

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-521139

(P2010-521139A)

(43) 公表日 平成22年6月24日(2010.6.24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G 0 4 5
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 B 0 2 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 2	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 139 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-549848 (P2009-549848)  
 (86) (22) 出願日 平成20年2月14日 (2008. 2. 14)  
 (85) 翻訳文提出日 平成21年10月19日 (2009. 10. 19)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2008/000518  
 (87) 国際公開番号 W02008/099185  
 (87) 国際公開日 平成20年8月21日 (2008. 8. 21)  
 (31) 優先権主張番号 60/901, 332  
 (32) 優先日 平成19年2月15日 (2007. 2. 15)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 0702990. 3  
 (32) 優先日 平成19年2月15日 (2007. 2. 15)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)  
 (31) 優先権主張番号 0714036. 1  
 (32) 優先日 平成19年7月18日 (2007. 7. 18)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

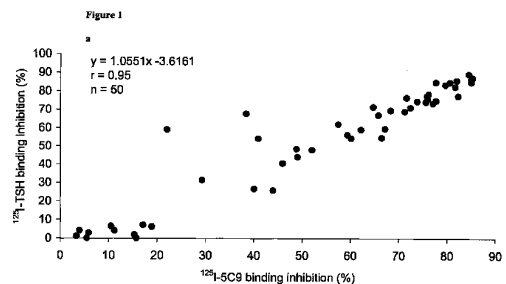
(71) 出願人 507044468  
 アールエスアール リミテッド  
 イギリス国, カーディフ シーエフ23  
 8エイチイー, ペントウィン, アヴェニュー  
 ー・パーク (番地なし)  
 (74) 代理人 100100549  
 弁理士 川口 嘉之  
 (74) 代理人 100090516  
 弁理士 松倉 秀実  
 (74) 代理人 100106622  
 弁理士 和久田 純一  
 (74) 代理人 100089244  
 弁理士 遠山 勉  
 (74) 代理人 100126505  
 弁理士 佐貫 伸一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アンタゴニストとして作用する、サイロトロピンレセプターに対するヒトモノクローナル抗体

(57) 【要約】

本発明は T S H のアンタゴニストである、T S H R に対する単離抗体を提供する。本発明はまた、本発明の抗体の使用法に関する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

甲状腺刺激ホルモン (TSH) のアンタゴニストである、甲状腺刺激ホルモンレセプター (TSHR) に対する単離されたヒト抗体。

## 【請求項 2】

TSH のアンタゴニストである、TSHR に対する単離されたヒト化抗体。

## 【請求項 3】

甲状腺刺激性抗体のアンタゴニストである、請求項 1 または 2 に記載の抗体。

## 【請求項 4】

TSH のアンタゴニストである患者血清 TSHR 自己抗体の TSH アンタゴニスト特性を有する、請求項 1、2、または 3 に記載の抗体。 10

## 【請求項 5】

TSH のアンタゴニストおよび甲状腺刺激性抗体のアンタゴニストである、請求項 3 または 4 に記載の抗体。

## 【請求項 6】

甲状腺刺激性抗体のアンタゴニストである患者血清 TSHR 自己抗体のアンタゴニスト特性を有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体。

## 【請求項 7】

TSH、M22、TSHR への刺激活性を有する抗体、または遮断活性を有する抗体による TSHR もしくはその一部への結合の阻害剤である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体。 20

## 【請求項 8】

該 TSHR の一部が TSHR のロイシンリッチドメイン (LRD) またはその実質的な一部を含む、請求項 7 に記載の抗体。

## 【請求項 9】

前記結合を阻止する、請求項 7 または 8 に記載の抗体。

## 【請求項 10】

モノクローナルもしくはリコンビナント抗体であるか、またはその断片を含むかもしくはその断片よりなる、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体。

## 【請求項 11】 30

1 または 2 以上の相補性決定領域 (CDR) を含む  $V_H$  領域を含む請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の抗体であって、該 CDR が、

- a) SNYMS (CDR 1) ;
- b) VTYSGGSTSYADSVKG (CDR 2) ; または
- c) GGRYCSSISCYARSGCDY (CDR 3)

またはこれらの CDR に実質的な相同性を有する 1 または 2 以上のアミノ酸配列から選択される抗体。

## 【請求項 12】

1 または 2 以上の CDR を含む  $V_L$  領域を含む請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の抗体であって、該 CDR が、 40

- a) RASQSISNYLN (CDR 1) ;
- b) AASSLQS (CDR 2) ; または
- c) QQSYSSTT (CDR 3)

またはこれらの CDR に実質的な相同性を有する 1 または 2 以上のアミノ酸配列から選択される抗体。

## 【請求項 13】

ヒト完全長 TSHR に対して約  $10^{10}$  L/mol の結合アフィニティーを有する、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の抗体。

## 【請求項 14】

ヒト完全長 TSHR に対して約  $10^9$  L/mol の結合アフィニティーを有する、請求 50

項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 1 5】

ヌクレオチドであって、

- a . 請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の抗体をコードするヌクレオチド配列 ;  
b .

i .

gaagtgcagctggaggagctgaggaggcctgatccagcctggggggctc cctgagactctcctgtgcagcctctgggt  
tcaccgtcagtagcaactaca tgagctgggtccgccaggctccaggggaaggggctggagtggggtctcagtt acttata  
gcggtggttagcacatcctacgcagactccgtgaagggccgatt  
caccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatcttcaaatagaaca gcctgagagccgaggacacggccgtgtat  
tactgtgcgagagggggcgga tattgtagtagtataagctgctacgcgaggagcgggtgtgactactgggg ccagggg  
accctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcccatcgg tcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctg  
ggggcacagcggcc ctgggctgctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgtcgtg gaactcaggcggcc  
tgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctac agtcctcaggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgcc  
ctccagc agcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaa caccaagggtggacaagagagt  
tgagcccaaatctgtgacaaaactagt ; または

i i .

gcatccagatgaccagctctccttccctcctgtctgcatctgtaggaga cagagtcaccatcacttgccgggcaagtc  
agagcattagcaactatftaa attggtatcagcagaaaccagggaaagcccctaagctcctgatctatgct gcatcca  
gtttgcaaagtggggccccatcaaggttcagtggcagtggtatc tgggacagatttactctcaccatcagcagctctgca  
acctgaagattttg caacttactactgtcaacagagttacagttccccctccaccactttttggc cagggggaccaagct  
ggagatcaaacgaactgtggctgcacacatctgtctt catcttcccggccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcc  
tctgttg tgtgctgtgtaataacttctatcccagagagggccaaagtacagtggaag gtggataacgccctccaatcg  
ggtaactcccaggagagtgacagagca ggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagca  
aagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgccaagtcacccatcag  
ggcctgagctcgcccgt

から選択され、

抗体  $V_H$  ドメイン ; および抗体  $V_L$  ドメインまたは

- i . S N Y M S ( C D R 1 ) ;  
i i . V T Y S G G S T S Y A D S V K G ( C D R 2 ) ;  
i i i . G G R Y C S S I S C Y A R S G C D Y ( C D R 3 ) ;  
i v . R A S Q S I S N Y L N ( C D R 1 ) ;  
v . A A S S L Q S ( C D R 2 ) ; または  
v i . Q Q S Y S S P S T T ( C D R 3 )

から選択される C D R のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列もしくはその一部分 ; または

c . a . または b . のヌクレオチド配列への高い相同性を有し、かつ少なくとも約  $10^9$  L / m o l のアフィニティーで T S H R に結合する抗体をコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド。

【請求項 1 6】

請求項 1 5 に記載のヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む単離細胞。

【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の抗体を発現する単離細胞。

【請求項 1 9】

請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の抗体を分泌する単離細胞。

【請求項 2 0】

安定ヘテロ - ハイブリドーマ細胞株由来である、請求項 1 7 , 1 8、または 1 9 に記載の単離細胞。

10

20

30

40

50

- 【請求項 2 1】  
請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む、規定濃度の、T S H R 自己抗体を含む組成物。
- 【請求項 2 2】  
請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む、規定濃度の、T S H アンタゴニスト活性を有する T S H R 自己抗体を含む組成物。
- 【請求項 2 3】  
請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む、規定濃度の、甲状腺刺激性抗体のアンタゴニストである T S H R 自己抗体を含む組成物。
- 【請求項 2 4】 10  
請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む、規定濃度の、T S H アンタゴニスト活性を有し、かつ甲状腺刺激性抗体のアンタゴニストである T S H R 自己抗体を含む組成物。
- 【請求項 2 5】  
請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の抗体を薬理的に許容される担体と共に含み、甲状腺関連疾患の治療のために哺乳類被療体に投与するための医薬組成物。
- 【請求項 2 6】  
該甲状腺関連疾患が甲状腺活動亢進症、グレーブス眼病、新生児甲状腺機能亢進症、ヒト絨毛性ゴナドトロピン誘導性甲状腺機能亢進症、前頸骨粘液水腫、甲状腺癌、および甲状腺炎から選択される、請求項 2 5 に記載の医薬組成物。 20
- 【請求項 2 7】  
ヒトへの投与に適する、請求項 2 5 または 2 6 に記載の医薬組成物。
- 【請求項 2 8】  
該抗体が被療体の免疫システムにおいて有意な有害作用をもたない、請求項 2 5、2 6 または 2 7 に記載の医薬組成物。
- 【請求項 2 9】  
該組成物が 1 または 2 以上のさらなる甲状腺刺激ホルモンレセプターアンタゴニストを含む、請求項 2 5 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。
- 【請求項 3 0】  
該さらなる甲状腺刺激ホルモンレセプターアンタゴニストが 9 D 3 3 である、請求項 2 9 に記載の医薬組成物。 30
- 【請求項 3 1】  
注射用の形式である、甲状腺関連疾患の治療における使用のための請求項 2 5 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。
- 【請求項 3 2】  
局所用の形式である、前頸骨粘液水腫の治療における使用のための請求項 2 5 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。
- 【請求項 3 3】  
点眼薬の形式である、グレーブス眼病の治療における使用のための請求項 2 5 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。 40
- 【請求項 3 4】  
請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の抗体の産生方法であって、請求項 1 7 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の細胞を培養することにより該細胞に該抗体を発現させることを含む方法。
- 【請求項 3 5】  
該抗体が該細胞により分泌される、請求項 3 4 に記載の方法。
- 【請求項 3 6】  
哺乳類被療体または該被療体由来の細胞における甲状腺関連疾患の治療方法であって、該被療体、または該細胞を請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の抗体に接触させることを含む方法。 50

## 【請求項 37】

該甲状腺関連疾患が甲状腺活動亢進症、グレース眼病、新生児甲状腺機能亢進症、ヒト絨毛性ゴナドトロピン誘導性甲状腺機能亢進症、前頸骨粘液水腫、甲状腺癌、および甲状腺炎から選択される、請求項 36 に記載の方法。

## 【請求項 38】

哺乳類被療体の甲状腺中の TSHR を刺激する甲状腺刺激性自己抗体の阻害方法であって、該被療体を請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の抗体に接触させることを含む方法。

## 【請求項 39】

甲状腺刺激性自己抗体の TSHR への結合が阻止される、請求項 38 に記載の方法。

10

## 【請求項 40】

哺乳類被療体の甲状腺外 TSHR に結合する甲状腺刺激性自己抗体の阻害方法であって、該被療体を請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の抗体に接触させることを含む方法。

## 【請求項 41】

該甲状腺外 TSHR が該被療体の後眼窩組織および / または前頸骨組織に存在する、請求項 40 に記載の方法。

## 【請求項 42】

該抗体が、甲状腺外 TSHR に結合する TSHR 自己抗体を遮断する、請求項 40 または 41 に記載の方法。

## 【請求項 43】

甲状腺内にあるか、または転移した甲状腺癌を、被療体内か、または被療体由来の甲状腺細胞において治療する方法であって、細胞内の恒常的甲状腺刺激ホルモンレセプター活性を阻害するために、癌性細胞を請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の抗体に接触させることを含む方法。

20

## 【請求項 44】

甲状腺癌細胞の再増殖が阻止または遅延される、請求項 43 に記載の方法。

## 【請求項 45】

恒常的な甲状腺活性による甲状腺活動亢進症を、被療体内か、または被療体由来の甲状腺細胞において治療する方法であって、このような甲状腺活動亢進を阻害するために、被療体または細胞を請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の抗体に接触させることを含む方法。

30

## 【請求項 46】

該被療体がヒトである、請求項 36 ~ 45 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 47】

甲状腺関連疾患の治療における、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の抗体の使用。

## 【請求項 48】

甲状腺関連疾患の治療のための薬剤の調製における、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の抗体の使用。

## 【請求項 49】

医学的治療における使用のための、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の抗体。

40

## 【請求項 50】

甲状腺関連疾患の治療における使用のための、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の抗体。

## 【請求項 51】

該甲状腺関連疾患が甲状腺活動亢進症、グレース眼病、新生児甲状腺機能亢進症、ヒト絨毛性ゴナドトロピン誘導性甲状腺機能亢進症、前頸骨粘液水腫、甲状腺癌、および甲状腺炎から選択される、請求項 50 に記載の抗体。

## 【請求項 52】

TSHR 抗体を特徴付けるための方法であって、TSHR 関連アミノ酸配列を有するポリペプチドへの試験される TSHR 抗体の結合を決定することを含み、請求項 1 ~ 14 の

50

いずれか 1 項に記載の抗体の使用を含む方法工程に関わる方法。

【請求項 5 3】

T S H R 抗体の該ポリペプチドへの結合における請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の抗体の効果を決定することを含む、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

該 T S H R 関連ポリペプチドが完全長ヒト T S H R を含む、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

T S H および関連分子を特徴付けるための方法であって、T S H R 関連アミノ酸配列を有するポリペプチドへの、試験される T S H、または関連分子の結合を決定することを含み、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の抗体の使用を含む方法工程に関わる方法。

10

【請求項 5 6】

E L I S A 形式である、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

アンタゴニストとして作用する T S H R 自己抗体の結合に関わる T S H R アミノ酸を決定する方法であって、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の抗体が結合する第一の T S H R 関連アミノ酸配列を有するポリペプチドを提供すること、該 T S H R 関連アミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸を改変すること、およびこのような改変の効果を抗体の結合において決定することを含む方法。

【請求項 5 8】

請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の抗体を改変するための方法であって、該抗体の少なくとも 1 個のアミノ酸を改変すること、およびこのような改変の効果を T S H R 関連配列への結合において決定することを含む方法。

20

【請求項 5 9】

改変 T S H R 抗体は、T S H R に対する増強されたアフィニティーを有するものが選択される、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

T S H R に結合する甲状腺刺激性抗体を阻害する分子を同定するための方法であって、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 種の抗体を参照として提供することを含む方法。

【請求項 6 1】

T S H R に結合する甲状腺刺激性抗体を阻止する分子が選択される、請求項 6 0 に記載の方法。

30

【請求項 6 2】

T S H R に結合する甲状腺遮断性抗体を阻害する分子を同定するための方法であって、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 種の抗体を参照として提供することを含む方法。

【請求項 6 3】

T S H R に結合する甲状腺遮断性抗体を阻止する分子が選択される、請求項 6 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明はサイトロピン ( T S H ) レセプター ( T S H R ) と反応する抗体に関し、限定はされないが、特に、T S H R に結合して、T S H または T S H R 刺激性抗体による T S H R への刺激を阻害できる抗体に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

サイトロピン、すなわち甲状腺刺激ホルモン ( T S H ) は、T S H R を通して甲状腺機能を調節する下垂体ホルモンである ( Sz kud l i n s k i M W , F r e m o n t V , R o n i n C , W e i n t r a u b B D 2002 Thyroid-stimulating hormone and TSHR structure-function relationships.

50

Physiological Reviews 82: 473-502)。TSHRはGタンパク質共役型レセプターであり、ロイシンリッチドメイン(LRD)、切断ドメイン(CD)、および膜貫通ドメイン(TMD)の3つのドメインよりなる(Nunez Miguel R, Sanders J, Jeffreys J, Depraetere H, Evans M, Richards T, Blundell TL, Rees Smith B, Furmaniak J 2004 Analysis of the thyrotropin receptor- thyrotropin interaction by comparative modelling. Thyroid 14: 991-1011)。TSHのTSHRへの結合により、甲状腺ホルモンであるサイロキシン(T4)およびトリヨードサイロニン(T3)の形成および放出への刺激を導くレセプターシグナルを引き起こされる。循環しているT4およびT3の濃度に関わる負のフィードバックのメカニズムは下垂体からのTSHの放出(および視床下部から分泌されるサイトロピン放出ホルモン)を制御し、これが次に甲状腺刺激、および血清中の甲状腺ホルモンの濃度を制御する。

10

#### 【0003】

当該技術分野において、ある自己免疫性甲状腺疾患(AITD)の患者がTSHRと反応する自己抗体を有することはよく実証されている(Rees Smith B, McLachlan SM, Furmaniak J 1988 Autoantibodies to the thyrotropin receptor. Endocrine Reviews 9: 106-121)。大部分の場合、これらの自己抗体はTSHRに結合してTSHの作用を模倣することにより、甲状腺を刺激して高濃度のT4およびT3を産生する。これらの自己抗体は、刺激活性またはTSHアゴニスト活性を有する、甲状腺刺激性自己抗体またはTSHR自己抗体(TRAb)として記載されている。上述の甲状腺機能制御の生理的フィードバックメカニズムは、このような甲状腺刺激性自己抗体の存在下、および甲状腺機能亢進または甲状腺中毒症(血清中の過剰な甲状腺ホルモン)の徴候をもつ患者には有効でない。この疾患はグレース病として知られる。ある患者において、刺激活性のあるTRAbは後眼窩組織のTSHRとの相互作用に関与し、かつグレース病の目の徴候の一因となると考えられている。強力な甲状腺刺激剤として作用するヒトモノクローナル自己抗体(hMAbであるTSHR1)の詳細が、特許出願の国際公開第2004/050708A2号に記載されている。

20

#### 【0004】

一方AITDのある患者においては、自己抗体はTSHRに結合してTSHのレセプターへの結合を阻止するが、TSHRへの刺激能はもたない。このタイプの自己抗体は遮断活性またはTSHアンタゴニスト活性をもつTRAbとして知られており、血清中に遮断性のTRAbを有する患者は、不活発な甲状腺の症状(甲状腺機能低下症)を有し得る(Rees Smith B, McLachlan SM, Furmaniak J 1988 Autoantibodies to the thyrotropin receptor. Endocrine Reviews 9: 106-121)。特に、妊婦の血清中に遮断活性を有するTRAbが存在すると、これが胎盤を通過して胎児の甲状腺TSHRを遮断する場合があります。新生児甲状腺機能低下症および発育における重篤な結果を引き起こす。さらに、遮断活性を有するTRAbは発症した母親の母乳中に見出され、これが乳児の臨床的な甲状腺機能低下症のさらなる一因となり得る。現在までのところ、TSHアンタゴニスト活性を有する、TSHRに対するヒトモノクローナル自己抗体は入手不可能である。従って、このタイプの自己抗体がどのようにTSHRと相互作用するか、およびそのTSHRとの相互作用が、刺激性の自己抗体(例えばM22)およびTSHとTSHRとの相互作用とどのように比較されるかについての詳細な研究は限られている。

30

40

#### 【0005】

ヒト絨毛性ゴナドトロピンは、妊娠中に産生される、軽度の甲状腺刺激効果をもつホルモンである。

#### 【0006】

刺激活性または遮断活性によりTRAbの性質を特徴づけることは、TSHRへの自己免疫反応に関連する疾患の診断および管理を改善することを目標とする研究において決定的に重要である。特許出願の国際公開第2004/050708A2号に記載されている発明は、強力な刺激活性をもつヒトモノクローナル自己抗体の性質およびそのTSHRとの相互作用についての詳細を提供する。さらに、特許出願の国際公開第2006/016

50

121A号は、少なくとも1つの点突然変異を含む変異TSHR製剤を開示しており、これは患者血清刺激性TSHR自己抗体、患者血清遮断性TSHR自己抗体、およびスクリーニングされた患者体液サンプル中のTSHの識別スクリーニングおよび同定に用いられる。特許出願の国際公開第2004/050708A2号はまた、TSHR遮断活性をもつマウスモノクローナル抗体(9D33)について記載している。9D33は高アフィニティー( $2 \times 10^{10} \text{ L/mol}$ )でTSHRに結合する、TSH、hMABであるTSHR1(M22)、および刺激活性または遮断活性をもつ患者血清TRAbの効果的なアンタゴニストである(特許出願国際公開第2004/050708A2号およびSanders J, Allen F, Jeffreys J, Bolton J, Richards T, Depraetere H, Nakatake N, Evans M, Kiddie A, Premawardhana LD, Chirgadze DY, Miguel RN, Blundell TL, Furmaniak J, Res Smith B 2005 Characteristics of a monoclonal antibody to the thyrotropin receptor that acts as a powerful thyroid-stimulating autoantibody antagonist. *Thyroid* 15: 672-682)。このマウスモノクローナル抗体9D33は、遮断活性をもつ患者血清TRAbの特性の少なくとも幾つかを示すものの、これは実験動物をTSHRで免役することにより作られたマウス抗体であり、ヒトにおけるTSHRへの自己免疫反応過程で産生されるTSHR自己抗体を真に表し得ない。マウスモノクローナル抗体として、9D33はヒトにおける*in vivo*応用のためにヒト化される必要がある。このことは、ヒト化の過程に関わる費用および複雑化を考慮すれば不利であり得る。

10

**【0007】**

本発明は、患者血清中のTSHおよび刺激性TRAbの効果的なアンタゴニストである、TSHRに対するヒトモノクローナル自己抗体(5C9)の産生および特性に由来する。5C9は、甲状腺機能低下症および高濃度のTSHR自己抗体を有する患者の末梢リンパ球から単離された。このリンパ球をエプスタイン・バーウイルス(EBV)の感染により不死化させ、安定クローンを作製するために陽性クローンをマウス/ヒト細胞株と融合した。クローン培養の上清からIgGを精製し、5C9IgGのTSHRへの結合能、およびTSHR活性への影響を評価した。特に、TSHRへのTSHの結合の阻害、およびTSHのサイクリックAMP刺激活性の阻害に対する5C9の能力について調べた。さらに、刺激性または遮断性の患者血清TRAbのTSHRへの結合の阻害、およびそれらの生物活性の阻害に対する5C9の能力もまた評価した。加えて、TSHR抗体、TSH、および関連化合物のアッセイにおける5C9の使用も検討した。5C9の、重鎖(HC)および軽鎖(LC)の可変領域(V領域)の遺伝子の配列を決定し、相補性決定領域(CDR)を特定した。

20

30

**【発明の概要】****【0008】**

本発明の第一の態様によれば、TSHのアンタゴニストである、TSHRに対する単離されたヒト抗体が提供される。

**【0009】**

本発明の第二の態様によれば、TSHのアンタゴニストである、TSHRに対する単離されたヒト抗体が提供される。

**【0010】**

本発明の第一または第二の態様いずれかによる抗体は、「本発明による抗体」である。

40

**【0011】**

本発明による抗体は甲状腺刺激性抗体のアンタゴニストであってよい。

**【0012】**

本発明による抗体は、TSHアンタゴニストである患者血清TSHR自己抗体のTSHアンタゴニスト特性を有してよい。

**【0013】**

本発明による抗体は、TSHのアンタゴニストおよび甲状腺刺激性抗体のアンタゴニストであってよい。

**【0014】**

50

本発明による抗体は、甲状腺刺激性抗体のアンタゴニストである患者血清TSHR自己抗体のアンタゴニスト特性を有してよい。

【0015】

本発明による抗体は、TSH、M22、またはTSHRへの刺激活性をもつ抗体または遮断活性をもつ抗体による、TSHRまたはその一部への結合の阻害剤であってよい。TSHRの一部はLRDまたはその実質的な一部を含んでよい。好ましくは、このような結合を阻止する抗体である。

【0016】

本発明による抗体は、モノクローナルもしくはリコンビナント抗体であってよいか、またはTSHのアンタゴニストであるその断片を含むかもしくはその断片からなるとよい。本発明による抗体は、図2に示されるCDR1、CDR2、またはCDR3から選択される1または2以上のCDR、またはこれらCDRに実質的な相同性を有する1または2以上のアミノ酸配列を含むV<sub>H</sub>領域を含んでよい。さらに、またはあるいは、本発明による抗体は図3に示されるCDR1、CDR2、またはCDR3から選択される1または2以上のCDR、またはこれらCDRに実質的な相同性を有する1または2以上のアミノ酸配列を含むV<sub>L</sub>領域を含んでよい。

10

【0017】

本発明による抗体は、ヒト完全長TSHRに対し、約 $10^{10}$  L/molの結合アフィニティを有してよい。本発明による抗体は、好ましくはヒト完全長TSHRに対し、約 $10^9$  L/molの結合アフィニティを有する。

20

【0018】

本発明は当業者が、刺激性および遮断性TSHR自己抗体の発生および産生を推進する免疫メカニズムを理解するのに役立つ。さらに、本発明は当業者が、TSHR自己抗体の甲状腺刺激活性を有するものと遮断活性を有するものとの間の分子的相違を理解するのに役立つ。さらに、本発明の医学的治療法および薬理的組成物は甲状腺関連疾患に対する新しい治療法を提供する。

【0019】

本発明による好ましい抗体は5C9である。5C9は、甲状腺刺激ホルモンレセプターの恒常的活性、すなわち甲状腺刺激ホルモンまたはM22の非存在下での試験システムにおけるサイクリックAMPの産生を阻害することが予想外に見出された。これは特に、甲状腺内に残存、または転移した甲状腺癌細胞の治療、とりわけこれらの細胞が甲状腺刺激ホルモンレセプターの恒常的活性の結果としてさらに迅速に増殖し得る再増殖を防止または遅延させることに有利である。

30

【0020】

ここで用いられる「抗体(単数形: antibody)」および類似語、例えば「抗体(複数形: antibodies)」の語は、状況に従い、モノクローナルおよびポリクローナル抗体、単鎖抗体、多重特異性抗体のような免疫グロブリンを基礎とした結合部分を包含し、かつ当業者によってこのような免疫グロブリンを基礎とした結合部分へ置換されてもよい結合部分、例えばドメイン抗体、二重特異性抗体、IgG C<sub>H</sub>2、F(ab')<sub>2</sub>、Fab、scFv、V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub>、dsFv、ミニボディ(Minibody)、トリアボディ(Triabody)、テトラボディ(Tetrabody)、(scFv)<sub>2</sub>、scFv-Fc、F(ab')<sub>3</sub>もまた包含する(Holliger P, Prospero T, Winter G 1993 "Diabodies: small bivalent and bispecific antibody fragments" Proc Natl Acad Sci USA 90: 6444-6448.)、(Carter PJ 2006 "Potent antibody therapeutics by design" Nat Rev Immunol 6: 343-357)。

40

【0021】

「TSHR」との語は、図4に示されるアミノ酸配列を有する完全長のヒト甲状腺刺激ホルモンレセプター、またはその変異体または断片で、甲状腺刺激ホルモンレセプターとの高い相同性を有するものに適用される。好ましくはこのような変異体および断片は、図4に示されるアミノ酸配列と70から99.9%の相同性を有する。

【0022】

50

本発明の他の態様によれば、

a) 本発明の第一の態様による抗体をコードするヌクレオチド配列；

b) 図2または3に示される抗体V<sub>H</sub>ドメイン、抗体V<sub>L</sub>ドメイン、またはCDRのアミノ酸配列をコードする、図2または3に示されるヌクレオチド配列；または

c) a) または b) のヌクレオチド配列と高い相同性を有し、かつ少なくとも約10<sup>9</sup> L/molのアフィニティーでTSHRに結合する抗体をコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチドが提供される。

【0023】

本発明の他の態様によれば、上記本発明の態様によるヌクレオチドを含むベクターが提供される。

【0024】

該ベクターはプラスミド、ウィルスまたはその断片であってよい。当業者には多くの異なるタイプのベクターが知られている。

【0025】

本発明の他の態様によれば、本発明による抗体；ヌクレオチドまたはベクターを含む、単離細胞が提供される。該単離細胞は本発明による抗体を発現してよい。好ましくは、該単離細胞は本発明による抗体を分泌する。好ましくは、本発明による単離細胞は安定ヘテロ-ハイブリドーマ細胞株由来である。

【0026】

本発明のさらなる態様によれば、TSHR自己抗体の規定濃度を含み、かつ本発明による抗体を含む組成物が提供される。このような組成物は、TSHアンタゴニスト活性をもつTSHR自己抗体の規定濃度を含んでよく、かつ本発明による抗体を含む。

【0027】

あるいは、本発明のこの態様による組成物は、甲状腺刺激性抗体のアンタゴニストであるTSHR自己抗体の規定濃度を含んでよく、かつ本発明による抗体を含む。組成物は、甲状腺刺激性抗体のアンタゴニストである、TSHアンタゴニスト活性をもつTSHR自己抗体の規定濃度を含んでよく、かつ本発明による抗体を含む。

【0028】

本発明の他の態様によれば、甲状腺関連疾患の治療のために哺乳類被療体に投与するための、本発明による抗体を薬理的に許容される担体と共に含む医薬組成物が提供される。該甲状腺関連疾患は、甲状腺活動亢進症、グレーブス眼病、新生児甲状腺機能亢進症、ヒト絨毛性ゴナドトロピン誘導性甲状腺機能亢進症、前頸骨粘液水腫、甲状腺癌、および甲状腺炎から選択されてよい。

【0029】

本発明による医薬組成物は、ヒトへの投与に適してよい。好ましくは本発明による医薬組成物は、被療体の免疫システムにおいて有意な有害作用をもたない。

【0030】

本発明による医薬組成物は、さらなる甲状腺刺激ホルモンレセプターアンタゴニストを含んでよい。適切な、さらなる甲状腺刺激ホルモンレセプターアンタゴニストは、国際公開第2004/050708号に開示されている9D33である。

【0031】

本発明による医薬組成物のために様々な形式が企図される。甲状腺関連疾患の治療における使用のための本発明による医薬組成物は、注射用の形式であってよい。前頸骨粘液水腫の治療における使用のための本発明による医薬組成物は、好ましくは局所用の形式である。グレーブス眼病の治療における使用のための本発明による医薬組成物は、好ましくは点眼薬の形式である。

【0032】

本発明の医薬組成物は、本発明の発明に従ったいずれかの抗体を、いずれかの薬理的に許容される担体、アジュバント、またはビヒクルと共に含む。本発明の医薬組成物に使用されてよい薬理的に許容される担体、アジュバント、およびビヒクルは、イオン交換

10

20

30

40

50

体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、ヒト血清アルブミンのような血清タンパク質、リン酸塩のような緩衝物質、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物性脂肪酸の部分的グリセリド混合物、水、硫酸プロタミンのような塩または電解質、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイドシリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロースを基礎とした物質、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸塩、ワックス、ポリエチレン-ポリオキシプロピレン-ブロック重合体、ポリエチレングリコール、および羊毛脂を含むがこれらに限定されない。

#### 【0033】

本発明の医薬組成物は、経口で、吸入噴霧により非経口で、点眼薬により局所的に、経直腸、経鼻、口腔経路で、経膈で、または埋め込み型リザーバー経路で投与されてよい。好ましくは経口投与、または注射による投与である。ここで用いられる「非経口」との語は、皮下、皮内、静脈内、筋肉内、関節内、滑膜内、胸骨内、包膜内、病巣内、および頭蓋内への注射または注入方法を含む。

10

#### 【0034】

該医薬組成物は、例えば水性または油性の無菌注射用懸濁液のような、無菌注射用製剤の形であってよい。この懸濁液は当該技術分野で公知の方法により、適切な分散剤または湿潤剤(例えば、Tween 80)および懸濁剤を用いて処方されてよい。該無菌注射用製剤はまた、無毒性の非経口投与可能な希釈剤または溶媒、例えば1,3-ブタンジオール溶液としての無菌注射用溶液または懸濁液であってよい。許容されるビヒクルおよび溶媒のうちで使用されてよいものは、マンニトール、水、リンゲル液および生理食塩水である。さらに、従来から、無菌の固定油が溶媒または懸濁化剤として使用されている。この目的のため、合成モノ-またはジグリセリドを含む、いずれの無菌性固定油も使用されてよい。オレイン酸のような脂肪酸およびそのグリセリド誘導体は、オリーブオイルまたはヒマシ油のような天然の薬理的に許容される油、特にこれらのポリオキシエチル化された形として、注射液の製剤に有用である。これらの油溶液または懸濁液はまた、Ph. Helvまたは類似アルコールのような長鎖アルコール希釈液または分散剤を含んでよい。

20

#### 【0035】

本発明の医薬組成物は、カプセル、錠剤、および水性懸濁液および溶液を含むがこれらに限定されない、いずれかの経口に使用可能な剤形により経口投与されてよい。経口使用のための錠剤の場合、一般に用いられる担体はラクトースおよびコーンスターチを含む。ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤もまた、典型的に添加される。カプセルの形による経口投与のための有用な希釈剤は、ラクトースおよび乾燥コーンスターチを含む。水性懸濁液を経口投与する場合、有効成分は乳化剤および懸濁剤と組み合わせられる。必要に応じ、特定の甘味料および/または香料および/または着色料が添加されてよい。

30

#### 【0036】

本発明の医薬組成物はまた、直腸内投与のための坐薬の形で投与されてよい。これらの組成物は、本発明の化合物を適切な非刺激性の賦形剤と混合することにより調製できる。この賦形剤は室温では固体であるが直腸温では液体であることにより、有効成分を放出するために直腸内で溶解し得る。このような物質はココアバター、蜜ろうおよびポリエチレングリコールを含むが、これらに限定されない。

40

#### 【0037】

本発明の医薬組成物の局所投与は、望ましい治療が局所投与により容易に利用できる部位または臓器に関わる場合に特に有用である。皮膚への局所投与のために該医薬組成物は、担体中に懸濁または溶解した有効成分を含む適切な軟膏剤により処方されなければならない。本発明の化合物の局所投与のための担体は、ミネラルオイル、鉱油、ホワイトペトロリアム(white petroleum)、プロピレングリコール、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン化合物、乳化ワックスおよび水を含むがこれらに限定されない。あるいは該医薬組成物は、担体中に懸濁または溶解した有効成分を含む適切なローションまたはクリームにより処方できる。適切な担体は、ミネラルオイル、モノステアリン酸ソルビタン、ポ

50

リソルベート60、セチルエステルワックス、セテアリルアルコール、2-オクチルドデカノール、ベンジルアルコールおよび水を含むがこれらに限定されない。本発明の医薬組成物はまた、直腸坐薬製剤または適切な浣腸製剤により下部腸管に局所投与されてよい。局所的な経皮パッチもまた、本発明に含まれる。

【0038】

本発明の医薬組成物は、経鼻エアロゾルまたは吸入により投与されてよい。このような組成物は医薬品処方技術分野における公知の方法により調製され、ベンジルアルコールまたはその他の適切な保存料、生物学的利用能を増強させるための吸収促進剤、フッ化炭素、および/またはその他の当該技術分野で公知の可溶化剤または分散剤を用いた、生理食塩水溶液として調製されてよい。

10

【0039】

本発明のさらなる態様によれば、本発明による1または2以上の単離細胞を培養することにより該細胞が抗体を発現することを含む、本発明による抗体の産生方法が提供される。好ましくは、該抗体は該細胞により分泌される。

【0040】

本発明のさらなる態様によれば、哺乳類被療体、または該被療体由来の細胞における甲状腺関連疾患の治療方法が提供され、該方法は該被療体、または該細胞を本発明による抗体に接触させることを含む。

【0041】

本発明の他の態様によれば、哺乳類被療体の甲状腺中のTSHRを刺激する甲状腺刺激性自己抗体の阻害方法が提供され、該方法は該被療体を本発明による抗体に接触させることを含む。好ましくは、甲状腺刺激性自己抗体のTSHRへの結合が阻止される。

20

【0042】

本発明の他の態様によれば、哺乳類被療体の甲状腺外TSHRに結合する甲状腺刺激性自己抗体の阻害方法が提供され、該方法は該被療体を本発明による抗体に接触させることを含む。該甲状腺外TSHRは、該被療体の後眼窩組織および/または前頸骨組織に存在してよい。本発明による抗体は、該方法において使用される際、甲状腺外TSHRに結合するTSHR自己抗体を好ましく遮断する。

【0043】

本発明の他の態様によれば、甲状腺内にあるか、または転移した甲状腺癌を、被療体内か、または被療体由来の甲状腺細胞において治療する方法が提供され、該方法は細胞内の恒常的甲状腺刺激ホルモンレセプター活性を阻害するために、癌性細胞を本発明による抗体に接触させることを含む。好ましくは、甲状腺癌細胞の再増殖は阻止または遅延される。

30

【0044】

恒常的な甲状腺活性による甲状腺活動亢進症を、被療体内か、または被療体由来の甲状腺細胞において治療する方法もまた提供され、該方法は恒常的な甲状腺活性による甲状腺活動亢進を阻害するために、被療体または甲状腺細胞を本発明による抗体に接触させることを含む。

【0045】

上記本発明の様々な方法において治療される被療体は、好ましくはヒトである。

40

【0046】

本発明の他の態様によれば、甲状腺関連疾患の治療における本発明による抗体の使用が提供される。あるいは、甲状腺関連疾患の治療のための薬剤の調製における本発明による抗体の使用が提供される。

【0047】

医学的治療における使用のための、本発明による抗体もまた提供される。特に、甲状腺関連疾患の治療における使用のための、本発明による抗体の使用が提供される。該甲状腺関連疾患は、甲状腺活動亢進症、グレーブス眼病、新生児甲状腺機能亢進症、ヒト絨毛性ゴナドトロピン誘導性甲状腺機能亢進症、前頸骨粘液水腫、甲状腺癌、および甲状腺炎か

50

ら選択されてよい。

【0048】

本発明の他の態様によれば、TSHR関連アミノ酸配列を有するポリペプチドへの、試験されるTSHR抗体の結合を決定することを含む、TSHR抗体を特徴付けるための方法が提供され、ここで該方法は本発明による抗体の使用を含む方法工程に関わる。好ましくは、該方法はTSHR抗体の該ポリペプチドへの結合において、本発明による抗体の効果を決定することを含む。TSHR関連アミノ酸配列を有する該ポリペプチドは、好ましくは完全長のヒトTSHRを含む。

【0049】

本発明の他の態様によれば、TSHR関連アミノ酸配列を有するポリペプチドへの、試験されるTSH、または関連分子の結合を決定することを含む、TSHおよび関連分子を特徴付けるための方法が提供され、ここで該方法は本発明による抗体の使用を含む方法工程に関わる。

10

【0050】

上記のTSHR抗体、またはTSHを特徴付けるための方法および関連方法はELISA形式によるものであってよい。

【0051】

本発明の他の態様によれば、アンタゴニストとして作用するTSHR自己抗体の結合に関わるTSHRアミノ酸を決定する方法が提供され、該方法は、本発明による抗体が結合する第一のTSHR関連アミノ酸配列を有するポリペプチドを提供すること、該TSHR関連アミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸を改変すること、およびこのような改変の効果を抗体の結合において決定することを含む。

20

【0052】

本発明による抗体を改変するための方法は、該抗体の少なくとも1個のアミノ酸を改変すること、およびこのような改変の効果をTSHR関連配列への結合において決定することを含む。改変TSHR抗体は、TSHRに対する増強されたアフィニティーを有するものが好ましく選択される。

【0053】

本発明の他の態様によれば、TSHRに結合する甲状腺刺激性抗体を阻害する分子を同定するための方法が提供され、該方法は、本発明による少なくとも1種の抗体を参照として提供することを含む。試験される分子は、TSHRに結合する甲状腺刺激性抗体を阻止するものが好ましく選択される。

30

【0054】

TSHRに結合する甲状腺遮断性抗体を阻害する分子を同定するための方法もまた提供され、該方法は、本発明による少なくとも1種の抗体を参照として提供することを含む。好ましくは、TSHRに結合する甲状腺遮断性抗体を阻止する分子が選択される。

【図面の簡単な説明】

【0055】

これより本発明による抗体および方法を、例としてのみの目的で、添付する図1から図4への参照により記述する。

40

【0056】

【図1-1】TSHRをコートしたチューブへの $^{125}\text{I}$ -5C9IgG、 $^{125}\text{I}$ -TSH、または $^{125}\text{I}$ -M22の結合における、グレーブス病の患者(n=40)および健常血液ドナー(n=10)からの血清の効果の比較を図示する一連の3グラフ。 a.  $^{125}\text{I}$ -5C9IgG対 $^{125}\text{I}$ -TSH結合

【図1-2】TSHRをコートしたチューブへの $^{125}\text{I}$ -5C9IgG、 $^{125}\text{I}$ -TSH、または $^{125}\text{I}$ -M22の結合における、グレーブス病の患者(n=40)および健常血液ドナー(n=10)からの血清の効果の比較を図示する一連の3グラフ。 b.  $^{125}\text{I}$ -5C9IgG対 $^{125}\text{I}$ -M22IgG結合

【図1-3】TSHRをコートしたチューブへの $^{125}\text{I}$ -5C9IgG、 $^{125}\text{I}$ -TSH、

50

または<sup>125</sup>I - M 2 2 の結合における、グレーブス病の患者 ( n = 4 0 ) および健常血液ドナー ( n = 1 0 ) からの血清の効果の比較を図示する一連の3グラフ。 c . <sup>125</sup>I - T S H 対 <sup>125</sup>I - M 2 2 I g G 結合

【図2 - 1】5 C 9 重鎖 ( H C ) の可変領域配列の配列を示す。 a . 5 C 9 H C のオリゴヌクレオチド配列を、注釈なし、および注釈付きの形式で示す。注釈付きの形式では、P C R プライマーに使用した配列を下線で示し、個々の相補性決定領域 ( C D R ) を四角で囲み、定常領域を太字で示す。

【図2 - 2】5 C 9 重鎖 ( H C ) の可変領域配列の配列を示す。 b . オリゴヌクレオチド配列由来の5 C 9 H C のアミノ酸配列を、注釈なし、および注釈付きの形式で示す。

【図3 - 1】5 C 9 軽鎖 ( L C ) の可変領域配列の配列を示す。 a . 5 C 9 L C のオリゴヌクレオチド配列を、注釈なし、および注釈付き ( 図2 の通り ) の形式で示す。 10

【図3 - 2】5 C 9 軽鎖 ( L C ) の可変領域配列の配列を示す。 b . オリゴヌクレオチド配列由来の5 C 9 L C のアミノ酸配列を、注釈なし、および注釈付きの形式で示す。

【図4】ヒト T S H R ( 受入番号 P 1 6 4 7 3、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=62298994> ) のコンセンサスアミノ酸配列を図示する。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 5 7 】

方法

リンパ球分離およびヒトモノクローナル T S H R 自己抗体 5 C 9 のクローニング

モノクローナル自己抗体 5 C 9 は通常、国際公開第 2 0 0 4 / 0 5 0 7 0 8 A 2 号に記載された方法を用いて分離した。リンパ球は最初に、産後甲状腺機能低下症で高濃度の T R A b を有する患者から集めた血液サンプルより分離した ( 地域の倫理委員会の承認を得た ) 。該リンパ球はエプスタイン・バーウイルス ( E B V ) ( European Collection of Cell Cultures - ECACC; Porton Down, SP4 OJG5, UK ) に感染させ、国際公開第 2 0 0 4 / 0 5 0 7 0 8 A 2 号に記載されているように、マウスマクロファージフィーダー層上で培養した。T S H R 自己抗体を分泌する不死化リンパ球はマウス/ヒトのハイブリッド細胞株である K 6 H 6 / B 5 ( E C A C C ) と融合させ、単一コロニーを得るため、限界希釈による4回のクローニングを行った。クローニングの様々な段階における、細胞培養上清中の T S H R 自己抗体の存在は、<sup>125</sup>I で標識した T S H の T S H R への結合の阻害により検出した ( 国際公開第 2 0 0 4 / 0 5 0 7 0 8 A 2 号 ) 。 T S H R 自己抗体を産生する単一クローンを増殖させ、自己抗体の精製のために培養上清を回収した。 20 30

【 0 0 5 8 】

5 C 9 I g G 製剤の精製および標識化

5 C 9 I g G は、Sanders J, Jeffreys J, Depraetere H, Evans M, Richards T, Kiddie A, Brereton K, Premawardhana LD, Chirgadze DY, Nunez Miguel R, Blundell TL, Furmaniak J, Rees Smith B 2004 Characteristics of a human monoclonal autoantibody to the thyrotropin receptor: sequence structure and function. Thyroid 2004 14: 560-570 に記載されている、MabSelect ( 商標 ) ( GE Healthcare、英国 ) によるプロテイン A アフィニティークロマトグラフィーを用いて培養上清より精製し、純度は S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 ( P A G E ) により評価した。 40

【 0 0 5 9 】

5 C 9 の重鎖アイソタイプは、放射拡散アッセイ ( The Binding Site ; バーミンガム、B 2 9 6 A T、英国 ) を用いて決定し、軽鎖のアイソタイプは、抗ヒトカップ鎖、および抗ヒトラムダ鎖特異的マウスモノクローナル抗体 ( Sigma-Aldrich Company Ltd ; プール、英国 ) を用いたウェスタンブロットティングにより決定した。

【 0 0 6 0 】

2 0 m m o l / L の酢酸ナトリウム ( p H 4 . 5 ) 中における 1 0 m g / m L の 5 C 9 I g G を、製造者 ( Perbio Science UK Ltd、クラムリントン、英国 ) の指示に従い調製した固定化ペプシンと共に、室温で4時間半、振とうしながらインキュベートした。その後、固定化ペプシンを遠心 ( 1 0 0 0 x g、室温で5分間 ) により除去し、上清を 3 0 0 50

mmol/LのNaCl, 10mmol/LのTris-HCl、pH7.5に対し、4  
 においてオーバーナイトで透析した。5C9F(ab')<sub>2</sub>および少量のインタクトな  
 IgGを含む透析された混合物は、Sephacryl S-300 High Resolution Matrix (GE Health  
 care、チャルフォント・セント・ジャイルズ、英国)を用いて分離した。この方法で精  
 製された5C9F(ab')<sub>2</sub>製剤は、SDS-PAGEおよびHPLCゲルろ過分析で  
 の判断によればインタクトなIgGを含まなかった。

【0061】

さらにF(ab')<sub>2</sub>は、最終濃度100mmol/LのL-システインを用い、37  
 、1時間で還元した。この反応は、最終濃度50mmol/Lのヨードアセトアミドに  
 より、室温、30分間で停止させた。F(ab')<sub>2</sub>は、上記のようにSephacryl S-300カ  
 ラムを用いて精製した。この方法で精製されたF(ab')<sub>2</sub>製剤は、SDS-PAGEお  
 よびHPLCゲルろ過分析での判断によればF(ab')<sub>2</sub>を含まなかった。

【0062】

さらに、5C9IgGをマーキュリーパイン(Sigma、英国)により、1:100の  
 酵素/タンパク質の比において処理し、50mmol/LのNaCl, Tris-HCl  
 、pH9.0中へ透析し、Fab製剤からインタクトなIgGまたはFcを分離するため  
 、陰イオン交換セファロース(GE Healthcareから入手したQ-Sepharose Fast flow)カ  
 ラムを通した。SDS-PAGEおよびゲルろ過(Sephacryl S-300カラム;上記)による  
 分析は、該Fab製剤中にインタクトなIgGは検出されないことを示した。

【0063】

5C9IgGは、Sanders J, Oda Y, Roberts S, Kiddie A, Richards T, Bolton J, M  
 cGrath V, Walters S, Jaskolski D, Furmaniak J, Rees Smith B 1999. The interactio  
 n of TSH receptor autoantibodies with <sup>125</sup>I-labelled TSH receptor. Journal of Cli  
 nical Endocrinology and Metabolism. 1999 84: 3797-3802に記載されているように<sup>125</sup>  
 Iにて標識するか、またはピオチンヒドラジド(Perbio Science、クラムリントン、英国  
 )にて標識した。

【0064】

<sup>125</sup>I-TSHまたは<sup>125</sup>I-M22または<sup>125</sup>I-5C9のTSHRへの結合の阻害

国際公開第2004/050708A2号の記述に従い、TSHRをコートしたチュー  
 ブを用いて結合阻害アッセイを行った。このアッセイにおいて、100μLの試験サンプ  
 ル(MAb製剤、患者血清または非標識TSH)および50μLの開始緩衝液(RSR Ltd  
 )を、TSHRをコートしたチューブ内で穏やかに振とうしながら、室温で2時間インキュ  
 ベートした。吸引後チューブを洗浄し、100μLの<sup>125</sup>I-標識タンパク質(5x1  
 0<sup>4</sup>cpm)を加え、振とうしながら室温で1時間インキュベートした。その後チューブ  
 を吸引、洗浄し、ガンマカウンター中で計数した。

【0065】

標識タンパク質の結合の阻害は以下のように算出した。

【数1】

$$100 \times \left[ 1 - \frac{\text{試験物質存在下での結合 c p m}}{\text{コントロール物質存在下での結合 c p m}} \right]$$

コントロール物質は種々の実験結果に示すように、健常血液ドナー血清のプール、または  
 個々の健常血液ドナー血清、またはその他の物質であった。

【0066】

5C9IgGのTSHRへの結合のスキヤッチャード解析

50μLのアッセイ緩衝液(50mmol/LのNaCl、10mmol/LのTris、  
 pH7.8、および1% Triton X-100)中の非標識5C9IgGおよび5  
 0μLの<sup>125</sup>I-標識5C9IgG(アッセイ緩衝液中で30,000cpm)を、TS  
 HRをコートしたチューブ内で振とうしながら、室温で2時間インキュベート(これらの

条件下で最大の結合が生じた)、吸引し、1 mLのアッセイ緩衝液で2回洗浄し、ガンマカウンター中で計数した。結合定数を求めるため、結合したIgGの濃度に対して結合濃度/遊離濃度をプロットした(Scatchard G 1949 The attraction of proteins for small molecules and ions. Annals of the New York Academy of Sciences 51: 660-672)。

#### 【0067】

##### サイクリックAMP産生刺激の解析

5C9 IgGおよびその他の製剤の、ヒトTSHRを導入したチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞におけるサイクリックAMP産生の刺激能を、国際公開第2004/050708A2号の記述に従い試験した。細胞あたり約 $5 \times 10^4$ または約 $5 \times 10^5$ のTSHRを発現するCHO細胞を、96ウェルプレート内にウェルあたり $3 \times 10^4$ 細胞まき、ウシ胎仔血清を含まないDMEM(Invitrogen Ltd、ペーズリー、英国)に適應させた後、試験サンプル(TSH、IgGまたは患者血清)を加え(1 g/Lのグルコース、20 mmol/LのHEPES、222 mmol/Lのシュクロース、15 g/Lのウシ血清アルブミン、および0.5 mmol/Lの3-イソブチル-1-メチルキサンチン pH 7.4を含み、NaClを含まないハンス緩衝塩溶液であるサイクリックAMPアッセイ緩衝液中に希釈して、100  $\mu$ L)、37°Cで1時間インキュベートした。試験溶液の除去後、細胞を溶解し、ライセート中のサイクリックAMP濃度を以下の2つの方法のうちの一つによりアッセイした: 1) GE Healthcare (チャルフォント・セント・ジヤイルズ、英国)から入手したBiotrak enzyme immunoassay systemの使用、または2) Assay Designs; Cambridge Bioscience (英国)から入手したDirect Cyclic AMP Correlate-EIA kitsの使用。結果は、細胞ライセート(200  $\mu$ L)中のサイクリックAMPをpmol/mLにより、または細胞ウェルあたりのfmolにより表した。

#### 【0068】

##### アンタゴニスト(遮断)活性の測定

TSHRを発現するCHO細胞において、5C9 IgGおよびその他の製剤が、ブタ(p)TSH、天然ヒト(h)TSH、およびリコンビナントヒト(rh)TSH、Mab M22、および患者血清TRAbの刺激活性を阻害する能力を評価した。これは、TSH、M22、またはTRAbの刺激効果を5C9 IgG(またはその他の試験される製剤)の非存在下および存在下において比較することにより行なわれた。アッセイは、サイクリックAMPアッセイ緩衝液中に希釈した50  $\mu$ Lの5C9(またはその他の試験される製剤)を細胞ウェルに加え、続いて50  $\mu$ LのTSHまたはM22または患者血清(サイクリックAMPアッセイ緩衝液中に適宜希釈)を加えること以外は上記のように行なわれ、上記の刺激アッセイと同様にインキュベートおよび試験された。

#### 【0069】

5C9に加え、その他のMabおよび遮断性TRAbをもつ患者由来の血清がこのアッセイにおいて試験された。

#### 【0070】

##### 可変領域遺伝子解析

5C9重鎖および軽鎖の可変領域遺伝子は国際公開第2004/050708A2号の記述に従い、RT-PCR(逆転写酵素PCR)反応のためのmRNAを作製するため、5C9 IgGを分泌する $1 \times 10^7$ のヘテロハイブリドーマ細胞から調整した全RNAを用いて決定した。IgG1HCおよびカッパLCに特異的なセンスおよびアンチセンス鎖オリゴヌクレオチドプライマーは、Medical Research CouncilのV-base(<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>)を用いてデザインし、Invitrogen(ペーズリー、PA49RF、英国)により合成した。RT反応は50-15分間で行い、それに続いて94-15秒間、50-30秒間、および72-30秒間で40サイクルのPCRを行なった。DNA産物はpUC18中にクローニングし、Sanger-Coulson法によりシークエンスした(Sanger F, Nicklen S, Coulson AR 1977 DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 74: 5463-5467)。V領域の配列は、Ig blast(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)を用いて、入手できるヒ

10

20

30

40

50

ト I g 遺伝子の配列と比較した。

【 0 0 7 1 】

ヒト T S H R 配列のアミノ酸変異の、5 C 9 活性における効果の解析

T S H R 配列中に特異的変異を導入するために使用された方法は、特許出願の国際公開第 2 0 0 6 / 0 1 6 1 2 1 A 号に記載されている。さらに、F l p - I n システムを用いた C H O 細胞への変異 T S H R コンストラクトのトランスフェクションもまた、国際公開第 2 0 0 6 / 0 1 6 1 2 1 A 号に記載されている。

【 0 0 7 2 】

野生型または変異 T S H R のいずれかを発現する F l p - I n - C H O 細胞を 9 6 ウェルプレートにまき、5 C 9 製剤が T S H、M 2 2、または患者血清 T R A b の刺激活性を遮断する能力を試験するため上記のように使用した。

【 0 0 7 3 】

T S H R 抗体、T S H および関連分子のための 5 C 9 に基づいたアッセイ

2 . 5 5 m L の 5 C 9 I g G を 1 0 0 m m o l / L のリン酸ナトリウム緩衝液 p H 8 . 5 中に透析し、I g G のビオチンに対する分子比 1 / 1 0 により、EZ-Link NHS-LC-Biotin (Perbio) と反応させた。試験血清サンプル ( 7 5 μ L ) を、T S H R をコートした E L I S A プレートウェル ( R S R L t d ) 中で振とう ( 1 分間に 5 0 0 振とう ) しながら、室温で 2 時間インキュベートした。試験サンプルを除去および洗浄した後、ビオチン標識 5 C 9 I g G ( 1 0 0 μ L 中に 2 n g ) を加え、インキュベーションを室温で 2 5 分間、振とうなしで継続した。ウェルを空にし、洗浄して 1 0 0 μ L のストレプトアビジン - ペルオキシダーゼ ( 1 0 0 μ L 中に 1 0 n g ; R S R L t d ) を加え、室温で 2 0 分間、振とうなしでインキュベートした。その後ウェルを 3 回洗浄し、ペルオキシダーゼの基質であるテトラメチルベンジジン ( T M B ; 1 0 0 μ L ; R S R L t d ) を加え、暗所において室温で 3 0 分間、振とうなしでインキュベートした。その後反応を停止させるため 5 0 μ L の 0 . 5 m o l / L の H 2 S O 4 を加え、E L I S A プレートのリーダーを用いて、各プレートウェルの吸光度を 4 5 0 n m にて読み取った。5 C 9 I g G - ビオチン結合の阻害は、以下のように算出した。

【 数 2 】

$$100 \times \left[ 1 - \frac{450 \text{ nm における試験サンプルの吸光度}}{450 \text{ nm におけるネガティブコントロール血清の吸光度}} \right]$$

【 0 0 7 4 】

結果

5 C 9 分泌細胞株の単離およびクローニング

2 0 m L の患者血液から得られたリンパ球 ( 2 7 × 1 0 <sup>6</sup> ) に E B V を感染させ、4 8 ウェルプレート内のマウスマクロファージフィーダー層上に、ウェルあたり 1 × 1 0 <sup>6</sup> の細胞をまいた。E B V 感染後 1 3 日目に、プレートウェルの上清の、<sup>125</sup>I - T S H 結合の阻害についてモニターした。陽性ウェルからの細胞を増殖させ、K 6 H 6 / B 5 ハイブリドーマ細胞株と融合し、9 6 ウェルプレートにまいた。<sup>125</sup>I - T S H 結合の阻害活性をもつ抗体を安定に産生する 1 クローンを得て、4 回再クローニングした。ヘテロ - ハイブリドーマ培養上清から精製され、5 C 9 と名付けられたモノクローナル抗体は、カッパ軽鎖を有する I g G 1 のサブクラスである。

【 0 0 7 5 】

5 C 9 I g G の T S H R への結合および遮断活性

様々な濃度における 5 C 9 I g G の、標識 T S H または標識 M 2 2 または標識 5 C 9 それ自体の T S H R への結合に対する阻害能を表 1 に示す。表 1 に示すように、最少量 0 . 0 0 5 μ g / m L の 5 C 9 I g G によって <sup>125</sup>I - T S H 結合の 1 2 % の阻害が認められ、この阻害は 1 0 0 μ g / m L の 5 C 9 による 8 4 % の阻害に至るまで量依存性に増大した。これはドナー血清 I g G による <sup>125</sup>I - T S H 結合の阻害、すなわち 0 . 0 5 m g /

10

20

30

40

50

mLにおける13%の阻害から、1mg/mLにおける94%の阻害までの量依存的な増大と比較することができる。ドナー血漿の場合、健常人血液ドナープール血清の1:160希釈においては $^{125}\text{I}$ -TSH結合の16%の阻害が認められ、1:10希釈においては95%の阻害が認められた。

【0076】

5C9IgGはまた、TSHRをコートしたチューブへの $^{125}\text{I}$ -M22IgGの結合に対する効果を有していた(表1)。0.01 $\mu\text{g/mL}$ の5C9IgGによって、 $^{125}\text{I}$ -M22IgG結合の9%の阻害が認められ、濃度を増大させることにより、100 $\mu\text{g/mL}$ における85%に至るまでの阻害の量依存的な増大がもたらされた。ドナー血清IgGは、9%の阻害を起こす0.01mg/mLにおいて有効であり、この効果は1mg/mLにおける89%の阻害まで量依存的に増大した。ドナー血清血漿は、1:320の希釈において $^{125}\text{I}$ -M22IgG結合の13%の阻害を示し、1:10の希釈において91%の阻害を示した。

10

【0077】

非標識5C9IgGは、TSHRをコートしたチューブへの $^{125}\text{I}$ -5C9の結合を量依存的に阻害(0.005 $\mu\text{g/mL}$ における11%の阻害から、100 $\mu\text{g/mL}$ における88%の阻害まで)(表1-2)することができた。 $^{125}\text{I}$ -5C9の結合はまた、ドナー血清IgGによっても阻害(0.05mg/mLにおける15%の阻害、および1mg/mLにおける91%の阻害)され、同様にドナー血漿の希釈によっても阻害(1:320希釈における10%の阻害、および1:10希釈における92%の阻害)された。

20

【0078】

TSHRを発現するCHO細胞におけるTSHおよびM22を介したサイクリックAMPの刺激に対する、5C9IgGの遮断能を表2a-cに示す。ブタTSH(3ng/mL)は、サイクリックAMP産生を強力に刺激した(19,020 $\pm$ 2154fmol/細胞ウェル;平均 $\pm$ SD;n=3)(表2a)。0.1 $\mu\text{g/mL}$ の5C9IgGの存在で、ブタTSHの刺激活性は11874 $\pm$ 4214fmol/細胞ウェル(平均 $\pm$ SD;n=3)まで減少し、かつ1 $\mu\text{g/mL}$ の5C9の存在下ではわずかに2,208 $\pm$ 329fmol/細胞ウェルのサイクリックAMPが産生されたことから、この阻害効果は5C9濃度に依存していた(表2a)。リンパ球ドナー血清もまた、CHO-TSHR細胞におけるTSHを介したサイクリックAMP刺激の強力な阻害効果を有していた。表2aに示すように、サイクリックAMP産生は血清非存在下での19000fmol/細胞ウェルと比較して、1:10希釈のドナー血清(この希釈における全血清IgG濃度は1.43mg/mL)存在下では約6000fmol/細胞ウェルへ減少する阻害が生じた。この効果は、約0.37 $\mu\text{g/mL}$ の精製5C9IgGによる効果に一致していた(表2aに示す、様々な濃度の5C9IgGによる効果の希釈曲線から算出した)。このことは、TSHのサイクリックAMP産生刺激能を遮断する能力に関して、精製5C9IgGはドナー血清IgGよりも約3900倍強い活性があることを示している。

30

【0079】

5C9F(ab')<sub>2</sub>および5C9Fabのような5C9の断片もまた、TSH刺激の有効な阻害剤であった。特に、100 $\mu\text{g/mL}$ における5C9IgG、5C9F(ab')<sub>2</sub>、および5C9FabのTSH刺激阻害活性は同等であった(表2b)。10 $\mu\text{g/mL}$ における3種の全ての製剤、すなわち5C9IgG、5C9F(ab')<sub>2</sub>、および5C9FabもまたTSH刺激活性の強力な阻害剤であったが、5C9IgGは5C9F(ab')<sub>2</sub>または5C9Fabよりもさらに効果的と考えられた(表2b)。

40

【0080】

M22Fab(3ng/mL)はサイクリックAMPの強力な刺激剤である(9,432 $\pm$ 822fmol/細胞ウェル)(表2c)。5C9の存在下でのM22Fabの刺激効果は量依存的に阻害され、0.1 $\mu\text{g/mL}$ の5C9IgGの存在下でのサイクリックAMP濃度は1,298 $\pm$ 134fmol/細胞ウェルに減少した。M22刺激の完全な阻害は、100 $\mu\text{g/mL}$ の5C9により生じた(表2c)。

50

## 【0081】

スキッチャード解析は、TSHRに結合する $^{125}\text{I}$ -標識5C9の結合定数は $4 \times 10^{10} \text{ L/mol}$ であることを示した。

## 【0082】

TSHRへの $^{125}\text{I}$ -5C9 IgG結合の、血清TRAbによる阻害

TSHRをコートしたチューブへの $^{125}\text{I}$ -5C9 IgGの結合に対する血清TRAbの阻害能を表3および図1に示す。 $^{125}\text{I}$ -TSHの結合および $^{125}\text{I}$ -M22 IgGの結合に対する同じ血清TRAbの効果もまた、比較のために示した。

## 【0083】

$^{125}\text{I}$ -5C9 IgGのTSHRへの結合は、10名の異なる健常血液ドナー(N1 - N10、表3)からの血清によって、明らかに阻害されなかった(阻害範囲は3.4 - 18.9%)。 $^{125}\text{I}$ -TSHおよび $^{125}\text{I}$ -M22の阻害アッセイ(表3)において、全てがTSHR自己抗体陽性であるグレーブス病の患者40名(G1 - G40、表3)からの血清は、TSHRをコートしたチューブへの $^{125}\text{I}$ -5C9の結合に対して健常血液ドナーからの血清よりも程度の大きな阻害を示した(阻害範囲は22.0 - 85.2%)(表3)。TSHRに対する $^{125}\text{I}$ -5C9 IgG、 $^{125}\text{I}$ -TSH、または $^{125}\text{I}$ -M22 IgGの結合に対する患者血清TRAbの阻害能は、ピアソン相関係数 $r = 0.95$ ( $^{125}\text{I}$ -5C9 IgG対 $^{125}\text{I}$ -TSH; 図1a)および $r = 0.95$ ( $^{125}\text{I}$ -5C9 IgG対 $^{125}\text{I}$ -M22 IgG; 図1b)で、同程度であった。図1cは、同血清による $^{125}\text{I}$ -TSHおよび $^{125}\text{I}$ -M22 IgGの阻害の比較を示す(ピアソン相関係数 $r = 0.99$ )。 10 20

## 【0084】

これらの実験は、TSHRへの5C9 IgG結合が血清TRAbによって効果的に阻害されること、および5C9 IgG結合における血清TRAbの阻害効果は、TSHまたはM22結合におけるこれらの阻害効果に類似していることを示している。

## 【0085】

表4は、TSH遮断活性を有する患者血清TRAb(B1 - B5)および強力な甲状腺刺激活性を有する患者血清TRAb(S1、S2、S4)の様々な希釈による、 $^{125}\text{I}$ -5C9 IgG結合の阻害を示す。 $^{125}\text{I}$ -5C9 IgG結合は、血清B1 - B5により、同様に血清S1、S2、およびS4により量依存的に阻害された。同遮断性および刺激性血清はまた、 $^{125}\text{I}$ -TSHおよび $^{125}\text{I}$ -M22 IgG結合を量依存的に阻害し、さらに3種の全ての標識リガンドに対する阻害のパーセンテージは血清の同希釈において同程度であった(表4aおよびb)。 30

## 【0086】

これらの結果は、刺激活性および遮断活性の両方を有するTSHR自己抗体は、TSHRへの5C9結合を阻害することを示している。

## 【0087】

TSH結合阻害活性を有するマウスMAbによる、TSHRへの $^{125}\text{I}$ -5C9 IgG結合の阻害

$^{125}\text{I}$ -TSH結合阻害活性をもつ様々なマウスTSHRMAbの、TSHRへの $^{125}\text{I}$ -5C9結合の阻害能を試験し、 $^{125}\text{I}$ -M22 IgG結合における効果と比較した(表5)。表5に示すように、 $^{125}\text{I}$ -TSHおよび $^{125}\text{I}$ -M22 IgG結合に対する阻害能を有する全てのMAbは $^{125}\text{I}$ -5C9結合もまた阻害したが、幾つかのMAbの場合、 $^{125}\text{I}$ -5C9および $^{125}\text{I}$ -M22結合における阻害効果は $^{125}\text{I}$ -TSH結合における阻害効果よりも弱かった。 40

## 【0088】

これらの実験は、TSHR上の5C9に対する結合部位と、TSH結合の阻害能を有するマウスTSHRMAbに対する結合部位の間にかかなりの重複があることを示唆している。

## 【0089】

TSHRを発現するCHO細胞における、患者血清によるサイクリックAMPの産生刺激に対する5C9IgGの効果

表2に示すように、5C9IgGはTSHRを発現するCHO細胞内のサイクリックAMP濃度に関するTSHまたはM22の刺激を遮断することができた。一連の異なる実験において、患者血清TRAbの刺激活性における5C9IgGの効果を試験した。その結果を表6aに示す。血清T1-T9およびT11-T18はCHO-TSHR細胞内のサイクリックAMP産生を刺激し、コントロールMAbIgG(ヒト甲状腺ペルオキシダーゼに特異的な2G4)とのインキュベーションはそれらの刺激活性への影響をもたなかった。しかしながら、5C9IgG(200μg/mLを50μL)の存在下では、試験された全ての血清の刺激活性は明らかに減少した(表6a)。

10

#### 【0090】

6種の異なる血清(T1、T6、T3、T19、T20、T21)の量反応効果を表6b-gに示す。これらの実験において、0.1μg/mLから100μg/mLの範囲の濃度の5C9IgGは血清の刺激活性の量依存的減少を起こし、5C9IgGの効果は血清T3を除く全ての試験された血清において、遮断活性をもつTSHRに対するマウスモノクローナル抗体9D33(国際公開第2004/050708A2号に記載)の効果と同程度であった。T3血清の場合(表6aおよび6d)、100μg/mLの5C9IgGの存在下においてサイクリックAMP産生の約50%の障害が観察されたが、100μg/mLの9D33IgGはほとんど完全な障害をもたらした。このことは、5C9および9D33によって認識されるエピトープの間に、ある小さな違いがある可能性を示唆した。

20

#### 【0091】

TSHRを発現するCHO細胞内の基本的(すなわち無刺激の)なサイクリックAMP産生における5C9IgGの効果

TSHおよびTSHR抗体の刺激活性の障害と同様に、5C9はこれらの甲状腺刺激剤の非存在下で産生されるサイクリックAMPの量を障害した。特に表6bは、100μg/mLのコントロールモノクローナルIgG(2G4)の存在下で産生された $1207 \pm 123$  fmol/細胞ウェルのサイクリックAMPが、100μg/mLの5C9IgGの存在下で $301 \pm 38$  fmol/細胞ウェルに減少したことを示している。9D33IgGの効果は、100μg/mLの9D33IgGの存在下での $721 \pm 183$  fmol/細胞ウェルの産生より、少なかった。表6d、6e、6fおよび6gに示す別々の実験において同様の結果が得られた。このことは、5C9IgGがTSHRの基本的、または恒常的活性において著しい効果を有することを示している。

30

#### 【0092】

アミノ酸変異を含むTSHRを発現するCHO細胞内サイクリックAMPの産生刺激における5C9IgGの効果

CHO-TSHR細胞内でのブタTSHのサイクリックAMP刺激活性に対する5C9の遮断能における、TSHRの単一アミノ酸変異の効果を表7に示す。特に以下の残基:Lys58、Ile60、Arg80、Tyr82、Thr104、Arg109、Lys129、Phe134、Asp151、Lys183、Gln235、Arg255、Trp258、Ser281をアラニンに変異させたTSHRを発現するCHO細胞において、サイクリックAMP産生刺激に対する5C9の効果調べた。さらに、TSHRの残基:Arg80Asp、Asp151Arg、Lys183Asp、Arg255Aspの事例において、電荷の変化による変異(change of charge mutation)の効果調べた。ここでは従来表記法に従い、置換されたアミノ酸残基、およびその一次配列ポリペプチド内の位置を置換アミノ酸残基の前に示す。以前の研究は、TSHRの電荷の変化による変異(change of charge mutation)であるAsp160LysはTSHRのTSHに対する反応性の喪失の原因となったが、M22に対する反応は影響されなかったことを示している(特許出願国際公開第WO2006/016121A号)。従って、5C9の生物活性におけるTSHRのAsp160Lys変異の効果は、M22をCHO-TSHR

40

50

細胞におけるサイクリックAMP刺激剤として使用することにより調べられた(表71)。

【0093】

研究された全てのTSHR変異のうち、3種の変異のみがアンタゴニストとして作用する5C9の能力に影響することが見出された。Lys129のAlaへの変異(表7h)は、サイクリックAMP産生のTSHによる刺激を遮断する5C9IgGの能力の完全な喪失をもたらした。

【0094】

TSHR変異であるLys183Alaもまた、5C9IgGの遮断活性の部分的な減少の原因となった。試験の際、1μg/mLにおいてTSHRのLys183Ala変異ではTSH刺激の28%の阻害が観察され、これは野生型TSHRによる84%の阻害と比較される(表7m)。100μg/mLの5C9IgGにおいても、TSHRのLys183Ala変異を用いた実験ではTSH刺激の部分的な阻害(43%)のみが検出されたが、野生型レセプターを用いた実験においては、同濃度においてTSH刺激活性の完全な遮断(93%)が観察された(表7m)。陽性荷電のLys183を陰性荷電のアスパラギン酸に変異させると、5C9の生物活性における効果はLys183Ala変異によって観察されたそれに類似した(表7m)。このことは、Lys183が5C9の生物活性に重要であることを示唆している。Asp151Ala変異の場合、5C9IgG遮断活性のわずかな減少; 1μg/mLにおいて、野生型による88%の遮断と比較して49%の阻害が観察された(表7j)。しかしながら100μg/mLの5C9IgGの存在下では、この活性は野生型のTSHRによるものと同様であった。陰性荷電のAsp151を陽性荷電のアルギニンに変異させると、5C9IgG遮断活性の有意な減少は観察されなかった(表7k)。

【0095】

5C9活性におけるTSHR変異の効果は、9D33活性におけるTSHR変異の効果と比較できる。特許出願国際公開第2006/016121A号に記載されているように、TSHRのLys58、Arg80、Tyr82、Arg109、Lys129およびPhe134の変異は、9D33活性における効果を有していた。しかしながらLys129を除いたこれらの変異のいずれもまた、5C9活性における効果を有してはいなかった。さらに、特許出願国際公開第2006/016121A号に記載されているようなM22活性に影響する変異(Arg80、Tyr82、Glu107、Arg109、Lys129、Phe130、Lys183、Tyr185、Arg255およびTrp258)であるLys129を除いたこれらの変異のいずれも、5C9活性には影響しなかった。さらに、Lys183変異は5C9活性およびM22活性において部分的効果を有していたが、9D33活性における効果は有していなかった。

【0096】

これらの結果は、甲状腺刺激性ヒト自己抗体M22、マウス遮断性抗体9D33、およびヒト遮断性自己抗体5C9との相互作用に重要なTSHR残基は異なっていることを示している。従って、5C9とアンタゴニスト活性をもつその他のTSHR抗体(例えば9D33)との組み合わせは、患者血清TRAb、その他の刺激剤による刺激活性および/またはTSHRの恒常的活性を阻害するための特に有効な手段となり得る。

【0097】

5C9の可変領域配列

5C9をコードする遺伝子の配列解析は、HCのV領域遺伝子はVH3-53ファミリー由来、D遺伝子はD2-2ファミリー由来、およびJ遺伝子はJH4ファミリー由来であることを示した。LCの場合、V領域遺伝子はO12ファミリー由来、およびJ領域遺伝子はJK2の生殖系列由来であった。HCのヌクレオチドおよびアミノ酸配列は図2aおよび2bそれぞれに示され、LCのヌクレオチドおよびアミノ酸配列は図3aおよび3bそれぞれに示される。

【0098】

10

20

30

40

50

生殖系列配列と比較して、HC遺伝子配列には体細胞変異、特にFWR1には1個のサイレント変異、CDR2には2個の置換変異、CDR3には1個のサイレント変異および1個の置換変異、およびFWR4には1個のサイレント変異が存在する。しかしながらHCのV領域配列は2個の挿入、すなわちVおよびD遺伝子の間の長さ6塩基対の1個、および、DおよびJ遺伝子の間の長さ15塩基対の1個により特徴付けられる。従って、HCのCDR1は長さ5アミノ酸、CDR2は長さ16アミノ酸、およびCDR3は長さ18アミノ酸となる(図2b)。

#### 【0099】

LC配列では、FWR1には1個のサイレント変異、CDR1には1個の置換変異、CDR3には1個の置換変異、および、VおよびJ遺伝子の間に長さ6塩基対の1個の挿入が存在する。LCのCDR1は11アミノ酸、CDR2は7アミノ酸、およびCDR3は10アミノ酸よりなる(図3b)。

10

#### 【0100】

TSHまたはTRAb検出のための5C9に基づくアッセイ

TSHR自己抗体を検出するための、TSHRをコートしたプレートウェルへの5C9 IgG - ビオチン結合に基づいたELISAの例を表8に示す。このアッセイにおいて、TSH - ビオチン結合の阻害に対して陽性の全てのサンプルは、5C9 IgG - ビオチン結合に対してもまた陽性であった。さらに、吸光度シグナル、パーセント阻害、および組立単位/L値は、TSH - ビオチンおよび5C9 - ビオチンアッセイの間で同程度であった(表8)。

20

#### 【0101】

TSHRを発現するCHO細胞へのマウス甲状腺刺激性モノクローナル抗体(マウスTSHRMAb; TSMAb)の刺激活性に対する5C9 IgGの効果

表9に示すように5C9 IgGは、試験された5種の全てのTSMAb(1, 2, 4, 5および7)によるサイクリックAMP産生の刺激を遮断することができた。例えばTSMAb1(表9)により刺激されたサイクリックAMPの濃度は $18.94 \pm 7.4 \text{ pmol/mL}$ であったが、 $100 \mu\text{g/mL}$ の5C9 IgGの存在下ではわずかに $1.24 \pm 0.07 \text{ pmol/mL}$ のサイクリックAMPが産生された。これは、 $100 \mu\text{g/mL}$ のコントロールMAb2G4の存在下でのサイクリックAMPの濃度である、 $16.5 \pm 1.1 \text{ pmol/mL}$ と比較することができる(表9)。

30

#### 【0102】

以下の表9、同様に表10-15に示すサイクリックAMP濃度は $\text{pmol/mL}$ で表している。すなわち、細胞ウェルあたりのサイクリックAMPの量は $\text{pmol/mL} \div 5$ (アッセイされた各ウェルからのサンプル $200 \mu\text{L}$ を表す)である。

#### 【0103】

TSHRを発現するCHO細胞への天然ヒトTSHおよびリコンビナントヒトTSHの刺激活性に対する5C9 IgGの効果

ブタTSHによるサイクリックAMP刺激を遮断する5C9 IgGの能力を、表2および表10に示す。さらに、5C9 IgGは天然ヒトTSH(NIBSC reference preparation 81/565 from National Institute for Biological Standards and Control, South Mimms, Potters Bar EN6 3QG UK)およびリコンビナントTSH(NIBSC reference preparation 94/674)両者のサイクリックAMP刺激に対する阻害能を示した(表10)。特に $100 \text{ ng/mL}$ のリコンビナントまたは天然ヒトTSHいずれかによるサイクリックAMP産生刺激は、サイクリックAMP産生の完全な阻害を得るために $0.1 - 1.0 \mu\text{g/mL}$ の5C9 IgGを要求する。5C9分離のための血液採集時におけるドナー血清中の循環TSH濃度は $160 \text{ mU/L}$ (約 $32 \text{ ng/mL}$ )であり、得られた結果(表2aおよび表10)は、この濃度の循環TSHは血清中の $32 - 320 \text{ ng/mL}$ の5C9 IgGの存在により完全に遮断され得ることを示している。ドナー血清中のTSHR自己抗体の濃度は、TSHRへの $^{125}\text{I} - \text{M}22$ 結合の阻害(Nakatake N, Sanders J, Richards T, Burne P, Barrett C, Dal Pra C, Presotto F, Betterle C, Furmaniak J, Rees Smith

40

50

B 2006 Estimation of serum TSH receptor autoantibody concentration and affinity . Thyroid 16: 1077-1084に記載されているように)を用いることにより  $1700 \text{ ng / mL}$  ( $120 \text{ ng / mg}$ )と推定された。これはすなわち、TSHによる甲状腺刺激の遮断に要求される5C9の濃度よりも数倍高めである。

【0104】

活性化変異であるS281I、I568TおよびA623IをもつTSHRを発現するCHO細胞内の基本的(すなわち無刺激の)なサイクリックAMP活性における5C9 IgGの効果

5C9 IgGは、甲状腺活性化剤(すなわちTSHまたはTSHR抗体)の非存在下で、活性化変異をもつTSHRを発現するCHO細胞内で産生されるサイクリックAMPの量を減少させることができた。表11aに示すように、活性化変異であるS281IをもつTSHRを発現するCHO細胞内の基本的なサイクリックAMP濃度は5C9の非存在下で  $9.90 \pm 1.51 \text{ pmol / mL}$ であり、これは  $0.01 \mu\text{g / mL}$ の5C9 IgGの存在下で  $4.17 \pm 0.60 \text{ pmol / mL}$ に減少し、 $1 \mu\text{g / mL}$ の5C9 IgGの存在下で  $3.44 \pm 0.63 \text{ pmol / mL}$ に減少した。遮断性マウスTSHRMAb 9D33は、コントロールMAb 2G4と同程度のわずかな効果を有した(表11a)。

10

【0105】

$21.39 \pm 5.31 \text{ pmol / mL}$ の基本的なサイクリックAMP濃度を示す、TSHR活性化変異のI568Tによって同様の結果が得られた(表11b)。これは  $1 \mu\text{g / mL}$ の5C9 IgGの添加によって  $5.29 \pm 0.75 \text{ pmol / mL}$ に減少し、2G4 IgG、および5C9 IgGを添加した場合の、 $20.52 \pm 0.95 \text{ pmol / mL}$ 、および  $21.65 \pm 1.99 \text{ pmol / mL}$ それぞれと比較される。 $36.89 \text{ pmol / mL}$ の基本的なサイクリックAMP濃度を有する、研究された第3のTSHR活性化変異であるA623Iの場合は、 $1 \mu\text{g / mL}$ の5C9 IgGの添加によりサイクリックAMP濃度は  $16.43 \pm 1.27 \text{ pmol / mL}$ に減少し、これは  $1 \mu\text{g / mL}$ のコントロールIgGである2G4によるわずかな効果( $28.96 \pm 2.29 \text{ pmol / mL}$ )または  $1 \mu\text{g / mL}$ の9D33 IgG( $40.09 \pm 7.73 \text{ pmol / mL}$ )と比較される(表11c)。

20

【0106】

これらの結果は、5C9はマウス遮断性MAbの9D33とは異なり、たとえTSHR活性化変異がTSHRの異なる部分に存在していても(すなわち、S281Iは細胞外ドメインにあり、I568Tは膜貫通ドメインの2番目の細胞外ループにあり、かつA623Iは膜貫通ドメインの3番目の細胞内ループにある)、これらの変異に関連したサイクリックAMP産生において著しい効果を有することを示している。

30

【0107】

野生型TSHRを発現するCHO細胞におけるTSHを介したサイクリックAMP産生の刺激に対する、5C9およびマウスTSHR遮断性モノクローナル抗体9D33およびこれら2種の抗体の混合物の効果の比較

前記の実験および表12に示すように、低くとも  $1 \mu\text{g / mL}$ の濃度のヒトTSHR遮断性MAb 5C9およびマウスTSHR遮断性MAb 9D33は、CHO-TSHR細胞におけるTSHのTSHRサイクリックAMP刺激活性に対する遮断能を有する。表12の実験1-5に示すように、TSHを介したサイクリックAMPの刺激に対する9D33 IgGおよび5C9 IgGの効果は相加的であった。刺激に2つの異なった濃度のTSH( $3 \text{ ng / mL}$ および  $0.3 \text{ ng / mL}$ )を用いた際、同じ相加的效果が観察された(表12; 実験1-3および実験4および5の各実験)。

40

【0108】

野生型TSHRを発現するCHO細胞におけるM22を介したサイクリックAMP産生の刺激に対する、5C9およびマウスTSHR遮断性モノクローナル抗体9D33およびこれら2種の抗体の混合物の効果の比較

以前に示したように、5C9および9D33は、CHO-TSHR細胞におけるM22

50

F a bを介したサイクリックAMPの刺激もまた阻害できる。M 2 2を介したサイクリックAMPの刺激に対する9 D 3 3 I g Gおよび5 C 9 I g Gの効果は相加的であった(表13、実験1 - 4)。刺激に2つの異なった濃度のM 2 2 F a b (3 n g / m Lおよび0.3 n g / m L)を用いた際、同じ相加的效果が観察された(表13; 実験1および2、および実験3および4の各実験)。

【0109】

5 C 9 I g Gおよび9 D 3 3 I g Gの相加的效果は、T S HおよびM 2 2の両者を介したサイクリックAMP産生の刺激について同様であった(表12および13)。

【0110】

野生型T S H Rを細胞あたり多数発現するC H O細胞内の基本的(すなわち無刺激の)なサイクリックAMP活性における5 C 9の効果

細胞あたり約 $5 \times 10^5$ のレセプターを発現するC H O細胞株は、以前の実験(例えば表9 - 13)で用いた標準的なC H O細胞株(細胞あたり約 $5 \times 10^4$ のT S H Rを発現する)に比較して高濃度の基本的(すなわち無刺激の)サイクリックAMPを示した。すなわち、それぞれの濃度は、約 $1.0 \text{ p m o l} / \text{m L}$ に比較して $47.1 \pm 11.7 \text{ p m o l} / \text{m L}$ である。野生型T S H Rの基本的活性における5 C 9 I g Gおよび9 D 3 3 I g Gの効果、細胞あたり多数のレセプターを発現する細胞株を用いて評価した。9 D 3 3 I g Gおよびネガティブコントロールの抗G A D抗体(5 B 3)とのインキュベーションは、基本的サイクリックAMP活性の0 - 5.3%の阻害をもたらした(表14; 実験1)。このことは、マウス遮断性M A b 9 D 3 3またはコントロールM A bは、野生型T S H Rを発現するC H O細胞における基本的なサイクリックAMP産生に対して効果をもたないことを示している。しかしながら5 C 9 I g Gの場合、基本的サイクリックAMP活性の明らかな阻害が観察された(表14; 実験2)。すなわち、 $0.1 \mu \text{g} / \text{m L}$ および $10 \mu \text{g} / \text{m L}$ の濃度はそれぞれ、45.7%および74.6%の阻害を起こした。さらに、5 C 9 F a bおよび5 C 9 F ( a b ' )もまた、細胞あたり多数のT S H Rを発現するC H O細胞における基本的サイクリックAMP活性の有効な阻害剤であった(表14、実験3)。例えば、 $1 \mu \text{g} / \text{m L}$ および $100 \mu \text{g} / \text{m L}$ の5 C 9 F a bはそれぞれ、基本的なサイクリックAMP産生の39%および61%の阻害を示し、これは $100 \mu \text{g} / \text{m L}$ の5 C 9 F ( a b ' )による48%の阻害と比較される(表14、実験3)。

【0111】

アンタゴニスト(すなわち遮断性)活性を有する患者血清T S H R自己抗体の、活性化変異I 5 6 8 Tを有するT S H Rを発現するC H O細胞の基本的(すなわち無刺激の)なサイクリックAMP活性に対する効果

T S H R I 5 6 8 T細胞によるサイクリックAMPアッセイ緩衝液存在下での基本的なサイクリックAMP産生( $20.5 \pm 8.7 \text{ p m o l} / \text{m L}$ )は、試験された健常血液ドナーからの正常プール血清(N P S)または異なった3名の個々の健常血液ドナー血清(N 1 - N 3)の1 / 10および1 / 50希釈における添加によって基本的に影響されなかった。N P SおよびN 1 - N 3血清の存在下での基本的なサイクリックAMP産生は、サイクリックAMPアッセイ緩衝液存在下での基本的なサイクリックAMP産生に比較して0 - 14%の阻害を示した(表15)。しかしながら、高濃度の遮断性T R A b ( B 2 - B 5)を有する4種の異なる血清の存在下では、基本的なサイクリックAMP産生の23 - 89%の阻害が観察された(表15)。5 C 9 I g G ( $1 \mu \text{g} / \text{m L}$ )の存在下では、T S H R I 5 6 8 Tの基本的なサイクリックAMP活性の83%の阻害が観察された。I 5 6 8 T変異をもつT S H Rを発現するC H O細胞の基本的なサイクリックAMP産生に対する、2種の遮断性血清(B 3およびB 4)の量依存性効果もまた表15に示す。

【0112】

これらの結果は、5 C 9が、特にT S H R活性化変異であるI 5 6 8 Tにおける基本的なサイクリックAMP産生の阻害に関して、患者遮断T S H R自己抗体のT S H R遮断活性特性を有することを示す。

10

20

30

40

50

## 【0113】

アンタゴニスト活性を有する患者血清 TSHR 自己抗体の、活性化変異 S281I を有する TSHR を発現する CHO 細胞の基本的 (すなわち無刺激の) なサイクリック AMP 活性に対する効果

TSHRS281I 細胞によるサイクリック AMP アッセイ緩衝液存在下での基本的なサイクリック AMP 産生は  $11.2 \pm 2.0 \text{ pmol/mL}$  であり、健常血液ドナープール血清または個々の健常血液ドナー血清 (1/10 または 1/50 希釈) とのインキュベーションは効果を示さなかった (表 16)。一方で、高濃度の遮断性 TRAb (B2-B5) を有する 4 種の異なる血清の存在下では、基本的なサイクリック AMP 産生の 31-56% の阻害が観察された (表 16)。TSHRS281I を用いた実験において、 $1 \mu\text{g/mL}$  の 5C9IgG は基本的なサイクリック AMP 活性を 71% 阻害した。

10

## 【0114】

アンタゴニスト活性を有する患者血清 TSHR 自己抗体の、活性化変異 A623I を有する TSHR を発現する CHO 細胞の基本的 (すなわち無刺激の) なサイクリック AMP 活性に対する効果

TSHRA623I 細胞の場合、サイクリック AMP アッセイ緩衝液存在下での基本的なサイクリック AMP 産生は  $43.5 \pm 11.2 \text{ pmol/mL}$  であり、健常血液ドナープール血清または個々の血清とのインキュベーションによって基本的に影響されなかった。(表 17)。高濃度の遮断性 TRAb (B2-B5) を有する 4 種の異なる血清とのインキュベーションでは、これらの実験においてサイクリック AMP の -1% から 56% を阻害した (表 17)。このことは、同じ実験における  $1 \mu\text{g/mL}$  の 5C9IgG による 49% の阻害と比較することができる。

20

## 【0115】

アンタゴニスト活性を有する患者血清 TSHR 自己抗体の、細胞あたり約  $5 \times 10^5$  の野生型 TSHR を発現する CHO 細胞の基本的 (すなわち無刺激の) なサイクリック AMP 活性に対する効果

細胞あたり比較的多数の野生型 TSHR を発現する CHO 細胞の基本的なサイクリック AMP 産生は、この一連の実験で  $28.1 \pm 0.7 \text{ pmol/mL}$  であった。該細胞を 1/10 希釈の健常血液ドナープール血清または個々の血清 (N1-N3) とインキュベートしたとき、サイクリック AMP アッセイ緩衝液存在下での基本的なサイクリック AMP 濃度は 99% から 146% の範囲であったが、1/50 希釈においてその範囲は 93% から 137% であった。遮断性 TSHR 自己抗体を有する試験された 4 種の血清のうち、1 種の血清 (B2) は基本的なサイクリック AMP 産生において効果を示さなかった (表 18)。2 種の血清 (B3 および B5) の場合、サイクリック AMP 濃度は、サイクリック AMP アッセイ緩衝液存在下で観察された濃度に比較して増大した (表 18)。血清 B3 および B5 が刺激活性および遮断活性を有する TSHR 自己抗体の混合物を含むことは十分にあり得る。一方、血清 B4 は 1/10 および 1/50 希釈において、基本的なサイクリック AMP 産生に対する明らかな阻害効果を有していた。すなわち基本的なサイクリック AMP 濃度は、サイクリック AMP 緩衝液存在下での濃度に比較してそれぞれ 31% および 61% であった (表 18)。このことは、 $1 \mu\text{g/mL}$  の 5C9IgG 存在下での濃度が、サイクリック AMP アッセイ緩衝液存在下での濃度に比べ 33% であることと比較することができる (表 18)。

30

40

## 【0116】

概して 5C9IgG は、野生型 TSHR、または遮断性 TSHR 自己抗体陽性患者由来の血清により観察された効果に対する活性化変異を有する TSHR を導入した CHO 細胞における、基本的なサイクリック AMP 産生に対し同様の効果を示す。しかしながら、様々な変異の場合において個々の患者血清による効果は変動する (表 19)。野生型 TSHR の場合、ある血清は刺激効果を示す。これはおそらく遮断性自己抗体と同様に TSHR 刺激性自己抗体も存在するためである (表 19)。

## 【0117】

50

アミノ酸変異を含むTSHRを発現するCHO細胞におけるサイクリックAMP産生の刺激に対する5C9の効果

アミノ酸変異を有するTSHRを発現するCHO細胞におけるサイクリックAMP産生の刺激に対する5C9の効果は、以下の、アラニンへの変異の包含に及ぶ：Asp43、Glu61、His105、Glu107、Phe130、Glu178、Tyr185、Asp203、Tyr206、Lys209、Asp232、Lys250、Glu251、Thr257、Arg274、Asp276（表20a-p、および表21に要約）。

【0118】

TSHRのアミノ酸であるAsp43、Glu61、His105、Glu107、Tyr185、Asp232およびThr275のアラニンへの変異は、TSH刺激によるサイクリックAMP産生に対する5C9IgGの阻害能に効果を示さなかった。TSH刺激によるサイクリックAMP産生に対する5C9の阻害能は、TSHRのPhe130、Glu178、Asp203、Tyr206、Lys250、Glu251およびAsp276のアラニンへの変異により減少した。Lys209AlaおよびAsp274Alaの2種の変異の場合、TSHを介したサイクリックAMP産生に対する5C9IgGの阻害能は増大した。

10

【0119】

要約すると(表7, 20、および21)、Lys129、Phe130、Asp151、Glu178、Lys183、Asp203、Tyr206、Lys250、Glu251およびAsp276の10種のTSHR残基全ては、5C9のTSHによるサイクリックAMP刺激に対する阻害能を、野生型TSHRに比べて減少させた。TSHRのLys129およびAsp203の変異は最大の効果を示し、5C9活性の完全な阻害の原因となった。

20

【0120】

野生型TSHRを発現するCHO細胞におけるTSHを介したサイクリックAMPの産生刺激に対する遮断性血清B2-B5の、Asp203Ala変異TSHRとの比較による効果

野生型TSHRにおける1μg/mLの5C9による遮断効果は(TSHにより誘導されたサイクリックAMP刺激の92%の阻害)、Asp203Ala変異TSHRにおいては4%に減少した(表22)。

30

【0121】

遮断性血清B4の活性はTSHRのAsp203Ala変異により影響されなかったが、遮断性血清B2およびB3では、TSHRのAsp203Ala変異の場合、野生型TSHRと比較してTSHにより誘導されたサイクリックAMP刺激のパーセント阻害にわずかな減少がみられた。

【0122】

血清B5の場合、TSHにより誘導されたサイクリックAMP刺激のパーセント阻害に顕著な減少が観察された；すなわち、野生型TSHRでの69%の阻害に対して、変異TSHRでは30%の阻害であった。

40

【0123】

5C9活性に対するTSHRのAsp203Ala変異の効果は遮断性血清の活性に対する効果よりも大きかったが、試験された3/4の血清の遮断活性は様々な程度に影響された。このことは、遮断性TSHR自己抗体および5C9の結合部位は重複しているが、様々な血清と接触する実際のTSHRアミノ酸には幾らかの違いのあることを示し得る。

【0124】

要約および結論

上記の実験は5C9のような本発明による抗体が、ヒトおよびマウスTSHR刺激性抗体、天然ヒトおよび動物TSH、およびリコンビナントヒトTSHを含む様々な甲状腺刺激剤の刺激活性を遮断できることを証明する。さらに、2種の異なる遮断性抗体、すなわ

50

ヒトMAb 5C9およびマウスMAb 9D33は個別に試験した際、TSHRを発現するCHO細胞におけるTSHまたはM22を介したサイクリックAMP刺激に対する遮断能を有し、混合した際、TSHまたはM22刺激に対して相加的遮断効果を示すことが証明される。

【0125】

5C9のような本発明による抗体は、TSHRの基本的(すなわち無刺激の)なサイクリックAMP活性に対する新規な効果を有する。これらの効果は、比較的高濃度の基本的なサイクリックAMPを有するTSHR導入CHO細胞を用いた実験により研究されてきた。すなわち、5C9のような本発明による抗体の基本的なサイクリックAMP活性に対する遮断効果が確認されてきた。さらに、遮断(アンタゴニスト)活性をもつTSHR自己抗体を有する幾つかの血清は、これらのTSHR導入細胞における基本的なサイクリックAMP活性への遮断能を有することが示されてきた。この実験はまた、5C9のような本発明による抗体および血清TSHR遮断自己抗体の、活性化TSHR変異に関連した基本的なサイクリックAMP活性に対する遮断効果を証明する。

10

【0126】

これらの結果は、5C9が遮断性TSHR自己抗体の特性を示すヒトMAbであること、すなわち甲状腺自己免疫疾患に付随する患者血清TSHR自己抗体の典型であることを強調する。

【0127】

記載された実験はまた、本発明による抗体の遮断活性に重要な幾つかのTSHRアミノ酸の同定も可能にした。

20

【0128】

概してこの結果は、5C9のような本発明による抗体は、甲状腺自己免疫疾患の患者由来の様々な血清中に見出されたTSHR遮断性自己抗体と同様のTSHR結合活性、およびTSHRの機能における同様の生物学的効果を呈することを示す。従って、血清中の遮断性TSHR自己抗体の特性および生物学的活性を有する5C9のような本発明による抗体は、様々な病態におけるTSHRの不活性化に適用できる。これらの病態は、TSHを介したTSHRの活性化、甲状腺刺激性TSHR自己抗体を介したTSHRの活性化、基本的な(無刺激の、恒常的な)TSHR活性、および活性化TSHR変異によるTSHRの活性化を含む。従って、5C9のような本発明による抗体は、上述のTSHRの活性化による病態;例えばグレーブス病、グレーブス眼症、TSHRの活性化変異による甲状腺機能亢進症、TSHの異常な濃度(病理的または薬理的)による甲状腺機能亢進症、甲状腺癌、および甲状腺癌転移の管理および制御に適用できる。

30

【0129】

【表 1 - 1】

[表 1]

5C9 IgG、リンパ球ドナー IgG、およびリンパ球ドナー血漿による、TSHR をコートしたチューブへの<sup>125</sup>I-TSH、<sup>125</sup>I-M22 IgG、または<sup>125</sup>I-5C9 IgG の結合の阻害

サンプル	<sup>125</sup> I-TSH (阻害率%)	<sup>125</sup> I-M22 IgG (阻害率%)	<sup>125</sup> I-5C9 (阻害率%)
ドナー血漿(HBDプール希釈)			
1/5	97	92	93
1/10	95	91	92
1/20	82	85	82
1/40	57	75	56
1/80	30	53	29
1/160	16	29	13
1/320	8	13	10
ドナーIgG (HBDプールIgGで1mg/mLに希釈)			
1 mg/mL	94	89	91
0.5 mg/mL	90	86	89
0.25 mg/mL	63	79	64
0.1 mg/mL	29	51	26
0.05 mg/mL	13	29	15
0.025 mg/mL	2	17	5
0.01 mg/mL	5	9	1

10

20

30

40

【表 1 - 2】

5C9 IgG (2G4で100 µg/mLに希釈)			
100 µg/mL	84	85	88
50 µg/mL	76	81	80
25 µg/mL	67	69	71
10 µg/mL	54	60	59
5 µg/mL	47	53	54
2.5 µg/mL	42	43	49
1 µg/mL	37	31	42
0.5 µg/mL	33	32	41
0.1 µg/mL	29	22	34
0.05 µg/mL	25	19	30
0.01 µg/mL	13	9	15
0.005 µg/mL	12	5	11
0.001 µg/mL	3	2	3

10

20

30

T S H R をコートしたチューブへの標識ラベルの平均結合%

$^{125}\text{I}$  - T S H を用いた実験において 14 %

$^{125}\text{I}$  - M 2 2 I g G を用いた実験において 21 %

および、5 C 9 I g G を用いた実験において 20 %

H B D プール = 健常人血液ドナープール血清

2 G 4 = コントロールの I g G ( ヒト甲状腺ペルオキシダーゼに対するヒト M A b )

【 0 1 3 0 】

【表 2 a】

[表 2 a]

ヒト TSHR を発現する CHO 細胞における TSH のサイクリック AMP 産生刺激に対する、5C9 IgG、またはリンパ球ドナー血清 IgG の効果

サンプル	IgG濃度	サイクリックAMP (fmol/cell well; 平均±SD、n=3)
pTSH (3 ng/mL) のみ		19020 ±2154
5C9 IgG のみ	1 µg/mL	141 ±5
5C9 IgG + pTSH (3 ng/mL)	1 µg/mL	2208 ±329
5C9 IgG + pTSH (3 ng/mL)	0.5 µg/mL	4754 ±876
5C9 IgG + pTSH (3 ng/mL)	0.1 µg/mL	11874 ±4214
5C9 IgG + pTSH (3 ng/mL)	0.08 µg/mL	14525 ±3690
5C9 IgG + pTSH (3 ng/mL)	0.06 µg/mL	13290 <sup>1</sup>
5C9 IgG + pTSH (3 ng/mL)	0.04 µg/mL	13928 ±1572
5C9 IgG + pTSH (3 ng/mL)	0.02 µg/mL	16432 ±9286
5C9 IgG + pTSH (3 ng/mL)	0.01 µg/mL	18969 ±5308
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ		207 ±51
ドナー血清 <sup>a</sup> 1/10	1.43 mg/mL <sup>b</sup>	1102 ±46
ドナー血清 1/10 + pTSH (3 ng/mL)	1.43 mg/mL	5931 ±350
ドナー血清 1/20 + pTSH (3 ng/mL)	0.715 mg/mL	16886 ±728
ドナー血清 1/30 + pTSH (3 ng/mL)	0.477 mg/mL	16453 ±3455
ドナー血清 1/40 + pTSH (3 ng/mL)	0.358 mg/mL	17716 ±1753
ドナー血清 1/50 + pTSH (3 ng/mL)	0.286 mg/mL	17928 ±4772
ドナー血清 1/100 + pTSH (3 ng/mL)	0.143 mg/mL	18226 ±2268

<sup>1</sup> 1 回の決定<sup>a</sup> ドナー血清は示されたようにサイクリックAMP検定緩衝液で希釈した<sup>b</sup> 比濁法により決定された非希釈血清のIgG濃度は14.3 mg/mLであった  
5C9 IgGおよびTSHはサイクリックAMPアッセイ緩衝液で希釈した。

【 0 1 3 1 】

10

20

30

40

50

## 【表 2 b - 1】

## [表 2 b]

TSHRを発現するCHO細胞においてTSHにより誘導されたサイクリックAMP産生の、5C9 IgG、F(ab')<sub>2</sub>、およびFab断片による阻害

## 実験 1

サンプル	サイクリックAMP (fmol/cell well; 平均±SD、n=3)
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ	586 ±148
TSH 3 ng/mLのみ	18557 ±363
5C9 Fab 100 µg/mLのみ	235 ±35
5C9 Fab 100 µg/mL + TSH	938 ±93
5C9 Fab 10 µg/mL + TSH	1283 ±239
5C9 F(ab') <sub>2</sub> 100 µg/mLのみ	204 ±12
5C9 F(ab') <sub>2</sub> 100 µg/mL + TSH	877 ±195
5C9 F(ab') <sub>2</sub> 10 µg/mL + TSH	916 ±188
5C9 IgG 100 µg/mLのみ	237 ±54
5C9 IgG 100 µg/mL + TSH	754 ±177
5C9 IgG 10 µg/mL + TSH	247 ±115
2G4 IgG 100 µg/mL + TSH	6082 <sup>1</sup>

10

20

30

【表 2 b - 2】

## 実験 2

サンプル	サイクリックAMP (fmol/cell well; 平均±SD、n=3)
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ	584 ±111
TSH 3 ng/mLのみ	19363 ±5198
2G4 IgG 100 µg/mLのみ	608 ±169
2G4 IgG 100 µg/mL + TSH	18147 ±972
2G4 IgG 10 µg/mL + TSH	18114 ±6544
5C9 F(ab') <sub>2</sub> 100 µg/mLのみ	414 ±22
5C9 F(ab') <sub>2</sub> 100 µg/mL + TSH	1058 ±223
5C9 F(ab') <sub>2</sub> 10 µg/mL + TSH	1333 ±443
5C9 IgG 100 µg/mLのみ	338 ±108
5C9 IgG 100 µg/mL + TSH	1109 ±375
5C9 IgG 10 µg/mL + TSH	723 ±71
5C9 Fab 100 µg/mLのみ	212 ±37
5C9 Fab 100 µg/mL + TSH	867 ±127
5C9 Fab 10 µg/mL + TSH	4131 ±776

10

20

30

<sup>1</sup> 2組のサンプルの平均

2 G 4 = コントロールの I g G ( ヒト甲状腺ペルオキシダーゼに対するヒト M A b )  
抗体および T S H 標本はサイクリック A M P アッセイ緩衝液で希釈した。

【 0 1 3 2 】

【表 2 c - 1】

ヒト TSHR を発現する CHO 細胞における TSH、または M22 Fab によるサイクリック AMP 産生刺激に対する、5C9 IgG および 9D33 IgG の効果

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/cell well; 平均±SD、n=3)
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ	473 ±21
pTSH 3 ng/mL のみ	12,270 ±980
5C9 IgG 100 µg/mL のみ	426 ±27
5C9 IgG 10 µg/mL のみ	360 ±53
5C9 IgG 1 µg/mL のみ	376 ±18
5C9 IgG 0.1 µg/mL のみ	404 ±42
5C9 IgG 0.01 µg/mL のみ	578 ±65
5C9 IgG 0.001 µg/mL のみ	554 ±47
5C9 IgG 100 µg/mL + pTSH 3 ng/mL	1094 ±70
5C9 IgG 10 µg/mL + pTSH 3 ng/mL	1028 ±47
5C9 IgG 1 µg/mL + pTSH 3 ng/mL	1872 ±168
5C9 IgG 0.1 µg/mL + pTSH 3 ng/mL	3920 ±464
5C9 IgG 0.01 µg/mL + pTSH 3 ng/mL	15,050 ±386
5C9 IgG 0.001 µg/mL + pTSH 3 ng/mL	14,147 ±1,310
9D33 IgG 100 µg/mL のみ	626 ±127
9D33 IgG 100 µg/mL + pTSH 3 ng/mL	2,218 ±5
M22 Fab 3 ng/mL のみ	9,432 ±822
5C9 IgG 100 µg/mL + M22 Fab 3 ng/mL	354 ±56

10

20

30

40

【表 2 c - 2】

5C9 IgG 10 µg/mL + M22 Fab 3 ng/mL	638 <sup>1</sup> ±190
5C9 IgG 1 µg/mL + M22 Fab 3 ng/mL	956 ±169
5C9 IgG 0.1 µg/mL + M22 Fab 3 ng/mL	1,298 ±134
5C9 IgG 0.01 µg/mL + M22 Fab 3 ng/mL	9,978 ±919
5C9 IgG 0.001 µg/mL + M22 Fab 3 ng/mL	11,614 ±393
9D33 IgG 100 µg/mL + M22 Fab 3 ng/mL	1,048 ±10

10

<sup>1</sup> 2 組のサンプルの平均

9 D 3 3 は、T S H R が発現する C H O 細胞において、T S H および T R A b が介在するサイクリック A M P 生産を遮断するマウス抗体である。

抗体および T S H 標本はサイクリック A M P アッセイ緩衝液で希釈した。

【 0 1 3 3 】

20

【表 3 - 1】

[表 3]

$^{125}\text{I}$ -5C9 IgG、 $^{125}\text{I}$ -TSH、および $^{125}\text{I}$ -M22 IgGのTSH  
Rをコートしたチューブへの結合、および患者血清サンプルによる阻害

血清サンプル	$^{125}\text{I}$ -5C9 結合阻害(%)	$^{125}\text{I}$ -TSH 結合阻害(%)	$^{125}\text{I}$ -M22 結合阻害(%)
N1	15.7	0	9.3
N2	3.3	1.2	7.2
N3	15.3	1.9	0.7
N4	4.0	4.2	0
N5	18.9	6.3	11.4
N6	5.9	2.9	1.4
N7	17.1	7.2	9.4
N8	5.5	0	0
N9	11.2	4.2	2.9
N10	10.5	6.5	5.8
G1	79.6	83.6	80.5
G2	75.8	77.5	73.5
G3	82.2	77.5	78.1
G4	77.7	74.9	74.8
G5	77.0	73.6	71.5
G6	64.7	71.6	69.1
G7	75.6	74.3	66.0
G8	73.7	74.7	77

10

20

30

40

【表 3 - 2】

G9	76.1	78.5	79.2
G10	75.9	75.8	69.9
G11	81.6	82.5	79.7
G12	71.6	76.6	73.9
G13	72.3	71.1	70.2
G14	81.9	85.8	80.9
G15	84.9	85.3	84.4
G16	80.5	84.9	81.7
G17	85.0	86.9	85.3
G18	84.9	85	84.2
G19	85.1	87.3	85.4
G20	84.4	89.3	87.7
G21	77.6	84.9	77.0
G22	67.1	59.7	61.5
G23	57.5	62.2	59.5
G24	65.7	67.1	64.4
G25	59.3	56.3	62.3
G26	38.4	67.7	69.4
G27	22.0	59.1	58.9
G28	68.3	69.7	72.8
G29	40.9	54.2	50.4
G30	71.2	69.1	72
G31	62.2	59.2	62.0

10

20

30

40

【表 3 - 3】

G32	46.0	40.6	49.2
G33	44.0	25.9	37.2
G34	52.0	48	55.0
G35	60.1	54.4	60.7
G36	29.3	31.4	43.2
G37	49.0	44.1	45.5
G38	40.1	26.7	29.8
G39	66.4	54.7	58.9
G40	48.8	48.5	48.5

10

N 1 - 1 0 = 健常人血液ドナーからの血清

G 1 - G 4 0 = グレーブス病にかかった経験のある患者からの血清

結果はほぼ一致する二重測定の平均である。

20

【数 3】

$$\text{阻害率\%} = 100 - \left[ \frac{A}{B} \times 100 \right]$$

ここで、A = テスト血清存在下での結合；B = 健常人血液ドナーからの血清 H B D プールの存在下での結合。

H B D プール存在下での<sup>125</sup>I - 5 C 9 は 2 0 % の結合率であり、H B D プール存在下での<sup>125</sup>I - T S H は 1 2 % の結合率であり、H B D プール存在下での<sup>125</sup>I - M 2 2 は 2 0 % の結合率であった。

30

【 0 1 3 4】

【表 4 a - 1】

[表 4 a]

$^{125}\text{I}$ -5C9 IgG、 $^{125}\text{I}$ -TSH、および $^{125}\text{I}$ -M22 IgGのTSH Rをコートしたチューブへの結合に対する、遮断活性または刺激活性のいずれかを有する患者血清による阻害の比較

テストサンプル	$^{125}\text{I}$ -5C9 結合阻害(%)	$^{125}\text{I}$ -TSH 結合阻害(%)	$^{125}\text{I}$ -M22 結合阻害(%)
アッセイキャリブレーター			
40 U/L	87	90	84.4
8 U/L	62	67	63.0
2 U/L	15	27	25.6
1 U/L	4.3	15	14.8
ポジティブコントロール血清	34	35	38.7
遮断性血清			
B1			
1/5	93	95	91.7
1/10	92	94	89.2
1/20	91	91	85.9
1/40	85	80	78.8
1/80	67	55	67.4
1/160	33	33	45.9
1/320	20	17	26.4

10

20

30

40

【表 4 a - 2】

<b>B2</b>			
1/5	92	91	86.6
1/10	85	85	79.5
1/20	NT	73	66.2
1/40	68	51	50.0
1/80	42	34	29.7
1/160	19	22	20.3
1/320	NT	13	7.8
<b>B3</b>			
1/5	89	93	85.5
1/10	82	84	76.3
1/20	62	64	61.7
1/40	37	44	42.5
1/80	14	26	26.2
1/160	NT	12	16.6
1/320	NT	7	8.9
<b>B4</b>			
1/5	93	94	90.3
1/10	93	95	88.5
1/20	92	93	85.1
1/40	89	89	81.1

10

20

30

40

【表 4 a - 3】

1/80	78	76	72.1
1/160	56	54	56.9
1/320	34	37	39.9
<b>B5</b>			
1/5	94	93	90.3
1/10	91	92	87.0
1/20	87	87	82.2
1/40	74	72	71.7
1/80	56	47	54.6
1/160	31	29	36.4
1/320	19	17	21.4
<b>刺激性血清</b>			
<b>S1</b>			
1/5	89	91	84.9
1/10	80	84	75.4
1/20	63	67	62.9
1/40	42	50	46.2
1/80	26	34	31.9
1/160	9	21	16.3
1/320	16	4	10.6

10

20

30

40

【 0 1 3 5 】

【表 4 b - 1】

[表 4 b]

テストサンプル	<sup>125</sup> I-5C9 結合阻害(%)	<sup>125</sup> I-TSH 結合阻害(%)	<sup>125</sup> I-M22 結合阻害(%)
アッセイキャリブレーター			
40 U/L	87.2	90.4	82.2
8 U/L	62.0	67.2	63.3
2 U/L	21.3	22.0	27.9
1 U/L	15.0	13.0	21.8
ポジティブコントロール血清	34.2	31.4	38.6
HBDプール	6.2	-0.6	12.5
S2			
ニート	91.8	95.1	88.6
1/5	76.7	84.5	72.7
1/10	62.3	71.4	66.4
1/20	48.2	57.0	51.9
1/40	31.8	39.3	41.4
1/80	21.3	19.4	32.9
1/160	16.8	9.7	25.1
S4			

10

20

30

40

【表 4 b - 2】

ニート	91.0	92.9	86.2
1/5	71.0	72.4	68.7
1/10	55.5	55.6	57.4
1/20	39.9	34.0	46.3
1/40	27.3	16.4	35.4
1/80	17.0	8.6	25.4
1/160	16.1	2.1	19.5

10

B 1 - B 5 はアンタゴニスト（遮断）活性を伴う高いレベルの T R A b を有する患者血清である。

B 3 は 5 C 9 に対するリンパ球ドナーからの血清である

S 1、S 2、および S 4 はアンタゴニスト（遮断）活性を伴う高いレベルの T R A b を有する患者血清である。

20

アッセイキャリブレーター 40 U / L、8 U / L、2 U / L、および 1 U / L、は、M 2 2 I g G を健常人血液ドナー血清（H B D プール）で希釈し、N I B S C 9 0 / 6 7 2 の U / L 活性を、標識した T S H が T S H R でコートしたチューブへ結合することの阻害率を用いて測定したものである。

【数 4】

$$\text{阻害率}\% = 100 - \left[ \frac{A}{B} \times 100 \right]$$

ここで、A = テストサンプル； B = H B D プール

30

N T = テストしない

1 / 5、1 / 10 等は H B D プールにおけるテスト血清の希釈率を示し、ニートは希釈無しを示す。

H B D プールの存在下、<sup>125</sup>I で標識した M 2 2 I g G、5 C 9 I g G、T S H の、それぞれ約 20 %、17 %、12 % がコートしたチューブへ結合した。

【0 1 3 6】

【表 5 - 1】

[表 5]

$^{125}\text{I}$ -標識TSH、 $^{125}\text{I}$ -M22 IgG、および $^{125}\text{I}$ -5C9 IgGのTSHRをコートしたチューブへの結合に対する、様々な濃度の抗TSHRマウスMAbによる阻害

テストサンプル		$^{125}\text{I}$ -TSH 阻害率(%)	$^{125}\text{I}$ -M22 IgG 阻害率(%)	$^{125}\text{I}$ -5C9 IgG 阻害率(%)
5C9 IgG	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	50	53	65.5
5C9 IgG	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	30	22	42
5C9 IgG	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	21	14	27
5C9 IgG	0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	8	6	10
5C9 IgG	0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2	5	0
7C71 IgG <sup>1</sup>	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	65	68	82
7C71 IgG	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	55	64	65
7C71 IgG	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	47	58	53
7C71 IgG	0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	28	37	17
7C71 IgG	0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$	8	14	5
10C31 IgG <sup>1</sup>	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	68	69	76
10C31 IgG	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	56	71	62
10C31 IgG	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	52	62	54
10C31 IgG	0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	39	48	36
10C31 IgG	0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15	24	8
2E71 IgG <sup>1</sup>	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	51	63	60
2E71 IgG	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	41	62	52

10

20

30

40

【表 5 - 2】

2E71 IgG	1 µg/mL	35.5	59	48	
2E71 IgG	0.1 µg/mL	30	43	32	
2E71 IgG	0.01 µg/mL	14.5	15	17.5	
3E71 IgG <sup>1</sup>	100 µg/mL	49	51	65	
3E71 IgG	10 µg/mL	37	51	50	10
3E71 IgG	1 µg/mL	37	45	40	
3E71 IgG	0.1 µg/mL	21.5	28	21	
3E71 IgG	0.01 µg/mL	12	15	3	
14D3 IgG <sup>1</sup>	100 µg/mL	57	62	63	
14D3 IgG	10 µg/mL	52	60	50.5	20
14D3 IgG	1 µg/mL	37	37	35	
14D3 IgG	0.1 µg/mL	12.5	15	10	
14D3 IgG	0.01 µg/mL	4	3	1	
16E5 IgG <sup>1</sup>	100 µg/mL	48	53	59	
16E5 IgG	10 µg/mL	44	51	53	
16E5 IgG	1 µg/mL	39	40	47	30
16E5 IgG	0.1 µg/mL	26	22	34	
16E5 IgG	0.01 µg/mL	9	12	20	
17D2 IgG <sup>1</sup>	100 µg/mL	56	49	55	
17D2 IgG	10 µg/mL	43	39	43	
17D2 IgG	1 µg/mL	24	24	26	40
17D2 IgG	0.1 µg/mL	7	13	11	

【表 5 - 3】

17D2 IgG	0.01 µg/mL	3	1	3
M22 IgG	100 µg/mL	95	95	88
M22 IgG	10 µg/mL	95	94	89
M22 IgG	1 µg/mL	94	93	87
M22 IgG	0.1 µg/mL	77	79	72
M22 IgG	0.01 µg/mL	22	32	24
9D33 IgG <sup>2</sup>	100 µg/mL	69	61	70
9D33 IgG	10 µg/mL	65	60	60
9D33 IgG	1 µg/mL	55	48	48
9D33 IgG	0.1 µg/mL	31	27	29
9D33 IgG	0.01 µg/mL	8	13	13
2G4 IgG <sup>3</sup>	100 µg/mL	3	3	6
2G4 IgG	10 µg/mL	3	4	10
2G4 IgG	1 µg/mL	0	0	8
2G4 IgG	0.1 µg/mL	4	6	4
2G4 IgG	0.01 µg/mL	0	0	0
2B4 IgG <sup>4</sup>	100 µg/mL	88.5	30	72
2B4 IgG	10 µg/mL	85	19	48
2B4 IgG	1 µg/mL	82	9	42
2B4 IgG	0.1 µg/mL	56	12	23
2B4 IgG	0.01 µg/mL	13.5	1	8
8E3 IgG <sup>4</sup>	100 µg/mL	82.5	27	65

10

20

30

40

【表 5 - 4】

8E3 IgG	10 µg/mL	72	18	42	
8E3 IgG	1 µg/mL	53	8	23	
8E3 IgG	0.1 µg/mL	17	0.5	9	
8E3 IgG	0.01 µg/mL	5	0	0	
4E2 IgG <sup>4</sup>	100 µg/mL	76	24	32	10
4E2 IgG	10 µg/mL	74	21	32	
4E2 IgG	1 µg/mL	57	15	20	
4E2 IgG	0.1 µg/mL	25	2	11	
4E2 IgG	0.01 µg/mL	4	1	5	
1D5 IgG <sup>4</sup>	100 µg/mL	77	26	26	20
1D5 IgG	10 µg/mL	72	20	20	
1D5 IgG	1 µg/mL	55	8	13	
1D5 IgG	0.1 µg/mL	23	0	3	
1D5 IgG	0.01 µg/mL	4	0	0	
7C4 IgG <sup>4</sup>	100 µg/mL	78	24	51	30
7C4 IgG	10 µg/mL	76	22	35	
7C4 IgG	1 µg/mL	72	22	36	
7C4 IgG	0.1 µg/mL	38	7	19	
7C4 IgG	0.01 µg/mL	9	6	6	
3E6 IgG <sup>4</sup>	100 µg/mL	84	46	55	40
3E6 IgG	10 µg/mL	79	31	40	
3E6 IgG	1 µg/mL	71	16	29	

【表 5 - 5】

3E6 IgG	0.1 µg/mL	28	5	9
3E6 IgG	0.01 µg/mL	3	0	6
1C52 IgG <sup>4</sup>	100 µg/mL	64	22	30
1C52 IgG	10 µg/mL	39	9	15
1C52 IgG	1 µg/mL	22	5	15
1C52 IgG	0.1 µg/mL	5	4	11
1C52 IgG	0.01 µg/mL	0	2	10
7B72 IgG <sup>4</sup>	100 µg/mL	88	32	39
7B72 IgG	10 µg/mL	77	21	27
7B72 IgG	1 µg/mL	50	14	22
7B72 IgG	0.1 µg/mL	16	2	13
7B72 IgG	0.01 µg/mL	8	1	4
8E2 IgG <sup>5</sup>	100 µg/mL	52	52	32
8E2 IgG	10 µg/mL	24.5	24	12
8E2 IgG	1 µg/mL	8	3	1
8E2 IgG	0.1 µg/mL	13	1	8
8E2 IgG	0.01 µg/mL	0	0	13
18C5 IgG <sup>6</sup>	100 µg/mL	57	50	51
18C5 IgG	10 µg/mL	17	14	24
18C5 IgG	1 µg/mL	3.5	2	17
18C5 IgG	0.1 µg/mL	3	0	13
18C5 IgG	0.01 µg/mL	0.7	0	14

10

20

30

40

【表 5 - 6】

2G2 IgG <sup>7</sup>	100 µg/mL	0.1	0	11
2G2 IgG	10 µg/mL	3	0.6	10
2G2 IgG	1 µg/mL	6	1.5	12
2G2 IgG	0.1 µg/mL	2	0.2	9
2G2 IgG	0.01 µg/mL	2	1.4	11

10

抗体は健常人血液ドナー血清のプールで希釈した（HBDプール）。

【数 5】

$$\text{阻害率\%} = 100 - \left[ \frac{A}{B} \times 100 \right]$$

ここで、A = テストサンプル存在下での結合率（%）； B = HBDプール存在下での結合率（%）

20

<sup>1</sup> 甲状腺刺激活性を有するマウスTSHR MA b

<sup>2</sup> TSHおよびTRAb両方が仲介するサイクリックAMP生産の刺激を遮断するマウスTSHR MA b

<sup>3</sup> 甲状腺ペルオキシダーゼMA bに対するヒトMA b（ネガティブコントロール）

<sup>4</sup> TSH遮断活性を有するマウスTSHR MA b（TSHRアミノ酸381 - 385により形成されるエピトープを認識する）

<sup>5</sup> TSH遮断活性を有するマウスTSHR MA b（TSHRアミノ酸36 - 42により形成されるエピトープを認識する）

<sup>6</sup> TSH遮断活性を有するマウスTSHR MA b（TSHRアミノ酸246 - 260により形成されるエピトープを認識する）

30

<sup>7</sup> マウスTg MA b（ネガティブコントロール）

HBDプールの存在下、<sup>125</sup>Iで標識したM22 IgG、5C9 IgG、TSHの、それぞれ約13%、24%、15%がコートしたチューブへ結合する。

【0137】

## 【表 6 a - 1】

## [表 6 a]

ヒトTSHRを発現するCHO細胞における患者血清中のTRAbによるサイクリックAMP産生刺激に対する、5C9IgGの効果

## 実験 1 a

テストサンプル	サイクリックAMP (fmol/cell well; 平均±SD、n=3)
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ	378 ±21
HBDプールのみ	352 ±38
HBDプール + 2G4 IgG	316 ±54
HBDプール + 5C9 IgG	136 ±46
T1のみ	13734 ±580
T1 + 2G4 IgG	10928 ±740
T1 + 5C9 IgG	142 ±4
T2のみ	1716 ±185
T2 + 2G4 IgG	1362 ±190
T2 + 5C9 IgG	146 ±4
T3のみ	11722 ±1280
T3 + 2G4 IgG	11948 ±3200
T3 + 5C9 IgG	5660 ±790
T4のみ	6388 ±820
T4 + 2G4 IgG	6022 ±710
T4 + 5C9 IgG	188 ±65

10

20

30

40

【表 6 a - 2】

T5のみ	3084 ±990
T5 + 2G4 IgG	2152 ±240
T5 + 5C9 IgG	152 ±15
T6のみ	14802 ±1475
T6 + 2G4 IgG	10878 ±675
T6 + 5C9 IgG	232 ±25

10

【表 6 a - 3】

実験 1 b

テストサンプル	サイクリックAMP (fmol/cell well; 平均±SD、n=3)
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ	434 ±52
HBDプールのみ	518 ±216
HBDプール + 2G4 IgG	378 ±34
HBDプール + 5C9 IgG	178 ±47
T7のみ	7388 ±1250
T7 + 2G4 IgG	5696 ±715
T7 + 5C9 IgG	ud
T8のみ	1736 <sup>1</sup>
T8 + 2G4 IgG	1392 <sup>1</sup>
T8 + 5C9 IgG	ud
T9のみ	5052 <sup>1</sup>
T9 + 2G4 IgG	5000 <sup>1</sup>
T9 + 5C9 IgG	ud

20

30

40

【表 6 a - 4】

実験 1 c

サンプル	サイクリックAMP (fmol/cell well; 平均±SD、n=3)
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ	366 ±316
HBDプールのみ	646 ±62
HBDプール + 2G4 IgG	496 ±42
HBDプール + 5C9 IgG	294 ±92
T13 のみ	4030 ±1146
T13 + 2G4 IgG	3330 ±63
T13 + 5C9 IgG	540 ±36
T14 のみ	5490 ±197
T14 + 2G4 IgG	4470 ±1867
T14 + 5C9 IgG	510 ±146
T15 のみ	2130 ±387
T15 + 2G4 IgG	2380 ±320
T15 + 5C9 IgG	ud
T16 のみ	4990 ±155
T16 + 2G4 IgG	5270 ±941
T16 + 5C9 IgG	ud
T17 のみ	4410 ±470
T17 + 2G4 IgG	4460 ±288

【表 6 a - 5】

T17 + 5C9 IgG	ud
T18 のみ	910 ±126
T18 + 2G4 IgG	830 ±21
T18 + 5C9 IgG	ud

10

20

30

40

【表 6 a - 6】

## 実験 1 d

サンプル	サイクリックAMP (fmol/cell well; 平均±SD、n=3)
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ	487 ±75
HBDプールのみ	285 ±71
HBDプール+ 2G4 IgG	311 ±68
HBDプール+ 5C9 IgG	108 ±33
T11のみ	4052 ±233
T11 + 2G4 IgG	4659 ±1260
T11 + 5C9 IgG	154 ±33
T12のみ	4058 ±721
T12 + 2G4 IgG	5556 ±593
T12 + 5C9 IgG	145 ±24

10

20

30

u d = 検出されず

<sup>1</sup> = 二重測定

HBDプールは健常人血液ドナー血清のプールである；これらの実験では、1：10に希釈したサイクリックAMPアッセイ緩衝液を使用した。

T1 - T9およびT11 - T18はTSHRを発現するCHO細胞においてサイクリックAMP産生を刺激する血清である。T1 - T9およびT11 - T18はサイクリックAMPアッセイ緩衝液で1：10に希釈してテストした。

2G4は甲状腺ペルオキシダーゼに対するヒトモノクローナル抗体である（ネガティブコントロール）。

2G4 IgGおよび5C9 IgGは100 μg/mLでテストした。

【0138】

【表 6 b - 1】

[表 6 b]

ヒト TSHR を発現する CHO 細胞における患者血清中の TRAb によるサイクリック AMP 産生刺激に対する、5C9IgG および 9D33IgG の量依存的効果

実験 2

テストサンプル	サイクリックAMP (fmol/cell well; 平均±SD、n=3)
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ	707 ±147
HBDプールのみ	503 ±80
T1 のみ	20336 ±1539
100 µg/mL 2G4 IgG (ネガティブコントロール)のみ	1207 ±123
T1 + 100 µg/mL 2G4 IgG	22078 ±2546
T1 + 10 µg/mL 2G4 IgG	18868 ±1806
T1 + 1 µg/mL 2G4 IgG	19025 ±1450
T1 + 0.1 µg/mL 2G4 IgG	16659 ±1031
T1 + 0.01 µg/mL 2G4 IgG	20876 ±1887
T1 + 0.001 µg/mL 2G4 IgG	18134 ±2126
100 µg/mL 9D33 IgG のみ	721 ±183
T1 + 100 µg/mL 9D33 IgG	1061 ±104
T1 + 10 µg/mL 9D33 IgG	1464 ±191
T1 + 1 µg/mL 9D33 IgG	4990 ±1670

10

20

30

40

【表 6 b - 2】

T1 + 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 9D33 IgG	17867 $\pm$ 2220
T1 + 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 9D33 IgG	19943 $\pm$ 1834
T1 + 0.001 $\mu\text{g/mL}$ 9D33 IgG	21648 $\pm$ 502
100 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG only	301 $\pm$ 38
T1 + 100 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	724 $\pm$ 28
T1 + 10 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	1119 $\pm$ 348
T1 + 1 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	2428 $\pm$ 594
T1 + 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	16152 $\pm$ 3577
T1 + 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	20314 $\pm$ 279
T1 + 0.001 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	16868 $\pm$ 912

10

20

T 1 は、T S H R を発現する C H O 細胞におけるサイクリック A M P 産生を刺激する、患者の血清サンプルである；これらの実験ではサイクリック A M P アッセイ緩衝液で 1 : 1 0 に希釈したものをを用いた。

2 G 4 は甲状腺ペルオキシダーゼに対するヒトモノクローナル抗体である（ネガティブコントロール）。

9 D 3 3 は、T S H R を発現する C H O 細胞における、T S H および T R A b によるサイクリック A M P 産生を遮断するマウス抗体である（表 2 を参照）。

【 0 1 3 9 】

30

【表 6 c - 1】

[表 6 c]

ls

ヒトTSHRを発現するCHO細胞における患者血清TRA bによるサイクリックAMP産生刺激に対する、5C9 IgGの量依存的効果

## 実験 3

テストサンプル	サイクリックAMP (fmol/cell well; 平均±SD、n=3)
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ	757 ±138
HBDプールのみ	512 ±76
T6のみ	14216 ±3985
100 µg/mL 9D33 IgGのみ	729 ±31
T6 + 100 µg/mL 9D33 IgG	1052 ±702
T6 + 10 µg/mL 9D33 IgG	2256 ±1088
T6 + 1 µg/mL 9D33 IgG	5447 ±313
T6 + 0.1 µg/mL 9D33 IgG	8700 ±665
T6 + 0.01 µg/mL 9D33 IgG	10290 ±495
T6 + 0.001 µg/mL 9D33 IgG	10296 <sup>1</sup>
100 µg/mL 5C9 IgGのみ	360 ±38
T6 + 100 µg/mL 5C9 IgG	295 ±30
T6 + 10 µg/mL 5C9 IgG	1027 ±368
T6 + 1 µg/mL 5C9 IgG	2368 ±528
T6 + 0.1 µg/mL 5C9 IgG	9533 ±1679

【表 6 c - 2】

T6 + 0.01 µg/mL 5C9 IgG	13883 ±1718
T6 + 0.001 µg/mL 5C9 IgG	11843 ±1241

<sup>1</sup> 一回の測定

説明注釈については表 6 a および 6 b を参照

【 0 1 4 0 】

【 表 6 d - 1 】

[ 表 6 d ]

ヒト TSHR を発現する CHO 細胞における患者血清中の TRAb によるサイクリック AMP 産生刺激に対する、5C9IgG の量依存的効果

サンプル	サイクリックAMP (fmol/cell well; 平均±SD、n=3)
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ	622 ±79
HBDプールのみ	479 ±53
T3 のみ	14023 ±2487
100 µg/mL 2G4 IgG のみ	745 ±136
T3 + 100 µg/mL 2G4 IgG	12086 ±2613
T3 + 10 µg/mL 2G4 IgG	12862 ±250
T3 + 1 µg/mL 2G4 IgG	12931 ±891
T3 + 0.1 µg/mL 2G4 IgG	13853 ±1589
T3 + 0.01 µg/mL 2G4 IgG	11939 ±131
T3 + 0.001 µg/mL 2G4 IgG	13650 ±1679
100 µg/mL 9D33 IgG only	616 ±111
T3 + 100 µg/mL 9D33 IgG	1597 ±323
T3 + 10 µg/mL 9D33 IgG	4262 ±367
T3 + 1 µg/mL 9D33 IgG	7385 ±554
T3 + 0.1 µg/mL 9D33 IgG	11960 ±1390
T3 + 0.01 µg/mL 9D33 IgG	12178 ±1676

10

20

30

40

【表 6 d - 2】

T3 + 0.001 $\mu\text{g/mL}$ 9D33 IgG	12159 $\pm$ 2970
100 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG のみ	212 $\pm$ 40
T3 + 100 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	6136 $\pm$ 558
T3 + 10 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	7806 $\pm$ 793
T3 + 1 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	8075 $\pm$ 610
T3 + 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	10414 $\pm$ 1094
T3 + 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	13743 $\pm$ 1687
T3 + 0.001 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	11641 $\pm$ 2168

10

説明注釈については表 6 a および 6 b を参照

20

【 0 1 4 1 】

【表 6 e - 1】

[表 6 e]

ヒト TSHR を発現する CHO 細胞における患者血清中の TRAb によるサイクリック AMP 産生刺激に対する、5C9 IgG の量依存的効果

サンプル	サイクリックAMP (fmol/cell well; 平均±SD、n=3)
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ	616 ±161
HBDプールのみ	312 ±56
T19 のみ	6014 ±280
100 µg/mL 2G4 IgG のみ	1058 ±75
T19 + 100 µg/mL 2G4 IgG	7142 ±215
T19 + 10 µg/mL 2G4 IgG	6182 ±46
T19 + 1 µg/mL 2G4 IgG	7280 ±1052
T19 + 0.1 µg/mL 2G4 IgG	7275 ±145
T19 + 0.01 µg/mL 2G4 IgG	6820 ±729
T19 + 0.001 µg/mL 2G4 IgG	7620 ±870
100 µg/mL 9D33 IgG のみ	592 ±168
T19 + 100 µg/mL 9D33 IgG	550 ±65
T19 + 10 µg/mL 9D33 IgG	448 ±76
T19 + 1 µg/mL 9D33 IgG	404 ±36
T19 + 0.1 µg/mL 9D33 IgG	2394 <sup>1</sup>
T19 + 0.01 µg/mL 9D33 IgG	5765 <sup>1</sup>

10

20

30

40

【表 6 e - 2】

T19 + 0.001 $\mu\text{g/mL}$ 9D33 IgG	7088 $\pm$ 668
100 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG のみ	186 <sup>2</sup>
T19 + 100 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	220 $\pm$ 90
T19 + 10 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	275 $\pm$ 150
T19 + 1 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	187 $\pm$ 34
T19 + 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	375 $\pm$ 129
T19 + 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	5747 $\pm$ 411
T19 + 0.001 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	6467 <sup>1</sup>

10

<sup>1</sup> 二重サンプルの平均

<sup>2</sup> 1 回の測定

説明注釈については表 6 a および 6 b を参照

【 0 1 4 2 】

20

【表 6 f - 1】

[表 6 f]

ヒト TSHR を発現する CHO 細胞における患者血清中の TRAb によるサイクリック AMP 産生刺激に対する、5C9 IgG の量依存的効果

サンプル	サイクリックAMP (fmol/cell well; 平均±SD、n=3)
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ	255 ±40
HBDプールのみ	200 ±82
T20のみ	4764 ±732
100 µg/mL 2G4 IgGのみ	835 ±94
T20 + 100 µg/mL 2G4 IgG	6684 ±931
T20 + 10 µg/mL 2G4 IgG	4571 ±776
T20 + 1 µg/mL 2G4 IgG	5744 ±727
T20 + 0.1 µg/mL 2G4 IgG	4323 ±849
T20 + 0.01 µg/mL 2G4 IgG	6396 ±1314
T20 + 0.001 µg/mL 2G4 IgG	6789 ±893
100 µg/mL 9D33 IgGのみ	382 ±142
T20 + 100 µg/mL 9D33 IgG	287 ±164
T20 + 10 µg/mL 9D33 IgG	204 ±49
T20 + 1 µg/mL 9D33 IgG	980 <sup>1</sup>
T20 + 0.1 µg/mL 9D33 IgG	5362 ±574
T20 + 0.01 µg/mL 9D33 IgG	5389 ±1139

10

20

30

40

【表 6 f - 2】

T20 + 0.001 µg/mL 9D33 IgG	7514 ±785
100 µg/mL 5C9 IgG のみ	224 ±109
T20 + 100 µg/mL 5C9 IgG	NT
T20 + 10 µg/mL 5C9 IgG	NT
T20 + 1 µg/mL 5C9 IgG	181 <sup>1</sup>
T20 + 0.1 µg/mL 5C9 IgG	2184 ±1078
T20 + 0.01 µg/mL 5C9 IgG	6486 ±436
T20 + 0.001 µg/mL 5C9 IgG	4856 <sup>1</sup>

10

20

<sup>1</sup>二重サンプルの平均

NT = テストせず

説明注釈については表 6 a および 6 b を参照

【 0 1 4 3 】

【表 6 g - 1】

[表 6 g]

ヒト TSHR を発現する CHO 細胞における患者血清中の TRAb によるサイクリック AMP 産生刺激に対する、5C9 IgG の量依存的効果

サンプル	サイクリックAMP (fmol/cell well; 平均±SD、n=3)
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ	466 ±65
HBDプールのみ	390 ±118
T21 のみ	9781 ±1672
100 µg/mL 2G4 IgG のみ	999 ±55
T21 + 100 µg/mL 2G4 IgG	10848 ±373
T21 + 10 µg/mL 2G4 IgG	10355 ±469
T21 + 1 µg/mL 2G4 IgG	10831 ±140
T21 + 0.1 µg/mL 2G4 IgG	12215 ±793
T21 + 0.01 µg/mL 2G4 IgG	13014 ±855
T21 + 0.001 µg/mL 2G4 IgG	10500 ±162
100 µg/mL 9D33 IgG のみ	534 ±89
T21 + 100 µg/mL 9D33 IgG	442 ±32
T21 + 10 µg/mL 9D33 IgG	605 ±254
T21 + 1 µg/mL 9D33 IgG	1383 ±66
T21 + 0.1 µg/mL 9D33 IgG	8719 ±389
T21 + 0.01 µg/mL 9D33 IgG	10772 ±799

10

20

30

40

【表 6 g - 2】

T21 + 0.001 $\mu\text{g/mL}$ 9D33 IgG	10229 $\pm$ 714
100 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG のみ	253 $\pm$ 25
T21 + 100 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	210 $\pm$ 60
T21 + 10 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	303 $\pm$ 107
T21 + 1 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	418 $\pm$ 65
T21 + 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	7483 $\pm$ 415
T21 + 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	10441 $\pm$ 122
T21 + 0.001 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	11281 $\pm$ 911

10

説明注釈については表 6 a および 6 b を参照

20

【 0 1 4 4 】

【表 7 a】

[表 7 a]

野生型TSHRおよびLys 58をアラニンに変異させたTSHRを発現するCHO細胞における、TSHにより誘導されたサイクリックAMP産生。5C9 IgGの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞 ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	315 ±39	822 ±52	260
TSHのみ	10730 ±1737	13228 ±1428	123
2G4 10 µg/mL + TSH	11707 ±2291	12883 ±2107	110
2G4 100 µg/mL + TSH	9640 ±1664	10148 ±3680	105
5C9 0.01 µg/mL + TSH	7341 ±343	7913 ±880	108
5C9 0.1 µg/mL + TSH	4635 ±257	4815 <sup>1</sup>	104
5C9 1.0 µg/mL + TSH	918 ±159	1794 ±308	195
5C9 10 µg/mL + TSH	351 ±187	955 ±405	272
5C9 100 µg/mL + TSH	528 ±363	1001 ±306	190
5C9 100 µg/mL のみ	47 ±15	<25	-

<sup>1</sup>二重測定の平均値

p TSH濃度 = 3 ng / mL

全ての希釈液はサイクリックAMPアッセイ緩衝液

2G4は甲状腺ペルオキシダーゼに対するヒトモノクローナル抗体である(5C9に対するネガティブコントロール)

【 0 1 4 5 】

10

20

30

【表 7 b】

[表 7 b]

野生型TSHRおよびI1e60をアラニンに変異させたTSHRを発現するCHO細胞における、TSHにより誘導されたサイクリックAMP産生。5C9IgGの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	470 ±92	837 ±78	114
TSHのみ	18654 <sup>1</sup>	22935 ±2542	123
2G4 10 µg/mL + TSH	17555 <sup>1</sup>	22960 ±4312	131
2G4 100 µg/mL + TSH	18654 ±3979	24488 ±4501	131
5C9 0.01 µg/mL + TSH	8018 ±276	18952 ±1811	236
5C9 0.1 µg/mL + TSH	7097 ±613	11609 ±1415	164
5C9 1.0 µg/mL + TSH	1568 ±133	3290 ±64	210
5C9 10 µg/mL + TSH	1772 ±632	1211 ±343	68
5C9 100 µg/mL + TSH	1733 ±132	3134 ±794	181
5C9 100 µg/mL のみ	61 ±8	260 ±43	426

説明注釈については表 7 a を参照

【 0 1 4 6 】

10

20

30

## 【表 7 c】

[表7c]

野生型TSHRおよびArg 80をアラニンに変異させたTSHRを発現するCHO細胞における、TSHにより誘導されたサイクリックAMP産生。5C9 IgGの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	775 ±66	1165 ±32	150
TSHのみ	12467 ±510	12930 ±179	104
2G4 10 µg/mL + TSH	13600 ±1555	14849 ±462	109
2G4 100 µg/mL + TSH	11726 ±177	13539 ±314	115
5C9 0.01 µg/mL + TSH	14410 ±1331	14273 ±1845	99
5C9 0.1 µg/mL + TSH	11256 ±1627	9278 ±837	82
5C9 1.0 µg/mL + TSH	6704 ±791	1358 ±500	20
5C9 10 µg/mL + TSH	2107 ±264	1163 ±415	55
5C9 100 µg/mL + TSH	2234 ±540	518 ±133	23
5C9 100 µg/mL のみ	244 ±92	494 ±163	202

10

20

30

説明注釈については表 7 a を参照

【 0 1 4 7 】

【表 7 d】

[表 7 d]

野生型TSHRおよびArg 80をアスパラギン酸に変異させたTSHRを発現するCHO細胞における、TSHにより誘導されたサイクリックAMP産生。5C9 IgGの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	548 ±67	637 ±96	116
TSHのみ	13598 ±3445	19400 ±1684	143
2G4 10 µg/mL + TSH	14795 ±2776	19430 ±1779	131
2G4 100 µg/mL + TSH	15500 ±897	16003 ±237	103
5C9 0.01 µg/mL + TSH	13082 <sup>1</sup>	21021 ±2838	161
5C9 0.1 µg/mL + TSH	6326 ±358	4420 ±182	70
5C9 1.0 µg/mL + TSH	2635 ±326	1912 ±101	73
5C9 10 µg/mL + TSH	1906 ±146	1249 ±329	66
5C9 100 µg/mL + TSH	1613 ±176	1274 ±15	79
5C9 100 µg/mLのみ	300 ±45	523 ±3	174

説明注釈については表 7 a を参照

【 0 1 4 8 】

10

20

30

【表 7 e】

[表 7 e]

野生型 TSHR および Tyr 82 をアラニンに変異させた TSHR を発現する CHO 細胞における、TSH により誘導されたサイクリック AMP 産生。5C9 IgG の様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリック AMP 産生 (fmol/細胞ウエル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型 TSHR	変異 TSHR	
サイクリック AMP アッセイ 緩衝液のみ	557 ±27	1219 ±49	219
TSH のみ	12674 ±234	15327 ±2041	121
2G4 10 µg/mL + TSH	13587 ±967	17585 <sup>1</sup>	129
2G4 100 µg/mL + TSH	13518 ±894	15395 ±1777	113
5C9 0.01 µg/mL + TSH	13902 ±1970	15737 ±1442	113
5C9 0.1 µg/mL + TSH	6250 ±1143	12692 ±3138	203
5C9 1.0 µg/mL + TSH	1600 ±467	2955 ±732	185
5C9 10 µg/mL + TSH	822 ±99	1646 ±308	200
5C9 100 µg/mL + TSH	978 ±102	1028 ±216	105
5C9 100 µg/mL のみ	289 ±30	1427 ±419	494

説明注釈については表 7 a を参照

【 0 1 4 9 】

10

20

30

## 【表 7 f】

[表 7 f]

野生型TSHRおよびThr104をアラニンに変異させたTSHRを発現するCHO細胞における、TSHにより誘導されたサイクリックAMP産生。5C9 IgGの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	590 ±59	640 ±95	108
TSHのみ	11294 ±1307	14247 ±3093	126
2G4 10 µg/mL + TSH	14255 ±1410	13227 ±1782	93
2G4 100 µg/mL + TSH	13422 ±2337	15499 ±2042	115
5C9 0.01 µg/mL + TSH	12307 ±1080	11733 ±422	95
5C9 0.1 µg/mL + TSH	7097 ±79	9506 ±738	134
5C9 1.0 µg/mL + TSH	3699 ±391	6196 ±1075	168
5C9 10 µg/mL + TSH	1796 ±417	3094 ±740	172
5C9 100 µg/mL + TSH	2218 ±395	3110 ±412	140
5C9 100 µg/mL のみ	195 ±23	264 ±102	135

説明注釈については表 7 a を参照

【 0 1 5 0 】

10

20

30

【表 7 g】

[表 7 g]

野生型 TSHR および Arg109 をアラニンに変異させた TSHR を発現する CHO 細胞における、TSH により誘導されたサイクリック AMP 産生。5C9IG の様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリック AMP 産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型 TSHR	変異 TSHR	
サイクリック AMP アッセイ 緩衝液のみ	381 ±28	675 ±50	177
TSHのみ	13823 ±5141	9769 ±372	71
2G4 10 µg/mL + TSH	14428 ±8959	9524 ±1014	66
2G4 100 µg/mL + TSH	19307 ±3130	8800 ±631	46
5C9 0.01 µg/mL + TSH	10820 ±1644	9651 ±1066	89
5C9 0.1 µg/mL + TSH	4011 ±1290	1719 ±40	43
5C9 1.0 µg/mL + TSH	1206 ±88	827 ±157	69
5C9 10 µg/mL + TSH	706 ±282	827 ±147	117
5C9 100 µg/mL + TSH	1230 ±120	561 ±164	46
5C9 100 µg/mL のみ	228 ±45	335 ±14	147

説明注釈については表 7 a を参照

【 0 1 5 1 】

10

20

30

## 【表 7 h】

[表 7 h]

野生型TSHRおよびLys129をアラニンに変異させたTSHRを発現するCHO細胞における、TSHにより誘導されたサイクリックAMP産生。5C9 IgGの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	370 ±97	590 ±17	159
TSHのみ	15632 ±2362	15502 ±547	99
2G4 10 µg/mL + TSH	11344 ±3278	14787 ±986	130
2G4 100 µg/mL + TSH	12580 ±2397	14148 ±1033	112
5C9 0.01 µg/mL + TSH	10545 ±161	12161 ±1797	115
5C9 0.1 µg/mL + TSH	2714 ±154	13257 ±2414	488
5C9 1.0 µg/mL + TSH	1008 ±229	12837 ±1148	1274
5C9 10 µg/mL + TSH	548 ±26	11175 <sup>1</sup>	2039
5C9 100 µg/mL + TSH	491 ±73	15929 ±1228	3244
5C9 100 µg/mLのみ	107 ±18	217 ±36	203

説明注釈については表 7 a を参照

【 0 1 5 2 】

10

20

30

【表 7 i】

[表 7 i]

野生型TSHRおよびPhe134をアラニンに変異させたTSHRを発現するCHO細胞における、TSHにより誘導されたサイクリックAMP産生。5C9 IgGの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	347 ±88	867 ±129	250
TSHのみ	17641 ±2133	15497 ±1691	88
2G4 10 µg/mL + TSH	13759 ±116	17235 ±1602	125
2G4 100 µg/mL + TSH	11224 ±4039	16213 ±1948	144
5C9 0.01 µg/mL + TSH	13584 ±1268	15872 ±1140	117
5C9 0.1 µg/mL + TSH	8702 ±1542	6368 ±778	73
5C9 1.0 µg/mL + TSH	4542 ±104	1944 ±838	43
5C9 10 µg/mL + TSH	2394 ±44	1058 ±189	44
5C9 100 µg/mL + TSH	1393 ±128	1069 ±65	77
5C9 100 µg/mL のみ	212 ±6	337 ±60	159

説明注釈については表 7 a を参照

【 0 1 5 3 】

10

20

30

【表 7 j】

[表 7 j]

野生型TSHRおよびAsp151をアラニンに変異させたTSHRを発現するCHO細胞における、TSHにより誘導されたサイクリックAMP産生。5C9 IgGの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	508 ±341	1236 ±88	243
TSHのみ	11266 ±76	10455 ±771	93
2G4 10 µg/mL + TSH	15208 ±1686	10713 ±1859	70
2G4 100 µg/mL + TSH	11915 ±1366	10416 ±3434	114
5C9 0.01 µg/mL + TSH	11245 ±1583	12616 ±1295	112
5C9 0.1 µg/mL + TSH	6949 ±99	9956 ±983	143
5C9 1.0 µg/mL + TSH	1388 ±238	6450 ±2088	465
5C9 10 µg/mL + TSH	380 ±108	2276 ±1238	599
5C9 100 µg/mL + TSH	945 ±180	1535 ±378	162
5C9 100 µg/mL のみ	176 ±49	395 ±42	224

10

20

30

説明注釈については表 7 a を参照

【 0 1 5 4 】

【表 7 k】

[表 7 k]

野生型TSHRおよびAsp151をアルギニンに変異させたTSHRを発現するCHO細胞における、TSHにより誘導されたサイクリックAMP産生。  
5C9 IgGの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	703 ±107	768 ±82	109
TSHのみ	11131 ±3208	19990 ±458	180
2G4 10 µg/mL + TSH	15927 ±2244	18846 ±3293	118
2G4 100 µg/mL + TSH	13643 ±3195	21275 ±1580	156
5C9 0.01 µg/mL + TSH	12351 ±5559	18254 ±1877	148
5C9 0.1 µg/mL + TSH	6694 ±3111	10561 ±1025	158
5C9 1.0 µg/mL + TSH	2754 ±166	2591 ±472	94
5C9 10 µg/mL + TSH	1217 <sup>1</sup>	1609 ±69	132
5C9 100 µg/mL + TSH	1572 ±515	2330 ±273	148
5C9 100 µg/mL のみ	260 ±156	409 ±88	157

説明注釈については表 7 a を参照

【 0 1 5 5 】

10

20

30

【表 7 1】

[表 7 1]

野生型TSHRおよびAsp160をリジンに変異させたTSHRを発現するCHO細胞における、M22により誘導されたサイクリックAMP産生。5C9 IgGの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	787 ±119	1252 ±274	159
TSHのみ	16750 ±1515	14288 ±1260	85
2G4 10 µg/mL + M22	16188 ±1463	15476 ±468	96
2G4 100 µg/mL + M22	15505 ±2665	12638 ±819	82
5C9 0.01 µg/mL + M22	16719 ±541	15239 ±445	91
5C9 0.1 µg/mL + M22	9385 ±4006	7704 ±703	82
5C9 1.0 µg/mL + M22	821 ±268	963 ±204	117
5C9 10 µg/mL + M22	208 ±89	642 ±386	309
5C9 100 µg/mL + M22	301 ±182	657 ±87	218
5C9 100 µg/mL のみ	429 ±49	458 ±8	107
M22 のみ(反復測定)	16702 ±2170	18892 ±2113	113

10

20

30

40

M22 濃度 = 3 ng / mL

説明注釈については表 7 a を参照

【 0 1 5 6 】

【表 7 m】

[表 7 m]

野生型TSHRおよびLys183をアラニンに変異させたTSHRを発現するCHO細胞における、TSHにより誘導されたサイクリックAMP産生。5C9 IgGの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	642 ±34	1153 ±236	180
TSHのみ	22385 ±532	20210 ±1366	90
2G4 10 µg/mL + TSH	20148 ±2625	23254 ±3027	115
2G4 100 µg/mL + TSH	19926 <sup>1</sup>	22442 ±2489	113
5C9 0.01 µg/mL + TSH	17974 <sup>1</sup>	23284 ±2243	130
5C9 0.1 µg/mL + TSH	11499 ±892	24289 ±720	211
5C9 1.0 µg/mL + TSH	3489 ±606	14586 ±155	418
5C9 10 µg/mL + TSH	1234 ±357	7568 ±605	618
5C9 100 µg/mL + TSH	1456 ±838	11448 ±933	786
5C9 100 µg/mL のみ	384 ±19	747 ±230	195

説明注釈については表 7 a を参照。

【 0 1 5 7 】

10

20

30

【表 7 n】

[表 7 n]

野生型TSHRおよびLys 183をアスパラギン酸に変異させたTSHRを発現するCHO細胞における、TSHにより誘導されたサイクリックAMP産生。

5C9 IgGの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	486 ±151	737 ±54	152
TSHのみ	14730 ±1647	17668 ±597	120
2G4 10 µg/mL + TSH	14234 ±1097	17133 ±2281	120
2G4 100 µg/mL + TSH	14737 ±1905	16071 ±1188	109
5C9 0.01 µg/mL + TSH	12911 ±2357	20614 ±2552	160
5C9 0.1 µg/mL + TSH	8577 ±615	17344 ±2898	202
5C9 1.0 µg/mL + TSH	3424 ±135	12655 ±835	370
5C9 10 µg/mL + TSH	1114 ±112	6587 ±1480	591
5C9 100 µg/mL + TSH	1720 ±119	9007 ±1295	524
5C9 100 µg/mL のみ	<12.5	54 ±8	-

説明注釈については表 7 a を参照。

【 0 1 5 8 】

10

20

30

【表 7 o】

[表 7 o]

野生型 TSHR および G1n235 をアラニンに変異させた TSHR を発現する CHO 細胞における、TSH により誘導されたサイクリック AMP 産生。

5C9 IgG の様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	478 ±94	713 ±52	149
TSHのみ	14882 ±944	15844 ±922	106
2G4 10 µg/mL + TSH	17754 ±3150	18900 ±3098	106
2G4 100 µg/mL + TSH	12991 <sup>1</sup>	18598 ±2708	143
5C9 0.01 µg/mL + TSH	7181 ±618	17535 ±3692	244
5C9 0.1 µg/mL + TSH	7784 ±1111	7437 ±1183	96
5C9 1.0 µg/mL + TSH	2545 ±471	2416 ±423	95
5C9 10 µg/mL + TSH	532 ±65	1023 ±400	192
5C9 100 µg/mL + TSH	747 ±114	727 ±168	97
5C9 100 µg/mL のみ	119 ±28	256 ±86	215

説明注釈については表 7 a を参照。

【 0 1 5 9 】

10

20

30

【表 7 p】

[表 7 p]

野生型TSHRおよびArg 255をアラニンに変異させたTSHRを発現するCHO細胞における、TSHにより誘導されたサイクリックAMP産生。5C9 Ig Gの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	538 ±12	797 ±113	148
TSHのみ	14362 ±3305	15243 ±2093	106
2G4 10 µg/mL + TSH	14444 ±3161	19042 ±1085	132
2G4 100 µg/mL + TSH	16810 ±3461	17710 ±4886	105
5C9 0.01 µg/mL + TSH	6624 ±1236	8124 ±395	123
5C9 0.1 µg/mL + TSH	3788 ±838	4137 ±537	109
5C9 1.0 µg/mL + TSH	966 ±150	1941 ±113	201
5C9 10 µg/mL + TSH	867 ±100	692 ±152	80
5C9 100 µg/mL + TSH	1013 ±247	809 ±248	80
5C9 100 µg/mL のみ	32 <sup>1</sup>	248 ±94	775

説明注釈については表 7 a を参照。

【 0 1 6 0 】

10

20

30

【表 7 q】

[表 7 q]

野生型TSHRおよびArg 255をアスパラギン酸に変異させたTSHRを発現するCHO細胞における、TSHにより誘導されたサイクリックAMP産生。

5C9 IgGの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	620 ±33	616 <sup>1</sup>	99
TSHのみ	17531 ±1730	18081 ±2439	103
2G4 10 µg/mL + TSH	19870 ±2766	15519 ±702	78
2G4 100 µg/mL + TSH	18265 ±1999	19638 ±1505	108
5C9 0.01 µg/mL + TSH	17518 ±2407	15654 ±148	89
5C9 0.1 µg/mL + TSH	6604 ±1552	5583 ±655	85
5C9 1.0 µg/mL + TSH	3375 ±227	1932 ±677	57
5C9 10 µg/mL + TSH	1244 ±565	735 ±9	59
5C9 100 µg/mL + TSH	1506 ±151	1414 ±568	94
5C9 100 µg/mL のみ	278 ±125	559 ±97	201

説明注釈については表 7 a を参照。

【 0 1 6 1 】

10

20

30

## 【表 7 r】

[表 7 r]

野生型TSHRおよびT r p 2 5 8をアラニンに変異させたTSHRを発現するCHO細胞における、TSHにより誘導されたサイクリックAMP産生。

5C9 I g Gの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	354 ±28	382 ±55	108
TSHのみ	21023 ±2104	7095 ±1086	33
2G4 10 µg/mL + TSH	19564 ±1076	7070 ±148	36
2G4 100 µg/mL + TSH	21591 ±2652	6066 ±336	28
5C9 0.01 µg/mL + TSH	19471 ±1456	6619 ±511	34
5C9 0.1 µg/mL + TSH	10455 ±1968	1944 ±168	19
5C9 1.0 µg/mL + TSH	2616 ±118	1127 ±24	43
5C9 10 µg/mL + TSH	1192 ±253	357 ±11	30
5C9 100 µg/mL + TSH	1316 ±283	484 ±247	37
5C9 100 µg/mLのみ	211 ±35	423 ±109	200

説明注釈については表 7 a を参照。

【 0 1 6 2 】

10

20

30

## 【表 7 s】

[表 7 s]

野生型TSHRおよびSer 281をアラニンに変異させたTSHRを発現するCHO細胞における、TSHにより誘導されたサイクリックAMP産生。5C9 IgGの様々な希釈による効果

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	496 ±72	1094 ±132	221
TSHのみ	13562 ±3416	26450 <sup>1</sup>	195
2G4 10 µg/mL + TSH	16805 ±1139	25086 ±1730	149
2G4 100 µg/mL + TSH	14334 ±860	27672 ±3549	193
5C9 0.01 µg/mL + TSH	13791 ±3221	28966 ±3443	210
5C9 0.1 µg/mL + TSH	9071 ±1696	15560 ±5836	172
5C9 1.0 µg/mL + TSH	3732 ±514	3550 ±725	95
5C9 10 µg/mL + TSH	802 ±215	1551 ±545	193
5C9 100 µg/mL + TSH	1078 ±158	1601 ±720	149
5C9 100 µg onl のみ	201 ±41	785 ±188	391

説明注釈については表 7 a を参照。

【 0 1 6 3 】

10

20

30

【表 8】

[表 8]

TSH-ビオチン結合または5C9 IgG-ビオチン結合の阻害に基づくELISAにより得られた、血清TRAbアッセイ結果の比較

テストサンプル	TSH-ビオチン定量アッセイ			5C9 IgG-ビオチンアッセイ		
	吸光度 450nm	阻害率%	濃度 (U/L)	吸光度 450nm	阻害率%	濃度 (U/L)
アッセイ ネガティブ コントロール	2.143	0	0	2.421	0	0
アッセイ キャリブレーター						
1 U/L	1.821	15	1	2.027	16	1
2 U/L	1.564	27	2	1.747	28	2
8 U/L	0.66	69	8	0.532	78	8
40 U/L	0.132	94	40	0.092	96	40
アッセイ ポジティブ コントロール	1.273	41	3.22	1.344	44	3.28
患者血清						
A	2.122	1	0.14	2.209	9	0.44
B	1.081	50	4.24	1.029	58	4.54
C	0.225	90	26.03	0.173	93	18.4
D	2.069	3	0.24	2.27	6	0.31
E	1.789	16	1.12	2.189	10	0.49
F	1.454	32	2.43	1.791	26	1.85
G	1.053	51	4.41	1.123	54	4.12
H	1.242	42	3.37	1.309	46	3.4
I	0.208	90	28.01	0.174	93	18.32
健常人ドナー 血清						
4276	2.182	-2	0	2.451	-1	0
4280	2.292	-7	0	2.621	-8	0
4281	2.138	0	0	2.529	-4	0
4282	2.204	-3	0	2.6	-7	0
4284	2.306	-8	0	2.613	-8	0
4285	2.328	-9	0	2.756	-14	0
4286	2.34	-9	0	2.691	-11	0
4289	2.381	-11	0	2.628	-9	0

アッセイキャリブレーター40 U/L、8 U/L、2 U/L、および1 U/LはM22 IgGを健常人血液ドナー血清(HBDプール)で希釈したものであり、NIBSC 90/672のU/L活性により、標識されたTSHのTSHRをコートしたチューブへの

10

20

30

40

50

結合の阻害を測定した。アッセイのネガティブコントロールはHBDプールである。

【0164】

【表9】

[表9]

甲状腺刺激性マウスMAb (mTSMAb) によるTSHR刺激における5C9 IgGの効果

テストサンプル <sup>a</sup>	TSMAbおよび以下のものを添加した後に、 野生型TSHRを発現するCHO細胞中での サイクリックAMP濃度 (pmol/mL平均±SD, n=3)		
	緩衝液のみ	5C9 IgG 100 µg/mL	2G4 IgG <sup>b</sup> 100 µg/mL
TSMAb 1 1 µg/mL	18.94 ± 7.4	1.24 ± 0.07	16.5 ± 1.1
TSMAb 2 1 µg/mL	9.71 ± 0.96	2.26 ± 0.05	8.96 ± 1.28
TSMAb 4 10 ng/mL	34.5 ± 2.04	2.20 ± 0.20	33.1 ± 1.25
TSMAb 5 100 ng/mL	27.26 ± 2.14	0.85 ± 0.01	22.5 ± 2.4
TSMAb 7 100 ng/mL	9.90 ± 1.52	1.26 ± 0.59	9.07 ± 0.65
緩衝液のみ	3.39 ± 1.35	1.56 ± 1.84	4.32 ± 0.95

10

20

30

<sup>a</sup> サイクリックAMPアッセイ緩衝液による希釈液

<sup>b</sup> 2G4はヒト甲状腺ペルオキシダーゼモノクローナル自己抗体コントロールである。

【0165】

【表 10 - 1】

[表10]  
 様々なTSH製剤によるTSHR刺激における5C9IgGの効果  
 実験1

サイクリックAMPアッセイ緩衝液 で希釈したテストサンプル	野生型TSHRを発現するCHO細胞中での サイクリックAMP濃度 (pmol/mL平均±SD、n=3)
緩衝液のみ	0.37 ± 0.15
天然ヒト TSH 100 ng/mLのみ	36.14 ± 1.83
天然ヒト TSH 100 ng/mLおよび 0.001 µg/mL 5C9 IgG.	36.0 ± 6.1
天然ヒト TSH 100 ng/mL および 0.01 µg/mL 5C9 IgG	18.0 ± 5.4
天然ヒト TSH 100 ng/mL および 0.1 µg/mL 5C9 IgG	0.20 ± 0.06
天然ヒト TSH 100 ng/mL および 1.0 µg/mL 5C9 IgG	0.14 ± 0.02
天然ヒト TSH 100 ng/mL および 10 µg/mL 5C9 IgG	0.11 ± 0.04
天然ヒト TSH 100 ng/mL および 100 µg/mL 5C9 IgG	0.16 ± 0.03
リコンビナントヒトTSH 100 ng/mL のみ	12.73 ± 4.0
リコンビナントヒトTSH 100 ng/mLおよび 0.001 µg/mL 5C9 IgG.	13.63 ± 1.7
リコンビナントヒトTSH 100 ng/mLおよび 0.01 µg/mL 5C9 IgG	8.13 ± 2.13
リコンビナントヒトTSH 100 ng/mLおよび 0.1 µg/mL 5C9 IgG	0.12 ± 0.06
リコンビナントヒトTSH 100 ng/mLおよび 1.0 µg/mL 5C9 IgG	0.10 ± 0.03
リコンビナントヒトTSH 100 ng/mLおよび 10 µg/mL 5C9 IgG	0.12 ± 0.05
リコンビナントヒトTSH 100 ng/mLおよび 100 µg/mL 5C9 IgG	0.19 ± 0.08

10

20

30

40

【表 10 - 2】

## 実験 2

サイクリックAMPアッセイ緩衝液 で希釈したテストサンプル	野生型TSHRを発現するCHO細胞中での サイクリックAMP濃度 (pmol/mL平均±SD、n=3)
緩衝液のみ	0.18 ± 0.08
天然ヒト TSH 100 ng/mLのみ	40.8 ± 6.92
天然ヒト TSH 100 ng/mLおよび 0.001 µg/mL 5C9 IgG.	37.6 ± 6.35
天然ヒト TSH 100 ng/mLおよび 0.01 µg/mL 5C9 IgG	34.4 ± 2.28
天然ヒト TSH 100 ng/mL および 0.1 µg/mL 5C9 IgG	15.8 ± 1.39
天然ヒト TSH 100 ng/mL および 1.0 µg/mL 5C9 IgG	0.13 ± 0.03
天然ヒト TSH 100 ng/mL および 10 µg/mL 5C9 IgG	0.18 ± 0.05
天然ヒト TSH 100 ng/mL および 100 µg/mL 5C9 IgG	0.21 ± 0.10
リコンビナントヒト TSH 100 ng/mL のみ	16.72 ± 2.90
リコンビナントヒト TSH 100 ng/mL および 0.001 µg/mL 5C9 IgG.	20.0 ± 1.73
リコンビナントヒト TSH 100 ng/mL および 0.01 µg/mL 5C9 IgG	20.6 ± 1.57
リコンビナントヒト TSH 100 ng/mL および 0.1 µg/mL 5C9 IgG	7.39 ± 1.74
リコンビナントヒト TSH 100 ng/mL および 1.0 µg/mL 5C9 IgG	0.07 ± 0.01
リコンビナントヒト TSH 100 ng/mL および 10 µg/mL 5C9 IgG	0.07 ± 0.01
リコンビナントヒト TSH 100 ng/mL および 100 µg/mL 5C9 IgG	0.11 ± 0.03

10

20

30

40

【表 10 - 3】

天然ブタ TSH 0.3 ng/mL のみ	40.2 ± 4.0
天然ブタ TSH 0.3 ng/mL および 0.001 µg/mL 5C9 IgG.	32.7 ± 4.0
天然ブタ TSH 0.3 ng/mL および 0.01 µg/mL 5C9 IgG	28.2 ± 2.04
天然ブタ TSH 0.3 ng/mL および 0.1 µg/mL 5C9 IgG	18.0 ± 1.36
天然ブタ TSH 0.3 ng/mL および 1.0 µg/mL 5C9 IgG	2.14 ± 0.85
天然ブタ TSH 0.3 ng/mL および 10 µg/mL 5C9 IgG	0.20 ± 0.14
天然ブタ TSH 0.3 ng/mL および 100 µg/mL 5C9 IgG	0.18 ± 0.13

10

20

【表 10 - 4】

## 実験3

サイクリックAMPアッセイ緩衝液 で希釈したテストサンプル	野生型TSHRを発現するCHO細胞中での サイクリックAMP濃度 (pmol/mL平均±SD、n=3)
緩衝液のみ	2.0 ± 0.8
天然ヒト TSH 100 ng/mLのみ	31.1 ± 2.55
天然ヒト TSH 100 ng/mLおよび 0.001 μg/mL 5C9 IgG.	36.0 ± 3.27
天然ヒト TSH 100 ng/mLおよび 0.01 μg/mL 5C9 IgG	28.4 ± 3.55
天然ヒト TSH 100 ng/mL および 0.1 μg/mL 5C9 IgG	7.22 ± 3.20
天然ヒト TSH 100 ng/mL および 1.0 μg/mL 5C9 IgG	0.67 ± 0.46
天然ヒト TSH 100 ng/mL および 10 μg/mL 5C9 IgG	0.8 ± 0.45
天然ヒト TSH 100 ng/mL および 100 μg/mL 5C9 IgG	1.35 ± 1.0
リコンビナントヒト TSH 100 ng/mL のみ	26.4 ± 3.53
リコンビナントヒト TSH 100 ng/mL および 0.001 μg/mL 5C9 IgG.	25.6 ± 2.45
リコンビナントヒト TSH 100 ng/mL および 0.01 μg/mL 5C9 IgG	22.9 ± 7.4
リコンビナントヒト TSH 100 ng/mL および 0.1 μg/mL 5C9 IgG	1.18 ± 0.49
リコンビナントヒト TSH 100 ng/mL および 1.0 μg/mL 5C9 IgG	0.81 ± 0.05
リコンビナントヒト TSH 100 ng/mL および 10 μg/mL 5C9 IgG	0.74 ± 0.42
リコンビナントヒト TSH 100 ng/mL および 100 μg/mL 5C9 IgG	0.88 ± 0.55

10

20

30

40

【表 10 - 5】

天然ブタ TSH 0.3 ng/mL のみ	35.7 ± 4.82
天然ブタ TSH 0.3 ng/mL および 0.001 µg/mL 5C9 IgG.	38.2 ± 2.54
天然ブタ TSH 0.3 ng/mL および 0.01 µg/mL 5C9 IgG	26.6 ± 3.22
天然ブタ TSH 0.3 ng/mL および 0.1 µg/mL 5C9 IgG	10.1 ± 1.79
天然ブタ TSH 0.3 ng/mL および 1.0 µg/mL 5C9 IgG	2.28 ± 0.71
天然ブタ TSH 0.3 ng/mL および 10 µg/mL 5C9 IgG	0.68 ± 0.21
天然ブタ TSH 0.3 ng/mL および 100 µg/mL 5C9 IgG	1.03 ± 0.63

10

20

【 0 1 6 6 】

【表 1 1 a】

[表 1 1 a]

活性化変異の S 2 8 1 I を有する T S H R の恒常的活性における 5 C 9 I g G および 9 D 3 3 I g G の効果

サイクリックAMPアッセイ緩衝液 で希釈したテストサンプル	T S H R S 2 8 1 I を発現する C H O 細胞中での サイクリックAMP濃度 (pmol/mL平均±SD、n=3)
緩衝液のみ	9.90 ± 1.51
0.001 µg/mL 2G4 IgG <sup>a</sup>	6.83 ± 0.37
0.01 µg/mL 2G4 IgG	7.74 ± 0.78
0.1 µg/mL 2G4 IgG	8.58 ± 1.12
1 µg/mL 2G4 IgG	8.37 ± 1.10
0.001 µg/mL 5C9 IgG	4.31 ± 0.16
0.01 µg/mL 5C9 IgG	4.17 ± 0.60
0.1 µg/mL 5C9 IgG	3.20 ± 0.63
1 µg/mL 5C9 IgG	3.44 ± 0.63
0.001 µg/mL 9D33 IgG	5.97 ± 0.94
0.01 µg/mL 9D33 IgG	9.27 ± 1.4
0.1 µg/mL 9D33 IgG	8.13 ± 0.72
1 µg/mL 9D33 IgG	7.33 ± 1.17

10

20

30

<sup>a</sup> 2 G 4 はヒト甲状腺ペルオキシダーゼモノクローナル抗体コントロールである。

【 0 1 6 7 】

## 【表 1 1 b】

[表 1 1 b]

活性化変異の I 5 6 8 T を有する T S H R の恒常的活性における 5 C 9 I g G および 9 D 3 3 I g G の効果

サイクリックAMPアッセイ緩衝液で希釈した テストサンプル	T S H R I 5 6 8 T を発現する C H O 細胞中での サイクリックAMP濃度 (pmol/mL 平均±SD、n=3)
緩衝液のみ	21.39 ± 5.31
0.001 µg/mL 2G4 IgG	19.13 ± 2.77
0.01 µg/mL 2G4 IgG	16.67 ± 1.87
0.1 µg/mL 2G4 IgG	19.92 ± 0.91
1 µg/mL 2G4 IgG	20.52 ± 0.95
0.001 µg/mL 5C9 IgG	18.81 ± 1.39
0.01 µg/mL 5C9 IgG	9.24 ± 0.83
0.1 µg/mL 5C9 IgG	6.02 ± 1.93
1 µg/mL 5C9 IgG	5.29 ± 0.75
0.001 µg/mL 9D33 IgG	16.58 ± 0.00
0.01 µg/mL RSR-B2 IgG	17.03 ± 2.36
0.1 µg/mL RSR-B2 IgG	19.96 ± 1.66
1 µg/mL RSR-B2 IgG	21.65 ± 1.99

10

20

30

## 【 0 1 6 8 】

## 【表 1 1 c】

[表 1 1 c]

活性化変異の A 6 2 3 I を有する T S H R の恒常的活性における 5 C 9 I g G および 9 D 3 3 I g G の効果

サイクリックAMPアッセイ緩衝液で希釈した テストサンプル	T S H R A623Iを発現するCHO細胞中での サイクリックAMP濃度 (pmol/mL平均±SD、n=3)
緩衝液のみ	36.89 <sup>a</sup>
0.001 μg/mL 2G4 IgG	28.46 ± 2.31
0.01 μg/mL 2G4 IgG	33.44 ± 1.12
0.1 μg/mL 2G4 IgG	30.40 ± 7.93
1 μg/mL 2G4 IgG	28.96 ± 2.29
0.001 μg/mL 5C9 IgG	26.52 ± 1.33
0.01 μg/mL 5C9 IgG	27.03 ± 2.13
0.1 μg/mL 5C9 IgG	19.79 ± 0.48
1 μg/mL 5C9 IgG	16.43 ± 1.27
0.001 μg/mL 9D33 IgG	29.55 ± 3.15
0.01 μg/mL 9D33 IgG	27.64 ± 3.49
0.1 μg/mL 9D33 IgG	31.78 ± 9.18
1 μg/mL 9D33 IgG	40.09 ± 7.73

10

20

30

<sup>a</sup> 2 回の測定

【 0 1 6 9 】

【表 1 2 - 1】

[表 1 2]

野生型TSHRを発現するCHO細胞における、サイクリックAMP産生のpTSH刺激の遮断に対する5C9プラス9D33の効果

## 実験1

サイクリックAMPアッセイ緩衝液中のテストサンプル	サイクリックAMP濃度 (pmol/mL平均±SD、n=3)
緩衝液のみ	1.9 ± 1.0
TSH 3 ng/mL	48.5 ± 14
10 µg/mL 9D33	2.9 ± 1.0
10 µg/mL 5C9	0.45 ± 0.31
10 µg/mL 9D33 + 10 µg/mL 5C9	1.12 ± 0.4
10 µg/mL 9D33 + TSH	23.8 ± 8.7
10 µg/mL 5C9 + TSH	3.7 ± 2.7
10 µg/mL 9D33 + 10 µg/mL 5C9 + TSH	4.9 (n = 2)
1 µg/mL 9D33 + TSH	28.7 ± 1.8
1 µg/mL 5C9 + TSH	13.9 ± 3.1
1 µg/mL 9D33 + 1 µg/mL 5C9 + TSH	12.6 ± 2.5

10

20

【表 1 2 - 2】

## 実験2

サイクリックAMPアッセイ緩衝液中のテストサンプル	サイクリックAMP濃度 (pmol/mL平均±SD、n=3)
緩衝液のみ	0.72 ± 0.63
TSH 3 ng/mL	34.3 ± 3.1
10 µg/mL 9D33	1.6 ± 1.3
10 µg/mL 5C9	0.4 ± 0.4
10 µg/mL 9D33 + 10 µg/mL 5C9	0.03 (n = 1)
10 µg/mL 9D33 + TSH	9.5 ± 1.7
10 µg/mL 5C9 + TSH	3.1 ± 1.0
10 µg/mL 9D33 + 10 µg/mL 5C9 + TSH	3.3 ± 2.0
1 µg/mL 9D33 + TSH	19.0 ± 3.2
1 µg/mL 5C9 + TSH	6.1 ± 0.6
1 µg/mL 9D33 + 1 µg/mL 5C9 + TSH	5.9 ± 0.6

30

40

【表 1 2 - 3】

## 実験 3

サイクリックAMPアッセイ緩衝液中の テストサンプル	サイクリックAMP濃度 (pmol/mL平均±SD、n=3)
緩衝液のみ	0.99 ± 0.03
TSH 3 ng/mL	51.3 ± 5.0
100 µg/mL 9D33	1.14 ± 0.13
100 µg/mL 5C9	0.50 ± 0.04
100 µg/mL 9D33 + 100 µg/mL 5C9	0.66 ± 0.9
100 µg/mL 9D33 + TSH	10.53 ± 0.84
100 µg/mL 5C9 + TSH	1.4 ± 0.18
100 µg/mL 9D33 + 100 µg/mL 5C9 + TSH	1.3 ± 0.36
10 µg/mL 9D33 + TSH	13.5 ± 2.9
10 µg/mL 5C9 + TSH	1.9 ± 1.1
10 µg/mL 9D33 + 10 µg/mL 5C9 + TSH	1.2 ± 0.1
1 µg/mL 9D33 + TSH	27.8 ± 2.2
1 µg/mL 5C9 + TSH	5.4 ± 1.8
1 µg/mL 9D33 + 1 µg/mL 5C9 + TSH	5.2 ± 0.3
0.1 µg/mL 9D33 + TSH	35.1 ± 2.3
0.1 µg/mL 5C9 + TSH	18.7 ± 3.4
0.1 µg/mL 9D33 + 0.1 µg/mL 5C9 + TSH	14.4 ± 1.0
0.01 µg/mL 9D33 + TSH	47.1 ± 1.9
0.01 µg/mL 5C9 + TSH	33.9 ± 7.8
0.01 µg/mL 9D33 + 0.01 µg/mL 5C9 + TSH	27.8 ± 1.3

10

20

30

【表 1 2 - 4】

## 実験4

サイクリックAMPアッセイ緩衝液中の テストサンプル	サイクリックAMP濃度 (pmol/mL平均±SD、n=3)
緩衝液のみ	1.4 ± 0.5
TSH 0.3 ng/mL	46.6 ± 12.9
100 µg/mL 9D33	0.99 ± 0.62
100 µg/mL 5C9	0.15 ± 0.12
100 µg/mL 9D33 + 100 µg/mL 5C9	0.41 ± 0.40
100 µg/mL 9D33 + TSH	3.53 ± 1.1
100 µg/mL 5C9 + TSH	0.29 ± 0.15
100 µg/mL 9D33 + 100 µg/mL 5C9 + TSH	0.63 ± 0.38
10 µg/mL 9D33 + TSH	4.23 ± 0.81
10 µg/mL 5C9 + TSH	0.23 ± 0.08
10 µg/mL 9D33 + 10 µg/mL 5C9 + TSH	0.52 ± 0.15
1 µg/mL 9D33 + TSH	9.01 ± 0.67
1 µg/mL 5C9 + TSH	1.65 ± 0.47
1 µg/mL 9D33 + 1 µg/mL 5C9 + TSH	1.21 ± 0.67
0.1 µg/mL 9D33 + TSH	20.2 ± 2.2
0.1 µg/mL 5C9 + TSH	6.2 ± 1.8
0.1 µg/mL 9D33 + 0.1 µg/mL 5C9 + TSH	7.6 ± 1.3

10

20

【表 1 2 - 5】

## 実験5

サイクリックAMPアッセイ緩衝液中の テストサンプル	サイクリックAMP濃度 (pmol/mL平均±SD、n=3)
緩衝液のみ	1.83±0.64
TSH 0.3 ng/mL	17.26±1.5
10 µg/mL 9D33	2.07±0.52
10 µg/mL 5C9	0.38±0.2
10 µg/mL 9D33 + 10 µg/mL 5C9	0.96±0.14
10 µg/mL 9D33 + TSH	3.57±0.58
10 µg/mL 5C9 + TSH	1.17±0.00
10 µg/mL 9D33 + 10 µg/mL 5C9 + TSH	1.58±0.20
5 µg/mL 9D33 + TSH	3.71±0.10
5 µg/mL 5C9 + TSH	1.21±0.36
1 µg/mL 9D33 + TSH	6.38±1.35
1 µg/mL 5C9 + TSH	2.57±0.65
1 µg/mL 9D33 + 1 µg/mL 5C9 + TSH	1.46±0.59
0.1 µg/mL 9D33 + TSH	14.67±4.69
0.1 µg/mL 5C9 + TSH	12.43±1.59
0.1 µg/mL 9D33 + 0.1 µg/mL 5C9 + TSH	9.99±3.78

10

20

【 0 1 7 0 】

【表 13 - 1】

[表 13]

野生型TSHRを発現するCHO細胞における、サイクリックAMP産生のM22 Fabを介する刺激の遮断に対する5C9プラス9D33の効果

実験1

サイクリックAMPアッセイ緩衝液中の テストサンプル	サイクリックAMP濃度 (pmol/mL平均±SD、n=3)
緩衝液のみ	1.45 ± 0.46
M22 3 ng/mL	49.1 ± 9.8
100 µg/mL 9D33	1.51 ± 0.22
100 µg/mL 5C9	0.35 ± 0.30
100 µg/mL 9D33 + 100 µg/mL 5C9	1.57 ± 0.13
100 µg/mL 9D33 + M22	2.13 ± 0.74
100 µg/mL 5C9 + M22	0.35 ± 0.08
100 µg/mL 9D33 + 100 µg/mL 5C9 + M22	0.70 ± 0.40
10 µg/mL 9D33 + M22	2.5 ± 0.8
10 µg/mL 5C9 + M22	0.36 ± 0.25
10 µg/mL 9D33 + 10 µg/mL 5C9 + M22	0.52 ± 0.12
1 µg/mL 9D33 + M22	5.25 ± 0.55
1 µg/mL 5C9 + M22	0.93 ± 0.07
1 µg/mL 9D33 + 1 µg/mL 5C9 + M22	0.69 ± 0.13
0.1 µg/mL 9D33 + M22	27.6 ± 2.5
0.1 µg/mL 5C9 + M22	6.0 ± 2.6
0.1 µg/mL 9D33 + 0.1 µg/mL 5C9 + M22	13.7 ± 7.5
0.01 µg/mL 9D33 + M22	47.5 ± 4.5
0.01 µg/mL 5C9 + M22	48.1 ± 5.4
0.01 µg/mL 9D33 + 0.01 µg/mL 5C9 + M22	47.5 ± 4.5

10

20

30

【表 13 - 2】

## 実験2

サイクリックAMPアッセイ緩衝液中の テストサンプル	サイクリックAMP濃度 (pmol/mL平均±SD、n=3)
緩衝液のみ	1.69 ± 0.47
M22 3 ng/mL	68.3 ± 6.3
100 µg/mL 9D33	1.76 ± 0.43
100 µg/mL 5C9	0.69 ± 0.18
100 µg/mL 9D33 + 100 µg/mL 5C9	1.16 ± 0.35
100 µg/mL 9D33 + M22	1.42 ± 1.20
100 µg/mL 5C9 + M22	測定不可
100 µg/mL 9D33 + 100 µg/mL 5C9 + M22	0.14 (n=2)
10 µg/mL 9D33 + M22	0.67 (n=2)
10 µg/mL 5C9 + M22	0.14 (n=1)
10 µg/mL 9D33 + 10 µg/mL 5C9 + M22	2.41 (n=1)
1 µg/mL 9D33 + M22	6.03 ± 1.15
1 µg/mL 5C9 + M22	2.54 (n=1)
1 µg/mL 9D33 + 1 µg/mL 5C9 + M22	1.51 (n=1)
0.1 µg/mL 9D33 + M22	38.7 ± 8.1
0.1 µg/mL 5C9 + M22	4.17 ± 1.7
0.1 µg/mL 9D33 + 0.1 µg/mL 5C9 + M22	5.17 ± 2.85
0.01 µg/mL 9D33 + M22	60.2 ± 8.0
0.01 µg/mL 5C9 + M22	57.3 ± 13.7
0.01 µg/mL 9D33 + 0.01 µg/mL 5C9 + M22	40.4 ± 5.3
0.001 µg/mL 9D33 + M22	79.1 ± 26.3
0.001 µg/mL 5C9 + M22	63.3 ± 19.0
0.001 µg/mL 9D33 + 0.001 µg/mL 5C9 + M22	40.2 ± 8.7

10

20

30

【表 1 3 - 3】

## 実験 3

サイクリックAMPアッセイ緩衝液中の テストサンプル	サイクリックAMP濃度 (pmol/mL平均±SD、n=3)
緩衝液のみ	0.86 ± 0.12
M22 0.3 ng/mL	21.8 ± 3.23
100 µg/mL 9D33	0.88 ± 0.30
100 µg/mL 5C9	0.58 ± 0.28
100 µg/mL 9D33 + 100 µg/mL 5C9	0.81 ± 0.36
100 µg/mL 9D33 + M22	1.03 ± 0.32
100 µg/mL 5C9 + M22	0.05 (n=2)
100 µg/mL 9D33 + 100 µg/mL 5C9 + M22	0.06 (n=2)
10 µg/mL 9D33 + M22	0.97 ± 0.48
10 µg/mL 5C9 + M22	0.20 (n=2)
10 µg/mL 9D33 + 10 µg/mL 5C9 + M22	0.14 ± 0.08
1 µg/mL 9D33 + M22	0.83 ± 0.21
1 µg/mL 5C9 + M22	0.02 (n=2)
1 µg/mL 9D33 + 1 µg/mL 5C9 + M22	0.13 ± 0.13
0.1 µg/mL 9D33 + M22	5.38 ± 1.71
0.1 µg/mL 5C9 + M22	1.43 ± 1.09
0.1 µg/mL 9D33 + 0.1 µg/mL 5C9 + M22	2.39 ± 1.0
0.01 µg/mL 9D33 + M22	15.2 ± 1.42
0.01 µg/mL 5C9 + M22	13.1 ± 1.34
0.01 µg/mL 9D33 + 0.01 µg/mL 5C9 + M22	12.7 ± 3.4
0.001 µg/mL 9D33 + M22	12.8 ± 1.60
0.001 µg/mL 5C9 + M22	13.3 ± 0.89
0.001 µg/mL 9D33 + 0.001 µg/mL 5C9 + M22	15.8 ± 2.15

10

20

30

【表 1 3 - 4】

## 実験 4

サイクリックAMPアッセイ緩衝液中の テストサンプル	サイクリックAMP濃度 (pmol/mL平均±SD、n=3)
緩衝液のみ	1.29 ± 0.68
M22 0.3 ng/mL	31.1 ± 9.4
100 µg/mL 9D33	2.38 ± 1.11
100 µg/mL 5C9	0.12 ± 0.09
100 µg/mL 9D33 + 100 µg/mL 5C9	0.81 ± 0.15
100 µg/mL 9D33 + M22	2.00 ± 0.87
100 µg/mL 5C9 + M22	0.22 ± 0.11
100 µg/mL 9D33 + 100 µg/mL 5C9 + M22	0.40 ± 0.18
10 µg/mL 9D33 + M22	1.25 ± 0.09
10 µg/mL 5C9 + M22	0.40 ± 0.17
10 µg/mL 9D33 + 10 µg/mL 5C9+ M22	0.45 ± 0.31
1 µg/mL 9D33 + M22	2.66 ± 0.64
1 µg/mL 5C9 + M22	0.21 ± 0.18
1 µg/mL 9D33 + 1 µg/mL 5C9 + M22	0.14 ± 0.07
0.1 µg/mL 9D33 + M22	27.6 ± 2.5
0.1 µg/mL 5C9 + M22	6.0 ± 2.6
0.1 µg/mL 9D33 + 0.1 µg/mL 5C9+ M22	7.2 ± 3.9
0.01 µg/mL 9D33 + M22	38.9 ± 6.4
0.01 µg/mL 5C9 + M22	31.5 ± 4.0
0.01 µg/mL 9D33 + 0.01 µg/mL 5C9 + M22	20.6 ± 5.3
0.001 µg/mL 9D33 + M22	43.2 ± 7.9
0.001 µg/mL 5C9 + M22	33.1 ± 4.0
0.001 µg/mL 9D33 + 0.001 µg/mL 5C9+ M22	25.3 ± 6.0

10

20

30

【 0 1 7 1 】

【表 1 4 - 1】

[表 1 4]

野生型 TSHR を発現する CHO 細胞 (細胞あたり約  $5 \times 10^5$  レセプター) における基本的なサイクリック AMP 産生に対する 5C9 IgG および 9D33 IgG の効果

## 実験 1

テストサンプル	サイクリック AMP 濃度 pmol/mL (平均 ± SD、n = 3)	基本的な サイクリック AMP 産生 の阻害率 (%)
サイクリック AMP アッセイ緩衝液のみ	47.1 ± 11.7	0
3 ng/mL TSH	152.0 ± 28.2	-ve
5B3 <sup>a</sup> IgG 100 µg/mL	44.5 ± 5.2	5.3
5B3 <sup>a</sup> IgG 10 µg/mL	45.4 ± 6.3	3.4
5B3 <sup>a</sup> IgG 1 µg/mL	52.0 ± 12.1	-ve
9D33 IgG 100 µg/mL	74.2 ± 7.2	-ve
9D33 IgG 10 µg/mL	56.5 ± 4.0	-ve
9D33 IgG 1 µg/mL	65.8 ± 9.8	-ve
9D33 IgG 0.1 µg/mL	61.7 ± 13.3	-ve
9D33 IgG 0.01 µg/mL	52.0 ± 5.1	-ve
9D33 IgG 0.001 µg/mL	61.6 ± 3.8	-ve

10

20

30

コントロールの CHO 細胞では、TSHR が発現されず、サイクリック AMP アッセイ緩衝液の存在下での基礎的なサイクリック AMP 産生は  $1.02 \pm 0.06$  pmol/mL (平均 ± SD; n = 3) であり、3 ng/mL TSH の存在下では  $0.74 \pm 0.32$  pmol/mL (平均 ± SD; n = 3) であった。

40

-ve = ネガティブ、すなわちサイクリック AMP 産生の阻害が無い。

<sup>b</sup> 5B3 はグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) ヒトモノクローナル抗体である (5C9 に対するネガティブコントロール)。

【表 1 4 - 2】

## 実験 2

テストサンプル	サイクリックAMP濃度 pmol/mL (平均±SD、n=3)	基本的な サイクリックAMP産生 の阻害率 (%)
サイクリックAMP アッセイ緩衝液のみ	58.0 ± 15.2	0
3 ng/mL TSH	156.5 ± 22.2	-ve
5B3 <sup>a</sup> IgG 100 µg/mL	52.7 ± 7.8	9.1
5B3 <sup>a</sup> IgG 10 µg/mL	43.7 ± 10.4	24.7
5B3 <sup>a</sup> IgG 1 µg/mL	55.9 ± 12.2	3.7
5C9 IgG 100 µg/mL	26.2 ± 2.7	54.9
5C9 IgG 10 µg/mL	14.7 ± 1.7	74.6
5C9 IgG 1 µg/mL	16.8 ± 4.2	71.0
5C9 IgG 0.1 µg/mL	31.5 ± 8.8	45.7
5C9 IgG 0.01 µg/mL	36.4 ± 4.5	37.2
5C9 IgG 0.001 µg/mL	51.7 ± 9.8	10.8

10

20

30

コントロールのCHO細胞では、TSHRが発現されず、サイクリックAMPアッセイ緩衝液の存在下での基礎的なサイクリックAMP産生は0.03 pmol/mL (n=2)であり、3 ng/mL TSHの存在下では0.40 ± 0.09 pmol/mL (平均±SD; n=3)であった。

-ve = ネガティブ、すなわちサイクリックAMP産生の阻害が無い。

<sup>a</sup> 5B3はグルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)ヒトモロクローナル抗体である(5C9に対するネガティブコントロール)。

【表 1 4 - 3】

## 実験 3

野生型 TSHR を発現する CHO 細胞におけるサイクリック AMP 産生の基礎的な 5C9 Fab および F ( a b ' ) の効果

サイクリック AMP アッセイ 緩衝液中の テストサンプル	サイクリック AMP 濃度 pmol/mL (平均±SD、n=3)	基本的な サイクリック AMP 産生 の阻害率 (%)
サイクリック AMP アッセイ緩衝液のみ	59.4 ±8.6	0
9D33 IgG 100 µg/mL	67.8 ±1.0	-ve
9D33 IgG 10 µg/mL	79.4 ±9.8	-ve
9D33 IgG 1 µg/mL	71.5 ±8.8	-ve
9D33 IgG 0.1 µg/mL	75.6 ±8.9	-ve
9D33 IgG 0.01 µg/mL	60.5 ±7.5	-ve
9D33 IgG 0.001 µg/mL	52.3 ±6.3	12
5C9 IgG 100 µg/mL	26.2 ±1.8	56
5C9 IgG 10 µg/mL	24.5 ±5.8	59
5C9 IgG 1 µg/mL	22.9 ±2.1	61
5C9 IgG 0.1 µg/mL	59.1 ±2.6	1
5C9 IgG 0.01 µg/mL	64.3 ±8.4	-ve
5C9 IgG 0.001 µg/mL	67.3 ±9.8	-ve

10

20

30

40

【表 1 4 - 4】

5C9 Fab 100 µg/mL	23.3 ±2.3	61
5C9 Fab 10 µg/mL	32.1 ±4.8	46
5C9 Fab 1 µg/mL	36.4 ±1.5	39
5C9 Fab 0.1 µg/mL	52.8 ±1.9	11
5C9 Fab 0.01 µg/mL	61.1 ±2.4	-ve
5C9 Fab 0.001 µg/mL	62.5 ±7.3	-ve
5C9 F(ab') 100 µg/mL	30.9 ±2.6	48
5C9 F(ab') 10 µg/mL	36.5 ±3.4	39
5C9 F(ab') 1 µg/mL	45.9 ±4.5	23
5C9 F(ab') 0.1 µg/mL	48.2 ±3.1	19
5C9 F(ab') 0.01 µg/mL	62.3 ±5.7	-ve
5C9 F(ab') 0.001 µg/mL	57.9 ±9.1	3

10

20

コントロールのCHO細胞では、TSHRが発現されず、サイクリックAMPアッセイ緩衝液の存在下での基礎的なサイクリックAMP産生は $1.03 \text{ pmol/mL}$  (平均±SD;  $n=2$ )であり、 $3 \text{ ng/mL}$  TSHの存在下では $0.04 \pm 0.09 \text{ pmol/mL}$  (平均±SD;  $n=3$ )であった。

30

-ve = ネガティブ、すなわち還元サイクリックAMP産生の阻害が無い。

F(ab')<sub>2</sub> F(ab')<sub>2</sub>の還元により準備される；詳細な説明の記載を参照

【0172】

## 【表 15 - 1】

## [表 15]

I 5 6 8 T活性化変異を有するT SHRを発現するCHO細胞における基本的なサイクリックAMP濃度に対する、アンタゴニスト活性をもつ患者血清T SHR自己抗体 (B 2 - B 5) の効果  
実験 1

サイクリックAMPアッセイ 緩衝液中の テストサンプル	サイクリックAMP濃度 pmol/mL (平均±SD、n=3)	基本的な サイクリックAMP産生 の阻害率 (%)
サイクリックAMP アッセイ緩衝液のみ	20.5 ±8.7	0
HBDプール/10	19.5 ±3.4	5
HBDプール/50	25.7 ±2.8	-ve
N1 /10	20.7 ±5.5	-ve
N1 /50	18.5 ±1.5	10
N2 /10	23.3 ±1.7	-ve
N2 /50	17.6 ±1.8	14
N3 /10	20.3 ±2.4	1
N3 /50	23.6 ±5.9	-ve
B2 /10	5.3 ±1.3	74
B2 /50	9.6 ±2.8	53
B3 /10	8.3 ±3.1	60
B3 /50	10.5 ±2.5	49
B4 /10	2.2 ±0.5	89
B4 /50	3.0 ±0.3	86
B5 /10	15.9 ±3.3	23
B5 /50	14.5 ±1.3	29

10

20

30

【表 15 - 2】

## 実験2

サイクリックAMPアッセイ 緩衝液中の テストサンプル	サイクリックAMP濃度 pmol/mL (平均±SD、n=3)	基本的な サイクリックAMP産生 の阻害率 (%)
サイクリックAMP アッセイ緩衝液のみ	19.7±3.7	0
HBDプール/10	28.0±1.6	-ve
HBDプール/50	18.1±3.9	8
HBDプール/100	18.0±1.6	9
HBDプール/500	17.8±1.3	10
HBDプール/1000	20.7±2.9	-ve
HBDプール/5000	15.6±2.1	20
B3 /10	14.7±2.2	25
B3 /50	13.7±1.3	31
B3 /100	12.6±0.6	36
B3 /500	19.0±0.8	4
B3 /1000	18.4±4.6	7

10

20

【表 15 - 3】

B3 /5000	17.6±0.9	11
B4 /10	4.0±0.5	80
B4 /50	3.6±0.8	81
B4 /100	3.8±1.1	81
B4 /500	7.2±2.6	64
B4 /1000	12.0±0.6	39
B4 /5000	17.7±2.7	10

30

40

- ve = ネガティブ、すなわちサイクリックAMP産生の阻害が無い。

HBDプール = 健常人血液ドナー血清のプール

N1 - N3 = 個々の健常人血液ドナー

全ての血清はサイクリックAMPアッセイ緩衝液で希釈された。

【0173】

## 【表 16】

## [表 16]

S281I 活性化変異を有する TSHR を発現する CHO 細胞における基本的なサイクリック AMP 濃度に対する、アンタゴニスト活性をもつ患者血清 TSHR 自己抗体 (B2-B5) の効果

サイクリック AMP アッセイ 緩衝液中の テストサンプル	サイクリック AMP 濃度 pmol/mL (平均±SD、n=3)	基本的な サイクリック AMP 産生 の阻害率 (%)
サイクリック AMP アッセイ緩衝液のみ	11.2 ±2.0	0
HBD プール / 10	12.1 ±0.6	-8
HBD プール / 50	10.0 ±2.0	11
N1 /10	8.0 ±1.6	28
N1 /50	10.8 ±3.3	4
N2 /10	8.8 ±1.4	21
N2 /50	8.8 ±2.3	22
N3 /10	10.0 ±0.8	17
N3 /50	9.3 ±1.7	17
B2 /10	7.7 ±0.39	31
B2 /50	5.7 ±1.3	49
B3 /10	5.4 ±0.5	52
B3 /50	6.6 ±1.1	41
B4 /10	5.4 ±1.1	52
B4 /50	4.9 ±0.7	56
B5 /10	9.1 ±2.5	18
B5 /50	7.6 ±0.8	32

説明注釈については表 15 を参照。

1 μg/mL の 5C9 IgG は、TSHR S281I を用いた実験における基本的なサイクリック AMP 活性の阻害の 71% を引き起こした。

【0174】

10

20

30

40

【表 17】

[表 17]

A 6 2 3 I 活性化変異を有する TSHR を発現する CHO 細胞における基本的なサイクリック AMP 濃度に対する、アンタゴニスト活性をもつ患者血清 TSHR 自己抗体 (B 2 - B 5) の効果

テストサンプルおよび血清の希釈	サイクリックAMP濃度 pmol/mL (平均±SD、n=3)	基本的な サイクリックAMP産生 の阻害率 (%)
サイクリックAMP アッセイ緩衝液のみ	43.5 ±11.2	0
HBD プール / 10	34.7 ±4.5	20
HBD プール / 50	49.9 ±5.7	-15
N1 /10	32.1 ±2.5	26
N1 /50	43.9 ±12.0	-1
N2 /10	51.1 ±8.4	-17
N2 /50	32.6 ±2.1	26
N3 /10	47.2 ±7.1	-10
N3 /50	57.3 ±16.5	-32
B2 /10	28.8 ±1.1	34
B2 /50	43.9 ±2.7	-1
B3 /10	33.5 ±3.5	23
B3 /50	44.2 ±12.7	-1
B4 /10	27.2 ±6.6	37
B4 /50	23.9 ±1.0	45
B5 /10	19.2 ±6.3	56
B5 /50	40.6 ±10.9	7

10

20

30

説明注釈については表 15 を参照。

1 μg / mL の 5 C 9 I g G は、TSHR A 6 2 3 I を用いた実験における基本的なサイクリックAMP活性の49%阻害を引き起こした。

【0175】

40

【表 18】

[表18]

野生型TSHRを発現するCHO細胞株(細胞あたり約 $5 \times 10^5$ レセプター)における基本的なサイクリックAMP濃度に対する、アンタゴニスト活性をもつ患者血清TSHR自己抗体(B2-B5)の効果

テストサンプルおよび血清の希釈	サイクリックAMP濃度 pmol/mL (平均±SD、n=3)	基本的なサイクリックAMP産生の変化(%)
サイクリックAMPアッセイ緩衝液のみ	28.1 ±0.7	100
HBD /10	37.5 ±6.9	133
HBD /50	37.2 ±2.4	132
N1 /10	27.7 ±5.7	99
N1 /50	26.0 ±4.8	93
N2 /10	41.0 ±2.7	146
N2 /50	27.0 ±1.2	96
N3 /10	34.3 ±2.7	122
N3 /50	38.5 ±7.8	137
B2 /10	39.7 ±1.7	141
B2 /50	41.4 ±3.8	147
B3 /10	74.0 ±11.2	263
B3 /50	46.5 ± 8.7	165
B4 /10	8.7 ±0.3	31
B4 /50	17.2 ±1.9	61
B5 /10	54.2 ±6.0	193
B5 /50	48.0 ±10.5	171

【数 6】

基本的なサイクリックAMP産生の変化(%) =

$$\frac{\text{テストサンプル存在下でのサイクリックAMP産生}}{\text{サイクリックAMPアッセイ緩衝液存在下でのサイクリックAMP産生}} \times 100$$

1 μg/mLの5C9 IgGの存在下、基本的なサイクリックAMPレベルはサイクリックAMPアッセイ緩衝液存在下でのレベルに比べ33%に減少した。

【0176】

## 【表 19】

[表 19]

TSHRを導入したCHO細胞における基本的なサイクリックAMP濃度に対する、  
アンタゴニスト活性をもつ患者血清TSHR自己抗体(B2-B5)の効果の要約

CHO細胞	下記存在下でのサイクリックAMPアッセイ濃度 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD、n=3)					
	HBDプール	B2	B3	B4	B5	5C9 IgG
野生型TSHR	5531 ±1140	7949 ±340	14804 ±2240	1740 ±68	10849 ±1206	1872 ±288
TSHR I568T	3900 ±671	1066 ±266	1660 ±628	438 ±90	3180 ±650	548 ±78
TSHR A623I	6420 ±968	5760 ±224	6700 ±704	5440 ±1324	7680 ±1260	1914 ±176
TSHR S281I	2420 ±130	1538 ±175	1080 ±96	1080 ±218	1822 ±494	655 ±60

10

HBDプール = 健常人血液ドナー血清のプール。

HBDプールおよびB2～B5の血清はサイクリックAMPアッセイ緩衝液中で1:10に希釈した。

5C9 IgGはサイクリックAMPアッセイ緩衝液中1μg/mLの濃度で用いた。

B2-B5は、野生型TSHRを発現するCHO細胞中での、TSHおよびM22の両方によるサイクリックAMP産生刺激を遮断した。

20

【0177】

## 【表 20 a】

[表 20 a]

野生型 TSHR および Asp43 をアラニンに変異させた TSHR を発現する CHO 細胞における、pTSH 刺激によるサイクリック AMP 産生に対する 5C9 IgG の効果。

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	277 ±109	173 ±81	76
TSHのみ	13924 ±717	11651 ±465	84
5B3 <sup>a</sup> 10 µg/mL + TSH	14263 ±2791	17452 ±2160	122
5B3 <sup>a</sup> 100 µg/mL + TSH	18892 ±1222	12685 <sup>1</sup>	67
5C9 0.01 µg/mL + TSH	13145 <sup>1</sup>	12722 ±695	97
5C9 0.1 µg/mL + TSH	7813 ±505	6726 ±488	86
5C9 1.0 µg/mL + TSH	2021 ±515	471 ±217	23
5C9 10 µg/mL + TSH	306 ±287	119 ±68	39
5C9 100 µg/mL + TSH	84 ±93	31 <sup>2</sup>	37
5C9 100 µg/mL のみ	47 ±23	206 ±107	438

10

20

30

## 【0178】

<sup>1</sup>二重測定の平均<sup>2</sup>一重測定

pTSH 濃度 = 3 ng / mL。

全ての希釈はサイクリックAMPアッセイ緩衝液で行った。

<sup>a</sup> 5B3 はグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) に対するヒトモノクローナル抗体である (5C9 に対するネガティブコントロール)。

40

## 【0179】

## 【表 2 0 b】

[表 2 0 b]

野生型TSHRおよびG1u61をアラニンに変異させたTSHRを発現するCHO細胞における、pTSH刺激によるサイクリックAMP産生に対する5C9IgGの効果。

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウエル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	210±101	146±22	70
TSHのみ	12818±2224	15398±982	120
5B3 <sup>a</sup> 10 µg/mL + TSH	11522±2220	19750±2950	171
5B3 <sup>a</sup> 100 µg/mL + TSH	14090±2394	15680±2708	111
5C9 0.01 µg/mL + TSH	13806±1188	18050±2948	131
5C9 0.1 µg/mL + TSH	2886±422	2114±592	73
5C9 1.0 µg/mL + TSH	536±150	766±354	143
5C9 10 µg/mL + TSH	254±208	346±292	136
5C9 100 µg/mL + TSH	202 <sup>1</sup>	328±96	162
5C9 100 µg/mL のみ	218±46	254±48	117

10

20

30

説明注釈については表 2 0 aを参照。

【 0 1 8 0 】

## 【表 20c】

## [表 20c]

野生型 TSHR および His105 をアラニンに変異させた TSHR を発現する CHO 細胞における、pTSH 刺激によるサイクリック AMP 産生に対する 5C9 IgG の効果。

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型 TSHR	変異 TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	245 ±98	590 ±72	241
TSHのみ	14214 ±2111	17979 ±1735	126
5B3 <sup>a</sup> 10 µg/mL + TSH	13214 ±3233	21359 ±1501	162
5B3 <sup>a</sup> 100 µg/mL + TSH	17232 ±2641	24044 ±3398	140
5C9 0.01 µg/mL + TSH	16652 ±2252	24168 ±1690	145
5C9 0.1 µg/mL + TSH	3511 ±590	2869 ±1460	82
5C9 1.0 µg/mL + TSH	454 ±11	561 ±393	124
5C9 10 µg/mL + TSH	289 ±84	434 ±392	150
5C9 100 µg/mL + TSH	223 <sup>1</sup>	134 <sup>1</sup>	60
5C9 100 µg/mL のみ	234 ±50	520 ±198	222

10

20

30

説明注釈については表 20a を参照。

## 【 0 1 8 1 】

【表 2 0 d - 1】

[表 2 0 d]

野生型TSHRおよびG1u107をアラニンに変異させたTSHRを発現するCHO細胞における、pTSH刺激によるサイクリックAMP産生に対する5C9IgGの効果。

## 実験1

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	326±157	1898±594	582
TSHのみ	14838±1396	13435±2613	91
5B3 <sup>a</sup> 10 µg/mL + TSH	14018±3049	17074±1442	122
5B3 <sup>a</sup> 100 µg/mL + TSH	15949±1340	16009±4606	100
5C9 0.01 µg/mL + TSH	17001±5209	15008±1053	88
5C9 0.1 µg/mL + TSH	5950 <sup>1</sup>	5783±3213	97
5C9 1.0 µg/mL + TSH	1058±396	394±314	37
5C9 10 µg/mL + TSH	496±52	449±116	91
5C9 100 µg/mL + TSH	193±196	203±56	105
5C9 100 µg/mL のみ	1266±359	462±324	36

10

20

30

説明注釈については表 2 0 aを参照。

【表 2 0 d - 2】

## 実験2

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	167 ±148	1824 ±354	1092
TSHのみ	17569 ±3919	19358 ±2365	110
5B3 <sup>a</sup> 10 µg/mL + TSH	11692 ±1161	21255 ±2597	182
5B3 <sup>a</sup> 100 µg/mL + TSH	24141 ±1869	22933 ±6554	95
5C9 0.01 µg/mL + TSH	18585 ±5353	21028 ±1432	113
5C9 0.1 µg/mL + TSH	4221 ±1003	1544 ±732	37
5C9 1.0 µg/mL + TSH	738 ±48	28 <sup>1</sup>	4
5C9 10 µg/mL + TSH	214 ±343	321 ±514	150
5C9 100 µg/mL + TSH	238 <sup>1</sup>	64 <sup>2</sup>	27
5C9 100 µg/mL のみ	211 ±75	408 ±138	193

10

20

30

説明注釈については表 2 0 aを参照。

【 0 1 8 2 】

【表 20 e】

[表 20 e]

野生型 TSHR および P h e 1 3 0 をアラニンに変異させた TSHR を発現する CHO 細胞における、p TSH 刺激によるサイクリック AMP 産生に対する 5C9 IgG の効果。

テストサンプル	サイクリック AMP 産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型 TSHR	変異 TSHR	
サイクリック AMP アッセイ 緩衝液のみ	345 ±119	410 ±85	119
TSHのみ	15897 ±1291	16392 ±1318	103
5B3 <sup>a</sup> 10 µg/mL + TSH	18414 ±1662	15765 ±1088	86
5B3 <sup>a</sup> 100 µg/mL + TSH	19561 ±1078	21673 ±3165	111
5C9 0.01 µg/mL + TSH	15255 ±2166	17414 ±1020	114
5C9 0.1 µg/mL + TSH	2712 ±462	9015 ±1835	332
5C9 1.0 µg/mL + TSH	398 ±378	2235 ±1635	562
5C9 10 µg/mL + TSH	151 ±195	1139 ±146	754
5C9 100 µg/mL + TSH	240 ±199	603 ±141	251
5C9 100 µg/mL のみ	334 ±75	446 ±41	134

説明注釈については表 20 a を参照。

【 0 1 8 3 】

10

20

30

【表 20 f】

[表 20 f]

野生型 TSHR および G1u178 をアラニンに変異させた TSHR を発現する CHO 細胞における、pTSH 刺激によるサイクリック AMP 産生に対する 5C9 IgG の効果。

テストサンプル	サイクリック AMP 産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型 TSHR	変異 TSHR	
サイクリック AMP アッセイ 緩衝液のみ	183 ±77	366 ±300	200
TSHのみ	8900 ±1185	7666 ±1659	86
5B3 <sup>a</sup> 10 µg/mL + TSH	9160 ±3180	10828 ±1650	118
5B3 <sup>a</sup> 100 µg/mL + TSH	12920 ±1300	9428 ±1350	73
5C9 0.01 µg/mL + TSH	12580 ±2700	8166 ±195	65
5C9 0.1 µg/mL + TSH	4354 ±920	7314 ±1830	168
5C9 1.0 µg/mL + TSH	688 ±140	3570 ±850	519
5C9 10 µg/mL + TSH	630 ±140	1904 ±360	302
5C9 100 µg/mL + TSH	712 <sup>1</sup>	894 ±120	126
5C9 100 µg/mL のみ	196 ±58	134 ±153	68

10

20

30

説明注釈については表 20 a を参照。

【 0 1 8 4 】

## 【表 20 g】

[表 20 g]

野生型TSHRおよびTy r 1 8 5をアラニンに変異させたTSHRを発現するCHO細胞における、pTSH刺激によるサイクリックAMP産生に対する5C9 Ig Gの効果。

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	139 ±40	163 ±72	117
TSHのみ	12649 ±1577	8305 ±870	66
5B3 <sup>a</sup> 10 µg/mL + TSH	16974 ±205	10088 ±1856	59
5B3 <sup>a</sup> 100 µg/mL + TSH	17089 ±2282	10920 ±2111	64
5C9 0.01 µg/mL + TSH	17264 ±4257	9368 ±2069	54
5C9 0.1 µg/mL + TSH	6217 ±2064	4536 ±724	73
5C9 1.0 µg/mL + TSH	1664 ±636	1199 ±1042	72
5C9 10 µg/mL + TSH	481 ±380	301 ±199	63
5C9 100 µg/mL + TSH	275 ±206	UD	
5C9 100 µg/mL のみ	123 ±38	163 ±60	133

10

20

30

UD = アッセイ測定限界以下。

説明注釈については表 20 aを参照。

## 【 0 1 8 5 】

【表 20h】

[表 20h]

野生型TSHRおよびAsp203をアラニンに変異させたTSHRを発現するCHO細胞における、pTSH刺激によるサイクリックAMP産生に対する5C9IgGの効果。

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	298 ±164	742 ±122	249
TSHのみ	11770 ±398	12594 ±400	107
5B3 <sup>a</sup> 10 µg/mL + TSH	13266 ±1105	12232 ±1819	92
5B3 <sup>a</sup> 100 µg/mL + TSH	14125 ±704	13006 ±2452	92
5C9 0.01 µg/mL + TSH	15454 ±422	14651 ±511	95
5C9 0.1 µg/mL + TSH	4445 ±405	13142 ±1589	296
5C9 1.0 µg/mL + TSH	1352 ±249	14678 ±6312	1086
5C9 10 µg/mL + TSH	807 ±479	12634 ±1036	1566
5C9 100 µg/mL + TSH	367 ±67	12721 ±3187	3446
5C9 100 µg/mL のみ	330 ±46	1368 ±206	415

説明注釈については表 20aを参照。

【0186】

10

20

30

【表 20 i】

[表 20 i]

野生型 TSHR および Tyr 206 をアラニンに変異させた TSHR を発現する CHO 細胞における、pTSH 刺激によるサイクリック AMP 産生に対する 5C9 IgG の効果。

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	380 ±166	402 ±96	106
TSHのみ	15360 ±670	18440 ±1390	120
5B3 <sup>a</sup> 10 µg/mL + TSH	15880 ±1150	21000 ±2340	132
5B3 <sup>a</sup> 100 µg/mL + TSH	19100 ±3090	19680 ±3200	103
5C9 0.01 µg/mL + TSH	16100 ±2360	18420 ±670	114
5C9 0.1 µg/mL + TSH	6220 ±1500	10820 ±1750	174
5C9 1.0 µg/mL + TSH	1306 ±123	3460 ±360	265
5C9 10 µg/mL + TSH	396 ±158	1564 ±176	395
5C9 100 µg/mL + TSH	292 ±130	506 ±120	173
5C9 100 µg/mL のみ	444 ±98	482 ±286	109

10

20

30

説明注釈については表 20 a を参照。

【 0 1 8 7 】

【表 2 0 j】

[表 2 0 j]

野生型 TSHR および L y s 2 0 9 をアラニンに変異させた TSHR を発現する CHO 細胞における、p TSH 刺激によるサイクリック AMP 産生に対する 5 C 9 I g G の効果。

テストサンプル	サイクリック AMP 産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型 TSHR	変異 TSHR	
サイクリック AMP アッセイ 緩衝液のみ	316 ±38	288 ±80	91
TSHのみ	14200 ±1420	9500 ±1620	67
5B3 <sup>a</sup> 10 µg/mL + TSH	12280 ±610	11200 ±3000	91
5B3 <sup>a</sup> 100 µg/mL + TSH	16000 ±1470	13240 ±1530	83
5C9 0.01 µg/mL + TSH	15440 ±2180	5960 ±950	39
5C9 0.1 µg/mL + TSH	4700 ±339	278 ±40	6
5C9 1.0 µg/mL + TSH	1184 ±59	360 ±146	30
5C9 10 µg/mL + TSH	984 ±117	482 ±100	49
5C9 100 µg/mL + TSH	602 ±240	354 ±184	59
5C9 100 µg/mL のみ	272 ±49	280 ±104	103

説明注釈については表 2 0 a を参照。

【 0 1 8 8 】

10

20

30

【表 20k】

[表 20k]

野生型TSHRおよびAsp232をアラニンに変異させたTSHRを発現するCHO細胞における、pTSH刺激によるサイクリックAMP産生に対する5C9IgGの効果。

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	650 ±87	652 ±300	100
TSHのみ	15681 ±866	14884 ±1587	95
5B3 <sup>a</sup> 10 µg/mL + TSH	15210 ±1697	17800 ±3219	117
5B3 <sup>a</sup> 100 µg/mL + TSH	19704 ±1173	17478 ±3150	89
5C9 0.01 µg/mL + TSH	17600 ±1347	15330 ±1593	87
5C9 0.1 µg/mL + TSH	7329 ±860	6556 ±1668	89
5C9 1.0 µg/mL + TSH	1072 ±705	1882 ±653	176
5C9 10 µg/mL + TSH	794 ±406	710 ±596	89
5C9 100 µg/mL + TSH	166 ±95	55 ±51	33
5C9 100 µg/mL のみ	522 ±84	99 <sup>†</sup>	19

説明注釈については表 20aを参照。

【0189】

10

20

30

## 【表 2 0 1】

## [表 2 0 1]

野生型TSHRおよびLys 250をアラニンに変異させたTSHRを発現するCHO細胞における、pTSH刺激によるサイクリックAMP産生に対する5C9IgGの効果。

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	590 ±86	1020 ±104	173
TSHのみ	13332 ±1177	10933 ±1510	82
5B3 <sup>a</sup> 10 µg/mL + TSH	11292 ±1784	13410 ±2930	119
5B3 <sup>a</sup> 100 µg/mL + TSH	14236 ±3521	14049 ±3372	99
5C9 0.01 µg/mL + TSH	15191 ±4117	14460 ±2690	95
5C9 0.1 µg/mL + TSH	6295 ±1897	8486 ±2961	135
5C9 1.0 µg/mL + TSH	643 ±207	2567 ±841	399
5C9 10 µg/mL + TSH	286 ±116	862 ±398	301
5C9 100 µg/mL + TSH	158 ±244	96 ±57	61
5C9 100 µg/mL のみ	458 ±94	448 ±280	98

説明注釈については表 2 0 aを参照。

## 【 0 1 9 0 】

10

20

30

【表 2 0 m】

[表 2 0 m]

野生型TSHRおよびG1u251をアラニンに変異させたTSHRを発現するCHO細胞における、pTSH刺激によるサイクリックAMP産生に対する5C9IgGの効果。

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウエル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	380 ±84	960 ±372	253
TSHのみ	18379 ±987	17492 ±1332	95
5B3 <sup>a</sup> 10 µg/mL + TSH	15152 ±4365	19951 ±2362	132
5B3 <sup>a</sup> 100 µg/mL + TSH	18169 ±3454	20461 ±1345	113
5C9 0.01 µg/mL + TSH	21197 ±1280	21950 ±936	104
5C9 0.1 µg/mL + TSH	8640 ±2123	15532 ±2571	180
5C9 1.0 µg/mL + TSH	915 ±139	5240 ±332	573
5C9 10 µg/mL + TSH	752 ±127	1881 ±212	250
5C9 100 µg/mL + TSH	496 ±166	1170 ±123	236
5C9 100 µg/mL のみ	460 ±102	406 ±212	88

10

20

30

説明注釈については表 2 0 aを参照。

【 0 1 9 1 】

【表 20 n】

[表 20 n]

野生型TSHRおよびThr 257をアラニンに変異させたTSHRを発現するCHO細胞における、pTSH刺激によるサイクリックAMP産生に対する5C9 IgGの効果。

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	626 ±153	1140 ±153	182
TSHのみ	16928 ±2079	18563 ±1573	110
5B3 <sup>a</sup> 10 µg/mL + TSH	17542 ±1874	23341 ±4203	133
5B3 <sup>a</sup> 100 µg/mL + TSH	18948 ±1444	20101 ±2902	106
5C9 0.01 µg/mL + TSH	18722 ±3876	21088 ±1810	113
5C9 0.1 µg/mL + TSH	6143 ±1233	7944 ±1138	129
5C9 1.0 µg/mL + TSH	1396 ±172	1594 ±156	114
5C9 10 µg/mL + TSH	638 ±58	972 ±12	152
5C9 100 µg/mL + TSH	591 ±99	611 ±52	103
5C9 100 µg/ml のみ	566 ±143	637 ±300	111

説明注釈については表 20 aを参照。

【 0 1 9 2 】

10

20

30

【表 2 0 0】

[表 2 0 0]

野生型TSHRおよびArg 274をアラニンに変異させたTSHRを発現するCHO細胞における、pTSH刺激によるサイクリックAMP産生に対する5C9 IgGの効果。

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	124 ±103	86 ±38	69
TSHのみ	21347 ±1112	11432 ±2511	54
5B3 <sup>a</sup> 10 µg/mL + TSH	18654 ±3700	12961 ±2609	69
5B3 <sup>a</sup> 100 µg/mL + TSH	26203 ±4753	13138 ±2248	50
5C9 0.01 µg/mL + TSH	16345 ±3974	9557 ±2479	58
5C9 0.1 µg/mL + TSH	4997 ±1392	1320 ±158	26
5C9 1.0 µg/mL + TSH	808 ±510	177 ±120	22
5C9 10 µg/mL + TSH	684 ±182	108 <sup>1</sup>	16
5C9 100 µg/mL + TSH	246 ±165	17 <sup>2</sup>	7
5C9 100 µg/mL のみ	111 ±26	34 ±43	31

説明注釈については表 2 0 aを参照。

【 0 1 9 3 】

10

20

30

【表 20 p - 1】

[表 20 p]

野生型TSHRおよびAsp276をアラニンに変異させたTSHRを発現するCHO細胞における、pTSH刺激によるサイクリックAMP産生に対する5C9IgGの効果。

## 実験1

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型TSHR	変異TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	365 ±166	1454 ±258	398
TSHのみ	17500 ±727	22416 ±2570	128
5B3 <sup>a</sup> 10 µg/mL + TSH	19354 ±1794	25180 ±5609	130
5B3 <sup>a</sup> 100 µg/mL + TSH	21671 ±2064	25707 ±4101	119
5C9 0.01 µg/mL + TSH	17236 ±2705	26212 ±2597	152
5C9 0.1 µg/mL + TSH	5594 ±723	16856 ±2110	301
5C9 1.0 µg/mL + TSH	759 <sup>1</sup>	4788 ±553	631
5C9 10 µg/mL + TSH	366 ±145	1384 ±602	378
5C9 100 µg/mL + TSH	344 ±566	565 ±176	164
5C9 100 µg/mL のみ	300 ±242	602 ±274	201

説明注釈については表 20 aを参照。

10

20

30

【表 2 0 p - 2】

## 実験 2

テストサンプル	サイクリックAMP産生 (fmol/細胞ウェル; 平均±SD, n=3)		変異/野生型 (%)
	野生型 TSHR	変異 TSHR	
サイクリックAMPアッセイ 緩衝液のみ	156 ±30	601 ±190	385
TSHのみ	13852 ±756	14616 ±453	106
5B3 <sup>a</sup> 10 µg/mL + TSH	13025 ±3292	17706 <sup>1</sup>	136
5B3 <sup>a</sup> 100 µg/mL + TSH	14245 ±1024	18041 ±4561	127
5C9 0.01 µg/mL + TSH	14066 ±2291	21213 ±3443	151
5C9 0.1 µg/mL + TSH	4462 ±363	7320 ±1614	164
5C9 1.0 µg/mL + TSH	657 ±257	1513 ±835	230
5C9 10 µg/mL + TSH	541 ±224	1301 ±911	240
5C9 100 µg/mL + TSH	286 ±184	288 ±87	101
5C9 100 µg/mL のみ	208 ±15	314 ±69	151

10

20

30

説明注釈については表 2 0 aを参照。

【 0 1 9 4 】

【表 2 1 - 1】

[表 2 1]

TSHRを導入したCHO細胞における、サイクリックAMP産生に関わるTSH刺激に対する5C9IgGおよび9D33IgGの遮断能におけるTSHR変異の効果（野生型と比較した）の要約

TSHR変異	(野生型と比較した) pTSHによる サイクリックAMP 産生刺激	5C9IgGによる (野生型と比較した) サイクリックAMP 産生のTSH刺激 の遮断	9D33IgGによる (野生型と比較した) サイクリックAMP 産生のTSH刺激 の遮断
野生型	+++++	+++++	+++++
Asp 43 Ala	+++	+++++	+++++
Lys 58 Ala	+++++	+++++	0
Ile 60 Ala	+++++	+++++	+++++
Glu 61 Ala	++++	+++++	+++++
Arg 80 Ala	+++++	+++++	0
Tyr 82 Ala	+++++	+++++	0
Thr 104 Ala	+++++	+++++	NT
His 105 Ala	+++++	+++++	NT
Glu 107 Ala	+++	+++++	+++++
Arg 109 Ala	+++++	+++++	0
Lys 129 Ala	+++++	0	0
Phe 130 Ala	+++++	+++	+++++
Phe 134 Ala	+++++	+++++	++
Asp 151 Ala	+++++	++++	NT
Glu 178 Ala	++++	+++	++++
Lys 183 Ala	+++++	+	+++++
Tyr 185 Ala	++++	+++++	+++++
Asp 203 Ala	++++	0	+++++
Tyr 206 Ala	++++	+++	+++++
Lys 209 Ala	++++	+++++	+++++
Asp 232 Ala	+++	+++++	+++++
Gln 235 Ala	+++++	+++++	+++++

10

20

30

40

【表 2 1 - 2】

Lys 250 Ala	+++++	++++	++++
Glu 251 Ala	+++++	+++	+++++
Arg 255 Ala	+++++	+++++	+++++
Thr 257 Ala	+++++	+++++	+++++
Trp 258 Ala	+++++	+++++	+++++
Arg 274 Ala	+++++	+++++++	+++++++
Asp 276 Ala	+++++	++++	+++++
Ser 281 Ala	++++	+++++	++++
Arg 80 Asp	++++	+++++	0
Asp 151 Arg	+++++	+++++	NT
Lys 183 Asp	+++	+	+++++
Arg 255 Asp	+++++	+++++	+++++++
Asp 160 Lys	0	+++++ <sup>a</sup>	NT

10

20

使用した p T S H 濃度 = 3 n g / m L

T S H R の比較した効果は野生型とともに観察された活性のパーセンテージで以下のように表される： - + + + + = 野生型活性の 1 0 0 % ； + + + + = 野生型活性の 8 0 % 以上 1 0 0 % 未満； + + + = 野生型活性の 6 0 % 以上 8 0 % 未満； + + = 野生型活性の 4 0 % 以上 6 0 % 未満； + = 野生型活性の 2 0 % 以上 4 0 % 未満、 0 = 野生型の 2 0 % 未満、および野生型と比較して増加した活性： > 1 0 0 % は + + + + + + + 。 N T = テストせず。

<sup>a</sup>この実験のためのサイクリック A M P 刺激は、 T S H の応答を欠失した M 2 2 を用いた（詳しくは明細書を参照）。

30

【 0 1 9 5 】

## 【表 2 2】

[表 2 2]

サイクリックAMP産生に関わるTSH刺激に対する、アンタゴニスト活性をもつ患者血清TSHR自己抗体(B2-B5)の遮断能におけるTSHRのAsp203Ala変異の効果

テストしたサンプルおよび希釈血清 <sup>a</sup>	野生型TSHRサイクリックAMP濃度 fmol/cell well. Mean ± SD; n=3	TSHで刺激されたサイクリックAMPレベルによる野生型TSHR阻害率(%)	TSHR Asp203AlaサイクリックAMP濃度 fmol/細胞 ウェル 平均±SD: n=3	TSHで刺激されたサイクリックAMP TSHRのレベルによるAsp203Ala阻害率(%)
サイクリックAMPアッセイ緩衝液	242 ±130		292 ±89	
TSH <sup>c</sup>	9357 ±1155		7591 ±832	
TSH <sup>c</sup> + 1 μg/mL 5C9	1110 ±811	92	9400 <sup>1</sup>	4
HDPプール/10	183 ±67		496 ±76	
TSH <sup>c</sup> + HBD	13303 ±1819	0	9756 <sup>1</sup>	0
B2/10	110 ±36		270 ±72	
TSH <sup>c</sup> + B2/10	454 ±381	97	1963 ±357	80
B3/10	329 <sup>1</sup>		582 ±74	
TSH <sup>c</sup> + B3/10	3407 ±1341	74	4027 ±278	59
B4/10	59 ±22		161 ±36	
TSH <sup>c</sup> + B4/10	278 ±73	98	150 ±41	98
B5/10	647 ±170		1064 ±228	
TSH <sup>c</sup> + B5/10	4173 ±515	69	6871 ±618	30

<sup>a</sup>サイクリックAMPアッセイ緩衝液での希釈

<sup>b</sup>TSHの関与するサイクリックAMP刺激の阻害率%

【数 7】

$$100 \times \left[ 1 - \frac{\text{テストサンプル/10およびTSH (3 ng/mL) 存在下で産生したサイクリックAMP}}{\text{/10HBDおよびTSH (3 ng/mL) の存在下で産生したサイクリックAMP}} \right]$$

<sup>1</sup>二重サンプルの平均

<sup>c</sup>最終濃度 3 ng/mL で使用された pTSH

HBD プール = 健常人ドナー血清のプール

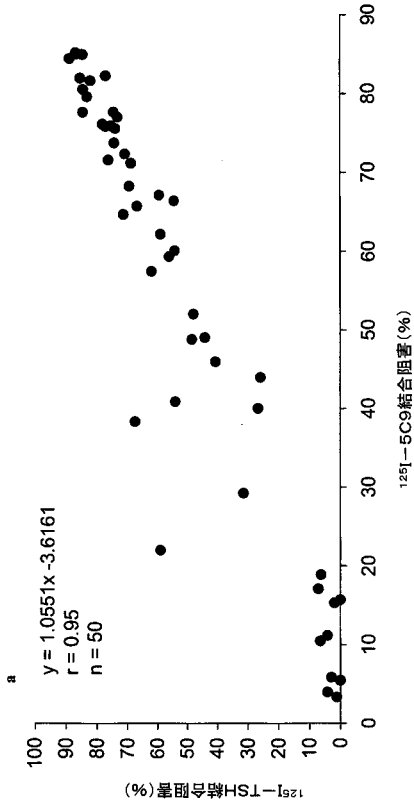
10

20

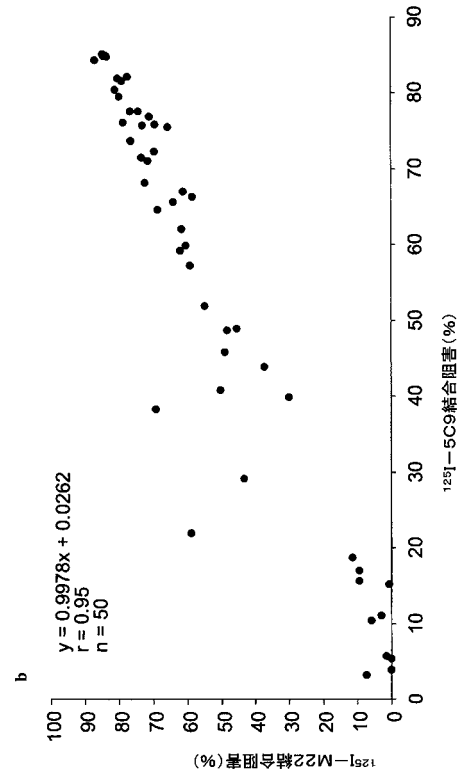
30

40

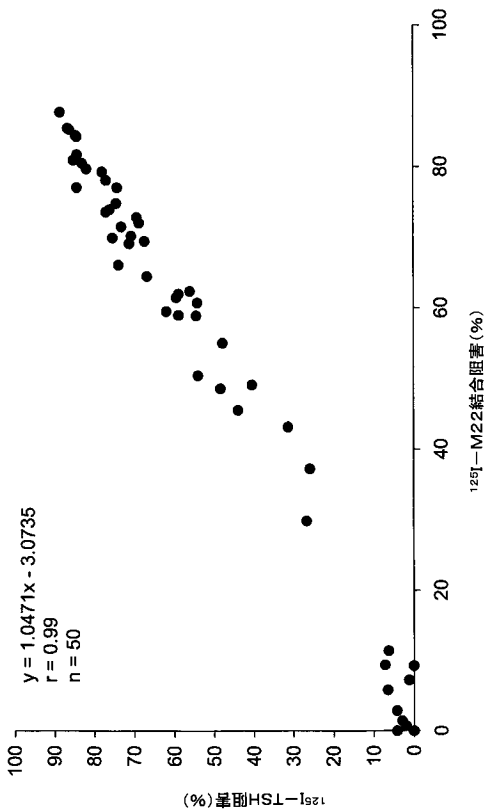
【 図 1 - 1 】



【 図 1 - 2 】



【 図 1 - 3 】



【 図 2 - 1 】

a

```

gaagtgcagctggtggagtctggaggagcctgatccagcctggggggtc
cctgagactctcctgtgagcctctgggtccacgctcagtagcaactaca
tgagctgggtccgccaggtccagggaagggctggagtggtctcagtt
acttatagcgggtgtagcactcctacgcagactccgtgaagggcagtt
caccatctccagagcaatccaagcaacgctgtatctccaatgaaca
gcctgagagccgaggaacagggcctgtatctctgtagcagagggggcga
tatgtagtagtataagctgctacgcagggaggggtgtagctactgggg
ccagggaaacctggtcacctctcctcagcctccacaagggccctcagc
tcttccccctggaccctctcccaagagcactctgggggcacagcggcc
ctgggtgctggtcaagactacttccccgaaccggtgacggtgtctgtg
gaactcagggccctgaccagcggctgcaacacttcccggtgtcttac
agtcctcaggaactctactccctcagcagcctggtgacctgacctcagc
agcttgggcaaccagactactctgcaactgcaatccaagccagcaaa
caccnaaggtggcaagaggttgagcccaaatcttgtagcaaaactagt

```

PCRプライマー

```

gaagtgcagctggtggagtctggaggagcctgatccagcctggggggtc 50
cctgagactctcctgtgagcctctgggtccacgctcagtagcaactaca 100
gaagtgcagctggtggagtctggaggagcctgatccagcctggggggtc 150
acttatagcgggtgtagcactcctacgcagactccgtgaagggcagtt 200
caccatctccagagcaatccaagcaacgctgtatctccaatgaaca 250
gcctgagagccgaggaacagggcctgtatctctgtagcagagggggcga 300
tatgtagtagtataagctgctacgcagggaggggtgtagctactgggg 350
ccagggaaacctggtcacctctcctcagcctccacaagggccctcagc 400
tcttccccctggaccctctcccaagagcactctgggggcacagcggcc 450
ctgggtgctggtcaagactacttccccgaaccggtgacggtgtctgtg 500
gaactcagggccctgaccagcggctgcaacacttcccggtgtcttac 550
agtcctcaggaactctactccctcagcagcctggtgacctgacctcagc 600
agcttgggcaaccagactactctgcaactgcaatccaagccagcaaa 650
caccnaaggtggcaagaggttgagcccaaatcttgtagcaaaactagt 699

```

CDR 1  
 CDR 2  
 CDR 3  
 定常領域

【 2 - 2 】

b

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYHSVVRQAPGKGLEWVSV  
 TYSGGSTYSADSVKGRFTISRDNKNTLYLNHNSLRAREDYAVYCAKGR  
 YCSSISCYARSGCDYWGQGLTVTVSSASTKPSVFFPLAPSSKSTSGGTAA  
 LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVFSS  
 SLGTQTYICNVNHKPSNTIKVDKRVKPKSCKDTS

PCRプライマー  
 EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYHSVVRQAPGKGLEWVSV 50  
 TYSGGSTYSADSVKGRFTISRDNKNTLYLNHNSLRAREDYAVYCAKGR 100  
 YCSSISCYARSGCDYWGQGLTVTVSSASTKPSVFFPLAPSSKSTSGGTAA 150  
 LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVFSS 200  
 SLGTQTYICNVNHKPSNTIKVDKRVKPKSCKDTS 233

【 3 - 1 】

a

gcaatccagatgaccagtcctctctccctctctctgctgcatctgtaggaga  
 cagagtcaccataccttgcgggcaagtcagagcattagcaactatttaa  
 attggtatcagcagaaccagggaagccccaagctctgctatgct  
 gcaatccagcttgcagaagtggggtcccaatcaaggtcaagtggcagtgacc  
 tgggacagatttcaactctaccatcagagctctgcaacctgaagattttg  
 caacttactactgtcaacagagttacagttccccctcccccaactttggc  
 caggggaccagctggagatcaaacgaactgtggctgccaccatctgtctt  
 cacttccccgcatctgatgagcagttgaaatctggaactgctctgttg  
 tgtgctgctgaataacttctatcccagagagggccaaagtcacagtggaag  
 gtggataacgcccctccatcgggtaactcccaggagaggtgtcacagagca  
 ggacagcagggcagcaccctcagcctcagcagcaccctgacctgagca  
 aagcagactacgagaacacaagctcagcctcagcagcagctgacccatcag  
 ggctgagctgcgccgt

PCRプライマー  
 gcaatccagatgaccagtcctctctccctctctctgctgcatctgtaggaga 50  
 cagagtcaccataccttgcgggcaagtcagagcattagcaactatttaa 100  
 attggtatcagcagaaccagggaagccccaagctctgctatgct 150  
 gcaatccagcttgcagaagtgggggtcccaatcaaggtcaagtggcagtgacc 200  
 tgggacagatttcaactctaccatcagagctctgcaacctgaagattttg 250  
 caacttactactgtcaacagagttacagttccccctcccccaactttggc 300  
 caggggaccagctggagatcaaacgaactgtggctgccaccatctgtctt 350  
 cacttccccgcatctgatgagcagttgaaatctggaactgctctgttg 400  
 tgtgctgctgaataacttctatcccagagagggccaaagtcacagtggaag 450  
 gtggataacgcccctccatcgggtaactcccaggagaggtgtcacagagca 500  
 ggacagcagggcagcaccctcagcctcagcagcaccctgacctgagca 550  
 aagcagactacgagaacacaagctcagcctcagcagcagctgacccatcag 600  
 ggctgagctgcgccgt 617

【 3 - 2 】

b

AIQNTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQISNLYNLYVQKPKAPKLLIYA  
 ASLSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSPSTTFG  
 QGTLKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQW#K  
 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSLSTLTLKADYERHKVYACEVTHQ  
 GLSSP

PCRプライマー  
 AIQNTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQISNLYNLYVQKPKAPKLLIYA 50  
 ASLSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSPSTTFG 100  
 QGTLKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQW#K 150  
 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSLSTLTLKADYERHKVYACEVTHQ 200  
 GLSSP 205

【 4 】

60	MRPADLQLV LILDLPRDLG GNGCSPPCE CHQEDRFVIT CKDIQRIPSL PPSDTGKLI
120	ETHLRITESH AFSNLENISR IYWSIDVTLQ QLESHSEFNL SKVTHIEIRM TENLTYIDPD
180	AJAKEFLKLF LGIFRITLGM FPDIAKVYST DIFFILEID NPMTSIPVN AFQGLCNETL
240	TLKLYNNGFT SVQCHAENGT KLDAYLNKN KLYTVDKDA FGGVYSGSL LDVSGTAVTA
300	LPSKGLHLK ELIARTWTIL KKLPLSLSLFL HLTRADLSYP SHCCAFKNOK KIRGLIESLM
360	CNESSMQSLR QRKSNVALNS PHLQYEENL GDSIVGYEK SKPQTHNNA HYYVFEQE
420	DEIGFGQEL KNPQETLQA FDSHYDYIC GDSIEDMCTP KSDEFNFCED IMGYFLRLV
480	VWFVSLALL GNVFVILLIL TSHYKLVNPR FLACNLAFAD FCWGMILLI ASVDLYTHSE
540	YNNHADMQT GPCGNTAGFF TVFASLSVY TLVTITLERN YALTFMRLD RKIRLRHCA
600	IMWGWVCCF LIALPLVGI SSVAKVSLC EMDTETPLAL AYIVFVILIN IVAFVIVCC
660	YVKIYTVRN EQINPDKOT KIAKRMVILI FTDFCWAPI SFYALSAILN KPLITVNSK
720	ILLVFLYPLN SCANPELYAI FTKAFQDVF ILLSKFEGIC RQAQVARGOR VPEKNSDIO
764	VQKVTHDMRQ GSHNMEVYE LIENSHLTPK KQGOISEEYM QTVL

1  
61  
121  
181  
241  
301  
361  
421  
481  
541  
601  
661  
721

【配列表】

2010521139000001.xml

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/GB2008/000518
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K16/28 A61K39/395 A61P5/08 C12N15/13 C12N5/24 C12N5/28 G01N33/564		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOHN L D ET AL: "Characterization of monoclonal thyroid-stimulating and thyrotropin binding-inhibiting autoantibodies from a Hashimoto's patient whose children had intrauterine and neonatal thyroid disease." THE JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM DEC 1997, vol. 82, no. 12, December 1997 (1997-12), pages 3998-4009, XP002482177 ISSN: 0021-972X the whole document, especially page 4003, left-hand column, 2nd paragraph - right-hand column, 2nd paragraph -/-	1-63
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 May 2008		Date of mailing of the international search report 11/06/2008
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bayer, Annette

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2008/000518

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/49050 A (BRAHMS DIAGNOSTICA GMBH [DE]; BERGMANN ANDREAS [DE]; STRUCK JOACHIM [D] 24 August 2000 (2000-08-24) page 8, line 20 - page 15, line 36 page 17, line 20 - page 22, line 19 claims 1-9	1-63
X	VALENTE W A ET AL: "Monoclonal antibodies to the thyrotropin receptor: stimulating and blocking antibodies derived from the lymphocytes of patients with Graves disease." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA NOV 1982, vol. 79, no. 21, November 1982 (1982-11), pages 6680-6684, XP002482178 ISSN: 0027-8424 the whole document, especially figures 1-3	1,4,6,7,9,10,17-24,34,35,52-56
X	YOSHIDA T ET AL: "MONOCLONAL ANTIBODIES TO THE TSH RECEPTOR BIND TO A 56 KDA SUBUNIT OF THE TSH RECEPTOR AND SHOW HETEROGENEOUS BIOACTIVITIES" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (ONLINE), BETHESDA, MD, vol. 263, no. 31, 5 November 1988 (1988-11-05), pages 16341-16347, XP008070247 ISSN: 1083-351X the whole document, especially page 16344, right-hand column, 2nd paragraph	1,3-7,9,10,17-19,21-24,34,35,52-55
A	WO 02/08723 A (BRAHMS DIAGNOSTICA GMBH [DE]; COSTAGLIOLA SABINE [BE]; VASSART GILBERT) 31 January 2002 (2002-01-31) the whole document, especially page 14ff "Materialien und Methoden - Ergebnisse" and claims 1-12	52-63
A	SANDERS JANE ET AL: "Effects of TSH receptor mutations on binding and biological activity of monoclonal antibodies and TSH." THYROID: OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN THYROID ASSOCIATION DEC 2006, vol. 16, no. 12, December 2006 (2006-12), pages 1195-1206, XP009100831 ISSN: 1050-7256 the whole document	52-63

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No  
 PCT/GB2008/000518

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DAVIES J ET AL: "Affinity improvement of single-antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding" IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL, vol. 2, no. 3, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 169-179, XP004070292 ISSN: 1380-2933 the whole document	
A	HOLT L J ET AL: "Domain antibodies: proteins for therapy" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, 1 November 2003 (2003-11-01), pages 484-490, XP004467495 ISSN: 0167-7799 the whole document	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2008/000518

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0049050	A	24-08-2000	AT 286914 T 15-01-2005
			DE 19907094 C1 13-04-2000
			EP 1153039 A2 14-11-2001
WO 0208723	A	31-01-2002	AT 278942 T 15-10-2004
			DE 10035706 A1 07-02-2002
			EP 1301767 A2 16-04-2003
			JP 2004518945 T 24-06-2004

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 5/00 (2006.01)	A 6 1 P 5/00	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	H
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	N
	G 0 1 N 33/53	E

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100131392

弁理士 丹羽 武司

(72) 発明者 リース, スミス バーナード

イギリス カーディフ C F 1 4 5 D U ラニシェン パーク タイ グラス アールエスアール  
リミテッド エフアイアールエス ラボラトリーズ

(72) 発明者 ファーマニアク, ヤドヴィガ

イギリス カーディフ C F 1 4 5 D U ラニシェン パーク タイ グラス アールエスアール  
リミテッド エフアイアールエス ラボラトリーズ

(72) 発明者 サンダース, ジェーン

イギリス カーディフ C F 1 4 5 D U ラニシェン パーク タイ グラス アールエスアール  
リミテッド エフアイアールエス ラボラトリーズ

F ターム(参考) 2G045 CA26 CB01 DA37 DA56 FB03 FB08

4B024 AA01 AA11 BA43 CA02 DA02 DA06 EA04 GA11 HA03

4B064 AG27 CA02 CA10 CA19 CA20 CC24 CE12 DA01 DA13

4B065 AA90X AA90Y AB01 AB04 AC14 BA02 CA25 CA44

4C085 AA14 AA16 BB31 CC02 CC23 DD23 DD62 EE01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA50 DA76 EA28 FA72 FA74

GA26

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2010521139A5</a>	公开(公告)日	2010-08-19
申请号	JP2009549848	申请日	2008-02-14
[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		
[标]发明人	リーススミスバーナード ファーマニアクヤドヴィガ サンダーズジェーン		
发明人	リース,スミス バーナード ファーマニアク,ヤドヴィガ サンダーズ,ジェーン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 C12P21/08 C12N15/02 C12N5/10 A61P35/00 A61P5/00 A61P27/02 A61K39/395 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 C12P21/08 C12N15/00.C C12N5/00.102 A61P35/00 A61P5/00 A61P27/02 A61K39/395.H G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.N G01N33/53.E		
F-TERM分类号	2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/DA37 2G045/DA56 2G045/FB03 2G045/FB08 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/CA02 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB31 4C085/CC02 4C085/CC23 4C085/DD23 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	川口义行 远山 勉		
优先权	60/901332 2007-02-15 US 2007002990 2007-02-15 GB 2007014036 2007-07-18 GB		
其他公开文献	JP2010521139A JP5345556B2		

#### 摘要(译)

本发明是TSH的拮抗剂，提供了针对TSHR分离的抗体。本发明还涉及本发明的抗体的用途。