T S H R 1) における T S H R 上の結合部位は、特許文献 1 に開示されておらず、結合部位またはポケット (pocket) は適合しており、共にフォールド (fold) するレセプターの不連続な領域を含むことがあり得るものと考えられた。h M A b T S H R 1 などの T S H R に対するヒトモノクローナル又は組換抗体における、T S H R の結合部位又はエピトープ領域の識別、あるいは、必須の結合アミノ酸残基又はそれらの配列の識別は、それとともに T S H R 構造及びヒト抗体の相互作用の理解において重要であって、このように自己抗体群の改良された評価および TSHR への自己免疫反応と関連する甲状腺の疾患の次の処置を可能にしなければならない。

【0004】

TSHR に対する様々な形の自己抗体が、TSHR に自己免疫と関連する疾患の経過で形成されることが従来技術において実証される。それら自己抗体の種類に依存して、T 3 及び T 4 の形成及び放出のいずれかの阻害は、TSH 分子から TSHR の遮蔽のために起こり得る。あるいは、一方で、抗 TSHR 自己抗体が TSH の作用を模倣して、甲状腺のホルモン類の合成及び放出を刺激するので、これらの甲状腺のホルモン類は制御されずに放出されることができ

10

20

30

40

50

る。

【0005】

自己免疫甲状腺疾患(AITD)は、世界的に異なる人口に影響を及ぼしている最も一般的な自己免疫疾患である。先に記載されているように、一部のAITD患者(主にグレース病を有する患者)は、実質的にTSHRに自己抗体を有する。自己抗体はTSHRと結合して、通常TSHの作用を模倣する。そして、甲状腺を刺激して、高水準の甲状腺のホルモン類を生じる。それら自己抗体は、刺激的な活性を有するように記載される。自己抗体を刺激することはまた、眼球細胞でTSHRsと相互作用し、少なくとも幾つかのグレース病の目の徴候をもたらす。ある患者において、自己抗体はTSHRに結合するが、甲状腺ホルモンの生成を刺激せず、活性を阻害することが非特許文献1に記載されている。

10

【0006】

TSHR自己抗体の測定は、AITD、特に、グレース病の診断及び管理において重要である。現在、TSHR自己抗体を測定するために、3種類のアッセイが使用されており、それらは、

(a) TSHをTSHRの試料に結合することを阻害するためにTSHR自己抗体の能力を測定する競合結合測定；

(b) 培養組織でTSHRを発現している細胞を刺激するためにTSHR自己抗体の能力を測定する生物検定；

(c) TSHR自己抗体でTSHR試料の免疫沈降；

である。

20

【0007】

このようなアッセイを用いるTSHR自己抗体の測定は、非特許文献1及び2に記載されている。

【0008】

しかしながら、TSHR自己抗体を測定するために上記した現在利用可能な検査法を用いて多くの限界がある。異なるフォーマットにおいて利用できるタイプ(a)の競合検査法は、通常、感度が高く、実行するのが比較的容易で、日常的な使用に適應できる。しかしながら、TSHR自己抗体を検出するために周知の競争的放射性受容体測定法によって、実際的な自然の基本的な不利な点を有して(それは、一般に、TSHR試料の結合能力が非常に高感度で、レセプターのまたはそれによって結合される生体分子の変化と反応するという事実)に帰する)、加えて、自己抗体群のディファレンシャル診断(differential diagnosis)が行われることができない(例えば、上述したように、自己抗体を刺激するか又は阻害する分化)。

30

【0009】

(b)で言及されるタイプの生物検定が関する限り、これらは高価で、時間がかかって、非常に熟練したスタッフを必要とする傾向がある。

【0010】

タイプ(c)の直接の免疫沈降分析に関して、実際には、それに関連する感度問題がしばしばあり、また、自己抗体群のディファレンシャル診断は現在まで可能でなかった。

【0011】

前述の考察から認められることができるようにTSHR自己抗体検出において改良された検査法を提供する必要がある。例えば、TSHRに対する自己免疫と関連する自己抗体を刺激することと遮断することを区別することが可能であることが有利である。この目的で、TSHR自己抗体のディファレンシャル診断決定を行う分析方法を特許文献2に記載する。それによって、刺激型TSHR自己抗体、遮断型TSHR自己抗体および非病原性のTSHR自己抗体(刺激的でもなく遮断的でもない)もサンプルにおいて理論的には選択的に決定されることができる。TSHR-キメラが採用され、ここでは、TSHR自己抗体の刺激及び/又は遮断の結合するために必要なTSHRの配列は、レセプターのGタンパク質結合型の異なるレセプターの配列と置換される。また、必要とされる、反応混合物の可溶性にされた野生型組換TSHRの使用が開示される。キメラAがTSHR-キメラを表し、ここで、TSH

40

50

Rの8から165のアミノ酸は、ルトロピン(lutropin)/絨毛膜性腺刺激ホルモンレセプターのうちの10から166のアミノ酸と置換され、キメラBはTSHR-キメラを表し、ここで、TSHRの261から370のアミノ酸は、ルトロピン(lutropin)/絨毛膜性腺刺激ホルモンレセプターのうちの261から329のアミノ酸と置換され、キメラCはTSHR-キメラを表し、ここで、TSHRの8-165及び261から370のアミノ酸は、ルトロピン(lutropin)/絨毛膜性腺刺激ホルモンレセプターのうちの10-166及び261-329のアミノ酸とそれぞれ置換されることが分かる。

【0012】

特許文献3は同様に、TSHR自己抗体のディファレンシャル診断決定を行う分析方法を記載する。それによって、刺激型TSHR自己抗体、遮断型TSHR自己抗体および非病原性のTSHR自己抗体はサンプルにおいて再び理論的には選択的に決定されることができ、少なくとも、選別されている自己抗体を結合する任意の結合剤(例えば野生型組換えTSHR)は、過剰な選択されたTSHRキメラ(遮断型または刺激型自己抗体にとって重要な配列を結合しているTSHRが選別されている自己抗体のそれぞれのタイプを結合しない配列と置換される)がある場合には、サンプルと作用される。特許文献3において開示されるTSHR-キメラは、上で述べた特許文献2のTSHR-キメラに対応する。

10

【0013】

さらに、特許文献2及び3に記載される上述の技術は、非特許文献3によって記載されている。

【0014】

非特許文献3に記載されているこれらの研究のための正当性は、TSHR(アミノ酸の25と165との間)のN末端のエピトープと相互作用する甲状腺の刺激(つまり、TSHアゴニスト)活性を有するTSHR自己抗体を報告し、一方で、より多くのC末端(アミノ酸261-370)であるエピトープと相互作用するTSHアンタゴニスト活性を有するTSHR自己抗体を報告する。特に、キメラAでの研究は、それが¹²⁵I標識のTSHと良好に結合し、このキメラとトランスフェクションする細胞が、良好にTSHに反応することを示した。

20

【0015】

キメラAと野生型TSHRの両方に対する標識TSHの結合は、TSHR自己抗体を含む血清によって阻害された。しかしながら、血清の阻害作用は野生型レセプターを使用して強力であり、これはTSHアゴニスト及び/又はTSHアンタゴニスト活性を有する自己抗体における場合であった。キメラと結合しているTSHの阻害に基づくアッセイは、TSHアゴニスト及びTSHアンタゴニスト活性を有するTSHR自己抗体間の改良された分化(野生型TSHRと比較して)を示すように見えたが、相当な重なりがあった。この重なりは、臨床応用を制限する。さらに、かなり以前の調査で、天然の(つまり、野生型)TSHRと結合している標識されたTSHの阻害に基づくTSHR自己抗体のアッセイは、分析感度を減少する(つまり、希釈されたテストサンプルを使用する)ことによってTSHアンタゴニスト活性を有するTSHR自己抗体において選択するために変更された。通常、TSHアンタゴニスト自己抗体が、TSHアゴニスト自己抗体よりも非常に高い濃度の血清に存在するので、これは効果的である。

30

【特許文献1】WO 2004/050708A2

40

【特許文献2】WO 01/27634

【特許文献3】WO 01/63296

【非特許文献1】J Sanders, Y Oda, S-A Roberts, M Maruyama, J Furmaniak, B Rees Smith "Understanding the thyrotropin receptor function-structure relationship." Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism. Ed. T F Davies 1997 1 1(3): 451-479. Pub. Bailliere Tindall, London

【非特許文献2】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 TSHR autoantibodies with ¹²⁵I-labelled TSHR", Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1999 84(10):3797-3802

50

【非特許文献3】Minich et al in Journal of Endocrinology & Metabolism, 89 (1): 352-356

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

TSHRに対する反応で生成されるTSHR自己抗体の検出及び分析のために改良したアッセイを提供し、さらに、従来技術を使用して経験される問題を軽減するために、本発明は、非特許文献3に記載の従来技術と異なる方法を提供する。特に、我々は、TSHRの一つのアミノ酸を突然変異させて、様々な新規なリガンドによって、TSHRの結合及び刺激における突然変異の効果を研究した。それらの新規なリガンドは、ヒトモノクローナル甲状腺刺激型自己抗体(hMAb TSHRI)、強力なhMAb TSHRI(及びTSH)アンタゴニストであるマウスモノクローナル抗体(9D33)並びに強力なTSHアゴニストであるマウスモノクローナル抗体を含む。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

従来技術とは対照的に、我々の研究は、驚くべきことに、様々なTSHRリガンド間の非常に明確な差異を提供するシステムを導いた。特に、我々は、TSHアゴニスト活性を有するTSHR抗体(自己抗体およびモノクローナル抗体)の作用を基本的に消失するが、TSHアンタゴニスト活性を有するTSHレセプター抗体(自己抗体およびモノクローナル抗体)の効果の影響を受けないか、あるいは同じ突然変異によって増加した、TSHRの特定の点突然変異を明らかにした。

20

【0018】

したがって、本発明は、TSHR自己抗体群の刺激と遮断とを区別する、新規の改良された手段を提供する。ここで、本発明によって、少なくとも1つの点突然変異を含む、変異型TSHR試料が提供され、完全長のヒトTSHRのアミノ酸255に対応する位置の少なくともアミノ酸Argが、変異型TSHR試料の異なるアミノ酸残基に突然変異したことを特徴とする。それによって、変異型TSHR試料は、ディファレンシャルに(differentially)患者の血清の刺激型TSHR自己抗体、患者の血清の遮断型TSHR自己抗体及びTSHと相互作用する。(i)完全長のヒトTSHRのアミノ酸255に対応する位置でArgの変異が基準TSHR試料に存在しないことを除いて、変異型TSHR試料のアミノ酸配列と対応するアミノ酸配列を有する基準TSHR試料と相互作用する患者の血清の刺激型TSHR自己抗体の刺激作用と比較した場合、変異型TSHR試料と相互作用する、患者の血清の刺激型TSHR自己抗体の刺激作用は、実質的に減少されるか、又は本質的に消失される。(ii)基準TSHR試料と相互作用するTSHの刺激作用と比較すると、変異型TSHR試料と相互作用する場合のTSHの刺激作用は基本的に影響されない。(iii)基準TSHR試料と相互作用する患者の血清の遮断型TSHR自己抗体の遮断作用と比較すると、変異型TSHR試料と相互作用する患者の血清の遮断型TSHR自己抗体の遮断効果は、基本的に影響されないか又は上昇し、それによって、変異型TSHR試料は、スクリーニングされる体液のサンプル中、患者の血清の刺激型TSHR自己抗体、患者の血清の遮断型TSHR自己抗体及びTSHのディファレンシャルスクリーニング(differential screening)及び識別に対して効果的である。

30

40

【0019】

本発明の好ましい実施態様において、完全長のヒトTSHRのアミノ酸255に対応する位置で少なくともアミノ酸Argが、負に帯電したアミノ酸残基、好ましくは、Aspに点突然変異される。好ましくは、したがって、少なくとも1つの点突然変異を含む、変異型TSHR試料が提供され、完全長のヒトのTSHRのアミノ酸255に対応する位置の少なくともアミノ酸Argが、変異型TSHR試料の異なるアミノ酸残基に突然変異したことを特徴とする。それによって、変異型TSHR試料は、ディファレンシャルに患者の血清の刺激型TSHR自己抗体、患者の血清の遮断型TSHR自己抗体及びTSHと相互作用する。(i)完全長のヒトTSHRのアミノ酸255に対応する位置でArgの変異が基準TSH

50

H R 試料に存在しないことを除いて、変異型 T S H R 試料のアミノ酸配列と対応するアミノ酸配列を有する基準 T S H R 試料と相互作用する患者の血清の刺激型 T S H R 自己抗体の刺激作用と比較した場合、変異型 T S H R 試料と相互作用する、患者の血清の刺激型 T S H R 自己抗体の刺激作用は、実質的に減少されるか、又は本質的に消失される。(i i) 基準 T S H R 試料と相互作用する T S H の刺激作用と比較すると、変異型 T S H R 試料と相互作用する場合の T S H の刺激作用は基本的に影響されない。(i i i) 基準 T S H R 試料と相互作用する患者の血清の遮断型 T S H R 自己抗体の遮断作用と比較すると、変異型 T S H R 試料と相互作用する、患者の血清の遮断型 T S H R 自己抗体の遮断効果は、基本的に影響されないか又は上昇し、それによって、変異型 T S H R 試料は、スクリーニングされる体液のサンプル中、患者の血清の刺激型 T S H R 自己抗体、患者の血清の遮断型 T S H R 自己抗体及び T S H のディファレンシャルスクリーニング及び識別に対して効果的である。

10

【 0 0 2 0 】

最適には、本発明によって提供される変異型 T S H R 試料は、上述したように突然変異された、完全長の野生型ヒト T S H R を含むことができる。代替として、変異型 T S H R 試料は、上述のように突然変異された完全長の野生型ヒト T S H R の断片を含み、その断片は、同じく、上述したように、患者の血清の刺激型 T S H R 自己抗体、患者の血清の遮断型 T S H R 自己抗体及び T S H とディファレンシャルに相互作用する。さらに、アミノ酸の突然変異が、ここに記載したように、変異型 T S H R 試料に存在し、さらに、そのような突然変異は、患者の血清の刺激型 T S H R 自己抗体、患者の血清の遮断型 T S H R 自己抗体及び T S H と変異型 T S H R 試料とのディファレンシャルな相互作用をさらに促進するための点突然変異であるか、または、本発明によって提供される変異型 T S H R 試料の生物学的活性又は機能を変えないか或いは実質的に変化するサイレント置換、付加又は削除であってよい。

20

【 0 0 2 1 】

更なる突然変異が保守的アミノ酸置換を意味する場合には、この種の置換は、同様の特徴の他のアミノ酸による変異型 T S H R 試料の所与のアミノ酸を置換するものである。保守的な置換として、典型的には、脂肪族アミノ酸、ヒドロキシ残基、酸性の残基、アミド残基、塩基の残基及び芳香族の残基の中で、1つが別のものにとって代わる置換である。

30

【 0 0 2 2 】

ここで使用される用語“断片”は、本発明による変異型 T S H R 試料に関するアミノ酸配列を意味し、そのアミノ酸配列は、野生型ヒト T S H R のアミノ酸配列のすべての配列ではなく、その一部に対応しており、完全長のヒト T S H R のアミノ酸 2 5 5 に対応する位置で少なくともアミノ酸 A r g が、上述のように、異なるアミノ酸残基への突然変異を含み、その断片は、患者の血清の刺激型 T S H R 自己抗体、患者の血清の遮断型 T S H R 自己抗体及び T S H のディファレンシャルに相互作用する。このようにして、スクリーニングされる体液のサンプル中、患者の血清の刺激型 T S H R 自己抗体、患者の血清の遮断型 T S H R 自己抗体及び T S H のディファレンシャルスクリーニング及び識別を可能にする。本発明による変異型 T S H R 試料において提供される“断片”は、“フリースタンディング (free standing) ”、つまり、他のアミノ酸又はポリペプチドの一部でないか、あるいは他のアミノ酸又はポリペプチドに連合されてよく、または、それら断片は、それらが一部または領域を形成する、より大きなポリペプチドの範囲内に含まれることができる。このような断片は、このように“スキヤホールド”タイプのポリペプチドに取り入れられてもよく、ここで、付加アミノ酸は、野生型 T S H R 試料の活性部位に存在するようなアミノ酸の形態、配列または配列に類似しているか、または実質的に類似している形態、配列または配列の変異型 T S H R 断片の試料のアミノ酸を“保持”するように提供される。

40

【 0 0 2 3 】

野生型ヒト T S H R のアミノ酸配列における完全な配列の情報は当該技術分野の刊行物及び/又はレセプター配列のアミノ酸データベースを参照することによって容易に得るこ

50

とができる。そのように、本発明に基づき適切な変異型試料及び変異型断片の完全な配列は、本明細書の開示に関連して周知の野生型の配列に基づいて、容易に決定できる。

【0024】

本発明によって提供されるような変異型TSHR試料は、患者の血清の刺激型TSHR自己抗体、患者の血清の遮断型TSHR自己抗体及びTSHのディファレンシャルスクリーニング及び識別における診断において用いられ、したがって、重要なステップはTSHRへの自己免疫反応と関連する自己免疫疾患の信頼性が高い診断を提供し、上述した従来技術で知られていた診断方法及びキットに関連する多数の問題を軽減する、重要なステップを提供する。特に、特許文献2及び3によって提供される教示に対する利点を提供する。

【0025】

本発明によると、したがって、TSHRに対する免疫反応に関連した自己免疫疾患であるか、その疾患の疑いがあるか、その疾患症状を有しているか、あるいはその疾患から回復したと思われる被験者（特に、ヒト）から得られるサンプル中の患者の血清の刺激型TSHR自己抗体、患者の血清の遮断型TSHR自己抗体及びTSHのディファレンシャルスクリーニング及び識別において、実質的に、ここで記載したような変異型TSHR試料の活用が提供される。

【0026】

また、本発明によって、TSHRに対する免疫反応に関連した自己免疫疾患であるか、その疾患の疑いがあるか、その疾患症状を有しているか、あるいはその疾患から回復したと思われる被験者（特に、ヒト）のTSHRに対する免疫反応に関連した自己免疫疾患の診断において、実質的に、ここで記載したような変異型TSHR試料の活用が提供される。

【0027】

さらに、本発明は、スクリーニングされる体液のサンプルに存在する、患者の血清の刺激型TSHR自己抗体、患者の血清の遮断型TSHR自己抗体及びTSHで、変異型TSHR試料のディファレンシャルな相互作用のモニタリングを可能にする検出手段を伴い、実質的に、ここで記載したような変異型TSHR試料を有するキットを提供する。

【0028】

さらに、本発明によって、TSHRに対する免疫反応に関連した自己免疫疾患であるか、その疾患の疑いがあるか、その疾患症状を有しているか、あるいはその疾患から回復したと思われる被験者から得られる体液のサンプル中の患者の血清の刺激型TSHR自己抗体、患者の血清の遮断型TSHR自己抗体及びTSHのディファレンシャルスクリーニングの方法が提供され、その方法は、被験者から得られる体液のサンプル中の患者の血清の刺激型TSHR自己抗体、患者の血清の遮断型TSHR自己抗体及びTSHとディファレンシャルに相互作用し、且つ、検出する、変異型TSHR試料を採用する。

【0029】

さらに、本発明は、TSHRに対する免疫反応に関連した自己免疫疾患であるか、その疾患の疑いがあるか、その疾患症状を有しているか、あるいはその疾患から回復したと思われる被験者（特にヒト）のTSHRに対する免疫反応と関連する自己免疫疾患の見込まれる発症または存在を診断する方法を提供し、その方法は、被験者から得られる体液のサンプル中の患者の血清の刺激型TSHR自己抗体、患者の血清の遮断型TSHR自己抗体及びTSHとディファレンシャルに相互作用し、且つ、検出する、実質的に上述されるような変異型TSHR試料を採用し、被験者のTSHRに対する免疫反応と関連する自己免疫疾患の見込まれる発症または存在の診断方法を提供する。

【0030】

さらにまた、本発明は、TSHRに対する免疫反応に関連した自己免疫疾患であるか、その疾患の疑いがあるか、その疾患症状を有しているか、あるいはその疾患から回復したと思われる動物被験者（特にヒトの被験者）のTSHRに対する免疫反応と関連する自己免疫疾患の見込まれる発症を遅延させるか、又は回避する方法を提供し、その方法は、被験者から得られる体液のサンプル中でTSHRに対する免疫反応と関連する自己免疫疾患

10

20

30

40

50

の見込まれる発症または存在を暗示する刺激及び/又は遮断型 T S H R 自己抗体と初期にディファレンシャルに相互作用し、且つ、検出する、実質的に上述されるような変異型 T S H R 試料を採用する。それによって、被験者の T S H R に対する免疫反応と関連する自己免疫疾患の見込まれる発症の診断方法を提供し、その後、被験者に治療処置を行い、T S H R に対する免疫反応と関連する自己免疫疾患の発症を遅延、及び/又は、T S H R に対する免疫反応と関連する自己免疫疾患を防ぐ。

【 0 0 3 1 】

本発明はさらに、被験者の T S H R に対する免疫反応と関連する自己免疫疾患の治療方法を提供し、その方法は、被験者から得られる体液のサンプル中で T S H R に対する反応で生成される刺激及び/又は遮断型 T S H R 自己抗体と初期にディファレンシャルに相互作用し、且つ、検出する、実質的に上述されるような変異型 T S H R 試料を採用する。それによって、被験者の自己免疫疾患の診断を提供し、被験者に対して、このような自己免疫疾患の治療に効果的な少なくとも一つの治療薬の治療上の有効量を投与する。

10

【 0 0 3 2 】

投与される治療薬の量は、治療されている特定の自己免疫疾患状態に依存し、おそらく、患者の年齢に依存する。また、投与される治療薬の量は、最終的に付き添いの医師の裁量となる。

【 0 0 3 3 】

さらにまた、本発明は、T S H R に対する免疫反応と関連する自己免疫疾患の治療に対して効果的な、実質的に上述されるような少なくとも一つの治療薬の治療上の有効量を伴って、実質的に上述されるようなキットも共に提供される。

20

【 0 0 3 4 】

典型的に、本発明によってスクリーニングされる体液のサンプルは血液サンプル又は他の流体の血液分画（例えば、特に、血清サンプルまたは血漿サンプル）であるが、サンプルは、原則として、他の生物流体（例えば、唾液、尿、若しくは可溶性の細胞抽出物）であってもよいし、又は針生検によって得てもよい。

【 0 0 3 5 】

実質的に上述の本発明による変異型 T S H R 試料は、TSHRに対する免疫反応と関連する自己免疫疾患を治療する治療薬として使用するために適しているか、または、自己免疫疾患の治療のための適切な治療薬の識別において使われることができる。例えば、変異型 T S H R 試料は、T S H R に対する免疫反応に関連した自己免疫疾患であるか、その疾患の疑いがあるか、その疾患症状を有しているか、あるいはその疾患から回復したと思われる被験者（特にヒト被験者）で、循環している刺激及び/又は遮断型 T S H R 自己抗体と相互作用し、且つ、基本的に取り除くように、治療上使用できる。

30

【 0 0 3 6 】

したがって、本発明によって、薬学的に受け入れられるキャリア、希釈剤または賦形剤を伴う、実質的に上述の本発明による変異型 T S H R 試料からなる医薬品組成物が提供され、変異型 T S H R 試料は、T S H R に対する反応で生成された刺激及び/又は遮断自己抗体とディファレンシャルに相互作用できる。

【 0 0 3 7 】

さらに、本発明は、グレーブス病の治療のための薬剤の製造に使用するための、実質的に上述した、変異型 T S H R 試料を提供する。特に、本発明によって提供されるような変異型 T S H R 試料は、グレーブス病の少なくとも目の徴候の治療のための薬剤の製造の使用において適している。

40

【 0 0 3 8 】

本発明による組成物又は薬剤は、薬学的に受け入れられるキャリアに、本発明により変異型 T S H R 試料の治療的又は予防的な量を含まなければならない。薬剤担体は、患者に対する変異型 T S H R 試料の送達に適した、いかなる互換性を有し、無毒な物質であり得る。滅菌水、アルコール、脂肪、ワックス及び不活性な固体が、キャリアとして使用されてよい。薬学的に受け入れられる佐剤、バッファー剤、分散助剤などもまた、医薬品組成

50

物に組み込まれてよい。このような組成物は、単一の変異型 T S H R 試料を含むことができるか、または本発明による2つ以上の変異型 T S H R 試料を含んでよい。

【 0 0 3 9 】

本発明による医薬品組成物は、非経口投与に有用である。好ましくは、組成物は、非経口的に、すなわち皮下に、筋注または静脈内に投与される。このように、本発明は、患者に対して非経口投与するための組成物を提供する。ここで、上述したように、組成物は、受け入れられるキャリアに、変異型 T S H R 試料の溶液または分散を含む。医薬品組成物の変異型 T S H R 試料の濃度は幅広く変化することができる、つまり、約0.1重量%未満から、通常、少なくとも約1重量%から20重量%以上までである。筋内注射のための典型的な医薬品組成物は、例えば、1mlの滅菌した緩衝水と、1~100 μgの本発明の精製された変異型 T S H R 試料を含むように形成される。静脈内注入のための典型的な組成物は、100~500mlの滅菌したリンガー溶液と、100~500mgの本発明の精製された変異型 T S H R 試料を含むように形成され得る。非経口的に投与可能な組成物を調製するための実際の方法は、従来技術において周知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980)を含む様々な情報源において、より詳細に記載されている。

10

【 0 0 4 0 】

本発明のさらなる態様と一致して、

- (i) 実質的に、上述の変異型 T S H R 試料をエンコードするヌクレオチド配列；
- (i i) (i) の配列の対立遺伝子のバリエーションからなるヌクレオチド配列；
- (i i i) (i) の配列の断片からなるヌクレオチド配列；又は
- (i v) (i) の配列のストリンジェントな状況でハイブリダイズするヌクレオチド配列；からなるポリヌクレオチドが提供される。

20

【 0 0 4 1 】

本発明はさらに、表1で表される、プライマーヌクレオチド配列 Arg 255 Asp F; Arg 255 Asp R、及び/又は、そこから遺伝コードの変質によるコドン配列において、異なっているヌクレオチド配列が提供される。ヌクレオチド配列が表1において与えられるプライマーの用途にだけ提供されるにもかかわらず、本発明による残りのヌクレオチドをコードする T S H R 試料は、従来技術において刊行物及び/又はレセプター・配列（野生型ヒトTSHRの全長配列は従来技術において周知である）のためのヌクレオチド・データベースを参照することで容易に得られることができることを認識できる。

30

【 0 0 4 2 】

より詳細には、本明細書の実施例に記載の特定技術を参照することによって理解できる。その実施例で、突然変異は、本発明によって提供されるようなポリヌクレオチド配列で存在し、本発明による変異型ヒト T S H R 試料に存在する点突発変異を遂行することを要求され、表1において示されるプライマー配列の以下の一対、Arg 255 Asp F: Arg 255 Asp Rを用いることによって成し遂げられ、255 (Arg) の255 (Asp) への突然変異をもたらす。さらに、表1に示されるプライマーが、要求される変異型ヌクレオチド配列を得るためにPCR増幅に使用され、本発明によって対応する変異型ヒト T S H R 試料が、本発明によるポリヌクレオチドの発現によって適切に得られるか、又は得られうることが好ましい。実質的に、ここに記載のような、本発明による変異型 T S H R 試料は、組換えタンパク質を生成する様々なシステムで発現できる。例えば、哺乳動物細胞（例えば、Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞など）での発現が好ましく、CHO細胞の特定の使用はpcDNA5.1/FRTベクターと共に実施例に記載されている。代替として、本発明の変異型ヒト T S H R 試料は、従来技術で周知な技術を採用する、従来のペプチド・シンセサイザーによって、総合的に生成できる。

40

【 0 0 4 3 】

本発明はさらに、実質的に、上述された変異型 T S H R 試料を調製するための方法を提供し、この方法は、

- (i) 実質的に、ここに記載のような、宿主細胞の提供；

50

(i i) 上記宿主細胞の成長 ; 及び

(i i i) その成長した宿主細胞からの本発明による変異型 T S H R 試料の回収を含む。

【 0 0 4 4 】

本発明による変異型 T S H R 試料の回収は、概して、従来技術において当業者にとって公知である、従来の抽出および精製技術（例えば、クロマトグラフィ分離または免疫学的分離）を使用することができる。

【 0 0 4 5 】

本発明のポリヌクレオチドは、DNAの形態であってよく、例えば、クローニングによって得られるか、若しくは化学的な合成技術によって生成される、cDNA、合成DNA及びゲノムDNAであってよく、又は、それらの組み合わせであってよい。本発明の好ましい実施態様は、cDNAまたは合成DNAを含むことが好ましい。

10

【 0 0 4 6 】

本発明はさらに、本発明によって提供されるような変異型 T S H R 試料をエンコードする、上述したポリヌクレオチドの異型に関する。ポリヌクレオチドの異型は、自然発生する異型（例えば、自然発生する対立遺伝子変異体）であってよく、又は、自然発生することが知られていない異型であってよい。ポリヌクレオチドのそのような非自然発生の異型は、突然変異生成技術によって成されてよい。

【 0 0 4 7 】

この点に関して、ヌクレオチドの置換、欠失または付加によって上述したポリヌクレオチドと異なる異型は、異型の一つである。置換、欠失または付加は、1つ以上のヌクレオチドを含んでよい。コード領域の変更は、保守的であるか非保守的なアミノ酸の置換、欠失または付加を生成することができる。

20

【 0 0 4 8 】

本発明による異型のポリヌクレオチドは、ここで記載されるような変異型 T S H R 試料をエンコードするポリヌクレオチド、及びそのようなポリヌクレオチドに相補的であるか又はハイブリダイズするポリヌクレオチドに対して、異型のポリヌクレオチドの完全長の少なくとも70%以上が同一であることが適している。あるいは、最も好ましいポリヌクレオチドは、ここで記載されるような変異型 T S H R 試料をエンコードするポリヌクレオチド、及びそのようなポリヌクレオチドに相補的であるか又はハイブリダイズするポリヌクレオチドに対して、異型のポリヌクレオチドの完全長の少なくとも80%以上が同一である領域を含む。この点に関して、完全長の少なくとも90%以上が同一であるポリヌクレオチドが特に好ましく、特に、それらの好ましいポリヌクレオチドにおいて、少なくとも95%が同一であるものが特に好ましい。さらに、少なくとも95%が同一であるものの中でも、少なくとも97%が同一であるものがより好ましく、さらにそれらの中でも、特に、少なくとも98%が同一及び少なくとも99%が同一のものがより好ましく、少なくとも99%が同一のものが、よりさらに好ましい。

30

【 0 0 4 9 】

実質的に上述されるように、本発明はさらに、ここで上述した配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。この点に関し、本発明は特に、ここで上述したポリヌクレオチドに対してストリンジントな条件でハイブリダイズする、ポリヌクレオチドに関する。ここで使用される用語、“ストリンジントな条件”は、配列間で少なくとも95%の相補的に同一、さらに好ましくは少なくとも97%の相補的に同一である場合にのみ、ハイブリダイゼーションが生じることを意味する。

40

【 0 0 5 0 】

本発明はまた、ベクターに関し、そのベクターは、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクターで遺伝子工学的に改変された宿主細胞、及び組換え技術による、本発明のここに記載された変異型 T S H R 試料の生成を含む。

【 0 0 5 1 】

したがって、本発明は、さらに、実質的にここに記載されたポリヌクレオチドを有し、

50

宿主生物のゲノムに対するポリヌクレオチドの導入が可能な生物学的に機能的なベクターシステムを提供する。

【0052】

宿主細胞は、ポリヌクレオチドを組み込み、本発明の変異型TSHR試料を発現するように遺伝子工学的に改変できる。また、本発明は、さらに、ポリヌクレオチド若しくは1つ以上のポリヌクレオチドで形質転換又はトランスフェクションされた宿主細胞、あるいは、ここに、各々が実質的に記載されたベクターシステムを提供する。適切なDNA配列は、様々な周知の慣習的な技術によって、ベクターに挿入されてよい。

【0053】

本発明はさらに、体液のサンプル中の患者の血清の刺激型TSHR自己抗体、患者の血清の遮断型TSHR自己抗体及びTSHのディファレンシャルスクリーニング及び識別に対して使用できる変異型TSHR試料を識別する方法を提供し、その方法は、TSHRの潜在的に相互作用している領域の識別と、TSHRのための結合パートナー（hMAb TSHR1, 9D33 又はTSHなど）と相互作用するそれらの能力（野生型TSHRに比較して異なる能力を含む）によってさらに識別できる、そこに存在するアミノ酸残基の識別を含み、候補であるアミノ酸は、一つ以上の患者の血清の刺激型TSHR自己抗体、患者の血清の遮断型TSHR自己抗体およびTSHとTSHRとの相互作用に必要とされるアミノ酸であり、さらに、この方法は、当該候補となるアミノ酸の点突然変異の実行を含み、さらに、変異型TSHR試料が結合パートナーと生じた相互作用のモニタリングを含み、変異型TSHRの少なくとも1つの患者の血清の刺激型TSHR自己抗体、患者の血清の遮断型TSHR自己抗体およびTSHとの結果として相互作用の阻害で生じる点突然変異を識別する。

【0054】

本発明はまた、TSHRのエピトープ領域に対して重要である、アミノ酸残基を識別するために使用でき、それによって、識別方法が提供され、その識別方法は、TSHRの潜在的に相互作用している領域の識別と、TSHRのための結合パートナー（hMAb TSHR1, 9D33 又はTSHなど）と相互作用するそれらの能力（野生型TSHRに比較して異なる能力を含む）によってさらに識別できる、そこに存在するアミノ酸残基の識別を含み、候補であるアミノ酸は、一つ以上の患者の血清の刺激型TSHR自己抗体、患者の血清の遮断型TSHR自己抗体およびTSHとTSHRとの相互作用に必要とされるアミノ酸であり、さらに、この方法は、当該候補となるアミノ酸の点突然変異の実行を含み、さらに、変異型TSHR試料が結合パートナーと生じた相互作用のモニタリングを含み、TSHRと1つ以上の患者の血清の刺激型TSHR自己抗体、患者の血清の遮断型TSHR自己抗体およびTSHとのそれぞれの相互作用において必要とされる、重要なアミノ酸を識別する。

【0055】

さらに、本発明は、1つ以上の患者の血清の刺激型TSHR自己抗体、患者の血清の遮断型TSHR自己抗体およびTSHとそれらの相互作用を可能にするように、TSHRの形態に必要なアミノ酸残基を識別するために用いることができ、それによって、識別方法が提供され、その識別方法は、TSHRの潜在的に相互作用している領域の識別と、TSHRのための結合パートナー（hMAb TSHR1, 9D33 又はTSHなど）と相互作用するそれらの能力（野生型TSHRに比較して異なる能力を含む）によってさらに識別できる、そこに存在するアミノ酸残基の識別を含み、候補であるアミノ酸は、一つ以上の患者の血清の刺激型TSHR自己抗体、患者の血清の遮断型TSHR自己抗体およびTSHとTSHRとの相互作用に必要とされるアミノ酸であり、さらに、この方法は、当該候補となるアミノ酸の点突然変異の実行を含み、さらに、変異型TSHR試料が結合パートナーと生じた相互作用のモニタリングを含み、TSHRと1つ以上の患者の血清の刺激型TSHR自己抗体、患者の血清の遮断型TSHR自己抗体およびTSHとのそれぞれの相互作用が可能となるように、TSHRの形態において必要とされる、重要なキーのアミノ酸を識別する。

【0056】

各々の上記の方法において、変異型TSHR試料との結合パートナーの相互作用の結果として、サイクリックAMPの生成をモニターすることによって、モニターされる変異型T

10

20

30

40

50

S H R 試料の相互作用は、好ましくは、変異型 T S H R の刺激、又はそのような刺激の遮断である。

【 0 0 5 7 】

ここに記載されるように、ヒト T S H R の完全長のアミノ酸 2 5 5 に対応する位置に存在するアミノ酸 A r g は、抗体が結合するために必要とされるヒト T S H R の重要なアミノ酸として、本発明によって識別される。さらに、その突然変異は、抗体群の刺激及び遮断のディファレンシャル診断を達成できる。

【 0 0 5 8 】

したがって、本発明によると、T S H R 抗体における結合部位として使用するために、ヒト T S H R の完全長のアミノ酸 2 5 5 に対応する位置で T S H R 試料に存在するアミノ酸 A r g が提供される。さらに、本発明によって、T S H R レセプター自己抗体又はその 1 つ以上の断片における結合部位として使用するために、ヒト T S H R の完全長のアミノ酸 2 5 5 に対応する位置で T S H R 試料に存在するアミノ酸 A r g が提供される。さらに、本発明によって、ヒトモノクローナル若しくは組換え抗体からなるか、又はヒトモノクローナル若しくは組換え抗体から派生した、T S H R 結合パートナー又はその 1 つ以上の断片における結合部位として使用するために、ヒト T S H R の完全長のアミノ酸 2 5 5 に対応する位置で T S H R 試料に存在するアミノ酸 A r g が提供される。さらに、本発明によって、スクリーニングされる体液のサンプルにおいて、1 つ以上の患者の血清の刺激型 T S H R 自己抗体、患者の血清の遮断型 T S H R 自己抗体及び T S H のディファレンシャルスクリーニングのために、さらに、好ましくは、体液のサンプル中の刺激型 T S H R 自己抗体の有無を識別するために、ヒト T S H R の完全長のアミノ酸 2 5 5 に対応する位置で T S H R 試料に存在する、変異型アミノ酸残基の活用が提供される。さらに、本発明によって、T S H R と関連する自己免疫疾患の診断のために、ヒト T S H R の完全長のアミノ酸 2 5 5 に対応する位置で T S H R 試料に存在する、変異型アミノ酸残基の活用が提供される。より詳細には、本発明によって、スクリーニングされる体液のサンプルにおいて、1 つ以上の患者の血清の刺激型 T S H R 自己抗体、患者の血清の遮断型 T S H R 自己抗体及び T S H のディファレンシャルスクリーニングのために、さらに、好ましくは、体液のサンプル中の刺激型 T S H R 自己抗体の有無を識別するために、ヒト T S H R の完全長のアミノ酸 2 5 5 に対応する位置で T S H R 試料に存在する、A s p の活用が提供される。さらに、本発明によって、T S H R と関連する自己免疫疾患の診断のために、ヒト T S H R の完全長のアミノ酸 2 5 5 に対応する位置で T S H R 試料に存在する、A s p の活用が提供される。

【 0 0 5 9 】

さらに、本発明によって、(a) ヒト T S H R の完全長のアミノ酸 2 5 5 に対応する位置に存在する、A r g によって表される結合部位と、(b) 当該結合部位のための結合パートナーとを含む結合複合体が提供され、その結合パートナーは、好ましくは、ヒトモノクローナル若しくは組換え抗体からなるか、又は派生する。あるいは、結合パートナーは、ヒトモノクローナル若しくは組換え抗体の一つ以上の断片からなる。

【 0 0 6 0 】

最適には、結合パートナーは、T S H R と反応的なヒトモノクローナル抗体、若しくはその 1 つ以上の断片からなるか、又は、当該抗体の 1 つ以上の断片から派生する。代替として、結合パートナーは、T S H R と反応的なヒト組換え抗体、若しくはその 1 つ以上の断片からなるか、又は、当該抗体の 1 つ以上の断片から派生する。好ましくは、結合パートナーは、T S H R と反応的なヒトモノクローナル若しくは組換え抗体、又は、当該抗体の 1 つ以上の断片から派生する。好ましくは、結合パートナーは、さらに、その能力によって、T S H R への T S H の結合を阻害し、及び/又は、T S H R を刺激することを特徴とすることができ、これら両者の特徴は、グレーブス病患者から得られる血清に存在する T S H R 自己抗体のそれぞれの抑制及び刺激特性と同等であることが認められる。

【 0 0 6 1 】

本発明によって提供されるような、特に好ましい、複合体の結合パートナーは、WO 20

10

20

30

40

50

04/050708A2に記載されるようなヒトTSHRモノクローナル抗体hMAb TSHR 1である。従来技術に記載されるように、hMAb TSHR 1の結合部位は開示されておらず、TSHRの複合体の性質、さらに、それに対する抗体の異質性からみて、エピトープ領域若しくはそこに対する結合部位を決定するか又は予測するために、従来技術開示に基づいて可能ではなかった。

【0062】

以下の図示する説明は、本願明細書において用いられる特定の条件の理解を容易にするために提供される。この説明は、便宜的に提供されて、本発明を制限するものではない。

【0063】

TSHRのための結合パートナーは、TSHRにおける特異的な結合を有する分子を記載する。ここに記載される結合パートナーは、自然に派生されてよいし、又は、全体的若しくは部分的に合成的に生成されてよい。そのような結合パートナーは、特異的に結合するドメイン又は領域を有し、したがって、TSHRの1つ以上のエピトープ領域と相補的であり、TSHRに対する刺激及び/又は遮断抗体を含むことができ、当該抗体は、自己抗体、モノクローナル若しくは組換え抗体、あるいはTSHなどのリガンドであってよい。

10

【0064】

結合部位は、TSHRの原子、官能基又はアミノ酸残基などの部位を意味し、TSHR抗体、他のリガンド、あるいはそれらの結合パートナーに対して結合し得る。キャビティ(cavity)の特異的な分子に依存して、部位は魅力的であるか不快な結合相互作用(電荷、立体的な条件などによってもたらされる)を呈することができる。

20

【0065】

結合パートナーによるTSHRの遮断は、TSHRに対する結合パートナーの結合能力を意味し、ここに記載されるように、例えば、TSHR刺激の結果として形成されるサイクリックAMPの生成を阻害する。

【0066】

遮断型TSHR抗体は、TSHRに結合し、ここに記載されるようにTSHRの遮断を遂行する。

【0067】

本発明によって提供される、変異型TSHR試料に関する、ディファレンシャルに相互作用する、又は、ディファレンシャルな相互作用は、下記を意味し、(i)完全長のヒトTSHRのアミノ酸255に対応する位置でArgの変異が基準TSHR試料に存在しないことを除いて、変異型TSHR試料のアミノ酸配列と対応するアミノ酸配列を有する基準TSHR試料と相互作用する患者の血清の刺激型TSHR自己抗体の刺激作用と比較した場合、変異型TSHR試料と相互作用する、患者の血清の刺激型TSHR自己抗体の刺激作用は、実質的に減少されるか、又は本質的に消失される。(ii)基準TSHR試料と相互作用するTSHの刺激作用と比較すると、変異型TSHR試料と相互作用する場合のTSHの刺激作用は基本的に影響されない。(iii)基準TSHR試料と相互作用する、患者の血清の遮断型TSHR自己抗体の遮断作用と比較すると、変異型TSHR試料と相互作用する患者の血清の遮断型TSHR自己抗体の遮断効果は、基本的に影響されないか又は上昇する。上記の記載の相互作用(阻害されるか、変化されないか、又は増幅される)は、TSHRの刺激又はTSHRの遮断である。さらに、実施例に記載されるように、変異型TSHRの、患者の血清の刺激型TSHR自己抗体、患者の血清の遮断型TSHR自己抗体及びTSHとの結合の相互作用、アフィニティに関して、これは、本発明によって提供される変異型TSHR試料の刺激及び/又は遮断に関して観察される結果に対応して見られる、特定の事象ではなく、例えば、変異型レセプターの減じた発現レベルによるものであってよい。

30

40

【0068】

プライマーの定義及びプライマーのネーミングの“F”は、フォワードプライマーを意味する。

50

【0069】

宿主細胞は、形質転換若しくはトランスフェクションされた細胞であるか、又は外因性のポリヌクレオチド配列によって形質転換若しくはトランスフェクションできる。

【0070】

配列を比較することによって定まる、同一性は、周知のように、2つ以上のポリペプチド配列または2つ以上のポリヌクレオチド配列の関係である。

【0071】

変異型TSHR試料は、TSHR試料を意味し、当該TSHR試料は、結果として生じるTSHR試料が、スクリーニングされる体液のサンプル中の患者の血清の刺激型TSHR自己抗体、患者の血清の遮断型TSHR自己抗体及びTSHのディファレンシャルスクリーニング及び識別を可能にすることを特徴とする、1つ以上の点突然変異を含む。しかしながら、特に、本発明によって提供されるような変異型TSHR試料は、ヒトTSHRの完全長のアミノ酸255に対応する位置にある少なくともアミノ酸Argが、変異型TSHR試料で異なるアミノ酸残基に突然変異することを特徴とする、少なくとも1つの点突然変異を含む。

10

【0072】

点突然変異は、別のアミノ酸又はヌクレオチドによる、アミノ酸又はヌクレオチドの置換を意味する。これは、本発明の範囲内でPCRプライマーの使用と突然変異したヌクレオチド配列の後の発現によって達成される点突然変異を含む。さらに、ここに使用されるような点突然変異は突然変異であり、この突然変異は、所望のポリペプチド配列の合成を成すために、例えば、従来のペプチド・シンセサイザーを用いる、周知の合成技術によって達成できる突然変異である。ここで、合成された配列は、他のアミノ酸を有する所望のアミノ酸の置換を含む。

20

【0073】

プライマーの定義及びプライマーのネーミングの“R”は、リバースプライマーを意味する。

【0074】

ここに記載される結合パートナーによるTSHRの刺激は、TSHRに対して結合し、それによって、そのようなTSHRに対する結合の結果として、例えば、サイクリックAMPの生成をなす、結合パートナーの結合能力を意味する。そのような刺激は、TSHRに対する、TSHまたはTSHR自己抗体の結合に見られる反応に類似しており、この手法で、ここに記載される結合パートナーは、TSHRに対するTSHまたはTSHR自己抗体の結合する効果を擬態する。

30

【0075】

刺激型TSHR抗体はTSHRに結合し、ここに記載されるTSHRの刺激をもたらす。

【0076】

TSHは、甲状腺刺激ホルモンを意味する。

【0077】

TSHRは、甲状腺刺激ホルモンレセプターを意味し、さらに、当該技術分野において、TSHレセプターとしても呼ばれる。

40

【0078】

TSHR自己抗体は、TSHRと関連する自己免疫疾患の経過でTSHRに対して生成される抗体を意味する。生成される抗体の種類に依存して、TSH分子からTSHRの遮断に起因して、T3及びT4の形成及び放出のいずれかの障害が生じる。また一方で、生成された抗体がTSHの作用を擬態し、甲状腺ホルモンの合成と放出を刺激するので、T3及びT4は非制御下で放出され得る。

【0079】

TSHR試料は、野生型TSHRの完全長に一致することができるか、ここに記載されたような、1つ以上の異形、類似体、派生体又はそれらの断片を含むことができる、ペプ

50

チド配列を意味する。

【0080】

本発明は、添付図及び実施例によって例示されるが、本発明の範囲を制限しない。

【実施例】

【0081】

TSHRの細胞外領域の様々なアミノ酸が選択されて、アラニンに突然変異される。それらのアミノ酸は、下記を含む。

【0082】

Asp43。電荷された残基、(電荷-電荷の相互作用)TSHRとTSHR自己抗体及びTSHとの相互作用で重要であると知られているためである。(Rees Smith B, McLachlan SM, Furmaniak J 1988 Autoantibodies to the thyrotropin receptor. *Endocr Rev* 9: 106-121を参照。)加えて、ASP43はTSHRのロイシンが豊富な領域(LRD;アミノ酸36-281)の第一の(つまり、大部分のN末端)繰り返しに位置する。同様に、電荷されており、TSHR LRDの第二の繰り返しにあるので、Glu61が選択される。

10

【0083】

電荷しており、TSHR Lys183とのソルトブリッジ(salt bridge)の形成における関与に基づいて、Glu157が選択された。(Duprez L, Parma J, Costagliola S, Hermans J, Van-Sande J, Dumont JE, Vassart G 1997 Constitutive activation of the TSHR by spontaneous mutations affecting the N-terminal extracellular domain. *FEBS Letters* 409: 469-474を参照。)2つの追加の電荷されたアミノ酸、Glu178及びAsp203は、それぞれ、LRDの第七番目と、第八番目の繰り返しのそれらの位置に基づいて選択された。

20

【0084】

電荷されたアミノ酸、Asp232及びArg255が、それぞれ、TSHR LRDの第9番目と、第10番目の繰り返しのそれらの位置に基づいて選択された。また、LRDの第10番目の繰り返しの芳香族アミノ酸Trp258は、アラニンに突然変異された。さらに、LRDのC末端のアミノ酸、Asp276及びSer281は、TSHR活性化におけるそれらの関与から、突然変異された。(Corvilain B, Van Sande J, Dumont J E and Vassart G 2001 Somatic and germ line mutations of the TSH receptor and thyroid disease. *Clin Endocrinol* 55: 143-158; and Russo D, Arturi F, Chieari E, Filetti S 1997 Molecular insights into TSHR abnormality and thyroid disease. *J Endocrinol Invest* 20: 36-47を参照。)

30

方法

PCRを用いて、ヒトTSHR配列への特定のアミノ酸の突然変異の導入

下記の基本的なクローニング手法にしたがって、TSHRの完全長のヌクレオチド配列(スイスプロトアクセションナンバー(Swiss prot accession number): P16473 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=136448>; NCBI Entrez Nucleotide accession number NM000369-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=4507700>)は、BamHI及びXhoIを用いて、pCDNA5.1/FRTベクター(Invitrogen)にクローニングされた。

40

【0085】

ヌクレオチドのコード配列を適切なアミノ酸の突然変異のためのコードに変化するために、各突然変異(表1)において、特定の“フォワード”及び“リバーズ”PCRプライマーが設計された。2つの個別のPCR反応が設定された(PCR1及びPCR2)。

【0086】

PCR1に添加された試薬: 32.5µLのH₂O、2.5µLの20xデオキシヌクレオチド三リン酸(dNTPs)(5mmol/L)、5µLの10xPfuDNAポリメラー

50

ゼバッファー (10x Pfuバッファー; プロメガ)、2.5 μLの10 pmol/μL T7プライマー (表1)、2.5 μLの10 pmol/μLの突然変異のための“リバー”プライマー、4 μLのpcDNA5.1/FRT TSHRテンプレートDNA (100 ng) 及び1 μLのPfu DNAポリメラーゼ (3 units、プロメガ)。PCR2に添加された試薬: 34.5 μLのH₂O、2.5 μLの20x dNTPs (5 mmol/L)、5 μLの10x Pfuバッファー、2.5 μLの10 pmol/μLの突然変異のための“フォワード”プライマー (表1)、2.5 μLのウシ成長ホルモンポリアデニレーションシグナルリバープライマー (BGHRプライマー) (表1) 10 pmol/μL、2 μLのテンプレートDNA (100 ng) 及び1 μLのPfu DNAポリメラーゼ (3 units)。

10

【0087】

テンプレートDNAの使用量は、生成されるPCR産物の長さに依存する。上述に示された実施例において、PCR1産物は800塩基対の長さであり、PCR2産物は1600塩基対の長さである。PCR1及びPCR2産物のサイズは、TSHR配列内で突然変異される、アミノ酸の位置に依存する。

【0088】

PCR反応は、GeneAmp PCR System 9700 (アプライドバイオシステムズ) を用い、94 °Cの5分間に続いて、94 °Cの1分間、40 °Cの1分間及び72 °Cの2分間の30サイクル (94 °Cから40 °C及び40 °Cから72 °Cまで50%ランプ率によって) に続いて、72 °Cで7分間、その後、反応物は4 °Cまで冷却された。

20

【0089】

PCR1及びPCR2の産物は、TAEバッファーの1%アガロースゲル (40 mmol/L Tris-HCl pH8.0、1 mmol/L EDTA、0.114%氷酢酸) で泳動され、スカルペルブレードでゲルからバンドを取り出した。バンドはGeneClean II kit (Anachem Ltd, Luton, LU2 0EB, UK) を用いて、使用説明書にしたがって洗浄された。DNA濃度は、当該技術の基本的な方法を用いて決定された。このDNAは、突然変異を含む、完全なTSHR配列を構成するように、PCR3反応を設定するように使用された。PCR3反応は、2.5 μLの10x Pfuバッファー、1 μLの20x dNTPs、200 ngのPCR1産物及び200 ngのPCR2産物、1 μLのPfu DNAポリメラーゼ、並びに水を25 μLの終量に含む。この反応は、94 °Cの1.5分間、65 °Cの1.5分間及び72 °Cの1.5分間の7サイクルのために、GeneAmp PCR System 9700に設置された。次いで、温度は94 °Cの2分間まで高められ、PCR4反応 (25 μLに対して、2.5 μL 10x Pfuバッファー、1.3 μL 20x dNTPs、2.5 μL T7プライマー 10 pmol/μL、2.5 μL BGHR プライマー 10 pmol/L、1 μL Pfu DNAポリメラーゼ及び水) がPCR3に添加された。この混合物は、94 °Cの1分間、52 °Cの1分間及び72 °Cの2分間の30サイクル (94 °Cから52 °C及び52 °Cから72 °Cまで50%ランプ率によって) に続いて、72 °Cで10分間、その後、反応物は4 °Cまで冷却された。

30

【0090】

PCR産物は、酢酸ナトリウム及びエタノールで沈殿させた、50 μLの1:1フェノール/クロロフォルムの混合物を用いて洗浄され、当該技術に記載のように空気乾燥された。次いで、DNAは、制限消化 (Roche Diagnostics, Lewes, BN7 1LG, UK) のために1xバッファーBで再懸濁されて、37 °Cで4時間においてBamHI/XhoIで切断された。PCRバンドは、1%アガロースゲル上で泳動されて、GeneClean II kitを用いて、切り出されて洗浄された。次いで、PCR産物は、BamHI/XhoIで切断されたpBluescript (ストラタジーン) にライゲーションされて、突然変異は、当該技術に記載のDNAシーケンシング (アマシャムバイオサイエンス、Sequenase version 2 DNA sequencing kit) を用いて確認された。次いで、突然変異されたTSHR DNAは、BamHI/XhoI制限酵素を用いて、pBluescriptから取り除かれ、pcDNA 5.1/FRTベクター (Invitrogen) にクローニングされ

40

50

て、上述したように、配列が再度確認された。

【 0 0 9 1 】

Flp-Inシステムを用いるCHO細胞に対する突然変異されたTSHR構造のトランスフェクション

Flp-In-CHO細胞(Invitrogen)のコンフルエント(confluent)フラスコは、 $1 \times 10^5 - 1.5 \times 10^5$ 細胞/ウェルのDMEM(Invitrogen)、10%胎仔の仔牛血清(FCS)(Invitrogen)、1xのL-グルタミン(Invitrogen)及び抗体がなく、1xの必須でないアミノ酸(NEAA)(Invitrogen)で、24穴のプレートウェルで播種するために使用された。ウェルは、37℃、5%CO₂、95%より高い湿度でオーバーナイトにわたって培養された。

10

【 0 0 9 2 】

上記のpcDNA5.1/FRT TSHR DNA及びPOG44 DNA(Invitrogen)は、0.01 µg/mL及び0.1 µg/mL溶液となるように、蒸留水でそれぞれ希釈された。POG44 DNAとTSHR DNAは、3種類の異なる濃度に希釈された。それらは、(1)9 µLのPOG44、10 µLのTSHR DNA及び31 µLのOptimem 1(Invitrogen); (2)8 µLのPOG44、20 µLのTSHR DNA及び22 µLのOptimem 1; (3)9.5 µLのPOG44、5 µLのTSHR DNA及び35.5 µLのOptimem 1であり、室温で5分間インキュベーションされた。Optimem 1で1:25に希釈された、50 µLのlipofectamine(Invitrogen)は、各試験管(上記の1-3)に加えられ、室温で20分間インキュベーションされた。次いで、各インキュベーションされた混合物は、95%のコンフルエントな(confluent)Flp-In-CHO細胞のウェル(24穴プレート)に添加され、上述した条件下にて、オーバーナイトでインキュベーションした。次いで、培地を取り除かれて、DMEM、10% FCS、1x L-glutamine、1x NEAA及び1x ペニシリン(100u/mL)/ストレプトマイシン(100 µg/mL)(Invitrogen)に変えられ、オーバーナイトのインキュベーションが継続される。次いで、細胞は、1xトリプシン/EDTA溶液(Invitrogen)を用いてウェルから分離され、4つの新規なウェルに分割されて、600 µg/mLのハイグロマイシン(hygromycin)(Invitrogen)を添加して、上述のように培地で成長される。

20

【 0 0 9 3 】

POG44プラスミドDNAとpcDNA5.1/FRT TSHRの両者でトランスフェクションされた細胞は、TSHRのFlp-In-CHO細胞のゲノムへの挿入を可能にし、ハイグロマイシン選択培地で成長することが可能であるように細胞にハイグロマイシンに対する耐性を与える。我々の構成のTSHRがPOG44によってFlp-In-CHO細胞のFRT部位に挿入されるように、インビトロジェンのFlp-Inシステムが設計される。Flp-In-CHO細胞は、細胞ごとに1つのFlp-In部位を含んでおり、したがって、TSHR DNAは各実験においてゲノムの同一の場所に挿入され、細胞ごとに1つのコピーとして存在する。このシステムは、最適な発現レベルの細胞のコロニーのスクリーニング(安定した細胞系を見つけるために、細胞クローニングが続く)が必要でないという利点を有する。結果として、ハイグロマイシン選択培地で成長する、突然変異したTSHRを発現する細胞が、急速に膨張することができて、異なる分析法で用いられることができる。

30

【 0 0 9 4 】

サイクリックAMP生成の刺激分析

野生型及び突然変異型のTSHRの両者を発現する、Flp-In-CHO細胞のサイクリックAMPの生成を刺激する、hMab TSHR 1及びTSHの能力は、W02004/050708A2に従って分析された。要約すると、CHO細胞は、96穴プレート(12, 500-20, 000細胞/ウェル)に播種され、10%仔牛の胎児の血清を含むDMEM(インビトロジェン)で48時間にわたってインキュベーションされた。次いで、DMEMが取り除かれ、サイクリックAMPアクセシバツファー(1 g/L グルコース、20 mmol/L HEPES、222 mmol/Lスクロース、15 g/Lウシ血清アルブミン(BSA)と0.5 mmol/L 3イソブチル-1-メチルキサンチン、pH 7.4を含むNaClフリーのHank's バツファー塩溶液)でのブタのTSH(RSR Ltd; 0.01-3 ng/mL)及びhMab TSHR1 Fab(0.1-10 ng/mL)の希釈液

40

50

が添加され、5% CO₂の大気下にて37℃で1時間インキュベーションされた。試験溶液を除去した後、細胞は溶解されて、アマシャムバイオサイエンスのBiotrak酵素免疫アッセイシステムを用いて、サイクリックAMPをアッセイした。TSHアゴニスト活性を有するTSHレセプター抗体を含有する血清を用いた実験は、アッセイに先立ってサイクリックAMPアッセイバッファーで血清サンプルが1:10に希釈された以外は、同様の手順で実行された。

【0095】

TSHアンタゴニスト活性の測定

いくつかの実験において、ブタのTSHの活性を阻害するようにTSHRに対する患者の血清及びマウスモノクローナル抗体の能力が評価された。これは、(a) TSH単独の刺激効果と、(b) 患者の血清又はマウスモノクローナル抗体が存在する際のTSHの刺激効果を比較することによって実行された。簡潔すると、サイクリックAMPバッファーで希釈された50 µLの患者の血清と、50 µLのマウスモノクローナル抗体が、細胞のウェルに添加され、続いて50 µLのバッファー又は50 µLのTSH (0.6ng/mL終濃度0.3 ng/mL) が添加され、上述の刺激アッセイのようにインキュベーションされた。試験溶液を除去した後、細胞は溶解されて、Biotrak酵素免疫アッセイシステムを用いて、cAMPをアッセイした。

【0096】

洗剤に可溶性の野生型試料及び突然変異型TSHR試料

野生型(wt)又は突然変異型TSHRのいずれかを発現する、Flp-In-CHO細胞は、175 cm²フラスコでコンフルエンス(confluence)に成長されて、細胞はDulbecco's PBS (カルシウム及びマグネシウムイオンなしで) (Invitrogen)で洗浄されて、ロシュダイアグノスティックスのプロテアーゼインヒビター(50 mLの溶液に対して、1タブレット(プロダクトコード1836145))及び1 mmol/Lのフェニルメチルスルフォニルフロライド(PMSF)を含有する10 mLの冷却バッファーA (50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl pH 7.5) にスクレイプ(scrape)された。細胞は4℃下にて1000 × gで5分間ペレットにされて、ペレットは1 mLのバッファーAで再懸濁されて、氷上のグラスホモジナイザーでホモジナイズされた。細胞膜は4℃下にて12,000 × gで30分間ペレットにされて、6 mLのバッファーAに加えて0.5 g/Lのアジ化ナトリウム及び2.75 g/Lのヨードアセトアミドで再懸濁されて、上述のようにペレットにされた。次いで、膜ペレットは、1%のTriton X-100及び0.5 g/Lのアジ化ナトリウムを含有する1 mLの冷バッファーAで再懸濁されて、ホモジナイズされた。可溶化されたTSHR試料は、4℃下にて90,000 × gで2時間遠心分離されて、上澄みはアリコートに-70℃で保存された。

【0097】

野生型又は突然変異型TSHRに対する標識されたTSH及び標識されたモノクローナル抗体の結合

これらの実験において、¹²⁵Iを用いた標識及び未標識のブタのTSH (RSRLtdの70 units/mg) 及びモノクローナル抗体 (Fab又はIgG) が、既に記載されたように調製された(WO2004/050708A2)。

【0098】

まず最初に、各TSHR試料のプロファイルが設定された。これらの実験において、プラスチックチューブ(Maxisorp Star; NUNC)は、10 µg/mLのコーティング・バッファー(0.1 mmol/L Na₂CO₃ pH 9.2)で、200 µL TSHR C末端に対するマウスモノクローナル抗体を4℃において、オーバーナイトでコーティングされた。洗浄及びポストコーティング(水10 µg/mLのBSA)後、チューブは、0.1% Triton X-100を含有するアッセイバッファー(10mmol/L Tris-HCl pH 7.8, 50 mmol/L NaCl及び1 mg/mL BSA)で洗浄された。次のステップでは、200 µLの可溶化された野生型又は突然変異型TSHR試料がチューブに添加されて、4℃にてオーバーナイトでインキュベーションされた。チューブの内容物はアスピレーションで取り除かれ、チュ

10

20

30

40

50

ープはアッセイバッファーで洗浄され、50 μ Lの開始バッファー (RSRLtd)、50 μ Lのアッセイバッファー及び50 μ Lの¹²⁵I-TSH又は¹²⁵I標識のモノクローナル抗体 (10,000 - 15,000 cpm) が添加されて、2時間にわたって攪拌されながら室温でインキュベーションされた。溶液のアスピレーション後、チューブは洗浄されてガンマカウンターでカウントされた。

【0099】

15 - 40%の標識されたTSH又はモノクローナル抗体の結合を与えるTSHR試料の希釈は、分析のためのTSHRでコーティングされたチューブを調製するために使用された。幾つかの実験において、50 μ Lのアッセイバッファーは、未標識TSH (0.4 - 500 munits/mL) 又はモノクローナル抗体 (0.001 - 1.0 μ g/mL) の濃度の増加と共に、溶液と置換された。結合及びフリーのTSH又はモノクローナル抗体の濃度が算出されて、結合/フリーに対する結合のプロット (スカチャード分析 (Scatchard analysis)) は、TSHRを結合するためのアフィニティを計算するために使用された。

【0100】

突然変異型TSHRを含有するCHOの刺激の分析

様々な突然変異を含み、TSHRでトランスフェクションされたCHO細胞でサイクリックAMP生成を刺激する、TSH又はhMAb TSHR1の能力が評価された。結果は表2a - 2j、15a - 15x及び27a - 27hに示され、さらに、表3、16及び28に要約された。大部分の突然変異は、TSH及びhMAb TSHR1の両方の反応に対して、わずかな減少を引き起こした。しかしながら、しかしながら、Alaに対するArg80、Aspに対するArg80、Alaに対するTyr82、Alaに対するGlu 107、Alaに対するArg109、Aspに対するArg109、Alaに対するLys129、Aspに対するLys129、Alaに対するPhe130、Alaに対するLys183、Aspに対するLys183、Alaに対するTyr185、Alaに対するAsp232、Alaに対するArg255、Alaに対するAla、並びにダブルミューテーション (double mutation) Alaに対するArg255及びAlaに対するTrp258; Alaに対するTrp258及びAlaに対するLys183; Alaに対するTrp258及びAlaに対するTyr185の場合において、突然変異の効果の明確な相違が、ホルモン及び抗体に対する反応にあった。TSHへの反応が基本的に維持されたのに対して、これらのアミノ酸のいずれかの突然変異はhMAb TSHR1に対する反応において、著しい減少を引き起こした。

【0101】

Asp232、Arg255およびTrp258を突然変異させる効果は、若干の詳細において調査された。Asp232の場合、近くのグルタミン (Glu235) は、Alaに変異した。しかしながら、この突然変異は、TSH又はhMAb TSHR1によって、刺激にほとんど影響を及ぼさなかった (野生型と比較して) (表4a)。同様に、Trp258に隣接したトレオニン257の突然変異は、ホルモン又は抗体の刺激にほとんど影響を及ぼさなかった (表4b)。しかしながら、ダブルミューテーション、Alaに対するArg255及びAlaに対するTrp258; Alaに対するTrp258及びAlaに対するLys183; Alaに対するTrp258及びAlaに対するTyr185は、TSHによって、刺激にほとんど影響を及ぼさないか又は全く影響がないが、hMAb TSHR1による刺激は、基本的に無くなった (表4c、27g及び27hをそれぞれ参照)。さらに、Arg255 (正帯電のアミノ酸) の負電荷のアスパラギン酸 (中性Alaに代わって) への突然変異は、また基本的に、hMAb TSHR1に対する反応がなくなったが、TSH刺激に対しては、ほとんど影響を及ぼさないか、又は全く影響を及ぼさなかった (表4d)。これらの結果は、表5及び28において要約される。

【0102】

14人の異なるグレーブス病患者からTSHR自己抗体を含有する血清の能力においてAspにArg255を突然変異させる効果も研究されて、結果が表6に示される。表から分かるように、この変異体を発現するCHO細胞は、14人のすべての血清に対する反応を多大に減じた (野生型と比較して)。対照的に、Alaに対するArg80、Aspに対するArg80、Alaに対するGlu 107、Alaに対するArg109、Aspに対するArg109、Alaに対するLys129、Alaに対するLys183、Aspに対するLys183の突然変異は、血清に若干影響を及ぼしたが、試験される血清

で刺激の全てを低下させるというわけではなかった(表19a-19h及び表20に要約)。唯一、AspへのArg255と、ダブルミューテーションAlaに対するArg255及びAlaに対するTrp258が、試験される全ての血清の反応を減じることができた(表6、19i及び表20に要約)。表7は、野生型TSHR及びAspに変異したArg255を有するTSHRを発現するCHO細胞でhMAb TSHR1 IgGとドナーの血漿(hMAb TSHR1 ハイブリドーマのためのリンパ球を抽出するように使用される同一の血液サンプルから得られる)の異なる投与による、サイクリックAMPの生成の刺激を示す。突然変異したTSHRに対するIgGと血漿の両者の効果は、野生型と比較して、かなり減じられ、投与の反応効果は同様であった。甲状腺刺激活性を有する、様々なマウスモノクローナル抗体(WO 03/018632A2のように調製されたmTSMAbs)の効果はまた、野生型TSHR及びAspに変異したArg255(表8)、Aspに変異したArg80、Alaに変異したGlu107、Alaに変異したArg109、Aspに変異したArg109、Alaに変異したLys129、Alaに変異したLys183、Aspに変異したLys183(表21a-g)を有するTSHRによってトランスフェクションされたCHO細胞のサイクリックAMP生成を刺激する、それら抗体の能力に関して試験された。表8及び表21a-gから認識でき、表22に要約されるように、mTSMAbの刺激効果は、基本的に突然変異によって逸した。野生型TSHR及びAspに変異したArg255を有するTSHRを発現するCHO細胞でのサイクリックAMP生成のTSH刺激に影響する、TSHアンタゴニストを有する、4人の患者の血清の能力もまた調査された。全ての4つの血清は、野生型及び突然変異型TSHRを発現するCHO細胞の強力なTSHアンタゴニストとして作用した(表9)。さらに、投与反応の試験は、TSHアンタゴニスト効果が、変異型レセプターを発現する細胞において、患者の血清の低い投与(高い希釈)で、より強力であった(表10)。さらに、Alaへの突然変異Glu107は、患者の血清で同様の増強したアンタゴニスト効果を示した(表23a及び24)が、一方で、他の2つの突然変異(AlaへのArg109、AlaへのLys183)は効果がなかった(表23a及び24)(表24に要約)。強力なTSHアンタゴニスト(及びhMAb TSHR1アンタゴニスト)活性(9D33、WO2004/05078A2に記載)を有する、TSHRへのマウスモノクローナル抗体の作用もまた調査された(表11、13a-j、17a-v並びに要約表14及び18)。表11で認識できるように、9D33は、野生型TSHR又はAspに変異したArg255を有するTSHRを発現するCHO細胞のTSH刺激を遮断することが可能であった。加えて、9D33のアンタゴニスト効果は、変異型レセプターを発現する細胞において、低い投与で、さらに強力であった(表11)。Alaに変異するAsp160及びAlaに変異するArg274の2つの他の突然変異は、野生型TSHRと比較して、9D33での増大したアンタゴニスト効果を示し(表17n及び17v)、一方で、Lys58のAlaへの変異、Arg80のAlaへの変異、Arg80のAspへの変異、Tyr82のAlaへの変異、Glu107のArgへの変異、Arg109のAlaへの変異、Arg109のAspへの変異、Lys129のAspへの変異、Phe134のAlaへの変異及びLys250のAlaへの変異は、それらの変異型TSHRを発現するCHO細胞におけるTSH刺激を遮断する9D33の能力の減少を示した(表17、さらに表18に要約)。しかしながら、検討した32の異なる突然変異のうちの19は、サイクリックAMPのTSH刺激を遮断する9D33の能力に、影響を及ぼさなかった(表13、14、17及び18)。

【0103】

変異型TSHRに対する結合の分析

TSH、hMAb TSHR1及び9D33 MAbの結合において、アラニン、アルギニン又はアスパラギン酸に対して変異する、様々なTSHRのアミノ酸の効果が表12、25、29及び要約表26に示される。

【0104】

AlaへのAsp43、AlaへのGlu61、AlaへのAsp203、AlaへのGln235、AlaへのGlu251、AlaへのAsp276及びAlaへのSer

10

20

30

40

50

281の突然変異は、TSH、hMAb TSHR1又は9D33結合に対して、ほとんど影響を及ぼさないか、全く影響を及ぼさなかった。しかしながら、ArgへのGlu107、AspへのArg109、AspへのLys129、AspへのLys183及びAla又はArgへのAsp232の突然変異は、検出不可能になる、TSH、hMAb TSHR1又は9D33結合に結果としてなった。AlaへのTyr206は、TSH及び9D33における検出できない結合を有したが、一方で、hMAb TSHR1は検討されなかった。AlaへのGlu157、AlaへのAsp160、AlaへのLys209、AlaへのThr257及びAlaへのTrp258の突然変異は検出可能なTSHが結合するのを妨げたが、hMAb TSHR1又は9D33 MAb結合に対して、ほとんど影響を及ぼさないか、全く影響を及ぼさなかった。AlaへのLys58、AlaへのIle60、AlaへのTyr82の突然変異は検出できない9D33 MAb結合を示し、一方で、hMAb TSHR1及びTSHへの結合は野生型と同様であった。AlaへのArg80及びAspへのArg80の突然変異は、検出できない9D33 MAb及びhMAb TSHR1結合に結果としてなったが、一方、TSHはいまだ良好な結合であった。AlaへのGlu107及びAlaへのPhe134の突然変異は、結果として、hMAb TSHR1及び9D33 MAbにおける低い結合アフィニティとなったが、一方、TSHはいまだ良好な結合であった。AlaへのArg109の突然変異は、TSH結合でわずかな減少を示したが、一方、hMAb TSHR1結合の変化はなく、9D33 MAb結合は検出できなかった。TSHとhMAb TSHR1の両者の低い結合アフィニティは、Glu178がAlaに変異した際に観察されたが、一方で、9D33 MAb結合は影響を受けなかった。Lys129がAlaに変異した場合、TSHはいまだ良好に結合したが、一方、hMAb TSHR1におけるアフィニティは著しく減じられ、9D33 MAbの結合は検出できなかった。AlaへのPhe130、AlaへのTyr185、AlaへのArg255の突然変異は、結果として、hMAb TSHR1結合での著しい減少及び9D33 MAb結合での減少となったが、一方、TSHはいまだ良好に結合した。Arg255がAspに変異した場合、TSH結合は検出不可能で、かつ、hMAb TSHR1結合のアフィニティは著しく減じられたが、一方、9D33 MAb結合は影響を受けなかった。Lys250がAlaに、Arg274がAlaに、及びTyr279がAlaに変異した場合、TSH結合は検出できなかったが、一方、hMAb TSHR1及び9D33結合のアフィニティは減じられた。Lys183がAlaに変異する突然変異(hMAb TSHR1及び9D33 MAb結合は検討されなかった)(表25)は、Tyr185がAlaに変異し、Lys183がAlaに変異するダブルミューテーション(double mutation)(hMAb TSHR1結合は検討されなかったが、一方、9D33 MAb結合は減じられた)(表29)でなされたように、TSHの結合アフィニティを高めた。

【0105】

Arg255がAlaに変異し、Trp258がAlaに変異するダブルミューテーションは、検出不可能なTSH結合を示し、hMAb TSHR1におけるわずかに減じられたアフィニティを示したが、一方、9D33 MAbはいまだ良好に結合した(表25)。Asp232のArgへの変異及びArg255のAspへの変異; Asp232のAlaへの変異及びTrp258のAlaへの変異; Asp232のAlaへの変異、Arg255のAlaへの変異及びTrp258のAlaへの変異; Trp258のAlaへの変異及びLys183のAlaへの変異; Arg255のAlaへの変異及びLys183のAlaへの変異; Trp258のAlaへの変異、Lys183のAlaへの変異及びTyr185のAlaへの変異; Arg255のAlaへの変異、Trp258のAlaへの変異、Tyr185のAlaへの変異及びLys183のAlaへの変異の突然変異はすべてTSH、hMAb TSHR1及び9D33 MAbに対する検出できない結合を示した(表29)。Asp232のAlaに変異し、Arg255がAlaに変異するダブルミューテーションも、TSH又は9D33 MAbに対する結合を示さず、hMAb TSHR1におけるアフィニティは検討されなかった(表29)。Glu15

10

20

30

40

50

7がAlaに変異し、Asp203がAlaに変異するダブルミューテーションの場合、TSH結合は検出できず、hMAb TSHR1に対する結合は野生型と同様であったが、一方、9D33 MAb結合は減じられた(表29)。Glu178のAlaへの変異及びAsp203のAlaへの変異; Trp258のAlaへの変異及びTyr185のAlaへの変異; Arg255のAlaへの変異及びTyr185のAlaへの変異; Arg255のAlaへの変異、Trp258のAlaへの変異及びTyr185のAlaへの変異の突然変異は検出できないTSH結合をもたらし、hMAb TSHR1結合を著しく減じ、さらに、9D33 MAb結合をわずかに減じた(表29)。Arg255がAlaに変異、Lys183がAlaに変異及びTyr185がAlaに変異する場合、TSH及びhMAb TSHR1の両者の結合は検出できなかったが、一方、9D33 MAb結合は減じられた(表29)。

10

【0106】

結論/解釈

1) TSHRの選択された一つのアミノ酸を突然変異させる効果は、様々なりガンドによって、サイクリックAMP生成の刺激に関して観察された。

【0107】

驚いたことに、幾つかのアミノ酸の突然変異は、TSH結合および/または刺激よりも、hMAb TSHR1結合および/または刺激に対して多大な影響を及ぼした。ホルモンと抗体の効果における、この違いは、AlaへのArg80、AspへのArg80、AlaへのTyr82、AlaへのGlu107、AlaへのArg109、AspへのArg109、AlaへのLys129、AspへのLys129、AlaへのPhe130、AlaへのLys183、AspへのLys183、AlaへのTyr185、AlaへのAsp232、AlaへのArg255及びAlaへのTrp258の突然変異の場合において、最も明白であった。加えて、AlaへのArg255及びAlaへのTrp258のダブルミューテーションは、AlaへのArg255の単独又はAlaへのTrp258の単独の突然変異よりも、より強力な効果を有した。

20

【0108】

さらに、TSHによる刺激が基本的に影響を受けない一方で、反対に電荷されたAspに対するArg255の突然変異は基本的にhMAb TSHR1の刺激効果は消失した。さらに、また、14人の異なるグレーブス病患者のTSHレセプター自己抗体は、6つのマウスモノクローナル甲状腺刺激抗体のように、AspへのArg255の突然変異によって基本的に消失される、それらの刺激効果を有した。

30

【0109】

AspへのArg255の突然変異と対照的に、AlaへのArg80、AspへのArg80、AlaへのGlu107、AlaへのArg109、AspへのArg109、AlaへのLys129、AlaへのLys183、AspへのLys183を含む他のTSHRのアミノ酸の突然変異及びAlaへのArg255とAlaへのTrp258のダブルミューテーションは、hMAb TSHR1の刺激効果を減じるか又は消失させたが、すべての患者の血清のTSHR自己抗体を検査しなかった。

【0110】

2) 結果として、驚くべくことに、TSHRのアミノ酸、Arg255の突然変異は、TSHと患者の血清のTSHR自己抗体(hMAb TSHR1を含む)との刺激作用の明確な差異をもたらす唯一のものであると我々は見出した。

40

【0111】

3) TSHアンタゴニスト活性を有する患者の血清は、変異型TSHR(Arg255Asp変異)を発現するCHO細胞のTSH刺激の遮断において効果的である。さらに、強力なTSHアンタゴニスト活性を有するマウスモノクローナル抗体(9D33)は、野生型又は変異型(Arg255Asp)レセプターを発現するCHO細胞における効果的なTSHアンタゴニストである。

【0112】

50

我々はまた、TSH刺激を阻害する9D33の能力を妨げる、Alaに変異する、アミノ酸Arg109の突然変異を見出したが、この突然変異は、TSH刺激を遮断する、血清TSHR自己抗体(TSHアンタゴニスト自己抗体)の能力に効果がない。

【0113】

4) 結果として、AspへのTSHR Arg255の突然変異は、基本的に、レセプターと相互作用する、TSHアゴニストタイプのTSHR自己抗体(hMAb TSHR1を含む)の能力を消失する。対照的に、TSHアンタゴニストタイプのTSHR自己抗体(及びTSH)は、変異型レセプターと良好に反応できる。TSHR Arg255のAspへの突然変異は、したがって、TSHアゴニストとTSHアンタゴニスト活性を有するTSHR自己抗体を区別するために使用できる。

10

【0114】

5) 野生型及び変異型TSHR試料に対する標識TSH及び未標識hMAb TSHR1の結合の分析は、AlaへのArg255の突然変異がhMAb TSHR1におけるレセプターのアフィニティを減じるが、TSH結合ではほとんど効果がないことを示す。これは、サイクリックAMP生成の刺激における突然変異の効果と整合している。

【0115】

Asp232 Alaの突然変異の場合、おそらく変異型レセプターの減少した表現レベルのため、ホルモン又は抗体の結合は、検出可能でなかった。

【0116】

hMAb TSHR1結合が約3倍減少するだけだったのに対してTrp258がAlaに突然変異する際、TSH結合はまた、検出できなかった。

20

【0117】

【表 1】

表1

プライマー	配列 (5'-3')
Asp232 Ala F	accaagcttgctgga ^a cggtgtctcaaacagtggt
Asp232 Ala R	acactgggttgagacacgg ^t ccagcaagcttgggt
Arg255 Ala F	aggaactgatagcag ^{ag} caaacacctggactctta
Arg255 Ala R	taagagtccaggtgtt ^{ct} gtgctatcagttcct
Asp203 Ala F	atgggacaaagctgg ^a ctgctgtttacctaaaca
Asp203 Ala R	tgtttaggtaaacagcag ^t ccagcttgtcccat
Glu178 Ala F	agggactatgcaatg ^a caaccttgacactgaagc
Glu178 Ala R	gcttcagtgcaaggt ^t gcatatgcatagtcct
Glu157 Ala F	attctttataactg ^a caattacagacaaccctta
Glu157 Ala R	taagggtgtctgtaatt ^t gaagtataaagaat
Asp43 Ala F	agtcacctgcaagg ^a ctattcaacgcacccccag
Asp43 Ala R	ctggggatgcttgaata ^t gcttgcaggtgact
Glu61 Ala F	tctgaagcttattg ^a caactcacctgagaactat
Glu61 Ala R	atagttctcaggtgagtg ^t caataagcttcaga
Ser281 Ala F	acctttcttaccag ^{ag} ccactgctgtgccttta
Ser281 Ala R	taaaggcacagcagtg ^{ct} gggttaagaaaggt
Asp276 Ala F	ctcacacgggctg ^a cctttcttacccaagccac
Asp276 Ala R	gtggcttgggtaagaaagg ^t cagcccgtgtgag
Trp258 Ala F	agcaagaaacacac ^{tc} ggactcttaagaaacttccact
Trp258 Ala R	agtggaagtttcttaagagtg ^{ca} gggtgtttcttgct
BGH R	tagaaggcacagtcgagg
T7	taatacgactcactataggg
Arg255 Asp F	aggaactgatagcag ^{aga} caaacacctggactctta
Arg255 Asp R	taagagtccaggtgtt ^{tct} gtgctatcagttcct
Arg255 Ala/ Trp258 Ala F	aggaactgatagcag ^{ag} caaacac ^{tc} ggactcttaagaaact
Arg255 Ala/ Trp258 Ala R	agtttcttaagagtg ^{ca} gggtgtt ^{ct} gtgctatcagttcct

F = "フォワード" プライマー

R = "リバース" プライマー

BGH R = ウシ成長ホルモンポリペプチド遺伝子のリバーズプライマー

T7 = バクテリオファージ T7 RNA ポリメラーゼプロモーター

【表2】

表2a

AlaへのTSHR Asp43の突然変異

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1636 ±204	1940 ±48	119
0.3	2550 ± 196	2772 ±98	109
1	11362 ± 1120	12660 ±3610	111
3	14498 ± 1400	13308 ±1030	92
10	24914 ±4330	17962 ±1360	72
TSH (ng/mL)			
0.01	902 ±168	894 ±104	99
0.03	1454 ±82	1532 ±326	105
0.1	4210 ±240	3996 ±612	95
0.3	9158 ±1440	8986 ±560	98
1	20136 ±1380	11864 ±1200	59
3	24812 ^a	13496 ±920	54
サイクリックAMPアッセイバッファー	616 ±30	680 ±100	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1564 ±390	1648 ±120	105
0.3	3594 ±426	3416 ±522	95
1	10750 ±200	6940 ±530	65
3	17850 ±940	16630 ±1820	93
10	24850 ±3050	20064 ±1040	81
TSH (ng/mL)			
0.01	1000 ±98	742 ±60	74
0.03	1380 ±326	1164 ±282	83
0.1	2920 ±498	2136 ±142	73
0.3	10700 ±960	6650 ±1040	62
1	17200 ±4010	13980 ±330	81
3	27864 ±350	14260 ±1460	51
サイクリックAMPアッセイバッファー	720 ±22	670 ±116	

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

^a 重複して行った平均値

【表3】

表2b

AlaへのTSHR Glu61の突然変異

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ; n = 2)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1648	998	61
0.3	3678	3204	87
1	19912	16020	80
3	25336	22304	88
10	28292	23370	83
TSH (ng/mL)			
0.01	740	482	65
0.03	824	612	74
0.1	2324	1688	73
0.3	4320	3392	79
1	24168	12914	53
3	23332	15842	68
サイクリックAMPアッセイバッファー	578	366	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1808	1312	73
0.3	3926	2738	70
1	11452	6400	56
3	20400	20962	103
10	20114	26718	133
TSH (ng/mL)			
0.01	992	722	73
0.03	1796	960	53
0.1	3316	2452	74
0.3	10440	5296	51
1	15826	13840	87
3	17582	19448	111
サイクリックAMPアッセイバッファー	794	680	

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【0120】

【表4】

表2c
AlaへのTSHR Glu157の突然変異

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3 又は平均, n = 2)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1682	1216	72
0.3	4150	1284	31
1	13668	6264	46
3	17390	8366	48
10	25920	13156	51
TSH (ng/mL)			
0.01	548	800	146
0.03	760	820	107
0.1	2560	1190	46
0.3	5124	2668	52
1	19034	3288	17
3	22720	12830	56
サイクリックAMPアッセイバッファー	582	710	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1584 ±66	1490 ±12	94
0.3	3568 ±174	2584 ±250	72
1	14560 ±1680	7260 ±990	50
3	16560 ±2210	15350 ±3370	93
10	20900 ±3930	14910 ±1120	71
TSH (ng/mL)			
0.01	1410 ±270	1330 ±206	94
0.03	1592 ±28	1308 ±216	82
0.1	3788 ±534	1842 ±54	49
0.3	10500 ±170	2500 ±1730	24
1	16730 ±1650	7100 ±740	42
3	32000	11380 ±300	36
サイクリックAMPアッセイバッファー	774 ±58	1124 ±42	
実験3			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1040	1260	121
0.3	1644	2000	122
1	12588	10924	87
3	15736	14816	94
10	21950	26304	120
0.01	708	1026	145
0.03	914	1486	163
0.1	2458	2008	82
0.3	5916	2444	41
1	17014	8382	49
3	20002	15158	76
サイクリックAMPアッセイバッファー	608	988	

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【 0 1 2 1 】

【表5】

表2d

AlaへのTSHR Glu178の突然変異

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均; n = 2)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1210	1346	111
0.3	2710	2012	74
1	9190	4528	49
3	13790	9524	69
10	24166	12492	52
TSH (ng/mL)			
0.01	970	828	85
0.03	1416	1148	81
0.1	2218	1464	66
0.3	4564	3188	70
1	12524	9918	79
3	18440	13722	74
サイクリックAMPアッセイバッファー	540	910	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1354	1028	76
0.3	3372	1424	42
1	8820	3822	43
3	15524	8070	52
10	19540	12040	62
TSH (ng/mL)			
0.01	826	648	78
0.03	1042	810	78
0.1	2446	1182	48
0.3	5626	3018	54
1	13900	8050	58
3	19330	9080	47
サイクリックAMPアッセイバッファー	804	672	

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【 0 1 2 2 】

【表6】

表2e

AlaへのTSHR Asp203の突然変異

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3 又は平均; n = 2)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1202 ±222	968 ±58	81
0.3	2508 ±1198	1512 ±162	60
1	8052 ±1290	4824 ±520	60
3	13696 ±4150	8204 ±310	60
10	16974 ±1920	9680 ±3420	57
TSH (ng/mL)			
0.01	796 ±34	668 ±96	84
0.03	1028 ±72	984 ±124	96
0.1	2216 ±610	1248 ±82	56
0.3	nd	5700 ±380	nd
1	14976 ±1990	8258 ±116	55
3	18592 ±1740	11406 ±4130	61
サイクリックAMPアッセイバッファー	804 ±48	614 ±36	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1666	1712	103
0.3	2978	2642	89
1	nd	nd	nd
3	15392	11414	74
10	17498	21486	123
TSH (ng/mL)			
0.01	1146	660	58
0.03	1566	1360	87
0.1	2048	2232	109
0.3	5236	3112	59
1	16252	8790	54
3	16092	16328	101
サイクリックAMPアッセイバッファー	610	560	

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

nd = 未測定

【 0 1 2 3 】

【表7】

表2f

AlaへのTSHR Asp232の突然変異

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3 又は平均 ; n = 2)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1776	720	41
0.3	4086	1442	35
1	10000	3560	36
3	18030	8120	45
10	11250	11210	100
TSH (ng/mL)			
0.01	730	632	87
0.03	978	798	82
0.1	2436	1998	82
0.3	5600	5600	100
1	10170	7400	73
3	12800	9384	73
サイクリックAMPアッセイバッファー	368	586	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1006 ±156	804 ±384	80
0.3	2236 ±94	968 ±24	43
1	11138 ±1080	3894 ±320	35
3	12188 ±860	5984 ±690	49
10	16212 ±570	9476 ±650	58
TSH (ng/mL)			
0.01	850 ±54	606 ±34	71
0.03	908 ±148	956 ±152	105
0.1	2026 ±202	1652 ±256	82
0.3	4488 ±2060	3632 ±384	81
1	12034 ±880	7280 ±1070	60
3	16886 ±1400	12216 ±1460	72
サイクリックAMPアッセイバッファー	538 ±40	560 ±24	

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【0124】

【表 8】

表2g

AlaへのTSHR Arg255の突然変異

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3 又は平均; n = 2)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1644 ±156	706 ±108	43
0.3	3370 ±256	808 ±44	24
1	16964 ±1380	4172 ±660	25
3	18078 ±1210	8500 ±880	47
10	17820 ±1150	11208 ±670	63
TSH (ng/mL)			
0.01	950 ±86	826 ±50	87
0.03	1444 ±90	1416 ±86	98
0.1	nd	3784 ±1410	nd
0.3	8624 ±360	8920 ±460	103
1	16014 ±1220	12164 ±1060	76
3	16244 ±1570	13128 ±1170	81
サイクリックAMPアッセイバッファー	830 ±140	718 ±48	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1454	400	28
0.3	3126	534	17
1	6400	2278	36
3	11412	2606	23
10	16878	9584	57
TSH (ng/mL)			
0.01	450	404	90
0.03	778	610	78
0.1	1710	1566	92
0.3	4690	4680	100
1	10082	7180	71
3	14830	11938	80
サイクリックAMPアッセイバッファー	496	290	

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

nd = 未測定

【表 9】

表2h

AlaへのTSHR Trp258の突然変異

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均; n = 2)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	2040	1464	72
0.3	4908	4198	86
1	nd	5964	nd
3	17958	11242	63
10	29824	14208	48
TSH (ng/mL)			
0.01	1354	952	70
0.03	1464	1646	112
0.1	2954	3592	122
0.3	12154	10398	86
1	17270	14774	86
3	13142	17270	131
サイクリックAMPアッセイバッファー	526	390	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	2404	1206	50
0.3	5902	2518	43
1	nd	nd	nd
3	32000	9550	30
10	32000	17782	56
TSH (ng/mL)			
0.01	1026	514	50
0.03	2000	1416	71
0.1	nd	nd	nd
0.3	10716	12022	112
1	16596	13804	83
3	26302	18620	71
サイクリックAMPアッセイバッファー	698	1158	

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

nd = 未測定

【 0 1 2 6 】

【表10】

表2i

AlaへのTSHR Asp276の突然変異

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ; n = 2)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1490	1530	103
0.3	3056	3208	105
1	nd	nd	nd
3	12136	19610	162
10	21740	24030	111
TSH (ng/mL)			
0.01	1184	1282	108
0.03	1470	1550	105
0.1	3188	3748	118
0.3	9466	9180	97
1	12796	15670	122
3	13820	23070	167
サイクリックAMPアッセイバッファー	866	960	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1346	2130	158
0.3	4120	nd	nd
1	nd	nd	nd
3	14216	15236	107
10	18230	21320	117
TSH (ng/mL)			
0.01	866	1236	143
0.03	934	1594	171
0.1	2124	2160	102
0.3	5400	6000	111
1	9880	16640	168
3	16846	20480	122
サイクリックAMPアッセイバッファー	894	1132	

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

nd = 未測定

【0127】

【表 1 1】

表2j

AlaへのTSHR Ser281の突然変異

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ; n = 2)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1080	936	87
0.3	3236	2490	77
1	nd	4722	nd
3	15556	10416	67
10	27712	17190	62
TSH (ng/mL)			
0.01	402	828	206
0.03	708	1152	163
0.1	2068	1464	71
0.3	5200	3188	61
1	18548	9918	53
3	24136	13722	57
サイクリックAMPアッセイバッファー	550	356	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1500	1400	93
0.3	4706	4486	95
1	nd	nd	nd
3	17110	11418	67
10	23010	16384	71
TSH (ng/mL)			
0.01	402	566	141
0.03	708	1028	145
0.1	2068	1824	88
0.3	5200	6250	120
1	18548	10032	54
3	24136	14130	59
サイクリックAMPアッセイバッファー	582	696	

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

nd = 未測定

【 0 1 2 8 】

【表 1 2】

表 3 突然変異する TSHR を含む CHO 細胞の刺激における突然変異(野生型と関連して)の効果の概要

アミノ酸の突然変異	TSH刺激	hMAb TSHR1 Fab 刺激
Asp43がAlaに変異	若干の減少	若干の減少
Glu61がAlaに変異	若干の減少	若干の減少
Glu157がAlaに変異	いくらかのTSH投与の著しい減少	いくらかの抗体投与の著しい減少
Glu178がAlaに変異	若干の減少	若干の減少
Asp203がAlaに変異	若干の減少	若干の減少
Asp232がAlaに変異	若干の減少	<u>著しい減少</u>
Arg255がAlaに変異	若干の減少	<u>著しい減少</u>
Trp258がAlaに変異	ほとんど効果なし	<u>著しい減少</u>
Asp276がAlaに変異	ほとんど効果なし	ほとんど効果なし
Ser281がAlaに変異	若干の減少	若干の減少

10

20

【 0 1 2 9 】

【表 1 3】

表4a

AlaへのTSHR Gln235の突然変異

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	770 ±174	764 ±108	99
0.3	3020 ±398	2434 ±140	81
1	5904 ±650	6356 ±970	108
3	10538 ±2380	13320 ±2080	126
10	17314 ±1980	13486 ±2290	78
サイクリックAMPアッセイバッファー	252 ±58	234 ±24	
TSH (ng/mL)			
0.01	422 ±28	482 ±34	114
0.03	816 ±138	810 ±116	99
0.1	1412 ±86	1488 ±264	105
0.3	4756 ±280	4358 ±690	92
1	9722 ±2330	12656 ±160	130
3	12826 ±5000	14266 ±2730	111
サイクリックAMPアッセイバッファー	252 ±58	234 ±24	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1958 ±40	1722 ±172	88
0.3	3374 ±244	3378 ±556	100
1	11144 ±1850	11128 ±350	100
3	15536 ±820	18374 ±3140	118
10	17830 ±1560	17616 ±1750	99
サイクリックAMPアッセイバッファー	518 ±264	374 ±70	
TSH (ng/mL)			
0.01	1074 ±272	1054 ±222	98
0.03	2062 ±310	1878 ±298	91
0.1	4192 ±992	2912 ±254	69
0.3	11260 ±740	10458 ±1240	93
1	14364 ±720	18170 ±1680	126
3	18175 ±1220	20128 ±3240	111
サイクリックAMPアッセイバッファー	518 ±264	374 ±70	

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【表14】

表4b

AlaへのTSHR Thr257の突然変異

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1080 ±26	972 ±24	90
0.3	2438 ±382	1796 ±366	74
1	16096 ±4100	12862 ±4960	80
3	16788 ±3320	11692 ±1250	70
10	23688 ±3800	19994 ±3380	84
サイクリックAMPアッセイバッファー	550 ±58	402 ±132	
TSH (ng/mL)			
0.01	680 ±54	716 ±216	105
0.03	996 ±96	1142 ±98	115
0.1	1752 ±226	3188 ±364	182
0.3	6962 ±1320	6284 ±100	90
1	12316 ±4250	12486 ±3100	101
3	18212 ±3670	16674 ±1650	92
サイクリックAMPアッセイバッファー	550 ±58	402 ±132	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1532 ±580	998 ±80	65
0.3	3656 ±744	2718 ±286	74
1	8516 ±2600	5694 ±310	67
3	23294 ±6540	21948 ±740	94
10	30580 ±400	27366 ±2330	89
サイクリックAMPアッセイバッファー	690 ±50	584 ±66	
TSH (ng/mL)			
0.01	864 ±62	776 ±34	90
0.03	1244 ±550	1084 ±1.2	87
0.1	2882 ±584	3390 ±294	118
0.3	8584 ±2260	6996 ±680	82
1	19548 ±5380	25080 ±3710	128
3	30344	31488 ±430	104
サイクリックAMPアッセイバッファー	690 ±50	584 ±66	

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【表 15】

表4c

AlaへのTSHR Arg255及びAlaへのTSHR Trp258の突然変異

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 \pm SD; n = 3)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1718 \pm 92	1502 \pm 78	87
0.3	3116 \pm 204	1622 \pm 428	52
1	15540 \pm 2370	2708 \pm 340	17
3	14408 \pm 1960	1958 \pm 280	14
10	18652 \pm 2170	5506 \pm 130	30
TSH (ng/mL)			
0.01	1968 \pm 136	1786 \pm 66	91
0.03	2754 \pm 318	2628 \pm 144	95
0.1	4246 \pm 196	4488 \pm 742	106
0.3	12026 \pm 870	12608 \pm 1570	105
1	18016 \pm 3270	16362 \pm 700	91
3	18256 \pm 990	19162 \pm 1230	105
サイクリックAMPアッセイバッファー	1014 \pm 220	1386 \pm 460	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1778 \pm 24	646 \pm 48	36
0.3	3282 \pm 622	676 \pm 14	21
1	7054 \pm 2380	720 \pm 270	10
3	15036 \pm 700	1876 \pm 240	12
10	18292 \pm 2130	3330 \pm 620	18
TSH (ng/mL)			
0.01	910 \pm 146	796 \pm 60	87
0.03	1998 \pm 252	1558 \pm 80	78
0.1	5492 \pm 402	4066 \pm 644	74
0.3	8304 \pm 1280	7238 \pm 850	87
1	16858 \pm 1210	13718 \pm 1250	81
3	17088 \pm 2130	18132 \pm 2870	106
サイクリックAMPアッセイバッファー	666 \pm 88	662 \pm 78	

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【 0 1 3 2 】

10

20

30

40

【表16】

表4d

AspへのTSHR Arg255の突然変異

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1124 ±48	488 ±60	43
0.3	2578 ±152	478 ±50	19
1	8950 ±680	370 ±150	4
3	14870 ±2520	620 ±110	4
10	13750 ±1620	1440 ±20	10
TSH (ng/mL)			
0.01	1110 ±166	776 ±94	70
0.03	1360 ±210	1206 ±54	89
0.1	3246 ±594	2806 ±586	86
0.3	8880 ±800	8340 ±350	94
1	10030 ±2040	12400 ±390	124
3	12260 ±140	9980 ±510	81
サイクリックAMPアッセイバッファー	270 ±84	170 ±40	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1088 ±88	374 ±18	34
0.3	2250 ±240	360 ±30	16
1	5904 ±620	154 ±8	3
3	10604 ±420	190 ±4	2
10	17010	150 ±20	1
TSH (ng/mL)			
0.01	516 ±58	590 ±148	114
0.03	1048 ±320	908 ±54	87
0.1	3788 ±644	2382 ±858	63
0.3	6906 ±1090	9278 ±1310	134
1	18284 ±3660	9910 ±1100	54
3	17370	16000	92
サイクリックAMPアッセイバッファー	670 ±548	424 ±54	

10

20

30

40

【0133】

【表 17】

表 5 突然変異する TSHR を含む CHO 細胞の刺激における突然変異(野生型と関連して)の効果の概要

アミノ酸の突然変異	TSH刺激	hMAb TSHR1 Fab 刺激
Gln235がAlaに変異	ほとんど効果なし	ほとんど効果なし
Thr237がAlaに変異	ほとんど効果なし	ほとんど効果なし
Arg255がAspに変異	ほとんど効果なし	<u>基本的に消失</u>
Arg255がAlaに変異 及び Trp258がAlaに変異	ほとんど効果なし	<u>基本的に消失</u>

10

【 0 1 3 4 】

【表 18】

**表 6 野生型 TSHR 及び Asp に変異した Arg255 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、
グレース病(G1-G14)患者の 14 の血清によるサイクリック AMP 生成の刺激**

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	520 ±350	650 ±4	125
HBDプール	570 ±360	420 ±360	74
G1	11490 ±1030	3840 ±400	33
G2	9250 ±950	1420 ±630	15
G3	4590 ±910	950 ±240	21
G4	7340 ±370	750 ±570	10
G5	8480 ±800	1390 ±200	16
G6	3820 ±480	1140 ±200	30
G7	7880 ±580	1680 ±210	21
G8	9310 ±650	2530 ±380	27
TSH (3ng/mL)	10180 ±640	12000 ±1960	118
hMAb TSHR1 Fab (10ng/mL)	12060 ±1130	1860 ±190	15
実験2			
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	150 ±20	340 ±330	227
HBD	150 ^a	150 ±10	100
G9	12250 ±1590	1470 ±150	12
G10	5880 ±160	560 ±350	10
G11	1790 ±230	340 ±300	19
G12	3290 ±360	140 ^a	4
G13	8580 ±730	2160 ±140	25
G14	2750 ±20	700 ±80	25
TSH (3ng/mL)	21130 ^a	20580 ±2520	97
hMAb TSHR1 Fab (10ng/mL)	19240 ±2550	1510 ±310	8

^a 重複して行った平均値

HBD = 健常な血液ドナーの血清のプール

【 0 1 3 5 】

【表 19】

**表 7 野生型 TSHR 及び Asp に変異した Arg255 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、
hMAb TSHR1 IgG とドナーの血漿の異なる投与による、サイクリック AMP 生成の刺激**

サンプルの希釈 又は濃度 ^b	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
HBD/10	580 ±180	270 ^c	47
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	790 ±180	450 ±160	57
TSH (3 ng/mL)	19010 ±2360	16120 ±1230	85
hMAb TSHR1 IgG			
1ng/mL	4860 ±720	940 ±70	19
10ng/mL	16230 ±230	3160 ±380	19
100ng/mL	15410 ±1400	5700 ±360	37
1µg/mL	16340 ±3690	5030 ±780	31
ドナーの血漿の希釈			
2000x	2400 ±130	820 ±120	34
1000x	4180 ±980	970 ±240	23
200x	11020 ±900	1790 ±240	16
100x	14860 ±1560	2550 ±530	17
20x	15750 ±1480	3160 ±500	20

^a ドナーの血漿は、hMAb TSHR1 ハイブリドーマの調製において、リンパ球を抽出するために使用された同じ血液サンプルから得られた。

^b サンプルはサイクリックAMPアッセイバッファーで希釈された。

^c 重複して行った平均値

HBD = 健常な血液ドナーの血清のプール

【0136】

10

20

30

【表 2 0】

表 8 野生型 TSHR 及び Asp に変異した Arg255 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、6 の異なるマウスの甲状腺刺激モノクローナル抗体(mTSMABs)による、サイクリック AMP 生成の刺激

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	502 ±76	456 ±30	91
hMAb TSHR1 (10ng/mL)	18220 ±1210	1160 ±150	6
2G2 (1µg/mL)	524 ±22	540 ±20	103
TSMAB 1 (1µg/mL)	4810 ±1250	1740 ±170	36
TSMAB 2 (1µg/mL)	3440 ±420	860 ±90	25
TSMAB C (10ng/mL)	9960 ±1130	1490 ±150	15
TSMAB D (1µg/mL)	10850 ±1340	1520 ±170	14
TSMAB E (1µg/mL)	2490 ±160	640 ±10	26
TSMAB F (100ng/mL)	16200 ±2680	2670 ±110	16

^aサイクリックAMPバッファー中の試験サンプル

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(ネガティブコントロール)

【 0 1 3 7 】

10

20

30

【表 2 1】

表 9 野生型 TSHR 及び Asp に変異した Arg255 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、TSH が誘発したサイクリック AMP 生成、TSH アンタゴニスト活性を有する 4 つの血清(B1-B4)の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
サイクリックAMPアッセイバッファー	936 ±336	636 ±86	68
TSH ^b	9550 ±740	9580 ±840	100
HBD	610 ±84	514 ±34	84
HBD + TSH ^b	8510 ±590	5070 ±720	60
B1	390 ±92	496 ±90	127
B1 + TSH ^b	740 ±590	520 ±150	70
B2	408 ±30	408 ±172	100
B2 + TSH ^b	240 ±20	440 ±140	183
B3	504 ±20	522 ±96	104
B3 + TSH ^b	320 ±60	550 ±310	172
B4	414 ±326	474 ±12	114
B4 + TSH ^b	1180 ±430	690 ±340	58

10

20

B 阻害%の結果

TSHアンタゴニスト活性を有する血清	TSH刺激の阻害% ^c	
	野生型TSHR	変異型TSHR
B1	91	90
B2	97	91
B3	96	89
B4	86	86

30

HBD = 健康な血液ドナーの血清のプール

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル ; すべての血清は、10xの最終希釈でアッセイされた。

^b TSH終濃度=0.3ng/mL

$$c \quad \text{阻害\%} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{血清B1, B2, B3又はB4を加えたTSHの存在するcAMP}}{\text{HBDを加えたTSHの存在するcAMP}} \right]$$

40

【表 2 2】

表 10 野生型 TSHR 及び Asp に変異した Arg255 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、TSH が誘発したサイクリック AMP 生成、TSH アンタゴニスト活性を有する、異なる希釈の血清 B3(表 9)の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプルの希釈 ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
B3 1000x	718 ±68	462 ±80	64
B3 1000x + TSH ^c	11650 ±710	3710 ±570	32
B3 100x	626 ±50	228 ±24	36
B3 100x + TSH ^c	7590 ±480	180 ±20	2
B3 10x	358 ±46	190 ±20	53
B3 10x + TSH ^c	230 ±98	310 ±230	135
HBD 1000x	718 ^b	410 ±22	57
HBD 1000x + TSH ^c	12210 ±820	12594 ±496	103
HBD 100x	768 ±144	440 ±62	57
HBD 100x + TSH ^c	9970 ±800	10960 ±750	110
HBD 10x	626 ±106	346 ±66	55
HBD 10x + TSH ^c	8130 ±980	6920 ±360	85

10

20

B 阻害%の結果

TSHアンタゴニスト活性を有する血清の希釈	TSH刺激の阻害% ^d	
	野生型TSHR	変異型TSHR
B3 1000x	5	70
B3 100x	24	98
B3 10x	97	96

30

HBD = 健常な血液ドナーの血清のプール

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル

^b 重複して行った平均値

^c TSH終濃度=0.3ng/mL

^d 阻害%=100 x $\left[1 - \frac{\text{血清 B3+TSHの存在するcAMP}}{\text{HBD+TSHの存在するcAMP}} \right]$

40

ここで試験サンプルとHBD希釈は同じ。

【表 2 3】

表 11 野生型 TSHR 及び Asp に変異した Arg255 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、TSH が誘発したサイクリック AMP 生成。TSH アンタゴニスト活性を有する、TSH レセプター(9D33)に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	1208 ±20	776 ±344	64
TSH ^b	15410 ±1450	12410 ±3030	81
2G2 1µg/mL + TSH ^b	10890 ±1130	10770 ±1040	99
2G2 10µg/mL + TSH ^b	11580 ±720	11540 ±260	100
2G2 100µg/mL + TSH ^b	11710 ±1890	10450 ±1140	89
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	12960 ^c	11780 ±750	91
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	11730 ±220	11760 ±940	100
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	9960 ±520	5250 ±610	53
9D33 1µg/mL + TSH ^b	7530 ±1150	1160 ±140	15
9D33 10µg/mL + TSH ^b	2560 ±1470	700 ±220	27
9D33 100µg/mL + TSH ^b	1180 ±70	490 ±80	42
9D33 100µg	1178 ±60	558 ±216	47

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^d	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	29	13
2G2 10µg/mL	25	7
2G2 100µg/mL	24	16
9D33 0.001µg/mL	16	5
9D33 0.01µg/mL	24	5
9D33 0.1µg/mL	35	58
9D33 1µg/mL	51	91
9D33 10µg/mL	83	94
9D33 100µg/mL	92	96

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル

^b TSH終濃度=0.3ng/mL

^c 重複して行った平均値

^d 阻害%=100 x $\left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【表 2 4】

**表 12 野生型(非変異型)及び変異型 TSHレセプター試料に対する TSH 及び hMAb TSHR1 Fab 結合の
スキャチャード(Scatchard)分析**

レセプター試料	TSHにおけるアフィニティ	hMAb TSHR1 Fabにおけるアフィニティ
野生型	$4.2 \pm 1.0 \times 10^9$ L/mol	$2.9 \pm 0.6 \times 10^{10}$ L/mol
Asp43がAlaに変異	3.1×10^9 L/mol	3.0×10^{10} L/mol
Glu61がAlaに変異	2.7×10^9 L/mol	2.9×10^{10} L/mol
Glu157がAlaに変異	TSH結合は検出不可能	1.9×10^{10} L/mol
Glu178がAlaに変異	0.9×10^9 L/mol	0.6×10^{10} L/mol
Asp203がAlaに変異	1.9×10^9 L/mol	1.6×10^{10} L/mol
Asp232がAlaに変異	TSH結合は検出不可能	hMAb TSHR1 Fab結合は検出不可能
Arg255がAlaに変異	1.9×10^9 L/mol	0.5×10^{10} L/mol
Trp258がAlaに変異	TSH結合は検出不可能	1.0×10^{10} L/mol
Asp276がAlaに変異	3.4×10^9 L/mol	1.6×10^{10} L/mol
Ser281がAlaに変異	3.4×10^9 L/mol	2.3×10^{10} L/mol

10

20

【 0 1 4 1 】

30

【表 25】

表 13a 野生型 TSHR 及び Ala に変異した Asp43 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、
TSH が誘発したサイクリック AMP 生成、TSH アンタゴニスト活性を有する、TSH レセプター(9D33)に対する
モノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	84 ±13	128 ±20	152
TSH	7142 ±389	6858 ±2398	96
2G2 1µg/mL + TSH ^b	6631 ±226	6854 ^c	103
2G2 10µg/mL + TSH ^b	7928 ±1448	7876 ±343	99
2G2 100µg/mL + TSH ^b	6011 ±642	7572 ±196	126
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	5670 ±1727	5989 ±366	106
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	6809 ±411	6160 ^c	90
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	4958 ±1852	5462 ±467	110
9D33 1µg/mL + TSH ^b	1636 ±226	1851 ±314	113
9D33 10µg/mL + TSH ^b	1388 ±416	1175 ±116	85
9D33 100µg/mL + TSH ^b	681 ±258	863 ±192	127
9D33 100µg	1097 ±362	107 ±16	10

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^d	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	7	0
2G2 10µg/mL	-11	-15
2G2 100µg/mL	16	-10
9D33 0.001µg/mL	21	13
9D33 0.01µg/mL	5	10
9D33 0.1µg/mL	31	20
9D33 1µg/mL	77	73
9D33 10µg/mL	81	83
9D33 100µg/mL	90	87

* サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル

b TSH終濃度=0.5ng/mL

c 重複して行った平均値

$$d \text{ 阻害\%} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【 0 1 4 2 】

【表 26】

表 13b 野生型 TSHR 及び Ala に変異した Glu61 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、TSH が誘発したサイクリック AMP 生成、TSH アンタゴニスト活性を有する、TSH レセプター(9D33)に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	154 ±16	113 ±35	86
TSH	15616 ±3992	12824 ±651	82
2G2 1µg/mL + TSH ^b	10613 ±1188	15077 ±2841	142
2G2 10µg/mL + TSH ^b	9163 ^c	12327 ^c	135
2G2 100µg/mL + TSH ^b	12967 ^c	14982 ±908	116
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	11478 ±1868	14708 ±1441	128
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	12543 ^c	16118 ±2133	129
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	13098 ±253	7695 ±3489	59
9D33 1µg/mL + TSH ^b	3249 ±162	3960 ±232	122
9D33 10µg/mL + TSH ^b	1819 ±609	2800 ±201	154
9D33 100µg/mL + TSH ^b	625 ±27	1679 ±546	269
9D33 100µg	87 ±43	nd	nd

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^d	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	32	-18
2G2 10µg/mL	41	4
2G2 100µg/mL	17	-17
9D33 0.001µg/mL	26	-15
9D33 0.01µg/mL	20	-26
9D33 0.1µg/mL	16	40
9D33 1µg/mL	79	69
9D33 10µg/mL	88	78
9D33 100µg/mL	96	87

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル^b TSH終濃度=0.5ng/mL^c 重複して行った平均値
$$^d \text{ 阻害\%} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

nd =未測定

【 0 1 4 3 】

【表 27】

表 13c 野生型 TSHR 及び Ala に変異した Glu178 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、
TSH が誘発したサイクリック AMP 生成、TSH アンタゴニスト活性を有する、TSH レセプター(9D33)に対する
モノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	122 ±25	ud	nd
TSH	6162 ±458	4613 ^c	75
2G2 1µg/mL + TSH ^b	5070 ±271	5825 ^c	115
2G2 10µg/mL + TSH ^b	4493 ^c	nd	nd
2G2 100µg/mL + TSH ^b	4468 ±1019	4083 ±1170	91
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	2784 ±625	4062 ±637	146
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	3255 ±124	4476 ±1383	138
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	3439 ±147	1886 ±396	55
9D33 1µg/mL + TSH ^b	754 ±372	540 ±303	72
9D33 10µg/mL + TSH ^b	774 ±99	519 ±135	67
9D33 100µg/mL + TSH ^b	654 ±115	395 ±241	60
9D33 100µg	83 ±42	34 ±7	41

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^d	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	18	-26
2G2 10µg/mL	27	nd
2G2 100µg/mL	27	11
9D33 0.001µg/mL	55	12
9D33 0.01µg/mL	53	3
9D33 0.1µg/mL	44	59
9D33 1µg/mL	88	88
9D33 10µg/mL	87	89
9D33 100µg/mL	89	91

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル^b TSH終濃度=0.3ng/mL^c 重複して行った平均値

$$^d \text{ 阻害\%} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

ud = 検出不可

nd = 未測定

【 0 1 4 4 】

【表 2 8】

表 13d 野生型 TSHR 及び Ala に変異した Asp203 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、TSH が誘発したサイクリック AMP 生成、TSH アンタゴニスト活性を有する、TSH レセプター(9D33)に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	140 ±11	134 ^c	96
TSH	6227 ±1211	6167 ±923	99
2G2 1µg/mL + TSH ^b	4307 ±553	6428 ^c	149
2G2 10µg/mL + TSH ^b	5579 ±1128	4708 ±908	84
2G2 100µg/mL + TSH ^b	6920 ±1455	5204 ±787	75
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	4916 ±405	5093 ±581	104
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	4600 ±394	5671 ±1164	123
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	3814 ±342	2905 ±295	76
9D33 1µg/mL + TSH ^b	760 ±315	1322 ±125	174
9D33 10µg/mL + TSH ^b	466 ^c	498 ±97	107
9D33 100µg/mL + TSH ^b	171 ^c	275 ±27	161
9D33 100µg	159 ±22	151 ±23	95

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^d	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	31	-4
2G2 10µg/mL	10	24
2G2 100µg/mL	-11	16
9D33 0.001µg/mL	21	17
9D33 0.01µg/mL	26	8
9D33 0.1µg/mL	39	53
9D33 1µg/mL	88	79
9D33 10µg/mL	93	92
9D33 100µg/mL	97	96

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル

^b TSH終濃度=0.3ng/mL

^c 重複して行った平均値

^d 阻害%=100 x $\left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【 0 1 4 5 】

【表 29】

表 13e 野生型 TSHR 及び Ala に変異した Gln235 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、
TSH が誘発したサイクリック AMP 生成、TSH アンタゴニスト活性を有する、TSH レセプター(9D33)に対する
モノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	524 ^c	141 ^c	27
TSH	12503 ±1060	11847 ±689	95
2G2 1µg/mL + TSH ^b	12569 ±1992	13130 ^c	104
2G2 10µg/mL + TSH ^b	14948 ±1044	11648 ±723	78
2G2 100µg/mL + TSH ^b	12514 ±2316	11909 ±533	95
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	10756 ±1623	12067 ^c	112
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	13418 ±1640	14843 ±2529	111
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	11906 ±1805	11792 ±898	99
9D33 1µg/mL + TSH ^b	10325 ±816	10567 ±685	102
9D33 10µg/mL + TSH ^b	8185 ^c	4368 ^c	53
9D33 100µg/mL + TSH ^b	6127 ±166	2171 ^c	35
9D33 100µg	156 ±8	499 ±37	320

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^d	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	-1	-11
2G2 10µg/mL	-20	2
2G2 100µg/mL	0	-1
9D33 0.001µg/mL	14	-2
9D33 0.01µg/mL	-7	-25
9D33 0.1µg/mL	5	0
9D33 1µg/mL	17	11
9D33 10µg/mL	35	63
9D33 100µg/mL	51	82

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル^b TSH終濃度=3ng/mL^c 重複して行った平均値^d 阻害%=100 x

$$\left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSH の存在する cAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【 0 1 4 6 】

【表 3 0】

表 13f 野生型 TSHR 及び Ala に変異した Arg255 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、TSH が誘発したサイクリック AMP 生成。TSH アンタゴニスト活性を有する、TSH レセプター(9D33)に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	197 ±34	325 ±47	165
TSH	6871 ±970	10822 ±1435	158
2G2 1µg/mL + TSH ^b	6407 ±1141	11502 ±2692	180
2G2 10µg/mL + TSH ^b	5803 ±154	8806 ^c	152
2G2 100µg/mL + TSH ^b	8283 ±1485	12027 ±463	145
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	7451 ±1473	12018 ±2501	161
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	6528 ±2277	11961 ±1453	183
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	3019 ±528	6107 ±753	202
9D33 1µg/mL + TSH ^b	1765 ±145	2858 ±268	162
9D33 10µg/mL + TSH ^b	1369 ±146	1873 ±247	137
9D33 100µg/mL + TSH ^b	768 ±158	1662 ±177	216
9D33 100µg	223 ±19	402 ±57	180

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^d	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	7	-6
2G2 10µg/mL	16	19
2G2 100µg/mL	-21	-11
9D33 0.001µg/mL	-8	-11
9D33 0.01µg/mL	5	-11
9D33 0.1µg/mL	56	44
9D33 1µg/mL	74	74
9D33 10µg/mL	80	83
9D33 100µg/mL	89	85

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル^b TSH終濃度=0.3ng/mL^c 重複して行った平均値

$$^d \text{ 阻害\%} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【 0 1 4 7 】

【表 3 1】

表 13g 野生型 TSHR 及び Ala に変異した Thr257 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、TSH が誘発したサイクリック AMP 生成。TSH アンタゴニスト活性を有する、TSH レセプター(9D33)に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	365 ±40	410 ±82	112
TSH	4491 ^c	4179 ±281	93
2G2 1µg/mL + TSH ^b	3900 ±124	3723 ±344	95
2G2 10µg/mL + TSH ^b	4478 ±153	3549 ±199	79
2G2 100µg/mL + TSH ^b	4038 ±549	4191 ±686	104
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	4400 ±672	3655 ±244	83
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	3301 ±114	3796 ±372	115
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	2804 ±474	2225 ±45	79
9D33 1µg/mL + TSH ^b	1256 ±227	1486 ±217	118
9D33 10µg/mL + TSH ^b	536 ^c	598 ^c	112
9D33 100µg/mL + TSH ^b	435 ±19	523 ±53	120
9D33 100µg	356 ±11	457 ^c	128

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^d	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	13	11
2G2 10µg/mL	0	15
2G2 100µg/mL	10	0
9D33 0.001µg/mL	2	13
9D33 0.01µg/mL	26	9
9D33 0.1µg/mL	38	47
9D33 1µg/mL	72	64
9D33 10µg/mL	88	86
9D33 100µg/mL	90	87

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル^b TSH終濃度=0.3ng/mL^c 重複して行った平均値
^d 阻害%=100 x $\left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【 0 1 4 8 】

【表 3 2】

表 13h 野生型 TSHR 及び Ala に変異した Trp258 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、TSH が誘発したサイクリック AMP 生成。TSH アンタゴニスト活性を有する、TSH レセプター(9D33)に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		
	野生型 TSHR	変異型 TSHR	変異型/野生型(%)
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	119 ±13	154 ±41	129
TSH	8836 ±2375	8958 ±703	101
2G2 1µg/mL + TSH ^b	7339 ±1966	6244 ±1452	85
2G2 10µg/mL + TSH ^b	5250 ±626	7015 ±758	134
2G2 100µg/mL + TSH ^b	7991 ±3095	6842 ±771	111
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	9371 ±1878	7449 ^c	79
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	7411 ±1694	6123 ±685	83
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	6379 ±226	3435 ±359	54
9D33 1µg/mL + TSH ^b	1893 ±1164	1990 ±197	105
9D33 10µg/mL + TSH ^b	1342 ±451	1150 ±84	86
9D33 100µg/mL + TSH ^b	689 ±118	601 ±17	87
9D33 100µg	179 ±11	117 ±25	65

10

20

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^d	
	野生型 TSHR	変異型 TSHR
2G2 1µg/mL	17	30
2G2 10µg/mL	41	22
2G2 100µg/mL	10	1
9D33 0.001µg/mL	-6	17
9D33 0.01µg/mL	16	32
9D33 0.1µg/mL	28	62
9D33 1µg/mL	79	78
9D33 10µg/mL	85	87
9D33 100µg/mL	92	93

30

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル

^b TSH終濃度=0.3ng/mL

^c 重複して行った平均値

^d 阻害% = 100 x $\left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$

40

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【 0 1 4 9 】

【表 3 3】

表 13i 野生型 TSHR 及び Ala に変異した Ser281 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、TSH が誘発したサイクリック AMP 生成。TSH アンタゴニスト活性を有する、TSH レセプター(9D33)に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	94 ±4	173 ±58	184
TSH	4846 ±620	9761 ±4189	201
2G2 1µg/mL + TSH ^b	4887 ±1492	7017 ^c	144
2G2 10µg/mL + TSH ^b	5206 ^c	6929 ±1601	133
2G2 100µg/mL + TSH ^b	5128 ±1801	13529 ±2725	264
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	6502 ±2731	5846 ±613	90
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	4502 ±716	7709 ±1418	171
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	4745 ±290	4119 ±1045	87
9D33 1µg/mL + TSH ^b	1994 ±361	1973 ±45	99
9D33 10µg/mL + TSH ^b	1184 ±136	1143 ±322	97
9D33 100µg/mL + TSH ^b	1332 ±469	1066 ±319	80
9D33 100µg	186 ±15	172 ±24	92

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^d	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	-1	28
2G2 10µg/mL	-7	29
2G2 100µg/mL	-6	-39
9D33 0.001µg/mL	-34	40
9D33 0.01µg/mL	7	21
9D33 0.1µg/mL	2	58
9D33 1µg/mL	59	80
9D33 10µg/mL	76	88
9D33 100µg/mL	73	89

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル^b TSH終濃度=0.3ng/mL^c 重複して行った平均値

$$^d \text{ 阻害\%} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【 0 1 5 0 】

【表 3 4】

表 13j 野生型 TSHR 並びに Ala に変異した Arg255 及び Ala に変異した Trp258 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、TSH が誘発したサイクリック AMP 生成、TSH アンタゴニスト活性を有する、TSH レセプター(9D33) に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	876 ±26	536 ±108	61
TSH	11487 ±683	6935 ±796	60
2G2 1µg/mL + TSH ^b	9762 ±684	7202 ±334	74
2G2 10µg/mL + TSH ^b	9374 ±1023	6369 ±33	68
2G2 100µg/mL + TSH ^b	12285 ±1718	6513 ±254	53
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	8773 ±1226	6741 ±381	77
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	10499 ±1934	5660 ±157	54
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	7500 ±336	1647 ±197	22
9D33 1µg/mL + TSH ^b	3468 ±548	643 ±80	19
9D33 10µg/mL + TSH ^b	1243 ±57	497 ±132	40
9D33 100µg/mL + TSH ^b	1063 ±163	189 ±24	18
9D33 100µg	695 ±33	386 ±28	56

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^c	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	15	-4
2G2 10µg/mL	18	8
2G2 100µg/mL	-7	6
9D33 0.001µg/mL	24	3
9D33 0.01µg/mL	9	18
9D33 0.1µg/mL	35	76
9D33 1µg/mL	70	91
9D33 10µg/mL	89	93
9D33 100µg/mL	91	97

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル^b TSH終濃度=0.3ng/mL

$$^c \text{ 阻害\%} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【 0 1 5 1 】

【表 3 5】

表 14 **マウスモノクローナル抗体 9D33 による TSH が介在したサイクリック AMP 刺激の
阻害における突然変異(野生型と比較して)の効果の概要**

アミノ酸の突然変異	9D33によるTSHが介在したサイクリックAMP刺激の阻害
Asp43がAlaに変異	効果なし
Glu61がAlaに変異	効果なし
Glu178がAlaに変異	効果なし
Asp203がAlaに変異	効果なし
Glu235がAlaに変異	効果なし
Arg255がAlaに変異	効果なし
Arg255がAspに変	増強された効果
Thr257がAlaに変異	効果なし
Trp258がAlaに変異	効果なし
Ser281がAlaに変異	効果なし
Arg255がAlaに変異及びTrp258がAlaに変異	効果なし

10

20

【 0 1 5 2 】

【表 3 6】

表 15a hMAb TSHR1 及び TSH によって TSHR を含んでいる CHO 細胞の
サイクリック AMP の刺激において Ala への TSHR Lys58 の突然変異の効果

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1410 ±124	997 ±132	71
0.3	1718 ±381	1962 ±135	114
1	3067 ±270	8960 ±1501	292
3	13569 ±3730	6003 ±242	44
10	16312 ±1559	17808 ±4348	109
TSH (ng/mL)			
0.01	1410 ±124	1621 ±162	115
0.03	2881 ±684	3020 ±443	105
0.1	nd	nd	nd
0.3	17623 ±493	19584 ±1889	111
1	15629 ±2427	26367 ±1861	169
3	16621 ±1196	20053 ±3738	121
サイクリックAMPアッセイバッファー	377 ±229	356 ±122	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1206 ±70	777 ±75	64
0.3	2571 ±130	1298 ±121	50
1	6754 ±1140	2948 ±169	44
3	11485 ±1262	7373 ±197	64
10	12204 ±1056	13538 ±1409	111
TSH (ng/mL)			
0.01	675 ±34	783 ±57	116
0.03	1207 ±251	1441 ±175	119
0.1	3350 ±326	3637 ±245	109
0.3	9564 ±785	8522 ±335	89
1	12149 ±73	14785 ±1379	122
3	13701 ±652	18020 ±1527	132
サイクリックAMPアッセイバッファー	429 ±31	569 ±23	

nd = 未測定

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【 0 1 5 3 】

【表 3 7】

表 15b hMAb TSHR1 及び TSH によって TSHR を含んでいる CHO 細胞の
サイクリック AMP の刺激において Ala への TSHR Ile60 の突然変異の効果

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均 \pm SD (n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1432 \pm 83	1574 \pm 284	110
0.3	3834 \pm 101	3060 \pm 648	80
1	9355 \pm 1170	6368 \pm 673	68
3	17404 \pm 2551	11276 \pm 798	65
10	21898 \pm 1209	22384 \pm 3337	102
TSH (ng/mL)			
0.01	1106 \pm 127	966 \pm 72	87
0.03	1678 \pm 37	1624 \pm 166	97
0.1	5942 ^a	4550 \pm 538	77
0.3	12023 \pm 2060	9552 \pm 846	79
1	18051 \pm 1955	22768 \pm 5454	126
3	24292 \pm 1961	26734 \pm 511	110
サイクリックAMPアッセイバッファー	654 \pm 19	857 \pm 76	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1537 \pm 223	1434 \pm 115	93
0.3	3684 \pm 149	2812 \pm 192	76
1	9685 \pm 723	7287 \pm 833	81
3	17373 \pm 656	12398 \pm 775	71
10	20390 ^a	18968 \pm 286	93
TSH (ng/mL)			
0.01	1104 \pm 142	1191 \pm 73	108
0.03	1699 \pm 80	2014 \pm 338	119
0.1	4731 \pm 167	4642 \pm 328	98
0.3	12871 \pm 1429	11634 \pm 434	90
1	17341 \pm 592	17668 \pm 1213	102
3	22282 \pm 1483	20934 \pm 554	94
サイクリックAMPアッセイバッファー	834 \pm 97	879 \pm 54	

^a 重複して行った平均値

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【 0 1 5 4 】

【表 3 8】

表 15c hMAb TSHR1 及び TSH によって TSHR を含んでいる CHO 細胞の
サイクリック AMP の刺激において Ala への TSHR Arg80 の突然変異の効果

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1758 ±502	719 ±78	41
0.3	4283 ±192	745 ±55	17
1	11225 ±673	465 ±57	4
3	20033 ±3422	443 ±29	2
10	22299 ±1244	1026 ±350	5
TSH (ng/mL)			
0.01	1019 ±238	1612 ±720	158
0.03	2350 ±1100	3372 ±721	143
0.1	5650 ±304	5902 ^a	104
0.3	12387 ±3782	17557 ±4187	142
1	20052 ±2829	20003 ±2029	100
3	28631 ±1464	17696 ±3212	62
サイクリックAMPアッセイバッファー	683 ±19	676 ±66	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	2311 ±631	1159 ±214	50
0.3	4772 ±930	1352 ±404	28
1	11729 ±1421	1701 ±19	15
3	19197 ±6100	1714 ±189	9
10	19820 ±1443	1676 ±293	8
TSH (ng/mL)			
0.01	1069 ±227	1375 ±136	129
0.03	2810 ±539	3133 ±292	111
0.1	nd	5894 ^a	nd
0.3	14592 ±1531	13199 ±2744	90
1	23710 ±1972	19145 ±1820	81
3	26019 ±4795	21095 ±3355	81
サイクリックAMPアッセイバッファー	594 ±38	1194 ±231	

^a 重複して行った平均値

nd = 未測定

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【 0 1 5 5 】

【表 3 9】

表 15d hMAb TSHR1 及び TSH によって TSHR を含んでいる CHO 細胞の
サイクリック AMP の刺激において Asp への Arg80 の突然変異の効果

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1153 ±19	940 ±157	82
0.3	1933 ±194	923 ±19	48
1	5567 ±1067	895 ±66	16
3	11325 ±1045	1031 ±87	9
10	18903 ±3034	863 ±127	5
TSH (ng/mL)			
0.01	1015 ±71	1015 ±163	100
0.03	1620 ±309	1379 ±58	85
0.1	3470 ±271	2301 ±96	66
0.3	8692 ±455	7790 ±203	90
1	17173 ±1433	9859 ±744	57
3	19360 ±1243	14095 ±1426	73
サイクリックAMPアッセイバッファー	671 ±69	1098 ±66	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	728 ±54	1029 ±122	141
0.3	1435 ±135	807 ±70	56
1	6506 ±317	855 ±344	13
3	9982 ±1363	1089 ±225	11
10	24283 ±6165	649 ±346	3
TSH (ng/mL)			
0.01	815 ±69	1015 ±126	125
0.03	1088 ±116	1962 ±137	180
0.1	3291 ±424	4496 ±47	137
0.3	6511 ±785	11286 ±2733	173
1	13663 ±1309	13474 ±981	99
3	20084 ±4514	15230 ±3881	76
サイクリックAMPアッセイバッファー	905 ±258	785 ±113	

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【 0 1 5 6 】

【表 4 0】

表 15e hMAb TSHR1 及び TSH によって TSHR を含んでいる CHO 細胞の
サイクリック AMP の刺激において Ala への TSHR Tyr82 の突然変異の効果

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均±SD (n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1307 ±198	1316 ±177	100
0.3	2717 ±99	1611 ±225	59
1	7883 ±576	2993 ±741	38
3	11500 ±1811	6786 ±228	59
10	15890 ±3356	10749 ±1312	68
TSH (ng/mL)			
0.01	658 ±164	1764 ±110	268
0.03	1335 ±162	2070 ^a	155
0.1	3567 ±428	3932 ±553	110
0.3	8610 ^a	8104 ±723	94
1	13021 ^a	13821 ±1198	106
3	18076 ±5118	15070 ±2214	83
サイクリックAMPアッセイバッファー	432 ±53	914 ±87	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1393 ±27	1075 ±85	77
0.3	3709 ±434	1511 ±140	41
1	7756 ±918	3507 ±455	42
3	13197 ±2052	6528 ±202	49
10	18635 ±1877	9085 ^a	49
TSH (ng/mL)			
0.01	861 ±83	1047 ±74	122
0.03	1390 ±181	1535 ±234	110
0.1	3846 ±303	3790 ±288	99
0.3	7900 ±820	6400 ±278	81
1	12747 ±1290	9605 ±642	75
3	15892 ±125	16516 ^a	104
サイクリックAMPアッセイバッファー	682 ±97	697 ±12	

^a 重複して行った平均値

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【 0 1 5 7 】

【表 4 1】

表 15f hMAb TSHR1 及び TSH によって TSHR を含んでいる CHO 細胞の
サイクリック AMP の刺激において Ala への TSHR Glu107 の突然変異の効果

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1814 ±152	1135 ±53	63
0.3	4032 ±258	1096 ±28	27
1	9770 ±1020	985 ±90	10
3	17529 ±1597	1136 ±65	6
10	22348 ±3565	1760 ±175	8
TSH (ng/mL)			
0.01	1161 ±153	1160 ±68	100
0.03	2010 ±197	1469 ±111	73
0.1	4433 ±794	1906 ±138	43
0.3	10299 ^a	3717 ±283	36
1	18214 ±1154	8438 ±300	46
3	18540 ±1065	14885 ±2525	80
サイクリックAMPアッセイバッファー	784 ±38	1117 ±57	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1417 ±215	1331 ±95	94
0.3	3190 ±264	1259 ±39	39
1	7438 ±656	1053 ±79	14
3	11470 ±6099	1215 ^a	11
10	19199 ±1545	1793 ±280	9
TSH (ng/mL)			
0.01	1129 ±64	1302 ±118	115
0.03	1482 ±246	1465 ^a	99
0.1	3788 ±432	1996 ^a	53
0.3	8384 ±643	4290 ±120	51
1	12459 ^a	7910 ±64	63
3	15288 ±691	12050 ^a	79
サイクリックAMPアッセイバッファー	416 ±78	1057 ±53	

^a 重複して行った平均値

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【 0 1 5 8 】

【表 4 2】

表 15g hMAb TSHR1 及び TSH によって TSHR を含んでいる CHO 細胞の
サイクリック AMP の刺激において Arg への TSHR Glu107 の突然変異の効果

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均 \pm SD (n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	500 \pm 28	468 \pm 129	94
0.3	1118 \pm 133	350 \pm 13	31
1	5204 \pm 225	ud	ud
3	5424 \pm 566	ud	ud
10	9834 \pm 709	ud	ud
TSH (ng/mL)			
0.01	376 \pm 13	488 \pm 2	130
0.03	608 \pm 122	488 \pm 65	80
0.1	1960 \pm 109	496 \pm 100	25
0.3	3516 \pm 154	440 \pm 183	13
1	7114 \pm 67	1020 \pm 340	14
3	8384 \pm 666	2176 \pm 244	26
サイクリックAMPアッセイバッファー	404 \pm 54	412 \pm 23	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	682 \pm 141	612 \pm 69	90
0.3	1578 \pm 294	650 \pm 27	41
1	4592 \pm 38	366 \pm 71	8
3	6706 \pm 420	430 \pm 48	6
10	8858 \pm 503	404 \pm 26	5
TSH (ng/mL)			
0.01	712 \pm 62	662 \pm 92	93
0.03	1072 \pm 120	670 \pm 55	63
0.1	3680 \pm 178	732 \pm 115	20
0.3	6874 \pm 79	572 \pm 12	8
1	7652 \pm 379	2038 \pm 340	27
3	9250 \pm 2392	3922 \pm 650	42
サイクリックAMPアッセイバッファー	410 \pm 121	586 \pm 24	

ud = 検出不可

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【 0 1 5 9 】

【表 4 3】

表 15h hMAb TSHR1 及び TSH によって TSHR を含んでいる CHO 細胞の
サイクリック AMP の刺激において Ala への TSHR Arg109 の突然変異の効果

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	2160 ±121	1287 ±154	60
0.3	5494 ±360	1704 ±136	31
1	14680 ±475	3291 ±230	22
3	20089 ±1269	7588 ±451	38
10	25202 ±1926	17348 ^a	69
TSH (ng/mL)			
0.01	1436 ±152	1486 ±183	103
0.03	2355 ±85	1886 ±22	80
0.1	nd	4588 ±395	nd
0.3	13613 ±712	8503 ±292	62
1	20552 ±921	19037 ±1144	93
3	24503 ±1410	20440 ±299	83
サイクリックAMPアッセイバッファー	1070 ±141	902 ±141	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	2090 ^a	1122 ±169	54
0.3	3104 ±544	1529 ±65	49
1	8081 ±834	4013 ±733	50
3	17745 ±1891	5641 ±475	32
10	23838 ±3352	11764 ±385	49
TSH (ng/mL)			
0.01	1037 ^a	1632 ±121	112
0.03	1709 ±389	2063 ±317	121
0.1	2634 ^a	3970 ±165	151
0.3	9355 ±1215	10053 ±1175	107
1	17724 ±1701	12994 ±2273	73
3	24335 ±4993	20831 ^a	86
サイクリックAMPアッセイバッファー	739 ±49	843 ±85	

^a 重複して行った平均値

nd = 未測定

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【 0 1 6 0 】

【表 4 4】

表 15i hMAb TSHR1 及び TSH によって TSHR を含んでいる CHO 細胞の
サイクリック AMP の刺激において Asp への TSHR Arg109 の突然変異の効果

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1372 ±71	481 ±32	35
0.3	2649 ±369	512 ±71	19
1	6840 ±108	606 ±41	9
3	12527 ±1189	888 ±68	7
10	17301 ±1894	4140 ±1000	24
TSH (ng/mL)			
0.01	993 ±120	756 ±174	76
0.03	1433 ±74	1034 ±171	72
0.1	2742 ±32	1740 ±114	63
0.3	8283 ±48	4818 ±252	59
1	15571 ±1346	11540 ±379	74
3	20509 ±2613	14110 ±1048	69
サイクリックAMPアッセイバッファー	654 ±72	481 ±2	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1192 ±136	388 ±19	33
0.3	2890 ±205	431 ±95	15
1	7784 ±989	510 ±56	7
3	14298 ±2299	989 ±95	7
10	20908 ±696	2922 ±196	14
TSH (ng/mL)			
0.01	967 ±108	487 ±50	50
0.03	1084 ±32	711 ±77	66
0.1	4432 ±558	1148 ±101	26
0.3	6555 ±763	3211 ±103	49
1	17706 ±1115	7377 ±813	42
3	21807 ±2198	13421 ±966	62
サイクリックAMPアッセイバッファー	570 ±14	420 ±79	

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【 0 1 6 1 】

【表 4 5】

表 15j hMAb TSHR1 及び TSH によって TSHR を含んでいる CHO 細胞の
サイクリック AMP の刺激において Ala への TSHR Lys129 の突然変異の効果

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1536 ±125	1320 ±213	86
0.3	4391 ±441	1270 ±267	29
1	10466 ±1641	2398 ±427	23
3	16666 ±476	4050 ±125	24
10	23264 ±1103	10349 ±944	44
TSH (ng/mL)			
0.01	868 ±138	1761 ±184	203
0.03	1561 ±349	2482 ±294	159
0.1	4548 ±269	4236 ±548	93
0.3	8505 ±119	11128 ±1340	131
1	17249 ±430	11396 ±1457	66
3	17007 ^a	16021 ±4948	94
サイクリックAMPアッセイバッファー	1099 ±8	1217 ±80	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1631 ±75	1475 ±76	90
0.3	3811 ±556	1768 ±233	46
1	9073 ±850	1821 ±143	20
3	15292 ±1346	5892 ±650	39
10	20878 ±2859	10467 ^a	50
TSH (ng/mL)			
0.01	1682 ±59	1715 ±273	102
0.03	2042 ±116	2889 ±393	141
0.1	5969 ±369	5326 ^a	89
0.3	12989 ±613	9891 ±347	76
1	20148 ±3038	15817 ^a	79
3	23202 ±1348	20875 ±1639	90
サイクリックAMPアッセイバッファー	1168 ±47	970 ±257	

^a 重複して行った平均値

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【 0 1 6 2 】

【表 4 6】

表 15k hMAb TSHR1 及び TSH によって TSHR を含んでいる CHO 細胞のサイクリック AMP の刺激において Asp への TSHR Lys129 の突然変異の効果

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	865 ±26	367 ±120	42
0.3	1553 ±361	402 ±64	26
1	5074 ^a	284 ^a	6
3	7400 ±718	275 ±76	4
10	9642 ±210	412 ±131	4
TSH (ng/mL)			
0.01	755 ±116	514 ±112	68
0.03	1034 ±115	982 ±44	95
0.1	3829 ±514	2292 ±294	60
0.3	4967 ^a	4805 ±170	97
1	9675 ±1581	6491 ±607	67
3	9847 ±725	6092 ±160	61
サイクリックAMPアッセイバッファー	536 ^a	244 ±20	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	2539 ^a	484 ±96	19
0.3	4054 ±540	508 ±104	13
1	12154 ±2505	438 ±113	4
3	12618 ^a	423 ^a	3
10	18702 ±804	511 ±216	3
TSH (ng/mL)			
0.01	1236 ±139	692 ±122	56
0.03	4588 ±952	2448 ±410	53
0.1	5620 ±610	4735 ±757	84
0.3	15580 ±2946	12130 ±1978	78
1	22808 ^a	16915 ±852	74
3	23480 ±1160	18031 ±3157	77
サイクリックAMPアッセイバッファー	679 ±48	243 ±31	

^a 重複して行った平均値

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【 0 1 6 3 】

【表 4 7】

表 151 hMAb TSHR1 及び TSH によって TSHR を含んでいる CHO 細胞のサイクリック AMP の刺激において Ala への TSHR Phe130 の突然変異の効果

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	2990 ±1000	1613 ±706	54
0.3	6015 ±512	2126 ±163	35
1	16504 ±2978	3905 ±265	24
3	19850 ±1256	7947 ±841	40
10	21517 ±1037	17480 ±2580	81
TSH (ng/mL)			
0.01	1614 ±336	3371 ±1847	209
0.03	2590 ±672	4668 ±47	180
0.1	nd	6373 ^a	nd
0.3	14754 ±1095	19325 ±4162	131
1	19712 ±2403	26459 ±319	134
3	24515 ±1525	21361 ±805	87
サイクリックAMPアッセイバッファー	704 ±64	998 ±123	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1820 ±165	776 ±83	43
0.3	3536 ±433	899 ±21	25
1	9107 ±1296	1438 ±274	16
3	10390 ±870	3832 ±701	37
10	11042 ±688	6864 ±636	62
TSH (ng/mL)			
0.01	694 ±43	700 ±54	101
0.03	1470 ±395	1616 ±48	110
0.1	2663 ±155	2863 ±400	108
0.3	8206 ±678	4904 ±625	60
1	8888 ±1514	9401 ±1058	106
3	11261 ±937	9735 ±739	86
サイクリックAMPアッセイバッファー	620 ±63	522 ±68	

^a 重複して行った平均値

nd = 未測定

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【 0 1 6 4 】

【表 4 8】

表 15m hMAb TSHR1 及び TSH によって TSHR を含んでいる CHO 細胞のサイクリック AMP の刺激において Ala への TSHR Phe134 の突然変異の効果

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	2205 ±404	1284 ±130	58
0.3	5369 ±753	2149 ±559	40
1	16037 ±697	8482 ±353	53
3	22039 ±1469	12127 ±1947	55
10	20117 ±1880	24649 ±1133	123
TSH (ng/mL)			
0.01	1189 ±278	776 ±70	65
0.03	2004 ±570	1232 ±52	61
0.1	5366 ±665	2622 ±267	49
0.3	11790 ±1622	7654 ±675	65
1	16489 ±2900	12049 ±1239	73
3	24168 ±1405	18525 ±602	77
サイクリックAMPアッセイバッファー	999 ±33	714 ±142	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	2089 ±201	1404 ±67	67
0.3	4016 ±338	2460 ±191	61
1	9400 ±853	6484 ±304	69
3	12799 ±450	11263 ±1128	88
10	14729 ±2011	14146 ±1380	96
TSH (ng/mL)			
0.01	1108 ±43	1022 ±72	92
0.03	1511 ±34	1475 ±92	98
0.1	4111 ±316	2660 ±338	65
0.3	8747 ±646	7108 ±673	81
1	10290 ±108	12726 ±761	124
3	12027 ±996	14785 ±2611	123
サイクリックAMPアッセイバッファー	584 ±168	317 ±19	

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【 0 1 6 5 】

10

20

30

40

【表 4 9】

表 15n hMAb TSHR1 及び TSH によって TSHR を含んでいる CHO 細胞のサイクリック AMP の刺激において Ala への TSHR Asp160 の突然変異の効果

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1328 ±186	814 ±98	61
0.3	3123 ±117	1658 ±180	53
1	8120 ±1331	3850 ±213	47
3	12867 ±1041	7536 ±839	59
10	19292 ±2362	11234 ±1575	58
TSH (ng/mL)			
0.01	1100 ±27	770 ±48	70
0.03	2136 ±566	901 ±95	42
0.1	nd	2012 ±439	nd
0.3	11668 ±2382	4149 ±927	36
1	18079 ±206	8590 ±1072	48
3	16979 ±868	11805 ±1364	70
サイクリックAMPアッセイバッファー	742 ±66	546 ±56	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1430 ±532	578 ±238	40
0.3	2906 ±471	1465 ±392	50
1	10703 ±1591	3239 ±699	30
3	10749 ±662	6772 ±2578	63
10	23355 ^a	10965 ±2713	47
TSH (ng/mL)			
0.01	1054 ±28	789 ±164	75
0.03	2241 ±232	804 ±125	36
0.1	5517 ±755	1419 ±395	26
0.3	14042 ±1192	2731 ±1041	19
1	13411 ±3331	7500 ±531	56
3	22093 ±2324	10942 ±3387	50
サイクリックAMPアッセイバッファー	988 ±69	672 ±180	

^a 重複して行った平均値

nd = 未測定

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【 0 1 6 6 】

【表50】

表 15o hMAb TSHR1 及び TSH によって TSHR を含んでいる CHO 細胞のサイクリック AMP の刺激において Ala への TSHR Lys183 の突然変異の効果

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n=3)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1461 ±50	766 ±78	52
0.3	2482 ±141	1006 ±24	41
1	7550 ±616	1163 ±175	15
3	9020 ±703	1875 ±350	21
10	10168 ±1016	4658 ±518	46
TSH (ng/mL)			
0.01	910 ±110	921 ±121	101
0.03	1289 ±184	1293 ±124	100
0.1	3302 ±482	2132 ±269	65
0.3	6584 ±630	6661 ±293	101
1	8834 ±878	10049 ±996	114
3	9296 ±1282	10131 ±1244	109
サイクリックAMPアッセイバッファー	530 ±185	1020 ±39	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1370 ±113	1379 ±177	101
0.3	2542 ±236	1478 ±290	58
1	6654 ±690	806 ±160	12
3	10310 ±1621	2907 ±267	28
10	14617 ±3147	5071 ±388	35
TSH (ng/mL)			
0.01	699 ±168	1144 ±139	163
0.03	1471 ±144	2193 ±76	149
0.1	3134 ±388	4292 ±917	137
0.3	5976 ±693	7846 ±475	131
1	8083 ±1246	18003 ±4157	222
3	8896 ±565	17403 ±1656	196
サイクリックAMPアッセイバッファー	659 ±105	1010 ±108	
実験3			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1123 ±187	799 ±17	71
0.3	2037 ±537	914 ±49	45
1	6313 ±115	1697 ±357	27
3	7121 ±904	2997 ±195	42
10	8543 ±1196	4838 ±957	57
TSH (ng/mL)			
0.01	964 ±62	846 ±14	88
0.03	1069 ±139	1359 ±87	127
0.1	2903 ±332	3061 ±1253	105
0.3	6579 ±584	5867 ±763	89
1	7556 ±566	9442 ±629	125
3	8963 ±288	10414 ±2070	116
サイクリックAMPアッセイバッファー	610 ±22	804 ±103	

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【0167】

【表 5 1】

表 15p hMAb TSHR1 及び TSH によって TSHR を含んでいる CHO 細胞のサイクリック AMP の刺激において Asp への TSHR Lys183 の突然変異の効果

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1201 ±198	882 ±175	73
0.3	3025 ±387	756 ±74	25
1	9184 ±1712	1070 ±74	12
3	11693 ±254	1596 ±561	14
10	13439 ±1799	2665 ±318	20
TSH (ng/mL)			
0.01	838 ±45	1332 ±75	159
0.03	1387 ±318	2531 ±425	182
0.1	3993 ±712	4037 ±370	101
0.3	9320 ±80	12166 ±821	131
1	12667 ±1548	21066 ±2286	166
3	15764 ±1934	22044 ±1567	140
サイクリックAMPアッセイバッファー	441 ±41	837 ±95	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1227 ±154	668 ±39	54
0.3	2518 ±118	594 ±38	24
1	8013 ±646	809 ±22	10
3	12474 ±540	1097 ±59	9
10	14960 ±989	1822 ±116	12
TSH (ng/mL)			
0.01	693 ±33	1063 ±219	153
0.03	1531 ±101	1711 ±125	112
0.1	3619 ±171	3278 ±7	91
0.3	10721 ±729	10204 ±685	95
1	13599 ±380	13881 ±1383	102
3	17172 ±1329	15261 ±1578	89
サイクリックAMPアッセイバッファー	509 ±51	710 ±51	

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【 0 1 6 8 】

【表 5 2】

表 15q hMAb TSHR1 及び TSH によって TSHR を含んでいる CHO 細胞のサイクリック AMP の刺激において Ala への TSHR Tyr185 の突然変異の効果

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1560 ±238	938 ±68	60
0.3	3654 ±516	1178 ±178	32
1	9506 ±1399	1540 ±537	16
3	13540 ±3538	2974 ±240	22
10	16190 ±2880	4654 ±390	29
TSH (ng/mL)			
0.01	1134 ±36	1148 ±124	101
0.03	1344 ±46	1492 ±72	111
0.1	2218 ±256	2586 ±544	117
0.3	4980 ±464	5260 ±506	106
1	10620 ±1080	8976 ±526	85
3	16054 ±1372	9619 ±1098	60
サイクリックAMPアッセイバッファー	930 ±152	896 ±120	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1754 ±418	620 ±82	35
0.3	2914 ±210	620 ±32	21
1	8630 ±650	1030 ±266	12
3	20120 ^a	1690 ±108	8
10	18380 ±436	3360 ±380	18
TSH (ng/mL)			
0.01	760 ±22	840 ±70	111
0.03	1174 ±230	1150 ±86	98
0.1	1994 ±26	2476 ±395	124
0.3	4980 ±979	3770 ±216	76
1	10460 ±1392	6260 ±792	60
3	16230 ±1754	9060 ±2086	56
サイクリックAMPアッセイバッファー	694 ±11	586 ±56	

^a 重複して行った平均値

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【 0 1 6 9 】

【表 5 3】

表 15r hMAb TSHR1 及び TSH によって TSHR を含んでいる CHO 細胞のサイクリック AMP の刺激において Ala への TSHR Tyr206 の突然変異の効果

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	2730 ±626	1362 ±632	50
0.3	4960 ±300	3366 ±320	68
1	11744 ±1142	5307 ±1033	45
3	14787 ±2786	14223 ±1327	96
10	19505 ±1949	19885 ±3161	102
TSH (ng/mL)			
0.01	920 ±816	822 ±624	89
0.03	2360 ±232	2092 ±198	89
0.1	4276 ±1166	4612 ±754	108
0.3	14415 ^a	6570 ±2268	46
1	13467 ±2475	20320 ±4656	151
3	17150 ±3474	20753 ±5641	121
サイクリックAMPアッセイバッファー	670 ±46	730 ±112	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1815 ±256	1410 ±264	78
0.3	3059 ±388	2594 ±71	85
1	10159 ±2795	6218 ±480	61
3	16264 ±1688	12698 ±705	78
10	18386 ±170	18523 ±3130	101
TSH (ng/mL)			
0.01	1138 ±139	979 ±22	86
0.03	1588 ±262	1523 ±225	96
0.1	2438 ±364	2804 ±211	115
0.3	7787 ±1111	7931 ±414	102
1	12685 ±1379	15817 ±320	125
3	17173 ±512	20529 ±6651	120
サイクリックAMPアッセイバッファー	763 ±122	758 ±65	

^a 重複して行った平均値

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【 0 1 7 0 】

【表 5 4】

表 15s hMAb TSHR1 及び TSH によって TSHR を含んでいる CHO 細胞のサイクリック AMP の刺激において Ala への TSHR Lys209 の突然変異の効果

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	2078 ±431	745 ±9	36
0.3	5275 ±941	1504 ±235	29
1	10842 ±505	3057 ±158	28
3	17487 ±2798	7931 ±2983	45
10	23304 ±1886	12495 ±689	54
TSH (ng/mL)			
0.01	1605 ±609	780 ±80	49
0.03	2711 ±343	1641 ±375	61
0.1	5653 ^a	2798 ±373	49
0.3	15819 ±2569	7423 ±2337	47
1	22465 ±3295	15616 ±336	70
3	24344 ±6711	16125 ±1656	66
サイクリックAMPアッセイバッファー	735 ±69	592 ±14	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1485 ±77	1169 ±88	79
0.3	3934 ±295	1390 ±333	35
1	8271 ±419	4929 ±144	60
3	15762 ±1879	7564 ±528	48
10	25020 ±2040	16556 ±2821	66
TSH (ng/mL)			
0.01	1481 ±286	1106 ±230	75
0.03	2373 ±519	1507 ±160	64
0.1	6160 ^a	2781 ±632	45
0.3	12743 ±2376	6478 ±883	51
1	19059 ±1638	14596 ±2090	77
3	18790 ±2563	16519 ±1386	88
サイクリックAMPアッセイバッファー	911 ±164	989 ±87	

^a 重複して行った平均値

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【 0 1 7 1 】

【表 5 5】

表 15t hMAb TSHR1 及び TSH によって TSHR を含んでいる CHO 細胞のサイクリックAMP の刺激において Arg への TSHR Asp232 の突然変異の効果

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	872 ±87	376 ±33	43
0.3	1807 ±541	345 ±57	19
1	6117 ±1041	336 ±168	5
3	12613 ±887	482 ±112	4
10	17622 ±2689	365 ±176	2
TSH (ng/mL)			
0.01	565 ±37	499 ±36	88
0.03	730 ±205	415 ±83	57
0.1	1718 ±238	401 ±87	23
0.3	5104 ±985	482 ±68	9
1	9314 ±805	247 ±60	3
3	15288 ±4763	337 ±19	2
サイクリックAMPアッセイバッファー	296 ±96	326 ±42	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	579 ±70	310 ±38	54
0.3	1860 ±720	260 ±15	14
1	6492 ±3623	202 ±19	3
3	19766 ±8102	191 ±38	1
10	23054 ±6165	185 ±49	1
TSH (ng/mL)			
0.01	528 ±53	407 ±56	77
0.03	536 ±104	314 ±27	59
0.1	3114 ±586	292 ±29	9
0.3	3318 ±676	598 ±706	18
1	15396 ±4345	220 ±3	1
3	18431 ±4386	174 ±16	1
サイクリックAMPアッセイバッファー	364 ±20	326 ±10	

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【表 5 6】

表 15u hMAb TSHR1 及び TSH によって TSHR を含んでいる CHO 細胞のサイクリック AMP の刺激において Ala への TSHR Lys250 の突然変異の効果

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		
	野生型 TSHR	変異型 TSHR	変異型/野生型(%)
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	nd	nd	nd
0.3	3513 ±322	4225 ±118	120
1	10885 ±74	9440 ±601	87
3	15718 ±1932	15433 ±841	98
10	21864 ±441	18373 ±860	84
TSH (ng/mL)			
0.01	1168 ±206	1677 ±259	144
0.03	1830 ±144	2466 ±430	135
0.1	4133 ±300	4506 ±348	109
0.3	9269 ±1709	11416 ±747	123
1	18165 ±2560	16101 ±794	89
3	24491 ±903	18142 ±1121	74
サイクリックAMPアッセイバッファー	873 ±101	1143 ±47	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1599 ±213	1756 ±288	110
0.3	3312 ±554	3370 ±398	102
1	9469 ±2932	7817 ±924	83
3	15451 ±1813	10944 ±1432	71
10	23359 ±998	16126 ±1202	69
TSH (ng/mL)			
0.01	1543 ±276	1242 ±152	80
0.03	2150 ±252	2129 ±176	99
0.1	nd	4235 ±542	nd
0.3	14628 ±2493	11155 ±1593	76
1	18693 ±1137	15395 ±1097	82
3	18628 ±1570	18313 ±677	98
サイクリックAMPアッセイバッファー	1000 ±82	899 ±138	

nd = 未測定

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【 0 1 7 3 】

【表 5 7】

表 15v hMAb TSHR1 及び TSH によって TSHR を含んでいる CHO 細胞のサイクリック AMP の刺激において Ala への TSHR Glu251 の突然変異の効果

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1468 ±150	1806 ±113	123
0.3	2988 ±150	2496 ±368	84
1	8626 ±473	6874 ±146	80
3	13768 ±1791	10810 ±210	79
10	18100 ±1361	12512 ±297	69
TSH (ng/mL)			
0.01	1204 ±57	1324 ±63	110
0.03	1496 ±111	1764 ±134	118
0.1	3344 ±617	2570 ±273	77
0.3	9270 ±962	6872 ±457	74
1	15644 ±2238	11232 ±1478	72
3	18494 ±1815	11560 ±2771	63
サイクリックAMPアッセイバッファー	998 ±94	1200 ±105	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	990 ±116	1332 ±214	135
0.3	2186 ±237	3034 ±205	139
1	6726 ±147	4690 ±375	70
3	11466 ±403	11476 ±726	100
10	19820 ±2013	16780 ±1825	85
TSH (ng/mL)			
0.01	820 ±133	1552 ±322	186
0.03	1610 ±150	2476 ±321	187
0.1	3912 ±298	4922 ±750	126
0.3	10490 ±1393	8630 ±1595	82
1	12960 ±2792	14110 ±757	109
3	16684 ±958	18476 ±1985	111
サイクリックAMPアッセイバッファー	660 ±29	864 ±106	

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【 0 1 7 4 】

【表 5 8】

表 15w hMAb TSHR1 及び TSH によって TSHR を含んでいる CHO 細胞のサイクリック AMP の刺激において Ala への TSHR Arg274 の突然変異の効果

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均±SD (n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1390 ±607	686 ±63	49
0.3	2850 ±170	1310 ±284	46
1	7313 ±587	3295 ±25	45
3	13913 ±3769	8454 ±2347	61
10	14998 ±1828	14567 ±1722	97
TSH (ng/mL)			
0.01	666 ±56	552 ±30	83
0.03	712 ±25	664 ±28	93
0.1	2184 ±104	1216 ±340	56
0.3	3976 ±254	2664 ±14	67
1	11032 ±1183	6310 ±394	57
3	13956 ±1306	9688 ±1557	69
サイクリックAMPアッセイバッファー	590 ±30	553 ±24	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1380 ±276	996 ±56	72
0.3	2858 ±18	1510 ±252	53
1	9024 ±1360	4654 ±1369	52
3	12920 ±959	8230 ±1371	64
10	15570 ±454	12430 ±2176	80
TSH (ng/mL)			
0.01	702 ±152	1022 ±370	146
0.03	854 ±98	976 ±72	114
0.1	1412 ±106	1578 ±382	112
0.3	3364 ±122	3960 ±587	118
1	9936 ±1003	8954 ±1158	90
3	12894 ±1009	11234 ±856	87
サイクリックAMPアッセイバッファー	618 ±51	608 ±80	

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【 0 1 7 5 】

【表 5 9】

表 15x hMAb TSHR1 及び TSH によって TSHR を含んでいる CHO 細胞のサイクリック AMP の刺激において Ala への TSHR Tyr279 の突然変異の効果

実験1	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均±SD (n = 3)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1590 ±124	656 ±100	41
0.3	2760 ±24	682 ±188	7
1	8506 ±419	996 ±150	12
3	15260 ±2326	680 ±25	4
10	17580 ±2606	784 ±145	4
TSH (ng/mL)			
0.01	864 ±24	1068 ±124	124
0.03	1258 ±80	926 ±32	74
0.1	2410 ±244	750 ±250	31
0.3	5034 ±178	1064 ±220	21
1	13896 ±1193	1236 ±281	9
3	15820 ±784	1424 ±218	9
サイクリックAMPアッセイバッファー	730 ±16	750 ±24	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1390 ±136	686 ±82	49
0.3	3116 ±552	623 ±114	20
1	6123 ±514	410 ±59	7
3	13878 ±2820	500 ±83	4
10	14995 ±1266	674 ±149	4
TSH (ng/mL)			
0.01	830 ±32	684 ±22	82
0.03	1164 ±374	688 ±118	59
0.1	1960 ±126	766 ±106	39
0.3	3780 ±567	695 ±162	18
1	8691 ±662	810 ±227	9
3	12673 ±742	1217 ±170	10
サイクリックAMPアッセイバッファー	676 ±44	578 ±26	

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【 0 1 7 6 】

【表 6 0】

表 16 変異型 TSHR を含む CHO 細胞の刺激における突然変異(野生型と比較して)の効果の概要

アミノ酸の突然変異	TSH刺激	hMAb TSHR1 Fab刺激
Lys58がAlaに変異	効果なし	効果なし
Ile60がAlaに変異	効果なし	効果なし
Arg80がAlaに変異	効果なし	<u>著しい減少</u>
Arg80がAspに変異	効果なし	<u>著しい減少</u>
Tyr82がAlaに変異	効果なし	若干の減少
Glu107がAlaに変異	若干の減少	<u>著しい減少</u>
Glu107がArgに変異	<u>著しい減少</u>	<u>著しい減少</u>
Arg109がAlaに変異	効果なし	著しい減少
Arg109がAspに変異	若干の減少	<u>著しい減少</u>
Lys129がAlaに変異	効果なし	著しい減少
Lys129がAspに変異	効果なし	<u>著しい減少</u>
Phe130がAlaに変	効果なし	著しい減少
Phe134がAlaに変異	効果なし	効果なし
Asp160がAlaに変異	若干の減少	若干の減少
Lys183がAlaに変異	効果なし	著しい減少
Lys183がAspに変異	効果なし	<u>著しい減少</u>
Tyr185がAlaに変異	効果なし	<u>著しい減少</u>
Tyr206がAlaに変異	効果なし	効果なし
Lys209がAlaに変異	若干の減少	若干の減少
Asp232がArgに変異	<u>著しい減少</u>	<u>著しい減少</u>
Lys250がAlaに変異	効果なし	効果なし
Glu251がAlaに変異	効果なし	効果なし
Arg274がAlaに変異	効果なし	効果なし
Tyr279がAlaに変異	<u>著しい減少</u>	<u>著しい減少</u>

10

20

30

【 0 1 7 7 】

【表 6 1】

表 17a 野生型 TSHR 及び Ala に変異した Lys58 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、TSH が誘発したサイクリック AMP 生成。TSH アンタゴニスト活性を有する TSH レセプター(9D33)に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	545 ±200	640 ±34	117
TSH	21110 ±1582	17775 ±1851	84
2G2 1µg/mL + TSH ^b	19943 ^c	22426 ±3322	112
2G2 10µg/mL + TSH ^b	24474 ±1746	17626 ±3253	72
2G2 100µg/mL + TSH ^b	21471 ±1436	17478 ±679	81
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	18865 ±2836	23464 ±2827	124
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	21648 ±2909	16053 ^c	74
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	27181 ^c	22621 ±610	83
9D33 1µg/mL + TSH ^b	13290 ±2829	20233 ±2223	152
9D33 10µg/mL + TSH ^b	7942 ±2403	20192 ±3977	254
9D33 100µg/mL + TSH ^b	2447 ±1679	23258 ±4341	950
9D33 100µg	832 ±89	1204 ±366	145

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^d	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	6	-26
2G2 10µg/mL	-16	1
2G2 100µg/mL	-2	2
9D33 0.001µg/mL	11	-32
9D33 0.01µg/mL	-3	10
9D33 0.1µg/mL	-29	-27
9D33 1µg/mL	37	-14
9D33 10µg/mL	62	-14
9D33 100µg/mL	88	-31

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル^b TSH終濃度=1.5ng/mL^c 重複して行った平均値

$$^d \text{ 阻害\%} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【 0 1 7 8 】

【表 6 2】

表 17b 野生型 TSHR 及び Ala に変異した Ile60 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、TSH が誘発したサイクリック AMP 生成。TSH アンタゴニスト活性を有する TSH レセプター(9D33)に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

サイクリックAMPレベル

A

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	557 ±105	889 ±208	160
TSH	16781 ±1025	14407 ±3748	86
2G2 1µg/mL + TSH ^b	12022 ±2220	16669 ±2167	139
2G2 10µg/mL + TSH ^b	12439 ±2453	15501 ±1141	125
2G2 100µg/mL + TSH ^b	13056 ±1630	15106 ±931	116
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	13587 ±1777	18962 ±4050	140
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	12993 ±2404	18797 ^c	145
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	11196 ±1798	14519 ±3400	130
9D33 1µg/mL + TSH ^b	6601 ±712	12120 ^c	184
9D33 10µg/mL + TSH ^b	4500 ±678	7217 ±512	160
9D33 100µg/mL + TSH ^b	1627 ±166	4886 ±382	300
9D33 100µg	849 ±207	1174 ±312	138

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^d	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	28	-16
2G2 10µg/mL	26	-8
2G2 100µg/mL	22	-5
9D33 0.001µg/mL	19	-32
9D33 0.01µg/mL	23	-30
9D33 0.1µg/mL	33	0
9D33 1µg/mL	61	16
9D33 10µg/mL	73	50
9D33 100µg/mL	90	66

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル^b TSH終濃度=1.5ng/mL^c 重複して行った平均値

^d 阻害%=100 × $\left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【 0 1 7 9 】

【表 6 3】

表 17c 野生型 TSHR 及び Ala に変異した Arg80 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、TSH が誘発したサイクリック AMP 生成、TSH アンタゴニスト活性を有する TSH レセプター(9D33)に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	714 ±43	1088 ±92	152
TSH	18979 ^c	19704 ±2677	104
2G2 1µg/mL + TSH ^b	20640 ±581	20980 ^c	102
2G2 10µg/mL + TSH ^b	18496 ±343	19799 ±1419	107
2G2 100µg/mL + TSH ^b	19699 ±1947	23450 ±923	119
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	19575 ±4282	25960 ±1357	133
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	23162 ±1504	18751 ±865	81
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	17648 ±2178	23899 ±300	135
9D33 1µg/mL + TSH ^b	9905 ±1476	20875 ±800	211
9D33 10µg/mL + TSH ^b	5145 ±495	20797 ±3441	404
9D33 100µg/mL + TSH ^b	2241 ±281	21076 ±2980	904
9D33 100µg	965 ±86	1571 ±205	163

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^d	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	-9	-6
2G2 10µg/mL	3	0
2G2 100µg/mL	-4	-19
9D33 0.001µg/mL	-3	-32
9D33 0.01µg/mL	-22	5
9D33 0.1µg/mL	7	-21
9D33 1µg/mL	49	-6
9D33 10µg/mL	73	-6
9D33 100µg/mL	88	-7

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル^b TSH終濃度=1.5ng/mL^c 重複して行った平均値
$$^d \text{ 阻害\%} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【 0 1 8 0 】

【表 6 4】

表 17d 野生型 TSHR 及び Asp に変異した Arg80 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、TSH が誘発したサイクリック AMP 生成。TSH アンタゴニスト活性を有する TSH レセプター(9D33) に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
サイクリックAMPアッセイバッファ-のみ	659 ±58	514 ±40	78
TSH	20019 ±1871	17217 ±2685	86
2G2 1µg/mL + TSH ^b	16429 ±308	17022 ±1123	104
2G2 10µg/mL + TSH ^b	18361 ±1176	15857 ±2364	86
2G2 100µg/mL + TSH ^b	16916 ±814	16942 ±1683	100
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	15724 ±1763	20521 ±3779	131
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	15737 ±1060	19300 ±1479	123
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	16788 ±1341	16258 ±3120	97
9D33 1µg/mL + TSH ^b	8613 ±674	21217 ±2058	246
9D33 10µg/mL + TSH ^b	3517 ±798	17035 ±1707	484
9D33 100µg/mL + TSH ^b	1869 ±200	18217 ±1061	975
9D33 100µg	950 ±504	675 ±80	71

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^c	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	18	1
2G2 10µg/mL	8	8
2G2 100µg/mL	16	2
9D33 0.001µg/mL	21	-19
9D33 0.01µg/mL	21	-12
9D33 0.1µg/mL	16	6
9D33 1µg/mL	57	-23
9D33 10µg/mL	82	1
9D33 100µg/mL	95	6

^a サイクリックAMPアッセイバッファ-中の試験サンプル^b TSH終濃度=1.5ng/mL
^c 阻害%=100 x $\left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファ-+TSHの存在するcAMP}} \right]$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【 0 1 8 1 】

【表 6 5】

表 17e 野生型 TSHR 及び Ala に変異した Tyr82 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、TSH が誘発したサイクリック AMP 生成。TSH アンタゴニスト活性を有する TSH レセプター(9D33)に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	599 ±71	548 ±25	91
TSH	8350 ±1303	6602 ±96	79
2G2 1µg/mL + TSH ^b	7358 ±1153	5446 ±265	74
2G2 10µg/mL + TSH ^b	9821 ±1749	5906 ±335	60
2G2 100µg/mL + TSH ^b	7962 ±1218	5771 ±19	72
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	6393 ±1036	8064 ±1472	126
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	9482 ±1536	7608 ±875	80
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	8910 ±526	6485 ±146	73
9D33 1µg/mL + TSH ^b	4009 ±447	7291 ±591	181
9D33 10µg/mL + TSH ^b	3395 ±238	7648 ±1386	225
9D33 100µg/mL + TSH ^b	2869 ±254	5951 ±1035	207
9D33 100µg	596 ±33	679 ±48	114

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^c	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	12	18
2G2 10µg/mL	-18	11
2G2 100µg/mL	5	13
9D33 0.001µg/mL	23	-22
9D33 0.01µg/mL	-14	-15
9D33 0.1µg/mL	-7	2
9D33 1µg/mL	52	-10
9D33 10µg/mL	59	-16
9D33 100µg/mL	66	10

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル^b TSH終濃度=1.5ng/mL

$$^c \text{ 阻害\%} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【 0 1 8 2 】

【表 6 6】

表 17f 野生型 TSHR 及び Ala に変異した Glu107 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、TSH が誘発したサイクリック AMP 生成、TSH アンタゴニスト活性を有する TSH レセプター(9D33) に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	893 ±103	1215 ±93	136
TSH	18593 ±2469	14789 ±3005	80
2G2 1µg/mL + TSH ^b	17253 ±1508	13057 ±1259	76
2G2 10µg/mL + TSH ^b	18423 ±4503	9495 ±1017	52
2G2 100µg/mL + TSH ^b	18952 ±3984	13210 ±2663	70
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	17646 ±1558	9589 ±516	54
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	20021 ±949	11194 ±147	56
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	16937 ±2431	7651 ±1178	45
9D33 1µg/mL + TSH ^b	11655 ±4674	5613 ±1549	48
9D33 10µg/mL + TSH ^b	5903 ±1022	2386 ±1294	40
9D33 100µg/mL + TSH ^b	3493 ±395	2536 ±388	73
9D33 100µg	996 ±108	963 ±192	97

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^c	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	7	12
2G2 10µg/mL	1	36
2G2 100µg/mL	-2	11
9D33 0.001µg/mL	5	35
9D33 0.01µg/mL	-8	24
9D33 0.1µg/mL	9	48
9D33 1µg/mL	37	62
9D33 10µg/mL	68	84
9D33 100µg/mL	81	83

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル^b TSH終濃度=1.5ng/mL

$${}^c \quad \text{阻害\%} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【 0 1 8 3 】

【表 6 7】

表 17g 野生型 TSHR 及び Arg に変異した Glu107 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、TSH が誘発したサイクリック AMP 生成。TSH アンタゴニスト活性を有する TSH レセプター(9D33)に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	サイクリックAMPアッセイバッファーのみ (平均 ±SD; n = 3)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	1126 ±74	1263 ±73	112
TSH	21406 ±932	5857 ±571	27
2G2 1µg/mL + TSH ^b	21490 ±2227	5357 ±756	25
2G2 10µg/mL + TSH ^b	18305 ±2116	5502 ±431	30
2G2 100µg/mL + TSH ^b	20965 ±3258	4655 ±243	22
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	23207 ±5032	4504 ±471	19
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	20373 ±2048	5297 ±1069	26
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	16380 ±566	5577 ±192	34
9D33 1µg/mL + TSH ^b	16364 ±2028	5285 ±885	32
9D33 10µg/mL + TSH ^b	8126 ±407	5774 ±866	71
9D33 100µg/mL + TSH ^b	3587 ^c	5290 ±619	147
9D33 100µg	973 ^c	720 ±105	74

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^d	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	0	9
2G2 10µg/mL	14	6
2G2 100µg/mL	2	21
9D33 0.001µg/mL	-8	23
9D33 0.01µg/mL	5	10
9D33 0.1µg/mL	23	5
9D33 1µg/mL	24	10
9D33 10µg/mL	62	1
9D33 100µg/mL	83	10

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル^b TSH終濃度=1.5ng/mL^c 重複して行った平均値

$$d \quad \text{阻害\%} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【 0 1 8 4 】

【表 6 8】

表 17h 野生型 TSHR 及び Ala に変異した Arg109 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、TSH が誘発したサイクリック AMP 生成。TSH アンタゴニスト活性を有する TSH レセプター(9D33)に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	734 ±285	1214 ±66	165
TSH	15683 ±3332	16060 ±3546	102
2G2 1µg/mL + TSH ^b	16962 ±3784	15661 ±1152	92
2G2 10µg/mL + TSH ^b	16231 ^c	12589 ±1450	78
2G2 100µg/mL + TSH ^b	16675 ±3301	16387 ±1142	98
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	16646 ±2135	15716 ±283	94
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	18722 ±1091	14075 ±905	75
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	13435 ±333	13803 ±1416	103
9D33 1µg/mL + TSH ^b	8004 ±2106	14551 ±2498	182
9D33 10µg/mL + TSH ^b	4718 ±867	11169 ±488	237
9D33 100µg/mL + TSH ^b	1991 ±494	9554 ±830	480
9D33 100µg	1155 ±73	1148 ±19	99

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^d	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	-8	2
2G2 10µg/mL	-3	22
2G2 100µg/mL	-6	-2
9D33 0.001µg/mL	-6	2
9D33 0.01µg/mL	-19	12
9D33 0.1µg/mL	14	14
9D33 1µg/mL	49	9
9D33 10µg/mL	70	30
9D33 100µg/mL	87	59

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル^b TSH終濃度=1.5ng/mL^c 重複して行った平均値

$$^d \text{ 阻害\%} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【 0 1 8 5 】

【表 6 9】

表 17i 野生型 TSHR 及び Asp に変異した Arg109 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、TSH が誘発したサイクリック AMP 生成。TSH アンタゴニスト活性を有する TSH レセプター(9D33)に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		
	野生型 TSHR	変異型 TSHR	変異型/野生型(%)
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	656 ±50	312 ±151	48
TSH	16975 ^c	12341 ±1724	73
2G2 1µg/mL + TSH ^b	13540 ±1490	11663 ±980	86
2G2 10µg/mL + TSH ^b	12805 ±785	10932 ±1779	85
2G2 100µg/mL + TSH ^b	13629 ±689	12795 ±2243	94
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	14034 ±1530	14046 ±2244	100
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	12506 ±1906	10787 ±1468	86
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	10790 ±1948	14003 ±89	130
9D33 1µg/mL + TSH ^b	7392 ±661	15087 ±2096	204
9D33 10µg/mL + TSH ^b	3293 ±457	11271 ±1633	342
9D33 100µg/mL + TSH ^b	2062 ±439	10178 ±1136	494
9D33 100µg	564 ±66	367 ±45	65

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^d	
	野生型 TSHR	変異型 TSHR
2G2 1µg/mL	20	5
2G2 10µg/mL	25	11
2G2 100µg/mL	20	4
9D33 0.001µg/mL	17	-14
9D33 0.01µg/mL	26	13
9D33 0.1µg/mL	36	-13
9D33 1µg/mL	56	-22
9D33 10µg/mL	81	9
9D33 100µg/mL	88	18

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル

^b TSH終濃度=1.5ng/mL

^c 重複して行った平均値

^d 阻害%=100 × $\left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【 0 1 8 6 】

【表 70】

表 17j 野生型 TSHR 及び Ala に変異した Lys129 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、TSH が誘発したサイクリック AMP 生成。TSH アンタゴニスト活性を有する TSH レセプター(9D33) に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	748 ±106	710 ±70	95
TSH	21197 ±1858	11364 ±1348	54
2G2 1µg/mL + TSH ^b	20669 ±1577	13312 ±424	64
2G2 10µg/mL + TSH ^b	21235 ±2707	11279 ±1786	53
2G2 100µg/mL + TSH ^b	20993 ±1117	14886 ±2848	71
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	20299 ±2578	12194 ±1369	60
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	21147 ±908	12452 ±1342	59
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	19098 ±1944	12812 ±1016	67
9D33 1µg/mL + TSH ^b	10880 ±1530	14217 ±959	131
9D33 10µg/mL + TSH ^b	6851 ±1132	12058 ±80	176
9D33 100µg/mL + TSH ^b	3170 ±713	10607 ±754	335
9D33 100µg	1029 ±120	1140 ±58	111

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^c	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	2	-17
2G2 10µg/mL	0	0
2G2 100µg/mL	1	-31
9D33 0.001µg/mL	4	-7
9D33 0.01µg/mL	0	-10
9D33 0.1µg/mL	10	-13
9D33 1µg/mL	49	-25
9D33 10µg/mL	68	-6
9D33 100µg/mL	95	7

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル^b TSH終濃度=1.5ng/mL

$$^c \text{ 阻害\%} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【 0 1 8 7 】

【表 7 1】

表 17k 野生型 TSHR 及び Asp に変異した Lys129 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、TSH が誘発したサイクリック AMP 生成、TSH アンタゴニスト活性を有する TSH レセプター(9D33) に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	412 ^c	401 ±16	97
TSH	12783 ±422	4914 ±292	38
2G2 1µg/mL + TSH ^b	12434 ±264	5191 ^c	42
2G2 10µg/mL + TSH ^b	11974 ±467	4830 ±119	40
2G2 100µg/mL + TSH ^b	12042 ±1466	4168 ±45	35
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	10568 ±844	5012 ±134	47
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	11833 ±1266	8035 ^c	68
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	9392 ±1300	4905 ±805	52
9D33 1µg/mL + TSH ^b	5031 ±397	6339 ±823	126
9D33 10µg/mL + TSH ^b	2515 ±278	4567 ±505	182
9D33 100µg/mL + TSH ^b	776 ^c	3346 ±419	431
9D33 100µg	509 ±46	473 ±102	93

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^d	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	3	-6
2G2 10µg/mL	6	2
2G2 100µg/mL	6	15
9D33 0.001µg/mL	17	-2
9D33 0.01µg/mL	7	-64
9D33 0.1µg/mL	27	0
9D33 1µg/mL	61	-29
9D33 10µg/mL	80	7
9D33 100µg/mL	94	32

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル^b TSH終濃度=1.5ng/mL^c 重複して行った平均値

$$^d \text{ 阻害\%} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【 0 1 8 8 】

【表 7 2】

表 171 野生型 TSHR 及び Ala に変異した Phe130 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、TSH が誘発したサイクリック AMP 生成、TSH アンタゴニスト活性を有する TSH レセプター(9D33)に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞/ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	1019 ±65	915 ±83	90
TSH	18088 ±2962	11466 ±995	63
2G2 1µg/mL + TSH ^b	15207 ±1297	12415 ±570	82
2G2 10µg/mL + TSH ^b	16741 ±1303	11439 ±440	68
2G2 100µg/mL + TSH ^b	19281 ±3245	12223 ±895	63
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	14911 ±417	10584 ±1719	71
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	15722 ±693	11744 ±281	75
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	14409 ±810	9104 ±407	63
9D33 1µg/mL + TSH ^b	10277 ±629	5212 ±251	51
9D33 10µg/mL + TSH ^b	7116 ±438	3071 ±421	43
9D33 100µg/mL + TSH ^b	3953 ±523	1572 ±150	40
9D33 100µg	1110 ±43	890 ±78	80

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^c	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	16	-8
2G2 10µg/mL	7	0
2G2 100µg/mL	-7	-7
9D33 0.001µg/mL	18	8
9D33 0.01µg/mL	13	-2
9D33 0.1µg/mL	20	21
9D33 1µg/mL	43	55
9D33 10µg/mL	61	73
9D33 100µg/mL	78	86

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル^b TSH終濃度=1.5ng/mL

$$^c \text{ 阻害\%} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【 0 1 8 9 】

【表73】

表17m 野生型TSHR及びAlaに変異したPhe134を有するTSHRを発現するCHO細胞において、TSHが誘発したサイクリックAMP生成、TSHアンタゴニスト活性を有するTSHレセプター(9D33)に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均±SD; n=3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	1045 ±98	740 ±160	71
TSH	19796 ±1401	20249 ±425	102
2G2 1µg/mL + TSH ^b	20013 ±2808	19662 ±1329	98
2G2 10µg/mL + TSH ^b	19219 ±3257	19001 ±657	99
2G2 100µg/mL + TSH ^b	20722 ±1156	20770 ±594	100
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	20420 ±2123	22086 ±351	108
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	18407 ±1250	21142 ±1984	115
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	18571 ±1082	21620 ±1118	116
9D33 1µg/mL + TSH ^b	13342 ±433	21312 ±1471	160
9D33 10µg/mL + TSH ^b	9106 ±1056	16724 ±1503	184
9D33 100µg/mL + TSH ^b	4341 ±1186	11788 ±760	272
9D33 100µg	1193 ±108	1149 ±112	96

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^c	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	-1	3
2G2 10µg/mL	3	6
2G2 100µg/mL	-5	-3
9D33 0.001µg/mL	-3	-9
9D33 0.01µg/mL	7	-4
9D33 0.1µg/mL	6	-7
9D33 1µg/mL	33	-5
9D33 10µg/mL	54	17
9D33 100µg/mL	78	42

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル

^b TSH終濃度=1.5ng/mL

^c 阻害%=100 × $\left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【表74】

表17n 野生型TSHR及びAlaに変異したAsp160を有するTSHRを発現するCHO細胞において、TSHが誘発したサイクリックAMP生成、TSHアンタゴニスト活性を有するTSHレセプター(9D33)に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		変異型/野生型(%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	521 ±32	483 ±60	93
TSH	16267 ±1932	12291 ±1040	76
2G2 1µg/mL + TSH ^b	15536 ±1852	13116 ±693	84
2G2 10µg/mL + TSH ^b	14976 ±1066	10613 ±759	71
2G2 100µg/mL + TSH ^b	15211 ±1303	12054 ±447	79
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	12507 ±1070	14316 ±554	114
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	14146 ±50	11125 ±1618	79
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	13139 ±526	1312 ±116	10
9D33 1µg/mL + TSH ^b	10290 ^c	985 ±285	10
9D33 10µg/mL + TSH ^b	3445 ±491	796 ±135	23
9D33 100µg/mL + TSH ^b	2211 ±125	752 ±82	34
9D33 100µg	498 ±3	539 ±53	108

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^d	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	4	-7
2G2 10µg/mL	8	14
2G2 100µg/mL	6	2
9D33 0.001µg/mL	23	-16
9D33 0.01µg/mL	13	9
9D33 0.1µg/mL	19	89
9D33 1µg/mL	63	92
9D33 10µg/mL	79	94
9D33 100µg/mL	86	94

^aサイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル

^bTSH終濃度=1.5ng/mL

^c重複して行った平均値

^d阻害%=100 x $\left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$

2G2はチロキシンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【表 7 5】

表17o 野生型TSHR及びAla1に変異したLys183を有するTSHRを発現するCHO細胞において、TSHが誘発したサイクリックAMP生成、TSHアンタゴニスト活性を有するTSHレセプター(9D33)に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	371 ±17	264 ±29	71
TSH	13792 ±1706	12173 ±3906	88
2G2 1µg/mL + TSH ^b	9996 ±1289	14200 ±5323	142
2G2 10µg/mL + TSH ^b	12279 ±2013	10616 ±2142	86
2G2 100µg/mL + TSH ^b	10520 ±1450	12789 ±902	122
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	10372 ^c	13874 ±1472	134
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	12431 ±2262	17223 ±6145	139
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	9470 ±865	14012 ±1217	148
9D33 1µg/mL + TSH ^b	2920 ±597	10713 ±3015	367
9D33 10µg/mL + TSH ^b	2828 ±744	3857 ±316	136
9D33 100µg/mL + TSH ^b	2210 ±391	3220 ±261	146
9D33 100µg	260 ±76	320 ±12	123

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^d	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	28	-17
2G2 10µg/mL	11	13
2G2 100µg/mL	24	-5
9D33 0.001µg/mL	25	-14
9D33 0.01µg/mL	10	-42
9D33 0.1µg/mL	31	-15
9D33 1µg/mL	79	12
9D33 10µg/mL	79	68
9D33 100µg/mL	84	74

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル

^b TSH終濃度=0.3ng/mL

^c 重複して行った平均値

^d 阻害%=100 × $\left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【表 7 6】

表17p 野生型TSHR及びAspに変異したLys183を有するTSHRを発現するCHO細胞において、TSHが誘発したサイクリックAMP生成、TSHアンタゴニスト活性を有するTSHレセプター(9D33)に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	346 ±47	405 ±38	117
TSH	8666 ±185	5131 ±788	59
2G2 1µg/mL + TSH ^b	8025 ±514	3993 ±499	50
2G2 10µg/mL + TSH ^b	9382 ±722	4641 ±1139	49
2G2 100µg/mL + TSH ^b	6810 ±871	4838 ±543	71
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	6931 ±631	4903 ±880	70
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	7419 ±989	3778 ±300	51
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	6250 ±208	4025 ±1208	64
9D33 1µg/mL + TSH ^b	3686 ±390	2757 ±297	75
9D33 10µg/mL + TSH ^b	2197 ±141	1818 ±233	83
9D33 100µg/mL + TSH ^b	1293 ±113	1294 ±177	100
9D33 100µg	437 ±30	294 ±46	67

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^c	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	7	22
2G2 10µg/mL	-8	10
2G2 100µg/mL	21	6
9D33 0.001µg/mL	20	4
9D33 0.01µg/mL	14	26
9D33 0.1µg/mL	28	22
9D33 1µg/mL	57	46
9D33 10µg/mL	75	65
9D33 100µg/mL	85	75

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル

^b TSH終濃度=1.5ng/mL

$$\% \text{ 阻害} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【表 77】

表17g 野生型TSHR及びAla1に変異したTyr185を有するTSHRを発現するCHO細胞において、TSHが誘発したサイクリックAMP生成。TSHアンタゴニスト活性を有するTSHレセプター(9D33)に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	33 ^c	118 ±60	358
TSH	8951 ±1717	4807 ±518	54
2G2 1µg/mL + TSH ^b	9852 ±2211	4219 ±193	43
2G2 10µg/mL + TSH ^b	10415 ±1974	5199 ±1202	50
2G2 100µg/mL + TSH ^b	10829 ±2611	5153 ±1552	48
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	11064 ±2932	5476 ±216	49
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	9945 ±366	5437 ±632	55
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	10451 ±299	3132 ±251	30
9D33 1µg/mL + TSH ^b	2849 ±627	1717 ±219	60
9D33 10µg/mL + TSH ^b	1955 ±582	1038 ±27	53
9D33 100µg/mL + TSH ^b	1263 ±204	614 ±329	49
9D33 100µg	103 ±106	178 ±18	173

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^d	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	-10	12
2G2 10µg/mL	-16	-8
2G2 100µg/mL	-20	-7
9D33 0.001µg/mL	-24	-14
9D33 0.01µg/mL	-11	-13
9D33 0.1µg/mL	-17	35
9D33 1µg/mL	68	64
9D33 10µg/mL	78	78
9D33 100µg/mL	86	87

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル

^b TSH終濃度=1.5ng/mL

^c 重複して行った平均値

^d 阻害%=100 × $\left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$

2G2はチロキシンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【 0 1 9 4 】

【表 7 8】

表17r 野生型TSHR及びAla1に変異したTyr206を有するTSHRを発現するCHO細胞において、TSHが誘発したサイクリックAMP生成、TSHアンタゴニスト活性を有するTSHレセプター(9D33)に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP (fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	125 ±13	127 ±39	102
TSH	7714 ±372	6022 ±922	78
2G2 1µg/mL + TSH ^b	9832 ±2099	7272 ±732	74
2G2 10µg/mL + TSH ^b	6648 ±859	6423 ±781	97
2G2 100µg/mL + TSH ^b	9666 ±1599	6251 ±289	65
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	7654 ±1675	6523 ±485	85
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	7699 ±770	7540 ±1313	98
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	8113 ±222	3392 ±190	42
9D33 1µg/mL + TSH ^b	2495 ±581	1439 ±466	58
9D33 10µg/mL + TSH ^b	2487 ±396	776 ±128	31
9D33 100µg/mL + TSH ^b	920 ±210	832 ±207	90
9D33 100µg	117 ±31	132 ±10	113

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^c	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	-27	-21
2G2 10µg/mL	14	-7
2G2 100µg/mL	-25	-4
9D33 0.001µg/mL	1	-8
9D33 0.01µg/mL	0	-25
9D33 0.1µg/mL	-5	44
9D33 1µg/mL	68	76
9D33 10µg/mL	68	87
9D33 100µg/mL	88	86

^aサイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル^bTSH終濃度=1.5ng/mL

$$^{\circ} \text{ 阻害\%} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【 0 1 9 5 】

【表 7 9】

表17s 野生型TSHR及びAla1に変異したLys209を有するTSHRを発現するCHO細胞において、TSHが誘発したサイクリックAMP生成、TSHアンタゴニスト活性を有するTSHレセプター(9D33)に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型(%)
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	638 ±46	173 ±26	27
TSH	14724 ±601	5685 ±1592	39
2G2 1µg/mL + TSH ^b	15078 ±2313	10707 ±2563	71
2G2 10µg/mL + TSH ^b	16435 ±427	11223 ±2495	68
2G2 100µg/mL + TSH ^b	17412 ^c	7649 ±1735	44
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	13867 ^c	8335 ±691	60
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	19164 ±1515	7447 ±3118	39
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	18410 ^c	5547 ±2107	30
9D33 1µg/mL + TSH ^b	7982 ±1605	1292 ±512	16
9D33 10µg/mL + TSH ^b	3503 ±1401	772 ±89	22
9D33 100µg/mL + TSH ^b	964 ±474	710 ±148	74
9D33 100µg	529 ±22	860 ±212	163

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^d	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	2	-88
2G2 10µg/mL	-12	-97
2G2 100µg/mL	-18	-35
9D33 0.001µg/mL	6	-47
9D33 0.01µg/mL	-30	-31
9D33 0.1µg/mL	-25	2
9D33 1µg/mL	54	77
9D33 10µg/mL	76	86
9D33 100µg/mL	93	88

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル

^b TSH終濃度=1.5ng/mL

^c 重複して行った平均値

$$^d \text{ 阻害\%} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【 0 1 9 6 】

【表 8 0】

表17t 野生型TSHR及びAlaに変異したLys250を有するTSHRを発現するCHO細胞において、TSHが誘発したサイクリックAMP生成、TSHアンタゴニスト活性を有するTSHレセプター(9D33)に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP (fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型 (%)
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	1068 ±164	1491 ±182	140
TSH	22245 ^c	15844 ±2736	71
2G2 1µg/mL + TSH ^b	19749 ±2395	21309 ±1640	108
2G2 10µg/mL + TSH ^b	17609 ±981	13048 ±1718	74
2G2 100µg/mL + TSH ^b	22060 ±2265	17966 ±1997	81
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	21265 ±375	19697 ±2129	93
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	21435 ±3957	24374 ±4050	114
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	16626 ±1019	20358 ±2627	122
9D33 1µg/mL + TSH ^b	10260 ±1863	17657 ±2149	172
9D33 10µg/mL + TSH ^b	7115 ±1337	9725 ±1349	137
9D33 100µg/mL + TSH ^b	2012 ^c	6387 ±916	317
9D33 100µg	1349 ±122	1714 ±144	127

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^d	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	11	-34
2G2 10µg/mL	21	18
2G2 100µg/mL	1	-13
9D33 0.001µg/mL	4	-24
9D33 0.01µg/mL	4	-54
9D33 0.1µg/mL	25	-28
9D33 1µg/mL	54	-11
9D33 10µg/mL	68	39
9D33 100µg/mL	91	60

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル

^b TSH終濃度 = 1.5 ng/mL

^c 重複して行った平均値

$$^d \text{ 阻害\%} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【表 8 1】

表17u 野生型TSHR及びAla1に変異したGlu251を有するTSHRを発現するCHO細胞において、TSHが誘発したサイクリックAMP生成。TSHアンタゴニスト活性を有するTSHレセプター(9D33)に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP (fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		変異型/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	636 ±116	779 ±119	122
TSH	23009 ±3972	11398 ±2719	50
2G2 1µg/mL + TSH ^b	17299 ±1029	18350 ^c	106
2G2 10µg/mL + TSH ^b	18521 ±472	11028 ±839	60
2G2 100µg/mL + TSH ^b	17147 ^c	6999 ±631	41
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	19901 ^c	12930 ±1264	65
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	15319 ±2933	17445 ±1677	114
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	18030 ±4806	8723 ±1100	48
9D33 1µg/mL + TSH ^b	7108 ±1592	4776 ±933	67
9D33 10µg/mL + TSH ^b	4059 ±704	2300 ±680	57
9D33 100µg/mL + TSH ^b	1809 ±1090	1546 ±614	85
9D33 100µg	718 ±122	954 ±49	133

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^d	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	25	-61
2G2 10µg/mL	20	-3
2G2 100µg/mL	25	39
9D33 0.001µg/mL	14	-13
9D33 0.01µg/mL	33	-53
9D33 0.1µg/mL	22	23
9D33 1µg/mL	69	58
9D33 10µg/mL	82	80
9D33 100µg/mL	92	86

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル^b TSH終濃度 = 1.5 ng/mL^c 重複して行った平均値

$$^d \text{ 阻害\%} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファー+TSHの存在するcAMP}} \right]$$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【 0 1 9 8 】

【表 8 2】

表17v 野生型TSHR及びAla1に変異したArg274を有するTSHRを発現するCHO細胞において、TSHが誘発したサイクリックAMP生成。TSHアンタゴニスト活性を有するTSHレセプター(9D33)に対するモノクローナル抗体の異なる希釈の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプル ^a	生成されたサイクリックAMP (fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型 (%)
サイクリックAMPアッセイバッファ ^b のみ	621 ±37	157 ^c	25
TSH	5355 ±1126	3335 ^c	62
2G2 1µg/mL + TSH ^b	4032 ^c	4830 ^c	120
2G2 10µg/mL + TSH ^b	4399 ±504	3099 ±407	70
2G2 100µg/mL + TSH ^b	4247 ^c	3292 ±271	78
9D33 0.001µg/mL + TSH ^b	3663 ±310	4012 ±591	110
9D33 0.01µg/mL + TSH ^b	3881 ±459	4330 ±631	112
9D33 0.1µg/mL + TSH ^b	4788 ±1443	721 ±111	15
9D33 1µg/mL + TSH ^b	741 ±104	169 ±3	23
9D33 10µg/mL + TSH ^b	885 ^c	145 ^c	16
9D33 100µg/mL + TSH ^b	645 ±53	131 ^c	20
9D33 100µg	637 ^c	710 ±23	111

B 阻害%の結果

抗体濃度	TSH刺激の阻害% ^d	
	野生型TSHR	変異型TSHR
2G2 1µg/mL	25	-45
2G2 10µg/mL	18	7
2G2 100µg/mL	21	1
9D33 0.001µg/mL	32	-20
9D33 0.01µg/mL	28	-30
9D33 0.1µg/mL	11	78
9D33 1µg/mL	86	95
9D33 10µg/mL	83	96
9D33 100µg/mL	88	96

^aサイクリックAMPアッセイバッファ^a中の試験サンプル

^bTSH終濃度 = 1.5 ng/mL

^c重複して行った平均値

$$^d \text{ 阻害\%} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{試験サンプル+TSHの存在するcAMP}}{\text{サイクリックAMPアッセイバッファ+TSHの存在するcAMP}} \right]$$

2G2はチログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(9D33のためのネガティブコントロール)

【表 8 3】

表 18 マウスモノクローナル抗体 9D33 による TSH が介在したサイクリック AMP 刺激の阻害における突然変異(野生型と比較して)の効果の概要

アミノ酸の突然変異	9D33によるTSHが介在したサイクリックAMP刺激の阻害
Lys58がAlaに変異	著しい減少
Ile60がAlaに変異	効果なし
Arg80がAlaに変異	著しい減少
Arg80がAspに変異	著しい減少
Tyr82がAlaに変異	著しい減少
Glu107がAlaに変異	効果なし
Glu107がArgに変異	著しい減少
Arg109がAlaに変異	著しい減少
Arg109がAspに変異	著しい減少
Lys129がAlaに変異	著しい減少
Lys129がAspに変異	著しい減少
Phe130がAlaに変異	効果なし
Phe134がAlaに変異	著しい減少
Asp160がAlaに変異	増強された効果
Lys183がAlaに変異	効果なし
Lys183がAspに変異	効果なし
Tyr185がAlaに変異	効果なし
Tyr206がAlaに変異	効果なし
Lys209がAlaに変異	効果なし
Lys250がAlaに変異	若干の減少
Glu251がAlaに変異	効果なし
Arg255がAlaに変異	増強された効果
Arg274がAlaに変異	増強された効果

10

20

30

40

【 0 2 0 0 】

【表 8 4】

表 19a 野生型 TSHR 及び Ala に変異した Arg80 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、グレース病患者の 8 の血清によるサイクリック AMP 生成の刺激

サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル	生成されたサイクリックAMP (fmol/細胞 ウェル) (平均±SD;n=3)		変異型/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	720 ±122	1003 ±85	139
HBDプール	787 ±125	848 ±153	108
G1	14546 ±1913	10329 ±1326	71
G9	9192 ^a	633 ±36	7
G15	10180 ±1530	5538 ±958	54
G17	6592 ±291	6897 ±77	105
G19	9042 ±1407	6907 ±621	76
G20	11821 ±1569	1895 ±702	16
G21	11951 ±1402	11911 ±2267	100
G22	10877 ±752	12125 ±2063	111
TSH (3ng/mL)	12439 ±1630	18231 ±1357	147
hMAb TSHRI Fab (10ng/mL)	15900 ±1903	965 ±164	6

^a重複して行った平均値

HBD = 健常な血液ドナーの血清のプール

G1-G23 = グレース病患者の血清

【 0 2 0 1 】

【表 8 5】

表 19b 野生型 TSHR 及び Asp に変異した Arg80 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、糖尿病患者の 8 の血清によるサイクリック AMP 生成の刺激

サイクリックAMPアッセイバッファ 中の試験サンプル	生成されたサイクリックAMP (fmol/細胞 ウェル) 平均±SD (n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型 (%)
サイクリックAMPアッセイバッファ のみ	645 ±99	1208 ±141	187
HBDプール	496 ±78	1150 ±206	232
G1	23914 ±3837	9108 ±130	38
G9	14026 ±2339	434 ^a	3
G15	9131 ^a	2592 ±1027	28
G17	6311 ±545	7947 ±733	126
G19	10232 ±1812	8840 ±135	86
G20	7893 ±359	1670 ±275	21
G21	11033 ±1326	12006 ±1256	109
G22	14261 ±686	15182 ±2888	106
TSH (3ng/mL)	26172 ±3344	18825 ±1323	72
hMAb TSHR1 Fab (10ng/mL)	22054 ±1743	830 ±44	4

^a 重複して行った平均値

HBD = 健常な血液ドナーの血清のプール

G1-G23 = グレーブス病患者の血清

【 0 2 0 2 】

【表 8 6】

**表 19c 野生型 TSHR 及び Ala に変異した Glu107 を有する TSHR を発現する CHO 細胞に
 において、糖尿病患者の 8 の血清によるサイクリック AMP 生成の刺激**

サイクリックAMPアッセイバッファ 中の試験サンプル	生成されたサイクリックAMP (fmol/細胞 ウェル) 平均±SD (n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型 (%)
サイクリックAMPアッセイバッファ のみ	467 ±55	1044 ±120	224
HBDプール	349 ±31	563 ±16	161
G1	24022 ±2266	11449 ±1745	48
G2	10291 ±2092	9515 ±1660	92
G3	1750 ±89	945 ±68	54
G4	5654 ±902	630 ±105	11
G5	1997 ±429	841 ±90	42
G6	8862 ±648	2741 ±502	31
G7	8524 ±1333	563 ±9	7
G10	1072 ±78	862 ±57	80
TSH (3ng/mL)	21689 ±4541	14393 ±3517	66
hMAb TSHR1 Fab (10ng/mL)	20193 ^a	1269 ±214	6

^a重複して行った平均値

HBD = 健常な血液ドナーの血清のプール

G1-G23 = グレーブス病患者の血清

【 0 2 0 3 】

【表 87】

表 19d 野生型 TSHR 及び Ala に変異した Arg109 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、糖尿病患者の 8 の血清によるサイクリック AMP 生成の刺激

サイクリックAMPアッセイバッファ- 中の試験サンプル	生成されたサイクリックAMP (fmol/細胞 ウェル) 平均 \pm SD (n = 3)		変異型/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
サイクリックAMPアッセイバッファ- のみ	1109 \pm 216	837 \pm 166	75
HBDプール	469 \pm 68	538 \pm 156	115
G1	20487 \pm 2394	18398 \pm 2682	90
G11	1541 \pm 40	471 \pm 116	31
G15	12402 \pm 671	6619 ^a	53
G16	2382 \pm 166	508 ^a	21
G17	8351 \pm 142	240 ^a	3
G18	2160 ^a	271 \pm 33	13
G19	11235 \pm 1167	7134 \pm 458	63
G20	10485 \pm 1872	5486 \pm 231	52
TSH (3ng/mL)	22177 \pm 3724	18545 \pm 1365	84
hMAb TSHR1 Fab (10ng/mL)	18509 \pm 1980	8835 ^a	48

^a重複して行った平均値

HBD = 健常な血液ドナーの血清のプール

G1-G23 = グレーブス病患者の血清

【0204】

【表 8 8】

表 19e 野生型 TSHR 及び Asp に変異した Arg109 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、グレープス病患者の 8 の血清によるサイクリック AMP 生成の刺激

サイクリックAMPアッセイバッファ- 中の試験サンプル	生成されたサイクリックAMP (fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型 (%)
サイクリックAMPアッセイバッファ- のみ	1164 ±135	156 ±17	13
HBDプール	684 ±9	142 ^a	21
G1	13261 ±1829	12183 ±440	92
G9	10959 ±1289	3985 ±714	36
G15	10163 ±1093	2895 ±372	28
G17	8802 ±1300	ud	nd
G19	9120 ±1226	7588 ±261	83
G20	9028 ±0	774 ±170	9
G21	11249 ±665	2711 ±47	24
G22	10929 ±605	592 ±159	5
TSH (3ng/mL)	13087 ±1240	12308 ±500	94
hMAb TSHRI Fab (10ng/mL)	12318 ±513	29701 ^a	24

^a 重複して行った平均値

HBD = 健常な血液ドナーの血清のプール

G1-G23 = グレープス病患者の血清

ud = 検出不可

nd = 未測定

【 0 2 0 5 】

【表 8 9】

表 19f 野生型 TSHR 及び Ala に変異した Lys129 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、グレース病患者の 8 の血清によるサイクリック AMP 生成の刺激

サイクリックAMPアッセイバッファ- 中の試験サンプル	生成されたサイクリックAMP (fmol/ 細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		変異型/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
サイクリックAMPアッセイバッファ- のみ	733 ±130	774 ±116	106
HBDプール	555 ±82	676 ±63	122
G1	14504 ±1914	12217 ±1309	84
G9	11371 ±1268	6705 ±490	59
G15	8331 ±413	5896 ±841	71
G17	6769 ±1311	3642 ±534	54
G19	6232 ^a	5588 ±433	90
G20	6974 ±416	4561 ^a	65
G21	9638 ±923	6384 ±717	66
G22	11167 ±849	8579 ±1015	77
TSH (3ng/mL)	12021 ±597	10747 ±1097	89
hMAb TSHR1 Fab (10ng/mL)	15281 ±2616	5457 ±294	36

^a 重複して行った平均値

HBD = 健常な血液ドナーの血清のプール

G1-G23 = グレース病患者の血清

【 0 2 0 6 】

【表 9 0】

**表 19g 野生型 TSHR 及び Ala に変異した Lys183 を有する TSHR を発現する CHO 細胞に
おいて、糖尿病患者の 8 の血清によるサイクリック AMP 生成の刺激**

サイクリックAMPアッセイバッファー 中の試験サンプル	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均±SD (n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型 (%)
<u>実験 1</u>			
サイクリックAMPアッセイバッファー のみ	564 ^a	501 ±30	89
HBDプール	388 ±7	423 ±83	109
G1	20190 ^a	13292 ±1339	66
G2	11793 ±1112	4213 ±350	36
G3	3406 ±149	2699 ±246	79
G4	3465 ±102	2473 ±302	71
G5	3850 ±297	4540 ^a	118
G6	2702 ±76	2148 ±262	79
G7	3666 ±72	11567 ±604	316
G10	3682 ±136	9445 ^a	257
TSH (3ng/mL)	15633 ±1329	15528 ±2057	99
hMAb TSHR1 Fab (10ng/mL)	12921 ±1927	2685 ±166	21
<u>実験 2</u>			
サイクリックAMPアッセイバッファー のみ	609 ±103	824 ±115	135
HBD	767 ^a	847 ±82	110
G7	8582 ±919	21820 ±3119	254
G10	6900 ±1020	11315 ±582	164
TSH (3ng/mL)	6652 ±507	10158 ^a	153

^a重複して行った平均値

HBD = 健康な血液ドナーの血清のプール

G1-G23 = グレーブス病患者の血清

【 0 2 0 7 】

【表 9 1】

表 19h 野生型 TSHR 及び Asp に変異した Lys183 を有する TSHR を発現する CHO 細胞において、糖尿病患者の 8 の血清によるサイクリック AMP 生成の刺激

サイクリックAMPアッセイバッファール中の試験サンプル	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型 (%)
サイクリックAMPアッセイバッファールのみ	1177 ±84	1060 ±129	90
HBD プール	1083 ±90	818 ±87	76
G1	23805 ±711	16885 ±3813	71
G2	15218 ±742	5498 ±463	36
G3	6751 ±299	2222 ^a	33
G4	8658 ^a	1891 ±383	21
G5	9597 ±880	5432 ±502	57
G6	6452 ±251	6751 ±295	105
G7	9408 ±1016	8245 ±1419	88
G10	10221 ±634	5346 ±794	52
TSH (3ng/mL)	20683 ±1193	20430 ±1646	99
hMAb TSHR1 Fab (10ng/mL)	21674 ±6631	2288 ±332	11

^a重複して行った平均値

HBD = 健常な血液ドナーの血清のプール

G1-G23 = グレーブス病患者の血清

【 0 2 0 8 】

【表 9 2】

表 19i 野生型 TSHR 並びに Ala に変異した Arg255 及び Ala に変異した Trp258 のダブルミューテーションを有する TSHR を発現する CHO 細胞において、糖尿病患者の 8 の血清によるサイクリック AMP 生成の刺激

サイクリックAMPアッセイバッファ- 中の試験サンプル	生成されたサイクリックAMP(fmol/細胞 ウェル) 平均 \pm SD (n = 3)		変異型/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
サイクリックAMPアッセイバッファ- のみ	971 \pm 158	852 \pm 39	88
HBD プール	195 \pm 15	192 \pm 11	98
G1	23823 \pm 3713	10040 ^a	42
G15	16707 ^a	988 \pm 184	6
G16	5936 ^a	284 \pm 56	5
G18	4188 \pm 249	539 \pm 54	13
G19	9319 \pm 2112	1166 \pm 187	13
G21	18524 ^a	1131 \pm 90	6
G22	20146 \pm 599	10350 ^a	51
G23	3135 \pm 965	614 \pm 112	20
TSH (3ng/mL)	22914 \pm 3567	21673 \pm 2216	95
hMAb TSHR1 Fab (10ng/mL)	22605 \pm 2137	1228 \pm 48	5

^a重複して行った平均値

HBD = 健常な血液ドナーの血清のプール

G1-G23 = グレーブス病患者の血清

【 0 2 0 9 】

【表 9 3】

表20 グレーブス病患者の血清(n=8)によるサイクリックAMP生成の刺激における
突然変異(野生型と比較して)の効果の概要

アミノ酸の突然変異	著しい減少	減少	わずかな効果	効果なし	増強した効果
Arg80がAlaに変異	2/8	1/8	2/8	3/8	0/8
Arg80がAspに変異	3/8	1/8	1/8	3/8	0/8
Glu107がAlaに変異	2/8	4/8	1/8	1/8	0/8
Arg109がAlaに変異	3/8	3/8	1/8	1/8	0/8
Arg109がAspに変異	5/8	1/8	1/8	1/8	0/8
Lys129がAlaに変異	0/8	2/8	5/8	1/8	0/8
Lys183がAlaに変異	0/8	1/8	4/8	1/8	2/8
Lys183がAspに変異	1/8	4/8	2/8	1/8	0/8
Arg255がAspに変異	8/8	0/8	0/8	0/8	0/8
Arg255がAlaに変異 及び Trp258がAlaに変異	6/8	2/8	0/8	0/8	0/8

各々の突然変異において試験された8の血清のうち影響を受けた血清の数

【 0 2 1 0 】

【表 9 4】

表21a 野生型TSHR及びAspに変異したArg80を有するTSHRを発現するCHO細胞において、
6種類の異なるマウス甲状腺刺激モノクローナル抗体(mTSMABs)によるサイクリックAMP生成の刺激

サイクリックAMPアッセイバッファーでの試験サンプル	生成されたサイクリックAMP (fmol/細胞 ウェル) (平均±SD; n=3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型 (%)
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	484 ±74	880 ±142	182
hMAb TSHR1 (10ng/mL)	15218 ±1052	1284 ±469	8
2G2 (1µg/mL)	726 ±164	946 ±207	130
TSMAB 1 (1µg/mL)	4862 ±510	1480 ±160	30
TSMAB 2 (1µg/mL)	3390 ±459	945 ±200	28
TSMAB C (10ng/mL)	5261 ±472	1532 ±320	29
TSMAB D (1µg/mL)	6714 ±398	1255 ±316	19
TSMAB E (1µg/mL)	6861 ±1025	1083 ±199	16
TSMAB F (100ng/mL)	11271 ±1753	1424 ±279	13

2G2は、チロトロピンに対するマウスモノクローナル抗体(ネガティブコントロール)

【 0 2 1 1 】

【表 9 5】

表21b 野生型TSHR及びAlaに変異したGlu107を有するTSHRを発現するCHO細胞において、
6種類の異なるマウス甲状腺刺激モノクローナル抗体(mTSMABs)によるサイクリックAMP生成の刺激

サイクリックAMPアッセイバッファーでの 試験サンプル	生成されたサイクリックAMP (fmol/細胞 ウェル) (平均±SD; n=3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型 (%)
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	470 ±85	1130 ±119	240
hMAb TSHR1 (10ng/mL)	19175 ^a	1238 ±15	6
2G2 (1µg/mL)	632 ±214	1057 ±129	167
TSMAB 1 (1µg/mL)	5986 ±374	1049 ±170	18
TSMAB 2 (1µg/mL)	4214 ±448	1106 ±105	26
TSMAB C (10ng/mL)	7181 ±678	1267 ±140	18
TSMAB D (1µg/mL)	10157 ^a	1149 ±120	11
TSMAB E (1µg/mL)	7425 ^a	1224 ±50	16
TSMAB F (100ng/mL)	13203 ±891	1158 ±137	9

^a 重複して行った平均値

2G2は、チログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(ネガティブコントロール)

【 0 2 1 2 】

【表 9 6】

表21c 野生型TSHR及びAlaに変異したArg109を有するTSHRを発現するCHO細胞において、
6種類の異なるマウス甲状腺刺激モノクローナル抗体(mTSMABs)によるサイクリックAMP生成の刺激

サイクリックAMPアッセイバッファーでの 試験サンプル	生成されたサイクリックAMP (fmol/細胞 ウェル) (平均±SD; n=3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型 (%)
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	727 ±41	1036 ±190	143
hMAb TSHR1 (10ng/mL)	18093 ±2166	9972 ±697	55
2G2 (1µg/mL)	935 ^a	718 ±161	77
TSMAB 1 (1µg/mL)	5622 ±381	526 ^a	9
TSMAB 2 (1µg/mL)	4325 ±731	444 ±86	10
TSMAB C (10ng/mL)	5807 ±708	3706 ±207	64
TSMAB D (1µg/mL)	8462 ±1673	3047 ±395	36
TSMAB E (1µg/mL)	6729 ±813	3246 ±612	48
TSMAB F (100ng/mL)	13964 ±1780	6727 ±791	48

^a 重複して行った平均

2G2は、チログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(ネガティブコントロール)

【 0 2 1 3 】

【表 9 7】

表21d 野生型TSHR及びAspに変異したArg109を有するTSHRを発現するCHO細胞において、
6種類の異なるマウス甲状腺刺激モノクローナル抗体(mTSMABs)によるサイクリックAMP生成の刺激

サイクリックAMPアッセイバッファーでの 試験サンプル	生成されたサイクリックAMP (fmol/細胞 ウェル) (平均±SD; n=3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型 (%)
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	630 ±22	413 ±1	66
hMAb TSHR1 (10ng/mL)	17787 ±1359	3733 ±395	21
2G2 (1µg/mL)	645 ±103	359 ±113	56
TSMAB 1 (1µg/mL)	4489 ±576	491 ±36	11
TSMAB 2 (1µg/mL)	4102 ±413	278 ^a	7
TSMAB C (10ng/mL)	7440 ±548	709 ^a	10
TSMAB D (1µg/mL)	9305 ±1019	591 ±30	6
TSMAB E (1µg/mL)	8387 ±720	530 ±52	6
TSMAB F (100ng/mL)	12292 ±1280	473 ^a	4

^a 重複して行った平均値

2G2は、チログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(ネガティブコントロール)

【 0 2 1 4 】

【表 9 8】

表21e 野生型TSHR及びAlaに変異したLys129を有するTSHRを発現するCHO細胞において、
6種類の異なるマウス甲状腺刺激モノクローナル抗体(mTSMABs)によるサイクリックAMP生成の刺激

サイクリックAMPアッセイバッファーでの 試験サンプル	生成されたサイクリックAMP (fmol/細胞 ウェル) (平均±SD; n =3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型 (%)
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	1196 ±28	1002 ±154	84
hMAb TSHR1 (10ng/mL)	28890 ±2504	10900 ±818	38
2G2 (1µg/mL)	1396 ±146	331 ^a	24
TSMAB 1 (1µg/mL)	6220 ±850	4700 ±840	76
TSMAB 2 (1µg/mL)	5706 ±792	3394 ±560	59
TSMAB C (10ng/mL)	10288 ^a	540 ±186	5
TSMAB D (1µg/mL)	13806 ±716	816 ±26	6
TSMAB E (1µg/mL)	8746 ±968	656 ±82	8
TSMAB F (100ng/mL)	20126 ±1972	2264 ^a	11

^a 重複して行った平均値

2G2は、チログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(ネガティブコントロール)

【 0 2 1 5 】

10

20

30

40

【表 9 9】

表21f 野生型TSHR及びAlaに変異したLys183を有するTSHRを発現するCHO細胞において、
6種類の異なるマウス甲状腺刺激モノクローナル抗体(mTSMABs)によるサイクリックAMP生成の刺激

サイクリックAMPアッセイバッファーでの 試験サンプル	生成されたサイクリックAMP (fmol/細胞 ウェル) (平均±SD; n=3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型 (%)
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	717 ±98	601 ±83	84
hMAb TSHR1 (10ng/mL)	25794 ±1025	3182 ±771	12
2G2 (1µg/mL)	784 ±77	796 ±104	102
TSMAB 1 (1µg/mL)	4213 ^a	881 ±188	21
TSMAB 2 (1µg/mL)	3455 ±435	524 ^a	15
TSMAB C (10ng/mL)	7935 ^a	655 ^a	8
TSMAB D (1µg/mL)	9919 ±983	556 ±89	6
TSMAB E (1µg/mL)	8487 ±1541	703 ±20	8
TSMAB F (100ng/mL)	15068 ±1503	797 ±131	5

^a 重複して行った平均値

2G2は、チログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(ネガティブコントロール)

【 0 2 1 6 】

【表 1 0 0】

表21g 野生型TSHR及びAspに変異したLys183を有するTSHRを発現するCHO細胞において、
6種類の異なるマウス甲状腺刺激モノクローナル抗体(mTSMABs)によるサイクリックAMP生成の刺激

サイクリックAMPアッセイバッファーでの 試験サンプル	生成されたサイクリックAMP (fmol/細胞 ウェル) (平均±SD; n=3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型 (%)
サイクリックAMPアッセイバッファーのみ	909 ±51	1005 ±136	111
hMAb TSHR1 (10ng/mL)	25297 ^a	1755 ±83	7
2G2 (1µg/mL)	1296 ±126	1256 ±134	97
TSMAB 1 (1µg/mL)	8228 ±1348	653 ±174	8
TSMAB 2 (1µg/mL)	8026 ±1398	370 ^a	5
TSMAB C (10ng/mL)	10381 ±70	540 ±144	5
TSMAB D (1µg/mL)	16466 ±5817	1350 ±98	8
TSMAB E (1µg/mL)	10765 ±1543	325 ±13	8
TSMAB F (100ng/mL)	17634 ±1701	390 ±34	2

^a 重複して行った平均値

2G2は、チログロブリンに対するマウスモノクローナル抗体(ネガティブコントロール)

【 0 2 1 7 】

10

20

30

40

【表 1 0 1】

表22 マウス甲状腺刺激モノクローナル抗体(mTSMAbs)によるサイクリックAMP生成の刺激における突然変異(野生型と比較して)の効果の概要

アミノ酸の突然変異	著しい減少	減少	わずかな減少	効果なし
Arg80がAspに変異	6/6	0/6	0/6	0/6
Glu107がAlaに変異	6/6	0/6	0/6	0/6
Arg109がAlaに変異	2/6	3/6	1/6	0/6
Arg109がAspに変異	6/6	0/6	0/6	0/6
Lys129がAlaに変異	4/6	2/6	0/6	0/6
Lys183がAlaに変異	6/6	0/6	0/6	0/6
Lys183がAspに変異	6/6	0/6	0/6	0/6
Arg255がAspに変異	6/6	0/6	0/6	0/6

10

各々の突然変異において試験された6のモノクローナル抗体のうち影響を受けたモノクローナル抗体の数

20

【 0 2 1 8】

【表 1 0 2】

表23a 野生型TSHR及びAlaに変異したGlu107を有するTSHRを発現するCHO細胞において、TSHが誘発したサイクリックAMP生成。
TSHアンタゴニスト活性を有する、異なる希釈の血清B3(表9)の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプルの希釈 ^a	生成されたサイクリックAMP (fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		変異型/野生型 (%)
	野生型 TSHR	変異型 TSHR	
B3 1000x	1041 ±143	1073 ±251	103
B3 1000x + TSH ^b	15561 ±1630	10918 ±601	70
B3 100x	567 ^c	214 ±24	38
B3 100x + TSH ^b	10246 ±469	478 ^c	5
B3 10x	161 ±23	168 ±33	104
B3 10x + TSH ^b	165 ^c	156 ±26	95
HBD 1000x	877 ±154	1518 ±195	173
HBD 1000x + TSH ^b	18086 ±1390	11896 ±1044	66
HBD 100x	931 ±73	1001 ±244	108
HBD 100x + TSH ^b	18850 ±1541	11777 ±759	62
HBD 10x	563 ±302	515 ±308	91
HBD 10x + TSH ^b	20456 ±1912	10284 ±146	50

B 阻害(%)の結果

TSHアンタゴニスト活性を有する血清	TSH刺激の阻害% ^d	
	野生型TSHR	変異型TSHR
B3 1000x	14	8
B3 100x	46	96
B3 10x	99	98

HBD = 健常な血液ドナーの血清のプール

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル

^b TSH 終濃度 = 1.5 ng/mL

^c 重複して行った平均値

$$^d \text{ 阻害\%} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{血清B3+TSHの存在するcAMP}}{\text{HBD+TSHの存在するcAMP}} \right]$$

ここで、試験サンプルとHBD希釈は同じ

【 0 2 1 9 】

【表103】

表23b 野生型TSHR及びAla1に変異したArg109を有するTSHRを発現するCHO細胞において、TSHが誘発したサイクリックAMP生成、TSHアンタゴニスト活性を有する、異なる希釈の血清B3(表9)の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプルの希釈 ^a	生成されたサイクリックAMP (fmol/細胞ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型 (%)
B3 1000x	510 ±100	1224 ^c	240
B3 1000x + TSH ^b	20938 ^c	12248 ±824	58
B3 100x	425 ^c	378 ±55	89
B3 100x + TSH ^b	20790 ^c	10358 ±1447	50
B3 10x	226 ±18	269 ±16	119
B3 10x + TSH ^b	349 ±64	294 ±46	84
HBD 1000x	419 ^c	473 ^c	113
HBD 1000x + TSH ^b	21126 ±884	14225 ±2494	67
HBD 100x	462 ^c	478 ^c	103
HBD 100x + TSH ^b	22146 ±919	11051 ^c	50
HBD 10x	378 ±14	302 ^c	80
HBD 10x + TSH ^b	22973 ±514	14197 ±1977	62

B 阻害%の結果

TSHアンタゴニスト活性を有する血清	TSH刺激の阻害% ^d	
	野生型TSHR	変異型TSHR
B3 1000x	1	14
B3 100x	6	6
B3 10x	98	98

HBD = 健常な血液ドナーの血清のプール

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル^b TSH終濃度 = 1.5 ng/mL^c 重複して行った平均値
$$^d \text{ 阻害\%} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{血清B3+TSHの存在するcAMP}}{\text{HBD+TSHの存在するcAMP}} \right]$$

ここで試験サンプルとHBD希釈は同じ

【0220】

【表104】

表23c 野生型TSHR及びAlaに変異したLys183を有するTSHRを発現するCHO細胞において、TSHが誘発したサイクリックAMP生成。TSHアンタゴニスト活性を有する、異なる希釈の血清B3(表9)の効果

A サイクリックAMPレベル

試験サンプルの希釈 ^a	生成されたサイクリックAMP (fmol/細胞 ウェル) (平均 ±SD; n = 3)		変異型/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
B3 1000x	535 ±52	549 ±31	103
B3 1000x + TSH ^b	12400 ±790	14656 ±2399	118
B3 100x	389 ±36	267 ±12	69
B3 100x + TSH ^b	3420 ±159	2929 ±310	86
B3 10x	149 ±6	150 ^c	101
B3 10x + TSH ^b	157 ±21	170 ^c	108
HBD 1000x	569 ^c	648 ±65	114
HBD 1000x + TSH ^b	12762 ±150	13589 ±2282	106
HBD 100x	548 ±16	404 ±237	74
HBD 100x + TSH ^b	13803 ±747	13112 ±1442	95
HBD 10x	396 ±102	368 ^c	93
HBD 10x + TSH ^b	11959 ±940	14161 ±1648	118

B 阻害%の結果

TSHアンタゴニスト活性を有する血清	TSH刺激の阻害% ^d	
	野生型TSHR	変異型TSHR
B3 1000x	3	-8
B3 100x	75	78
B3 10x	99	99

HBD = 健常な血液ドナーの血清のプール

^a サイクリックAMPアッセイバッファー中の試験サンプル^b TSH終濃度 = 1.5 ng/mL^c 重複して行った平均値

$$^d \text{ 阻害(\%)} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{血清B3+TSHの存在するcAMP}}{\text{HBD+TSHの存在するcAMP}} \right]$$

ここで試験サンプルとHBD希釈は同じ

【0221】

【表 1 0 5】

表24 TSHアンタゴニスト活性を有する血清B3(表9)によるTSHが介在した
サイクリックAMP刺激の阻害における突然変異(野生型と比較して)の効果の概要

アミノ酸の突然変異	TSHアンタゴニスト活性を有する血清B3による TSHが介在したサイクリックAMP刺激の阻害
Glu107がAlaに変異	増強された効果
Arg109がAlaに変異	効果なし
Lys183がAlaに変異	効果なし
Arg255がAspに変異	増強された効果

10

【 0 2 2 2】

【表106】

表25 野生型(非変異型)及び変異型TSHレセプター試料に対するTSH, hMAb TSHR1 Fab及び9D33 MAb結合のスクラッチャード(Scatchard)分析

レセプター試料	TSHにおける A_{71} に K_D	hMAb TSHR1 Fabにおける A_{71} に K_D	9D33 MAbにおける A_{71} に K_D
野生型	$6.0 \pm 0.9 \times 10^9$ L/mol	$3.4 \pm 1.0 \times 10^{10}$ L/mol	$1.8 \pm 0.7 \times 10^{10}$ L/mol
Asp43がAlaに変異	3.4×10^9 L/mol	2.7×10^{10} L/mol	1.4×10^{10} L/mol
Lys58がAlaに変異	5.9×10^9 L/mol	1.6×10^{10} L/mol	9D33 MAb 結合は検出不可
Ile60がAlaに変異	5.1×10^9 L/mol	4.4×10^{10} L/mol	9D33 MAb 結合は検出不可
Glu61がAlaに変異	2.4×10^9 L/mol	3.4×10^9 L/mol	0.9×10^{10} L/mol
Arg60がAlaに変異	4.2×10^9 L/mol	hMAb TSHR1 Fab 結合は検出不可	9D33 MAb 結合は検出不可
Arg60がAspに変異	2.8×10^9 L/mol	hMAb TSHR1 Fab 結合は検出不可	9D33 MAb 結合は検出不可
Tyr62がAlaに変異	4.0×10^9 L/mol	1.8×10^{10} L/mol	9D33 MAb 結合は検出不可
Glu107がAlaに変異	3.7×10^9 L/mol	0.1×10^{10} L/mol	0.6×10^{10} L/mol
Glu107がArgに変異	TSH 結合は検出不可	hMAb TSHR1 Fab 結合は検出不可	9D33 MAb 結合は検出不可
Arg109がAlaに変異	1.1×10^9 L/mol	2.3×10^{10} L/mol	9D33 MAb 結合は検出不可
Arg109がAspに変異	TSH 結合は検出不可	hMAb TSHR1 Fab 結合は検出不可	9D33 MAb 結合は検出不可
Lys129がAlaに変異	2.2×10^9 L/mol	0.3×10^{10} L/mol	9D33 MAb 結合は検出不可
Lys129がAspに変異	TSH 結合は検出不可	hMAb TSHR1 Fab 結合は検出不可	9D33 MAb 結合は検出不可
Phe130がAlaに変異	2.4×10^9 L/mol	0.3×10^{10} L/mol	0.9×10^{10} L/mol
Phe134がAlaに変異	2.1×10^9 L/mol	0.9×10^{10} L/mol	0.5×10^{10} L/mol
Glu157がAlaに変異	TSH 結合は検出不可	2.2×10^{10} L/mol	1.3×10^{10} L/mol
Asp160がAlaに変異	TSH 結合は検出不可	1.8×10^{10} L/mol	1.0×10^{10} L/mol
Glu178がAlaに変異	1.0×10^9 L/mol	0.5×10^{10} L/mol	1.3×10^{10} L/mol
Lys183がAlaに変異	16×10^9 L/mol	nt	nt
Lys183がAspに変異	TSH 結合は検出不可	hMAb TSHR1 Fab 結合は検出不可	9D33 MAb 結合は検出不可
Tyr185がAlaに変異	3.4×10^9 L/mol	0.4×10^{10} L/mol	0.9×10^{10} L/mol
Asp203がAlaに変異	2.2×10^9 L/mol	1.9×10^{10} L/mol	1.4×10^{10} L/mol
Tyr206がAlaに変異	TSH 結合は検出不可	nt	9D33 MAb 結合は検出不可
Lys209がAlaに変異	TSH 結合は検出不可	1.3×10^{10} L/mol	0.8×10^{10} L/mol
Asp232がAlaに変異	TSH 結合は検出不可	hMAb TSHR1 Fab 結合は検出不可	9D33 MAb 結合は検出不可
Asp232がArgに変異	TSH 結合は検出不可	hMAb TSHR1 結合は検出不可	9D33 MAb 結合は検出不可
Gln235がAlaに変異	4.9×10^{10} L/mol	2.5×10^{10} L/mol	1.1×10^{10} L/mol
Lys250がAlaに変異	TSH 結合は検出不可	0.9×10^{10} L/mol	0.6×10^{10} L/mol
Glu251がAlaに変異	2.0×10^9 L/mol	1.9×10^{10} L/mol	0.8×10^{10} L/mol
Arg255がAlaに変異	2.3×10^9 L/mol	0.7×10^{10} L/mol	0.8×10^{10} L/mol
Arg255がAspに変異	TSH 結合は検出不可	0.3×10^{10} L/mol	1.3×10^{10} L/mol
Thr257がAlaに変異	TSH 結合は検出不可	1.8×10^{10} L/mol	0.7×10^{10} L/mol
Trp258がAlaに変異	TSH 結合は検出不可	1.4×10^{10} L/mol	1.2×10^{10} L/mol
Arg274がAlaに変異	TSH 結合は検出不可	0.8×10^{10} L/mol	0.5×10^{10} L/mol
Asp276がAlaに変異	5.5×10^9 L/mol	1.6×10^{10} L/mol	1.3×10^{10} L/mol
Tyr279がAlaに変異	TSH 結合は検出不可	0.7×10^{10} L/mol	0.6×10^{10} L/mol
Ser281がAlaに変異	3.4×10^9 L/mol	2.3×10^{10} L/mol	0.9×10^{10} L/mol
Arg285がAlaに変異及びTrp258がAlaに変異	TSH 結合は検出不可	1.0×10^{10} L/mol	1.1×10^{10} L/mol

nt = 未試験

【表 1 0 7】

表26 ホルモンと抗体によるサイクリックAMP刺激における効果の違いを示す、
アミノ酸の突然変異を含むTSHレセプターにおけるhMAb TSHR1 Fab及び
TSHの結合アフィニティ

アミノ酸の突然変異	TSHにおけるアフィニティ	hMAb TSHR1 Fabにおけるアフィニティ
Arg80がAlaに変異	変化なし	検出不可の結合
Arg80がAspに変異	変化なし	検出不可の結合
Tyr82がAlaに変異	変化なし	変化なし
Glu107がAlaに変異	変化なし	<u>著しい減少</u>
Arg109がAlaに変異	減少	変化なし
Arg109がAspに変異	検出不可の結合	検出不可の結合
Lys129がAlaに変異	変化なし	<u>著しい減少</u>
Lys129がAspに変異	検出不可の結合	検出不可の結合
Phe130がAlaに変異	変化なし	<u>著しい減少</u>
Lys183がAlaに変異	増加	未試験
Lys183がAspに変異	検出不可の結合	検出不可の結合
Tyr185がAlaに変異	変化なし	<u>著しい減少</u>
Asp232がAlaに変異	検出不可の結合	検出不可の結合
Arg255がAlaに変異	変化なし	著しい減少
Arg255がAspに変異	検出不可の結合	<u>著しい減少</u>
Trp258がAlaに変異	検出不可の結合	わずかに減少
Arg255がAlaに変異及び Trp258がAlaに変異	検出不可の結合	わずかに減少

10

20

30

【 0 2 2 4】

【表108】

表27a hMAb TSHR1及びTSHIによるTSHRを含むCHO細胞で
サイクリックAMPの刺激において、AlaへのGlu157及び
AlaへのAsp203のTSHRのダブルミューテーションの効果

実験1	生成されたサイクリックAMP (fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型 (%)
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1737 ±112	1136 ±109	65
0.3	5032 ±458	1686 ±419	34
1	9528 ±1680	2499 ±1359	26
3	14622 ±2685	6831 ±65	47
10	20515 ±3415	9527 ±1081	46
TSH (ng/mL)			
0.01	953 ±166	1037 ±56	109
0.03	836 ±447	1128 ±57	135
0.1	2083 ±337	1114 ±113	53
0.3	13295 ±5822	1197 ±112	9
1	22327 ±1531	4622 ±245	21
3	20802 ±6167	7710 ±329	37
サイクリックAMPアッセイバッファー	1108 ±206	1029 ±67	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	2278 ±607	2489 ±91	109
0.3	4233 ±270	2856 ±227	63
1	13534 ±999	5506 ±1111	41
3	20909 ±500	13767 ±1284	66
10	23297 ±3180	19498 ±1786	84
TSH (ng/mL)			
0.01	1071 ±531	1769 ±426	165
0.03	2110 ±36	2291 ±230	109
0.1	4574 ±181	2306 ±339	50
0.3	12723 ±362	2342 ±342	18
1	22463 ±916	6969 ±1339	31
3	24331 ±834	13458 ±745	55
サイクリックAMPアッセイバッファー	877 ±118	2467 ±251	

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【0225】

10

20

30

40

【表109】

表27b hMAb TSHR1及びTSHによるTSHRを含むCHO細胞で
サイクリックAMPの刺激において、AlaへのGlu178及び
AlaへのAsp203のTSHRのダブルミューテーションの効果

実験1	生成されたサイクリックAMP (fmol/細胞ウエル) 平均 ±SD (n = 3)		変異型/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異型TSHR	
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1845 ±349	2199 ±25	119
0.3	2995 ±74	2388 ±474	80
1	10614 ±386	7005 ±975	66
3	14298 ±3757	13707 ±903	96
10	17794 ±1486	14808 ±1165	83
TSH (ng/mL)			
0.01	1682 ±329	2574 ±408	153
0.03	1913 ±132	3206 ±86	168
0.1	3881 ±290	3702 ±114	95
0.3	11501 ±1064	10892 ±616	95
1	17275 ±970	16664 ±1429	96
3	19963 ±2506	20605 ±1452	103
サイクリックAMPアッセイバッファー	895 ±30	1531 ±114	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1326 ±139	815 ±51	61
0.3	2244 ^a	1195 ±57	53
1	6558 ±1708	1965 ±89	30
3	14499 ±3232	5238 ±636	36
10	19735 ±1460	10913 ±2826	55
TSH (ng/mL)			
0.01	949 ±64	637 ±93	67
0.03	1343 ±240	1106 ±98	82
0.1	4351 ±928	1367 ±120	31
0.3	9438 ±1460	2540 ±232	27
1	18296 ±2078	7852 ±1106	43
3	20253 ±735	13321 ±3239	66
サイクリックAMPアッセイバッファー	613 ±45	500 ±55	

^a 重複して行った平均値

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【0226】

10

20

30

40

【表 1 1 0】

表27c hMAb TSHR1及びTSHによるTSHRを含むCHO細胞で
サイクリックAMPの刺激において、AlaへのAsp232及び
AlaへのArg255のTSHRのダブルミューテーションの効果

実験1	生成されたサイクリックAMP (fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型 (%)
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1653 ±187	609 ±20	37
0.3	2956 ±209	623 ±42	21
1	9782 ±1779	1153 ±516	12
3	13850 ±1496	1341 ±424	10
10	14827 ±1864	2713 ±289	18
TSH (ng/mL)			
0.01	1031 ±94	604 ±39	59
0.03	2142 ±256	779 ±72	36
0.1	4658 ±332	1581 ±139	34
0.3	9352 ±995	3877 ±116	41
1	16490 ±2070	5499 ±486	33
3	14656 ±501	5532 ±1145	38
サイクリックAMPアッセイバッファー	671 ±36	608 ±20	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1166 ±68	849 ±33	73
0.3	2407 ±359	967 ±70	40
1	6155 ±2046	1227 ±129	20
3	13626 ±2714	1315 ±128	10
10	14114 ±3164	2830 ±386	20
TSH (ng/mL)			
0.01	1373 ±284	1254 ±39	91
0.03	2761 ±611	1445 ±123	52
0.1	nd	2793 ±528	nd
0.3	10839 ±1399	5434 ±543	50
1	18337 ±2139	6879 ±748	38
3	16581 ±5023	6697 ±367	40
サイクリックAMPアッセイバッファー	747 ±160	749 ±148	

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

nd = 未測定

【 0 2 2 7 】

【表 1 1 1】

表27d hMAb TSHR1及びTSHによるTSHRを含むCHO細胞で
サイクリックAMPの刺激において、ArgへのAsp232及び
AspへのArg255のTSHRのダブルミューテーションの効果

実験1	生成されたサイクリックAMP (fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型 (%)
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1411 ±110	1098 ±86	78
0.3	5592 ^a	1036 ±91	19
1	8555 ^a	2660 ±164	31
3	16325 ^a	2976 ±246	18
10	20490 ^a	196 ±83	10
TSH (ng/mL)			
0.01	1456 ±63	1018 ±106	70
0.03	1755 ±173	1079 ±17	61
0.1	5811 ±153	1087 ±95	19
0.3	10213 ±897	2613 ^a	26
1	20782 ±3649	2703 ^a	13
3	25952 ±435	2743 ^a	11
サイクリックAMPアッセイバッファー	1233 ±208	1095 ±71	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1649 ±194	968 ±72	59
0.3	2786 ±320	1051 ±60	38
1	8364 ±344	949 ±305	11
3	13271 ±1940	794 ±316	6
10	17431 ±3371	399 ±83	2
TSH (ng/mL)			
0.01	1185 ±49	1219 ±246	103
0.03	1745 ±269	1463 ±98	84
0.1	2938 ±462	1571 ±173	53
0.3	8603 ±1998	1274 ±300	15
1	19137 ±1060	1291 ±243	7
3	19796 ±947	832 ±330	4
サイクリックAMPアッセイバッファー	1032 ±76	836 ±179	

^a重複して行った平均値

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【 0 2 2 8 】

【表 1 1 2】

表27e hMAb TSHR1及びTSHによるTSHRを含むCHO細胞で
サイクリックAMPの刺激において、AlaへのAsp232及び
AlaへのTrp258のTSHRのダブルミューテーションの効果

実験1	生成されたサイクリックAMP (fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型 (%)
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1371 ±89	387 ±51	28
0.3	2655 ±312	299 ±173	11
1	9988 ±2996	161 ^a	2
3	12979 ±2336	178 ±28	1
10	11756 ±1444	161 ^a	1
TSH (ng/mL)			
0.01	904 ±85	400 ±81	44
0.03	1555 ±196	391 ±50	25
0.1	3714 ±1022	203 ±185	5
0.3	9529 ^a	238 ±127	2
1	11451 ±782	163 ±32	1
3	11743 ±761	158 ±25	1
サイクリックAMPアッセイバッファー	739 ±94	293 ±155	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1735 ±359	880 ±62	51
0.3	3378 ±590	664 ±153	20
1	8934 ±3094	529 ±132	6
3	8362 ±1905	746 ±144	9
10	18753 ±1985	683 ±84	4
TSH (ng/mL)			
0.01	nd	888 ±52	nd
0.03	1726 ±322	950 ±68	55
0.1	nd	973 ±211	nd
0.3	17281 ±542	749 ±24	4
1	14866 ±2236	657 ±134	4
3	22039 ±4147	610 ±59	3
サイクリックAMPアッセイバッファー	755 ±305	647 ±203	

^a重複して行った平均値

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

nd = 未測定

【 0 2 2 9 】

【表 1 1 3】

表27f hMAb TSHR1及びTSHIによるTSHRを含むCHO細胞で
サイクリックAMPの刺激において、AlaへのAsp232、AlaへのArg255及び
AlaへのTrp258のTSHRのダブルミューテーションの効果

実験1	生成されたサイクリックAMP (fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型 (%)
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	2232 ±344	757 ±111	34
0.3	4812 ±202	825 ±97	17
1	12703 ±1110	610 ±38	5
3	20706 ±7441	545 ±221	3
10	25117 ±2140	721 ±280	3
TSH (ng/mL)			
0.01	1850 ±307	1282 ±278	69
0.03	2715 ±486	1177 ±341	43
0.1	5609 ±757	1327 ±31	24
0.3	14284 ±1250	771 ±320	5
1	21333 ±2573	1822 ±280	9
3	26438 ±4181	1156 ±501	4
サイクリックAMPアッセイバッファー	997 ±249	752 ±95	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1305 ±30	389 ±81	30
0.3	3818 ±743	328 ±33	9
1	8506 ±1163	309 ±56	4
3	18696 ±553	ud	nd
10	27645 ±1765	ud	nd
TSH (ng/mL)			
0.01	1234 ±104	423 ±138	34
0.03	1621 ±145	439 ±201	27
0.1	5228 ±415	809 ±257	15
0.3	15209 ±2728	ud	nd
1	20651 ±720	364 ±110	2
3	25628 ±256	422 ±47	2
サイクリックAMPアッセイバッファー	1346 ±29	374 ±126	

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

ud = 検出不可

nd = 未測定

【 0 2 3 0 】

【表 1 1 4】

表27g hMAb TSHR1及びTSHによるTSHRを含むCHO細胞で
サイクリックAMPの刺激において、AlaへのTrp258及びAlaへのLys183の
TSHRのダブルミューテーションの効果

実験1	生成されたサイクリックAMP (fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型 (%)
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1718 ±13	622 ±49	36
0.3	5342 ^a	792 ±100	15
1	9732 ±1608	995 ±223	10
3	16827 ±1629	1335 ±174	8
10	20111 ±1948	3233 ±1444	16
TSH (ng/mL)			
0.01	1436 ^a	1304 ±105	91
0.03	1640 ±168	2394 ±891	146
0.1	4569 ±866	5146 ±407	113
0.3	12178 ±887	10690 ±1722	88
1	18346 ±4068	13288 ±2771	72
3	21378 ±1576	19801 ±2390	93
サイクリックAMPアッセイバッファー	548 ±62	625 ±57	114

^a 重複して行った平均値

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

【 0 2 3 1 】

【表 1 1 5】

表27h hMAb TSHR1及びTSHIによるTSHRを含むCHO細胞で
サイクリックAMPの刺激において、AlaへのTrp258及びAlaへのTyr185の
TSHRのダブルミューテーションの効果

実験1	生成されたサイクリックAMP (fmol/細胞 ウェル) 平均 ±SD (n = 3)		
	野生型TSHR	変異型TSHR	変異型/野生型 (%)
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	2376 ±212	1130 ±235	48
0.3	1982 ±366	1117 ±168	56
1	5949 ±822	2012 ±289	34
3	11555 ±2562	3347 ±546	29
10	14591 ±3475	5184 ±558	35
TSH (ng/mL)			
0.01	793 ±87	1096 ±221	138
0.03	1184 ±307	2202 ±916	186
0.1	1761 ±122	nd	nd
0.3	6254 ±381	nd	nd
1	10869 ±1184	17880 ±2456	165
3	14479 ±246	20189 ±2735	139
サイクリックAMPアッセイバッファー	625 ±72	668 ±39	
実験2			
hMAb TSHR1 (ng/mL)			
0.1	1133 ±113	890 ±75	79
0.3	3122 ±134	941 ±31	30
1	8972 ±700	1477 ±82	16
3	14236 ±940	2406 ±337	14
10	16292 ±1113	4418 ±1000	27
TSH (ng/mL)			
0.01	814 ±147	873 ±43	107
0.03	885 ±142	1409 ±177	159
0.1	2754 ±435	2339 ±116	85
0.3	6713 ±647	4650 ±871	69
1	13019 ±1190	13522 ±1159	104
3	17402 ±768	20202 ±1233	116
サイクリックAMPアッセイバッファー	550 ±16	846 ±65	

hMAb TSHR1 Fabはすべての実験で使用された。

nd = 未測定

【 0 2 3 2 】

【表 1 1 6】

表28 変異型TSHRを含むCHO細胞の刺激における突然変異(野生型と比較して)の効果の概要

アミノ酸の突然変異	TSH刺激	hMAb TSHR1 Fab刺激
Glu157がAlaに変異及び Asp203がAlaに変異	著しい減少	若干の減少
Glu178がAlaに変異及び Asp203がAlaに変異	効果なし	効果なし
Asp232がAlaに変異及び Arg255がAlaに変異	著しい減少	<u>著しい減少</u>
Asp232がArgに変異及び Arg255がAspに変異	<u>著しい減少</u>	<u>著しい減少</u>
Asp232がAlaに変異及び Trp258がAlaに変異	<u>著しい減少</u>	<u>著しい減少</u>
Asp232がAlaに変異、 Arg255がAlaに変異及び Trp258がAlaに変異	<u>著しい減少</u>	<u>著しい減少</u>
Trp258がAlaに変異及び Lys183がAlaに変異	効果なし	<u>著しい減少</u>
Trp258がAlaに変異及び Tyr185がAlaに変異	効果なし	<u>著しい減少</u>

10

20

30

【 0 2 3 3 】

【表 1 1 7】

表29 野生型(非変異型)及び変異型TSHレセプター試料に対するTSH、hMAb TSHR1 Fab及び9D33 MAb結合のスキッチャード(Scatchard)分析

レセプター試料	TSHにおけるアフィニティ	hMAb TSHR1 Fabにおけるアフィニティ	9D33 MAbにおけるアフィニティ
野生型	$6.0 \pm 0.9 \times 10^9$ L/mol	$3.4 \pm 1.0 \times 10^{10}$ L/mol	$1.8 \pm 0.7 \times 10^{10}$ L/mol
Asp232がAlaに変異及びArg255がAlaに変異	TSH 結合は検出不可	nt	9D33 MAb 結合は検出不可
Asp232がArgに変異及びArg255がAspに変異	TSH 結合は検出不可	hMAb TSHR1 Fab 結合は検出不可	9D33 MAb 結合は検出不可
Asp232がAlaに変異及びTrp258がAlaに変異	TSH 結合は検出不可	hMAb TSHR1 Fab 結合は検出不可	9D33 MAb 結合は検出不可
Asp232がAlaに変異、Arg255がAlaに変異及びTrp258がAlaに変異	TSH 結合は検出不可	hMAb TSHR1 Fab 結合は検出不可	9D33 MAb 結合は検出不可
Glu157がAlaに変異及びAsp203がAlaに変異	TSH 結合は検出不可	1.5×10^{10} L/mol	0.6×10^{10} L/mol
Glu178がAlaに変異及びAsp203がAlaに変異	TSH 結合は検出不可	0.2×10^{10} L/mol	0.8×10^{10} L/mol
Tyr185がAlaに変異及びLys183がAlaに変異	13.9×10^7 L/mol	nt	0.6×10^{10} L/mol
Trp258がAlaに変異及びLys183がAlaに変異	TSH 結合は検出不可	hMAb TSHR1 Fab 結合は検出不可	9D33 MAb 結合は検出不可
Trp258がAlaに変異及びTyr185がAlaに変異	TSH 結合は検出不可	0.2×10^{10} L/mol	0.9×10^{10} L/mol
Arg255がAlaに変異及びLys183がAlaに変異	TSH 結合は検出不可	hMAb TSHR1 Fab 結合は検出不可	9D33 MAb 結合は検出不可
Arg255がAlaに変異及びTyr185がAlaに変異	TSH 結合は検出不可	0.1×10^{10} L/mol	0.9×10^{10} L/mol
Arg255がAlaに変異、Lys183がAlaに変異及びTyr185がAlaに変異	TSH 結合は検出不可	hMAb TSHR1 Fab 結合は検出不可	0.3×10^{10} L/mol
Trp258がAlaに変異及びLys183がAlaに変異、Tyr185がAlaに変異	TSH 結合は検出不可	hMAb TSHR1 Fab 結合は検出不可	9D33 MAb 結合は検出不可
Arg255がAlaに変異、Trp258がAlaに変異及びTyr185がAlaに変異	TSH 結合は検出不可	0.1×10^{10} L/mol	0.8×10^{10} L/mol
Arg255がAlaに変異、Trp258がAlaに変異、Tyr185がAlaに変異及びLys183がAlaに変異	TSH 結合は検出不可	hMAb TSHR1 Fab 結合は検出不可	9D33 MAb 結合は検出不可

nt = 未試験

10

20

30

40

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 N 5/00 1 0 1
C 1 2 P 21/02 (2006.01)		C 1 2 P 21/02 C
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53 D
A 6 1 K 38/00 (2006.01)		A 6 1 K 37/02
C 0 7 K 16/28 (2006.01)		C 0 7 K 16/28

(72)発明者 スミス,バーナード リース
イギリス国,カーディフ シーエフ3 9エックスイー,オールド・セイント・メロンズ,デュリュイドストーン・ロード,リッチモンド・ハウス(番地なし)

(72)発明者 ファーマニアク,ジャウイガ
イギリス国,カーディフ シーエフ14 9エイチエックス,ソーンヒル,ヘイヴンウッド・ドライヴ 35

(72)発明者 サンダース,ジェーン
イギリス国,カーディフ シーエフ3 2エイビー,セイント・メロンズ,フォード・ファガン7

審査官 清水 晋治

(56)参考文献 国際公開第01/063296(WO,A2)
国際公開第01/027634(WO,A2)
国際公開第00/005345(WO,A1)
女屋敏正,甲状腺自己抗原と抗体-TSH受容体抗体-,別冊・医学のあゆみ Basedow病と橋本病,医歯薬出版株式会社,1997年7月28日,第1版,p.22-26
EMBO journal. 2003, Vol.22, No.11, p.2692-2703

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C07K 14/00-19/00

C12N 15/00-15/90

PubMed

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)

SwissProt/PIR/GeneSeq

专利名称(译)	甲状腺刺激激素受体样品，所述促甲状腺激素受体的结合位点，激素与抗体的相互作用和所述结合位点，以及它们的用途		
公开(公告)号	JP5117853B2	公开(公告)日	2013-01-16
申请号	JP2007525337	申请日	2005-08-03
[标]申请(专利权)人(译)	R S R有限公司		
申请(专利权)人(译)	伯爵S.厄尔有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	伯爵S.厄尔有限公司		
[标]发明人	スミスバーナードリース ファーマニアクジャウイガ サンダーズジェーン		
发明人	スミス,バーナード リース ファーマニアク,ジャウイガ サンダーズ,ジェーン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/72 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 G01N33/53 A61K38/00 C07K16/28 G01N33/564		
CPC分类号	G01N33/564 C07K14/723 G01N2333/726		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/72 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/02.C G01N33 /53.D A61K37/02 C07K16/28		
代理人(译)	伊藤忠彦		
审查员(译)	清水慎		
优先权	2004018181 2004-08-13 GB		
其他公开文献	JP2008515387A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

包含至少一个点突变的变体TSHR样品，其中在对应于全长人TSHR的氨基酸255的位置处的至少氨基酸Arg突变为突变TSHR样品的不同氨基酸残基，突变TSHR样本用于区分患者血清刺激的TSHR自身抗体，患者血清阻断TSHR自身抗体和TSH并且 (i) 具有对应于突变TSHR样品的氨基酸序列的氨基酸序列，除了参考TSHR样品中在与全长人TSHR的氨基酸255相对应的位置处不存在Arg突变。与患者血清中刺激的TSHR自身抗体与参考TSHR样品相互作用的刺激作用相比，刺激患者血清，与突变TSHR样品相互作用型TSHR自身抗体的刺激，或显著减少，或基本上丧失，相比TSH的刺激 (ii) 参考TSHR样品相互作用时，用突变TSHR样品相互作用TSH的刺激时基本上不受到影响，相比于在患者的血清封闭阻断型TSHR自身抗体的动作与 (iii) 的参考TSHR样品，突变体TSH相互作用阻断的TSHR自身抗体对患者血清与R样品相互作用的阻断作用基本上不受影响或升高，因此突变TSHR样品存在于患者的血清样品中在刺激的TSHR自身抗体中，患者的血清阻断TSHR自身抗体和TSH差异筛查和鉴定要。

アミノ酸番号 (5'→3')	配列
Asp232 Ala F	acccaagcttggctgcaaggatgctcacaaccagtggt
Asp232 Ala R	acactgggttggagacacgcaaccagcaagcttgggt
Arg255 Ala F	agggaactgatagcgaacaacacctggactcttta
Arg255 Ala R	taagagtcagggtgttgcctcgctatcagttcct
Asp203 Ala F	atgggacaaaagctgctggctggtttacctaaca
Asp203 Ala R	tgtttaggtaaacagcgaaccagcttggteccat
Glu178 Ala F	agggactatgcaatgaaccttgacactggaagc
Glu178 Ala R	gcttcagtgccaaggttgcacatgcatagctccct
Glu157 Ala F	atttcttatacttgcattacagacaaccctta
Glu157 Ala R	taagggttgctctgtaattgcaaggtataaagaat
Asp43 Ala F	agtcaactcgaaggtgcaattcaacgcattcccag
Asp43 Ala R	ctggggatgagcttgaatgcaacttgcagggtgact
Glu61 Ala F	tctgaagcttattgcaactcactcaggaactat
Glu61 Ala R	atagttctcagggtgagtcgaataagcttcaga
Sec281 Ala F	accttcttaccacagcgaactgctgctgctctta
Sec281 Ala R	taaggcaccagcagctgctggctgggttaagaaaggt
Asp276 Ala F	ctcacaggggtgctgctcttcttaccacaagccac
Asp276 Ala R	gtggcttgggtagaagaaggcagcccgctgtgag
Tyr258 Ala F	agcaagaacaacacgcaactcttaagaacttccact
Tyr258 Ala R	agtggaaagtctcttaagagctgcaagggtttctctgct
BOHR	tagaaggcactgcaggg
T7	taatacagactcactataggg
Arg255 Asp F	agggaactgatagcgaacaacacctggactcttta
Arg255 Asp R	taagagtcagggtgttgcctcgctatcagttcct
Arg255 Ala F	agggaactgatagcgaacaacacctggactcttaagaaact
Arg255 Ala R	agtttcttaagagtcgaagggtgttgcctatcagttcct