

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5345556号
(P5345556)

(45) 発行日 平成25年11月20日 (2013.11.20)

(24) 登録日 平成25年8月23日 (2013.8.23)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2
請求項の数 47 (全 133 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2009-549848 (P2009-549848)	(73) 特許権者	507044468
(86) (22) 出願日	平成20年2月14日 (2008.2.14)		アールエスアール リミテッド
(65) 公表番号	特表2010-521139 (P2010-521139A)		イギリス国, カーディフ シーエフ23
(43) 公表日	平成22年6月24日 (2010.6.24)		8エイチイー, ペントウィン, アヴェニュー・パーク (番地なし)
(86) 国際出願番号	PCT/GB2008/000518	(74) 代理人	100100549
(87) 国際公開番号	W02008/099185		弁理士 川口 嘉之
(87) 国際公開日	平成20年8月21日 (2008.8.21)	(74) 代理人	100126505
審査請求日	平成22年6月30日 (2010.6.30)		弁理士 佐貫 伸一
(31) 優先権主張番号	60/901,332	(74) 代理人	100131392
(32) 優先日	平成19年2月15日 (2007.2.15)		弁理士 丹羽 武司
(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)		
		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) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

甲状腺刺激ホルモンレセプター (TSHR) に対する、単離されたヒトモノクローナル
またはリコンビナント抗体であって、

該抗体は、

甲状腺刺激ホルモン (TSH) のアンタゴニストであり、

ヒト完全長 TSHR に対して少なくとも 10^9 L / m o l の結合アフィニティを有し、

a) S N Y M S (C D R 1、配列番号 1) ;

b) V T Y S G G S T S Y A D S V K G (C D R 2、配列番号 2) ; および 10

c) G G R Y C S S I S C Y A R S G C D Y (C D R 3、配列番号 3)

を含む V_H 領域を含み、

a) R A S Q S I S N Y L N (C D R 1、配列番号 4) ;

b) A A S S L Q S (C D R 2、配列番号 5) ; および

c) Q Q S Y S S P S T T (C D R 3、配列番号 6)

を含む V_L 領域を含み、

該抗体は、

配列番号 7

gaagtgcagctgggtggagctctggaggaggcctgatccagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctgggtt
caccgtcagtagcaactacatgagctgggtccgccaggctccaggggaaggggtggagtggtctcagttacttatagcg 20

gtggtagcacatcctacgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctt
 caaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgagaggggggcatattgtagtagtataagctg
 ctacgcgaggagcgggtgtgactactggggccaggaacccctgggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcccatcgg
 tcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggacagcggccctgggctgctgggtcaaggactacttcccc
 gaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggtgtcctacagtctcagg
 actctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgcccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcaca
 agcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaatctgtgacaaaactagt

にコードされるアミノ酸配列、および、
 配列番号 8

gccatccagatgaccagctccttccctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagtca
 gagcattagcaactattttaattgggtatcagcagaaaccagggaagcccttaagctcctgatctatgctgcatccagtt
 tgcaaagtggggtcccatcaaggttcagtggcagtggtatctgggacagatttactctcaccatcagcagcttgcaacct
 gaagatttgcacacttactactgtcaacagagttacagttccccctccaccactttggccaggggaccaagctggagat
 caaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttg
 tgtgctgtgtaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcccctccaatcgggtaactcc
 caggagagtgctcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccttgacgctgagcaaagcagacta
 cgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccg

にコードされるアミノ酸配列を含む、抗体。

【請求項 2】

ヒト完全長 TSHR に対して少なくとも 10^{10} L / mol の結合アフィニティを有す
 る、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

TSHR の恒常的活性を阻害する、請求項 1 または 2 に記載の抗体。

【請求項 4】

甲状腺刺激性抗体のアンタゴニストである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体
 。

【請求項 5】

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 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 6】

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 4 ま
 たは 5 に記載の抗体。

【請求項 7】

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 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 8】

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 ~ 7 のいずれか 1 項に
 記載の抗体。

【請求項 9】

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 8 に記載の抗体。

【請求項 10】

前記結合を阻止する、請求項 8 または 9 に記載の抗体。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 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を含むヌク
 レオチド。

【請求項 12】

請求項 11 に記載のヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む単離細胞。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 1 0 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 5】

請求項 1 ~ 1 0 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 1 6】

安定ヘテロ - ハイブリドーマ細胞株由来である、請求項 1 3、1 4、または 1 5 に記載の単離細胞。

【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 1 0 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。 10

【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 1 0 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 1 9】

請求項 1 ~ 1 0 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 0】

請求項 1 ~ 1 0 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。 20

【請求項 2 1】

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の抗体を薬理学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 2】

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 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 3】

ヒトへの投与に適する、請求項 2 1 または 2 2 に記載の医薬組成物。 30

【請求項 2 4】

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 1、2 2 または 2 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 5】

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 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 2 6】

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 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 7】

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 1 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。 40

【請求項 2 8】

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 1 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 2 9】

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 1 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 3 0】

請求項 1 ~ 1 0 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 3 ~ 1 6 の 50

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 1】

該抗体が該細胞により分泌される、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

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 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の抗体の使用。

【請求項 3 3】

医学的治療における使用のための、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 3 4】

甲状腺関連疾患の治療における使用のための、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 3 5】

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 3 4 に記載の抗体。

【請求項 3 6】

T S H R 抗体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 R 抗体の結合を決定することを含み、請求項 1 ~ 1 0 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。

【請求項 3 7】

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 0 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 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

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 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

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 0 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。

【請求項 4 0】

E L I S A 形式である、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

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 0 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 4 2】

請求項 1 ~ 1 0 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。

【請求項 4 3】

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 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

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 0 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 4 5】

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 4 4 に記載

10

20

30

40

50

の方法。

【請求項 4 6】

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 0 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 4 7】

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 4 6 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0 0 0 1】

本発明はサイロトロピン (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】

サイロトロピン、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 kudlinski MW, Fremont V, Ronin C, Weintraub BD 2002 Thyroid-stimulating hormone and TSHR structure-function relationships. Physiological Reviews 82: 473-502) 。

T S H R 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 (L R D)、切断ドメイン (C D)、および膜貫通ドメイン (T M D) 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) 。

T S H の T S H R への結合により、甲状腺ホルモンであるサイロキシン (T 4) およびトリヨードサイロニン (T 3) 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 T 4 および T 3 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 T S H の放出 (および視床下部から分泌されるサイロ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。

20

30

【0 0 0 3】

当該技術分野において、ある自己免疫性甲状腺疾患 (A I T D) の患者が T S H R 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 T S H R に結合して T S H 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 T 4 および T 3 を産生する。これらの自己抗体は、刺激活性または T S H アゴニスト活性を有する、甲状腺刺激性自己抗体または T S H R 自己抗体 (T R A b) 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。

この疾患はグレーブス病として知られる。ある患者において、刺激活性のある T R A b は後眼窩組織の T S H R との相互作用に関与し、かつグレーブ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 (h M A b である T S H R 1) の詳細が、特許出願の国際公開第 2 0 0 4 / 0 5 0 7 0 8 A 2 号に記載されている。

40

【0 0 0 4】

一方 A I T D のある患者においては、自己抗体は T S H R に結合して T S H のレセプターへの結合を阻止するが、T S H R 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 T S H アンタゴニスト活性をもつ T R A b として知られており、血清中に遮断性の T R A b 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 (

50

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 T R A b が存在すると、これが胎盤を通過して胎児の甲状腺 T S H R 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 T R A b 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、T S H アンタゴニスト活性を有する、T S H R 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 T S H R と相互作用するか、およびその T S H R との相互作用が、刺激性の自己抗体（例えば M 2 2）および T S H と T S H R 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。

10

【 0 0 0 5 】

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。

【 0 0 0 6 】

刺激活性または遮断活性により T R A b の性質を特徴づけることは、T S H R 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 2 0 0 4 / 0 5 0 7 0 8 A 2 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 T S H R 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 2 0 0 6 / 0 1 6 1 2 1 A 号は、少なくとも 1 つの点突然変異を含む変異 T S H R 製剤を開示しており、これは患者血清刺激性 T S H R 自己抗体、患者血清遮断性 T S H R 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 T S H 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 2 0 0 4 / 0 5 0 7 0 8 A 2 号はまた、T S H R 遮断活性をもつマウスモノクローナル抗体 (9 D 3 3) について記載している。9 D 3 3 は高アフィニティー (2×10^{10} L / m o l) で T S H R に結合する、T S H、h M A b である T S H R 1 (M 2 2)、および刺激活性または遮断活性をもつ患者血清 T R A b の効果的なアンタゴニストである (特許出願国際公開第 2 0 0 4 / 0 5 0 7 0 8 A 2 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, Rees 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 9 D 3 3 は、遮断活性をもつ患者血清 T R A b 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 T S H R 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 T S H R への自己免疫反応過程で産生される T S H R 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、9 D 3 3 はヒトにおける i n v i v o 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。

20

30

【 0 0 0 7 】

本発明は、患者血清中の T S H および刺激性 T R A b の効果的なアンタゴニストである、T S H R に対するヒトモノクローナル自己抗体 (5 C 9) の産生および特性に由来する。5 C 9 は、甲状腺機能低下症および高濃度の T S H R 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・バーウィルス (E B V) 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 I g G を精製し、5 C 9 I g G の T S H R への結合能、および T S H R 活性への影響を評価した。特に、T S H R への T S H の結合の障害、および T S H のサイクリック A M P 刺激活性の障害に対する 5 C 9 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 T R A b の T S H R への結合の障害、およびそれらの生物活性の障害に対する 5 C 9 の能力もまた評価した。加えて、T S H R 抗体、T S H、および関連化合物のアッセイにおける 5 C 9 の使用も検討した。5 C 9 の、重鎖 (H C) および軽鎖 (L C) 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 (C

40

50

D R) を特定した。

【発明の概要】

【0008】

本発明の第一の態様によれば、T S H のアンタゴニストである、T S H R 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、T S H のアンタゴニストである、T S H R 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。

10

【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、T S H アンタゴニストである患者血清 T S H R 自己抗体の T S H 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、T S H 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】

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 T S H R 自己抗体のアンタゴニスト特性を有してよい。

20

【0015】

本発明による抗体は、T S H、M 2 2、または T S H R 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、T S H R またはその一部への結合の阻害剤であってよい。T S H R の一部は L R D 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が、または T S H 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っている。本発明による抗体は、図 2 に示される C D R 1、C D R 2、または C D R 3 から選択される 1 または 2 以上の C D R、またはこれら C D R 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_H 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 C D R 1、C D R 2、または C D R 3 から選択される 1 または 2 以上の C D R、またはこれら C D R 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_L 領域を含んでよい。

30

【0017】

本発明による抗体は、ヒト完全長 T S H R に対し、約 10^{10} L / m o l 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 T S H R に対し、約 10^9 L / m o l の結合アフィニティを有する。

【0018】

本発明は当業者が、刺激性および遮断性 T S H R 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、T S H R 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。

40

【0019】

本発明による好ましい抗体は 5 C 9 である。5 C 9 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 M 2 2 の非存在下での試験システムにおけるサイクリック A M P 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

50

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。

【 0 0 2 0 】

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、 $IgG\Delta C_H2$ 、 $F(ab')_2$ 、 Fab 、 $scFv$ 、 V_L 、 V_H 、 $dsFv$ 、ミニボディ(Minibody)、トリアボディ(Triabody)、テトラボディ(Tetrabody)、 $(scFv)_2$ 、 $scFv-Fc$ 、 $F(ab')_3$ 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)。

10

【 0 0 2 1 】

「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。

【 0 0 2 2 】

本発明の他の態様によれば、

20

- 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_H ドメイン、抗体 V_L 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 10^9 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。

【 0 0 2 3 】

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。

【 0 0 2 4 】

30

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。

【 0 0 2 5 】

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。

【 0 0 2 6 】

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。

40

【 0 0 2 7 】

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。

【 0 0 2 8 】

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、

50

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。

【 0 0 2 9 】

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。

【 0 0 3 0 】

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 2 0 0 4 / 0 5 0 7 0 8 号に開示されている 9 D 3 3 である。

【 0 0 3 1 】

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。

【 0 0 3 2 】

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、いずれかの薬理学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学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。

【 0 0 3 3 】

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、口腔経由で、経膈で、または埋め込み型リザーバー経由で投与されてよい。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。

【 0 0 3 4 】

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、T w e e n 8 0)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学的に許容される油、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。

【 0 0 3 5 】

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。

【 0 0 3 6 】

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。

10

【 0 0 3 7 】

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。

20

【 0 0 3 8 】

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の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。

【 0 0 3 9 】

30

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。

【 0 0 4 0 】

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。

【 0 0 4 1 】

本発明の他の態様によれば、哺乳類被療体の甲状腺中の T S H R 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 T S H R への結合が阻止される。

40

【 0 0 4 2 】

本発明の他の態様によれば、哺乳類被療体の甲状腺外 T S H R 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 T S H R 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 T S H R に結合する T S H R 自己抗体を好ましく遮断する。

【 0 0 4 3 】

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

50

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。

【 0 0 4 4 】

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。

【 0 0 4 5 】

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。

10

【 0 0 4 6 】

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。

【 0 0 4 7 】

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、および甲状腺炎から選択されてよい。

20

【 0 0 4 8 】

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。

【 0 0 4 9 】

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。

30

【 0 0 5 0 】

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。

【 0 0 5 1 】

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。

40

【 0 0 5 2 】

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。

【 0 0 5 3 】

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

50

するものが好ましく選択される。

【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。

【0056】

【図1-1】TSHRをコートしたチューブへの ^{125}I -5C9IgG、 ^{125}I -TSH、または ^{125}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}I -5C9IgG対 ^{125}I -TSH結合

【図1-2】TSHRをコートしたチューブへの ^{125}I -5C9IgG、 ^{125}I -TSH、または ^{125}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}I -5C9IgG対 ^{125}I -M22IgG結合

【図1-3】TSHRをコートしたチューブへの ^{125}I -5C9IgG、 ^{125}I -TSH、または ^{125}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。c. ^{125}I -TSH対 ^{125}I -M22IgG結合

【図2-1】5C9重鎖(HC)の可変領域配列の配列を示す。a. 5C9HC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、PCR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(CDR)を四角で囲み、定常領域を太字で示す。

【図2-2】5C9重鎖(HC)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5C9HC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】5C9軽鎖(LC)の可変領域配列の配列を示す。a. 5C9LC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。

【図3-2】5C9軽鎖(LC)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5C9LC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TSHR(受入番号P16473、<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】

【0057】

方法

リンパ球分離およびヒトモノクローナルTSHR自己抗体5C9のクローニング

モノクローナル自己抗体5C9は通常、国際公開第2004/050708A2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TRAb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・バーウィルス(EBV)(European Collection of Cell Cultures - ECACC; Porton Down, SP4 OJG5, UK)に感染させ、国際公開第2004/050708A2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。TSHR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K6H6/B5(ECACC)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TSHR自己抗体の存在は、 ^{125}I で標識したTSHのTSHRへの結合の阻害により検出した(国際公開第2004/050708A2号)。TSHR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。

10

20

30

40

50

【 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 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE)により評価した。

【 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、B296AT、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ティングにより決定した。

【 0 0 6 0 】

20 mmol/L の酢酸ナトリウム(pH 4.5)中における 10 mg/mL 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(1000 x g、室温で 5 分間)により除去し、上清を 300 mmol/L の NaCl, 10 mmol/L の Tris-HCl、pH 7.5 に対し、4

においてオーバーナイトで透析した。5 C 9 F(ab')₂ および少量のインタクトな I g G を含む透析された混合物は、Sephacryl S-300 High Resolution Matrix (GE Healthcare、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 5 C 9 F(ab')₂ 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 I g G を含まなかった。

【 0 0 6 1 】

さらに F(ab')₂ は、最終濃度 100 mmol/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 50 mmol/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') 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') 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')₂ を含まなかった。

【 0 0 6 2 】

さらに、5 C 9 I g G をマーキュリーパパイン(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、50 mmol/L の NaCl, Tris-HCl、pH 9.0 中へ透析し、Fab 製剤からインタクトな I g G 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 I g G は検出されないことを示した。

【 0 0 6 3 】

5 C 9 I g G は、Sanders J, Oda Y, Roberts S, Kiddie A, Richards T, Bolton J, McGrath V, Walters S, Jaskolski D, Furmaniak J, Rees Smith B 1999. The interaction of TSH receptor autoantibodies with ¹²⁵I-labelled TSH receptor. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 1999 84: 3797-3802 に記載されているように ¹²⁵I にて標識するか、またはビオチンヒドラジド(Perbio Science、クラムリントン、英国)にて標識した。

【 0 0 6 4 】

¹²⁵I-TSH または ¹²⁵I-M22 または ¹²⁵I-5 C 9 の TSHR への結合の阻害

国際公開第 2004/050708 A2 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、100 μL の試験サンプル(MAb 製剤、患者血清または非標識 TSH) および 50 μL の開始緩衝液(RSR Ltd

10

20

30

40

50

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、 $100\mu\text{L}$ の ^{125}I -標識タンパク質($5\times 10^4\text{cpm}$)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】

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

10

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への結合のスキッチャード解析

$50\mu\text{L}$ のアッセイ緩衝液(50mmol/L のNaCl、 10mmol/L のTris、 $\text{pH}7.8$ 、および 1% Triton X-100)中の非標識5C9IgGおよび $50\mu\text{L}$ の ^{125}I -標識5C9IgG(アッセイ緩衝液中で $30,000\text{cpm}$)を、TSHR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、 1mL 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)。

20

【0067】

サイクリックAMP産生刺激の解析

5C9IgG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 5×10^4 または約 5×10^5 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 3×10^4 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(1g/L のグルコース、 20mmol/L のHEPES、 222mmol/L のシュクロース、 15g/L のウシ血清アルブミン、および 0.5mmol/L の3-イソブチル-1-メチルキサンチン $\text{pH}7.4$ 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、 $100\mu\text{L}$)、37℃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1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($200\mu\text{L}$)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。

30

40

【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、5C9IgG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TRA b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TRA bの刺激効果を5C9IgG(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 $50\mu\text{L}$ 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 $50\mu\text{L}$ のTSHまたはM22または患者血清(サイク

50

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TRA b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、5C9IgGを分泌する 1×10^7 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5015分間で行い、それに続いて9415秒間、5030秒間、および7230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法によりシーケンスした(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、入手できるヒトIg遺伝子の配列と比較した。

【0071】

ヒトTSHR配列のアミノ酸変異の、5C9活性における効果の解析

TSHR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2006/016121A号に記載されている。さらに、Flp-Inシステムを用いたCHO細胞への変異TSHR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2006/016121A号に記載されている。

【0072】

野生型または変異TSHRのいずれかを発現するFlp-In-CHO細胞を96ウェルプレートにまき、5C9製剤がTSH、M22、または患者血清TRA 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。

【0073】

TSHR抗体、TSHおよび関連分子のための5C9に基づいたアッセイ

2.55mLの5C9IgGを100mmol/Lのリン酸ナトリウム緩衝液pH8.5中に透析し、IgGのビオチンに対する分子比1/10により、EZ-Link NHS-LC-Biotin(Perbio)と反応させた。試験血清サンプル(75μL)を、TSHRをコートしたELISAプレートウェル(RSR Ltd)中で振とう(1分間に500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5C9IgG(100μL中に2ng)を加え、インキュベーションを室温で25分間、振とうなしで継続した。ウェルを空にし、洗浄して100μLのストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ(100μL中に10ng; RSR Ltd)を加え、室温で20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(TMB; 100μL; RSR Ltd)を加え、暗所において室温で30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50μLの0.5mol/LのH2SO4を加え、ELISAプレートリーダーを用いて、各プレートウェルの吸光度を450nmにて読み取った。5C9IgG-ビオチン結合の阻害は、以下のように算出した。

【数 2】

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

【0074】

結果

5C9 分泌細胞株の単離およびクローニング

20 mL の患者血液から得られたリンパ球 (2.7×10^6) に EBV を感染させ、48 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 1×10^6 の細胞をまいた。EBV 感染後 13 日目に、プレートウェルの上清の、 ^{125}I -TSH 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、K6H6/B5 ハイブリドーマ細胞株と融合し、96 ウェルプレートにまいた。 ^{125}I -TSH 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、5C9 と名付けられたモノクローナル抗体は、カップパ軽鎖を有する IgG1 のサブクラスである。

10

【0075】

5C9 IgG の TSHR への結合および遮断活性

様々な濃度における 5C9 IgG の、標識 TSH または標識 M22 または標識 5C9 それ自体の TSHR 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 0.005 $\mu\text{g/mL}$ の 5C9 IgG によって ^{125}I -TSH 結合の 12% の阻害が認められ、この阻害は 100 $\mu\text{g/mL}$ の 5C9 による 84% 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 IgG による ^{125}I -TSH 結合の阻害、すなわち 0.05 mg/mL における 13% の阻害から、1 mg/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、健康人血液ドナープール血清の 1:160 希釈においては ^{125}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。

20

【0076】

5C9 IgG はまた、TSHR をコートしたチューブへの ^{125}I -M22 IgG の結合に対する効果を有していた (表 1)。0.01 $\mu\text{g/mL}$ の 5C9 IgG によって、 ^{125}I -M22 IgG 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 0.01 mg/mL において有効であり、この効果は 1 mg/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}I -M22 IgG 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。

30

【0077】

非標識 5C9 IgG は、TSHR をコートしたチューブへの ^{125}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}I -5C9 の結合はまた、ドナー血清 IgG によっても阻害 (0.05 mg/mL における 15% の阻害、および 1 mg/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。

40

【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、5C9 IgG の遮断能を表 2a-c に示す。ブタ TSH (3 ng/mL) は、サイクリック AMP 産生を強力に刺激した ($19,020 \pm 2154 \text{ fmol/細胞ウェル}$; 平均 $\pm$ SD; $n=3$) (表 2a)。0.1 $\mu\text{g/mL}$ の 5C9 IgG の存在で、ブタ TSH の刺激活性は $11874 \pm 4214 \text{ fmol/細胞ウェル}$ (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 $2,208 \pm 32$

50

9 fmol / 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5 C 9濃度に依存していた(表2 a)。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2 aに示すように、サイクリックAMP産生は血清非存在下での19000 fmol / 細胞ウェルに比較して、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 . 43 mg / mL)存在下では約6000 fmol / 細胞ウェルへ減少する阻害が生じた。この効果は、約0 . 37 µg / mLの精製5 C 9 IgGによる効果に一致していた(表2 aに示す、様々な濃度の5 C 9 IgG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5 C 9 IgG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。

10

【0079】

5 C 9 F (a b ')₂および5 C 9 F a bのような5 C 9の断片もまた、TSH刺激の有効な阻害剤であった。特に、100 µg / mLにおける5 C 9 IgG、5 C 9 F (a b ')₂、および5 C 9 F a bのTSH刺激阻害活性は同等であった(表2 b)。10 µg / mLにおける3種の全ての製剤、すなわち5 C 9 IgG、5 C 9 F (a b ')₂、および5 C 9 F a bもまたTSH刺激活性の強力な阻害剤であったが、5 C 9 IgGは5 C 9 F (a b ')₂または5 C 9 F a bよりもさらに効果的と考えられた(表2 b)。

【0080】

M22 Fab (3 ng / mL)はサイクリックAMPの強力な刺激剤である(9 , 432 ± 822 fmol / 細胞ウェル)(表2 c)。5 C 9の存在下でのM22 Fabの刺激効果は量依存的に阻害され、0 . 1 µg / mLの5 C 9 IgGの存在下でのサイクリックAMP濃度は1 , 298 ± 134 fmol / 細胞ウェルに減少した。M22刺激の完全な阻害は、100 µg / mLの5 C 9により生じた(表2 c)。

20

【0081】

スキャッチャード解析は、TSHRに結合する¹²⁵I - 標識5 C 9の結合定数は4 × 10¹⁰ L / molであることを示した。

【0082】

TSHRへの¹²⁵I - 5 C 9 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¹²⁵I - 5 C 9 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。¹²⁵I - TSHの結合および¹²⁵I - 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。

30

【0083】

¹²⁵I - 5 C 9 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%)。¹²⁵I - TSHおよび¹²⁵I - 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¹²⁵I - 5 C 9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¹²⁵I - 5 C 9 IgG、¹²⁵I - TSH、または¹²⁵I - 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 (¹²⁵I - 5 C 9 IgG対¹²⁵I - TSH ; 図1 a) およびr = 0 . 95 (¹²⁵I - 5 C 9 IgG対¹²⁵I - M22 IgG ; 図1 b) で、同程度であった。図1 c は、同血清による¹²⁵I - TSHおよび¹²⁵I - M22 IgGの阻害の比較を示す(ピアソン相関係数r = 0 . 99)。

40

【0084】

これらの実験は、TSHRへの5 C 9 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5 C 9 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

50

刺激活性を有する患者血清 T R A b (S 1、S 2、S 4) の様々な希釈による、 125 I - 5 C 9 I g G 結合の阻害を示す。 125 I - 5 C 9 I g G 結合は、血清 B 1 - B 5 により、同様に血清 S 1、S 2、および S 4 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 I - T S H および 125 I - M 2 2 I g G 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 4 a および b)。

【 0 0 8 6 】

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 T S H R 自己抗体は、T S H R への 5 C 9 結合を阻害することを示している。

【 0 0 8 7 】

T S H 結合阻害活性を有するマウス M A b による、T S H R への 125 I - 5 C 9 I g G 結合の阻害

125 I - T S H 結合阻害活性をもつ様々なマウス T S H R M A b の、T S H R への 125 I - 5 C 9 結合の阻害能を試験し、 125 I - M 2 2 I g G 結合における効果と比較した (表 5)。表 5 に示すように、 125 I - T S H および 125 I - M 2 2 I g G 結合に対する阻害能を有する全ての M A b は 125 I - 5 C 9 結合もまた阻害したが、幾つかの M A b の場合、 125 I - 5 C 9 および 125 I - M 2 2 結合における阻害効果は 125 I - T S H 結合における阻害効果よりも弱かった。

【 0 0 8 8 】

これらの実験は、T S H R 上の 5 C 9 に対する結合部位と、T S H 結合の阻害能を有するマウス T S H R M A b に対する結合部位の間にはかなりの重複があることを示唆している。

【 0 0 8 9 】

T S H R を発現する C H O 細胞における、患者血清によるサイクリック A M P の産生刺激に対する 5 C 9 I g G の効果

表 2 に示すように、5 C 9 I g G は T S H R を発現する C H O 細胞内のサイクリック A M P 濃度に関する T S H または M 2 2 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 T R A b の刺激活性における 5 C 9 I g G の効果を試験した。その結果を表 6 a に示す。血清 T 1 - T 9 および T 1 1 - T 1 8 は C H O - T S H R 細胞内のサイクリック A M P 産生を刺激し、コントロール M A b I g G (ヒト甲状腺ペルオキシダーゼに特異的な 2 G 4) 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、5 C 9 I g G (2 0 0 μ g / mL を 5 0 μ L) 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 6 a)。

【 0 0 9 0 】

6 種の異なる血清 (T 1、T 6、T 3、T 1 9、T 2 0、T 2 1) の量反応効果を表 6 b - g に示す。これらの実験において、0 . 1 μ g / mL から 1 0 0 μ g / mL の範囲の濃度の 5 C 9 I g G は血清の刺激活性の量依存的減少を起こし、5 C 9 I g G の効果は血清 T 3 を除く全ての試験された血清において、遮断活性をもつ T S H R に対するマウスモノクローナル抗体 9 D 3 3 (国際公開第 2 0 0 4 / 0 5 0 7 0 8 A 2 号に記載) の効果と同程度であった。T 3 血清の場合 (表 6 a および 6 d)、1 0 0 μ g / mL の 5 C 9 I g G の存在下においてサイクリック A M P 産生の約 5 0 % の阻害が観察されたが、1 0 0 μ g / mL の 9 D 3 3 I g G はほとんど完全な阻害をもたらした。このことは、5 C 9 および 9 D 3 3 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。

【 0 0 9 1 】

T S H R を発現する 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 A M P 産生における 5 C 9 I g G の効果

T S H および T S H R 抗体の刺激活性の阻害と同様に、5 C 9 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 A M P の量を阻害した。特に表 6 b は、1 0 0 μ g / mL のコントロールモノクローナル I g G (2 G 4) の存在下で産生された 1 2 0 7 $\pm$

10

20

30

40

50

123 fmol / 細胞ウェルのサイクリックAMPが、100 µg / mLの5C9 IgGの存在下で301 ± 38 fmol / 細胞ウェルに減少したことを示している。9D33 IgGの効果は、100 µg / mLの9D33 IgGの存在下での721 ± 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、5C9 IgG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。

【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5C9 IgG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。ここでは従来の表記法に従い、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5C9 IgG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、5C9 IgGの遮断活性の部分的な減少の原因となった。試験の際、1 µg / 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)。100 µg / mLの5C9 IgG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、5C9 IgG遮断活性のわずかな減少；1 µg / 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100 µg / mLの5C9 IgGの存在下では、この活性は野生型のTSHRによるものと同等であった。陰性荷電のAsp151を陽性荷電のアルギニンに変異させると、5C9 IgG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

P h e 1 3 4 の変異は、9 D 3 3 活性における効果を有していた。しかしながら L y s 1 2 9 を除いたこれらの変異のいずれもまた、5 C 9 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 2 0 0 6 / 0 1 6 1 2 1 A 号に記載されているような M 2 2 活性に影響する変異 (A r g 8 0 、 T y r 8 2 、 G l u 1 0 7 , A r g 1 0 9 , L y s 1 2 9 , P h e 1 3 0 、 L y s 1 8 3 、 T y r 1 8 5 、 A r g 2 5 5 および T r p 2 5 8) である L y s 1 2 9 を除いたこれらの変異のいずれも、5 C 9 活性には影響しなかった。さらに、L y s 1 8 3 変異は 5 C 9 活性および M 2 2 活性において部分的効果を有していたが、9 D 3 3 活性における効果は有していなかった。

【 0 0 9 6 】

これらの結果は、甲状腺刺激性ヒト自己抗体 M 2 2 、マウス遮断性抗体 9 D 3 3 、およびヒト遮断性自己抗体 5 C 9 との相互作用に重要な T S H R 残基は異なっていることを示している。従って、5 C 9 とアンタゴニスト活性をもつその他の T S H R 抗体 (例えば 9 D 3 3) との組み合わせは、患者血清 T R A b 、その他の刺激剤による刺激活性および / または T S H R 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。

【 0 0 9 7 】

5 C 9 の可変領域配列

5 C 9 をコードする遺伝子の配列解析は、H C の V 領域遺伝子は V H 3 - 5 3 ファミリー由来、D 遺伝子は D 2 - 2 ファミリー由来、および J 遺伝子は J H 4 ファミリー由来であることを示した。L C の場合、V 領域遺伝子は O 1 2 ファミリー由来、および J 領域遺伝子は J K 2 の生殖系列由来であった。H C のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は図 2 a および 2 b それぞれに示され、L C のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は図 3 a および 3 b それぞれに示される。

【 0 0 9 8 】

生殖系列配列と比較して、H C 遺伝子配列には体細胞変異、特に F W R 1 には 1 個のサイレント変異、C D R 2 には 2 個の置換変異、C D R 3 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 F W R 4 には 1 個のサイレント変異が存在する。しかしながら H C 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 1 5 塩基対の 1 個により特徴付けられる。従って、H C の C D R 1 は長さ 5 アミノ酸、C D R 2 は長さ 1 6 アミノ酸、および C D R 3 は長さ 1 8 アミノ酸となる (図 2 b)。

【 0 0 9 9 】

L C 配列では、F W R 1 には 1 個のサイレント変異、C D R 1 には 1 個の置換変異、C D R 3 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。L C の C D R 1 は 1 1 アミノ酸、C D R 2 は 7 アミノ酸、および C D R 3 は 1 0 アミノ酸よりなる (図 3 b)。

【 0 1 0 0 】

T S H または T R A b 検出のための 5 C 9 に基づくアッセイ

T S H R 自己抗体を検出するための、T S H R をコートしたプレートウェルへの 5 C 9 I g G - ビオチン結合に基づいた E L I S A の例を表 8 に示す。このアッセイにおいて、T S H - ビオチン結合の阻害に対して陽性の全てのサンプルは、5 C 9 I g G - 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、T S H - ビオチンおよび 5 C 9 - ビオチンアッセイの間で同程度であった (表 8)。

【 0 1 0 1 】

T S H R を発現する C H O 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 T S H R M A b ; T S M A b) の刺激活性に対する 5 C 9 I g G の効果

表 9 に示すように 5 C 9 I g G は、試験された 5 種の全ての T S M A b (1 , 2 , 4 , 5 および 7) によるサイクリック A M P 産生の刺激を遮断することができた。例えば T S M A b 1 (表 9) により刺激されたサイクリック A M P の濃度は $18.94 \pm 7.4 \text{ pmol / mL}$ であったが、 $100 \mu \text{g / mL}$ の 5 C 9 I g G の存在下ではわずかに $1.24 \pm$

10

20

30

40

50

0.07 pmol/mL のサイクリックAMPが産生された。これは、100 µg/mL のコントロールMAb 2G4の存在下でのサイクリックAMPの濃度である、 16.5 ± 1.1 pmol/mLと比較することができる(表9)。

【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pmol/mL ÷ 5 (アッセイされた各ウェルからのサンプル200 µL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 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 µg/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 mU/L (約32 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 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¹²⁵I-M22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 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 ng/mL (120 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 ± 1.51 pmol/mLであり、これは0.01 µg/mLの5C9 IgGの存在下で 4.17 ± 0.60 pmol/mLに減少し、1 µg/mLの5C9 IgGの存在下で 3.44 ± 0.63 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)。

【0105】

21.39 ± 5.31 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 µg/mLの5C9 IgGの添加によって 5.29 ± 0.75 pmol/mLに減少し、2G4 IgG、および5C9 IgGを添加した場合の、 20.52 ± 0.95 pmol/mL、および 21.65 ± 1.99 pmol/mLそれぞれと比較される。36.89 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 µg/mLの5C9 IgGの添加によりサイクリックAMP濃度は 16.43 ± 1.27 pmol/mLに減少し、これは1 µg/mLのコントロールIgGである2G4によるわずかな効果(28.96 ± 2.29 pmol/mL)または1 µg/mLの9D33 IgG(40.09 ± 7.73 pmol/mL)と比較

10

20

30

40

50

される(表11c)。

【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。

【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

10

前記の実験および表12に示すように、低くとも $1\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度のヒトTSHR遮断性MAb5C9およびマウスTSHR遮断性MAb9D33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9D33IgGおよび5C9IgG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($3\text{ng}/\text{mL}$ および $0.3\text{ng}/\text{mL}$)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)。

【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

20

以前に示したように、5C9および9D33は、CHO-TSHR細胞におけるM22Fabを介したサイクリックAMPの刺激もまた阻害できる。M22を介したサイクリックAMPの刺激に対する9D33IgGおよび5C9IgG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M22Fab($3\text{ng}/\text{mL}$ および $0.3\text{ng}/\text{mL}$)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】

5C9IgGおよび9D33IgGの相加的效果は、TSHおよびM22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)。

30

【0110】

野生型TSHRを細胞あたり多数発現する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の効果

細胞あたり約 5×10^5 のレセプターを発現するCHO細胞株は、以前の実験(例えば表9-13)で用いた標準的なCHO細胞株(細胞あたり約 5×10^4 のTSHR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 $1.0\text{pmol}/\text{mL}$ に比較して $47.1 \pm 11.7\text{pmol}/\text{mL}$ である。野生型TSHRの基本的活性における5C9IgGおよび9D33IgG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。9D33IgGおよびネガティブコントロールの抗GAD抗体(5B3)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MAb9D33またはコントロールMAbは、野生型TSHRを発現するCHO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5C9IgG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、 $0.1\mu\text{g}/\text{mL}$ および $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 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、5C9Fabおよび5C9F(ab')もまた、細胞あたり多数のTSHRを発現するCHO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、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ および $100\mu\text{g}/\text{mL}$ の5C9Fabはそれぞれ、基本

40

50

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の5C9F(ab')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TSHR自己抗体の、活性化変異I568T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

TSHRI568T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 pmol/mL)は、試験された健常血液ドナーからの正常プール血清(NPS)または異なった3名の個々の健常血液ドナー血清(N1-N3)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。NPSおよびN1-N3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産生と比較して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23-89%の阻害が観察された(表15)。5C9IgG(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)の存在下では、TSHRI568T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。I568T変異をもつTSHRを発現するCHO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(B3およびB4)の量依存性効果もまた表15に示す。

【0112】

これらの結果は、5C9が、特にTSHR活性化変異であるI568T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TSHR自己抗体のTSHR遮断活性特性を有することを示す。

【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 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の5C9IgGは基本的なサイクリックAMP活性を71%阻害した。

【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 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の5C9IgGによる49%の阻害と比較することができる。

【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 5×10^5 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

10

20

30

40

50

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

10

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 5C9 IgG 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)。

【0116】

概して 5C9 IgG 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 TSH

20

R 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】

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

30

)。

【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 5C9 IgG 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。Lys209 Ala および Asp274 Ala 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 5C9 IgG の阻害能は増大した。

40

【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。

【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、Asp203 Ala 変異 TSHR との比較による

50

効果

野生型 T S H R における $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ の 5 C 9 による遮断効果は (T S H により誘導されたサイクリック A M P 刺激の 9 2 % の障害)、A s p 2 0 3 A 1 a 変異 T S H R においては 4 % に減少した (表 2 2)。

【 0 1 2 1 】

遮断性血清 B 4 の活性は T S H R の A s p 2 0 3 A 1 a 変異により影響されなかったが、遮断性血清 B 2 および B 3 では、T S H R の A s p 2 0 3 A 1 a 変異の場合、野生型 T S H R と比較して T S H により誘導されたサイクリック A M P 刺激のパーセント障害にわずかな減少がみられた。

【 0 1 2 2 】

一血清 B 5 の場合、T S H により誘導されたサイクリック A M P 刺激のパーセント障害に顕著な減少が観察された；すなわち、野生型 T S H R での 6 9 % の障害に対して、変異 T S H R では 3 0 % の障害であった。

【 0 1 2 3 】

5 C 9 活性に対する T S H R の A s p 2 0 3 A 1 a 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 T S H R 自己抗体および 5 C 9 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 T S H R アミノ酸には幾らかの違いのあることを示し得る。

【 0 1 2 4 】

要約および結論

上記の実験は 5 C 9 のような本発明による抗体が、ヒトおよびマウス T S H R 刺激性抗体、天然ヒトおよび動物 T S H、およびリコンビナントヒト T S H 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、すなわちヒト M A b 5 C 9 およびマウス M A b 9 D 3 3 は個別に試験した際、T S H R を発現する C H O 細胞における T S H または M 2 2 を介したサイクリック A M P 刺激に対する遮断能を有し、混合した際、T S H または M 2 2 刺激に対して相加的遮断効果を示すことが証明される。

【 0 1 2 5 】

5 C 9 のような本発明による抗体は、T S H R の基本的 (すなわち無刺激の) なサイクリック A M P 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 A M P を有する T S H R 導入 C H O 細胞を用いた実験により研究されてきた。すなわち、5 C 9 のような本発明による抗体の基本的なサイクリック A M P 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 T S H R 自己抗体を有する幾つかの血清は、これらの T S H R 導入細胞における基本的なサイクリック A M P 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、5 C 9 のような本発明による抗体および血清 T S H R 遮断自己抗体の、活性化 T S H R 変異に関連した基本的なサイクリック A M P 活性に対する遮断効果を証明する。

【 0 1 2 6 】

これらの結果は、5 C 9 が遮断性 T S H R 自己抗体の特性を示すヒト M A b であることを、すなわち甲状腺自己免疫疾患に付随する患者血清 T S H R 自己抗体の典型であることを強調する。

【 0 1 2 7 】

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 T S H R アミノ酸の同定も可能にした。

【 0 1 2 8 】

概してこの結果は、5 C 9 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 T S H R 遮断性自己抗体と同様の T S H R 結合活性、および T S H R 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 T S H R 自己抗体の特性および生物学的活性を有する 5 C 9 のような本発明による抗体は、様々な病態における T S H R の不活性化に適用できる。これらの病態は、T S H を

10

20

30

40

50

介した T S H R の活性化、甲状腺刺激性 T S H R 自己抗体を介した T S H R の活性化、基本的な(無刺激の、恒常的な) T S H R 活性、および活性化 T S H R 変異による T S H R の活性化を含む。従って、5 C 9 のような本発明による抗体は、上述の T S H R 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、T S H R の活性化変異による甲状腺機能亢進症、T S H 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。

【 0 1 2 9 】

【表 1 - 1】

[表 1]

5 C 9 I g G、リンパ球ドナー I g G、およびリンパ球ドナー血漿による、T S H R をコートしたチューブへの ^{125}I -T S H、 ^{125}I -M 2 2 I g G、または ^{125}I -5 C 9 I g G の結合の阻害

サンプル	^{125}I -TSH (阻害率%)	^{125}I -M22 IgG (阻害率%)	^{125}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

【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

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 %

¹²⁵I - T S H を用いた実験において 1 4 %

¹²⁵I - M 2 2 I g G を用いた実験において 2 1 %

および、5 C 9 I g G を用いた実験において 2 0 %

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 ¹
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 ^a 1/10	1.43 mg/mL ^b	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

¹ 1 回の決定^a 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^b 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。

【0131】

【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')₂、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') ₂ 100 µg/mL のみ	204 ±12
5C9 F(ab') ₂ 100 µg/mL + TSH	877 ±195
5C9 F(ab') ₂ 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 ¹

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') ₂ 100 µg/mL のみ	414 ±22
5C9 F(ab') ₂ 100 µg/mL + TSH	1058 ±223
5C9 F(ab') ₂ 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

¹ 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 $\mu\text{g/mL}$ + M22 Fab 3 ng/mL	638 ¹ ± 190
5C9 IgG 1 $\mu\text{g/mL}$ + M22 Fab 3 ng/mL	956 ± 169
5C9 IgG 0.1 $\mu\text{g/mL}$ + M22 Fab 3 ng/mL	1,298 ± 134
5C9 IgG 0.01 $\mu\text{g/mL}$ + M22 Fab 3 ng/mL	9,978 ± 919
5C9 IgG 0.001 $\mu\text{g/mL}$ + M22 Fab 3 ng/mL	11,614 ± 393
9D33 IgG 100 $\mu\text{g/mL}$ + M22 Fab 3 ng/mL	1,048 ± 10

10

¹ 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}I -5C9 IgG、 ^{125}I -TSH、および ^{125}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}I -5C9 結合阻害(%)	^{125}I -TSH 結合阻害(%)	^{125}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

20

結果はほぼ一致する二重測定の前平均である。

【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¹²⁵I - 5 C 9 は 2 0 % の結合率であり、H B D プール存在下での¹²⁵I - T S H は 1 2 % の結合率であり、H B D プール存在下での¹²⁵I - 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}I -5C9 IgG、 ^{125}I -TSH、および ^{125}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}I -5C9 結合阻害(%)	^{125}I -TSH 結合阻害(%)	^{125}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】

B2			
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
B3			
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
B4			
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
B5			
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
刺激性血清			
S1			
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	¹²⁵ I-5C9 結合阻害(%)	¹²⁵ I-TSH 結合阻害(%)	¹²⁵ 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 4 0 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 / 1 0 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、¹²⁵I 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 2 0 %、1 7 %、1 2 % 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}I - 標識 TSH、 ^{125}I - M22 IgG、および ^{125}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 MA b による阻害

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

10

20

30

40

【表 5 - 2】

2E71 IgG	1 µg/mL	35.5	59	48	10
2E71 IgG	0.1 µg/mL	30	43	32	
2E71 IgG	0.01 µg/mL	14.5	15	17.5	
3E71 IgG ¹	100 µg/mL	49	51	65	
3E71 IgG	10 µg/mL	37	51	50	
3E71 IgG	1 µg/mL	37	45	40	20
3E71 IgG	0.1 µg/mL	21.5	28	21	
3E71 IgG	0.01 µg/mL	12	15	3	
14D3 IgG ¹	100 µg/mL	57	62	63	
14D3 IgG	10 µg/mL	52	60	50.5	
14D3 IgG	1 µg/mL	37	37	35	30
14D3 IgG	0.1 µg/mL	12.5	15	10	
14D3 IgG	0.01 µg/mL	4	3	1	
16E5 IgG ¹	100 µg/mL	48	53	59	
16E5 IgG	10 µg/mL	44	51	53	
16E5 IgG	1 µg/mL	39	40	47	40
16E5 IgG	0.1 µg/mL	26	22	34	
16E5 IgG	0.01 µg/mL	9	12	20	
17D2 IgG ¹	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 $\mu\text{g/mL}$	3	1	3
M22 IgG	100 $\mu\text{g/mL}$	95	95	88
M22 IgG	10 $\mu\text{g/mL}$	95	94	89
M22 IgG	1 $\mu\text{g/mL}$	94	93	87
M22 IgG	0.1 $\mu\text{g/mL}$	77	79	72
M22 IgG	0.01 $\mu\text{g/mL}$	22	32	24
9D33 IgG ²	100 $\mu\text{g/mL}$	69	61	70
9D33 IgG	10 $\mu\text{g/mL}$	65	60	60
9D33 IgG	1 $\mu\text{g/mL}$	55	48	48
9D33 IgG	0.1 $\mu\text{g/mL}$	31	27	29
9D33 IgG	0.01 $\mu\text{g/mL}$	8	13	13
2G4 IgG ³	100 $\mu\text{g/mL}$	3	3	6
2G4 IgG	10 $\mu\text{g/mL}$	3	4	10
2G4 IgG	1 $\mu\text{g/mL}$	0	0	8
2G4 IgG	0.1 $\mu\text{g/mL}$	4	6	4
2G4 IgG	0.01 $\mu\text{g/mL}$	0	0	0
2B4 IgG ⁴	100 $\mu\text{g/mL}$	88.5	30	72
2B4 IgG	10 $\mu\text{g/mL}$	85	19	48
2B4 IgG	1 $\mu\text{g/mL}$	82	9	42
2B4 IgG	0.1 $\mu\text{g/mL}$	56	12	23
2B4 IgG	0.01 $\mu\text{g/mL}$	13.5	1	8
8E3 IgG ⁴	100 $\mu\text{g/mL}$	82.5	27	65

10

20

30

40

【表 5 - 4】

8E3 IgG	10 µg/mL	72	18	42	10
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 ⁴	100 µg/mL	76	24	32	
4E2 IgG	10 µg/mL	74	21	32	20
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 ⁴	100 µg/mL	77	26	26	
1D5 IgG	10 µg/mL	72	20	20	30
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 ⁴	100 µg/mL	78	24	51	
7C4 IgG	10 µg/mL	76	22	35	40
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 ⁴	100 µg/mL	84	46	55	
3E6 IgG	10 µg/mL	79	31	40	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 ⁴	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 ⁴	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 ⁵	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 ⁶	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 ⁷	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

¹ 甲状腺刺激活性を有するマウスTSHR MA b

² TSHおよびTRA b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

³ 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）

⁴ 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）

⁵ 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）

⁶ 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

⁷ 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、¹²⁵I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、5C9 IgG 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 ¹
T8 + 2G4 IgG	1392 ¹
T8 + 5C9 IgG	ud
T9 のみ	5052 ¹
T9 + 2G4 IgG	5000 ¹
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

u d = 検出されず

¹ = 二重測定

HBDプールは健康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 T S H R を発現する C H O 細胞における患者血清中の T R A b によるサイクリック AMP 産生刺激に対する、5 C 9 I g G および 9 D 3 3 I g G 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

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 : 10 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 】

【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 ¹
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

¹一回の測定

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 T S H R を発現する C H O 細胞における患者血清中の T R A b によるサイクリック AMP 産生刺激に対する、5 C 9 I g G 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 T S H R を発現する C H O 細胞における患者血清中の T R A b によるサイクリック AMP 産生刺激に対する、5 C 9 I g G 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 ¹
T19 + 0.01 µg/mL 9D33 IgG	5765 ¹

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 ²
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 ¹

¹ 二重サンプルの平均² 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 】

10

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 [†]
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 $\mu\text{g/mL}$ 9D33 IgG	7514 $\pm$ 785
100 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG のみ	224 $\pm$ 109
T20 + 100 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	NT
T20 + 10 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	NT
T20 + 1 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	181 ¹
T20 + 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	2184 $\pm$ 1078
T20 + 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	6486 $\pm$ 436
T20 + 0.001 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	4856 ¹

¹二重サンプルの平均

N T = 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 】

10

20

【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Lys58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 ¹	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	—

¹二重測定の平均値

pTSH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)

【0145】

【表 7 b】

[表 7 b]

野生型 TSHR および I l e 6 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、
TSH により誘導されたサイクリック AMP 産生。5 C 9 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	470 ±92	837 ±78	114
TSH のみ	18654 ¹	22935 ±2542	123
2G4 10 µg/mL + TSH	17555 ¹	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 】

【表 7 c】

[表 7 c]

野生型TSHRおよびArg80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

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Arg80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 ¹	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 】

【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	557 ±27	1219 ±49	219
TSH のみ	12674 ±234	15327 ±2041	121
2G4 10 µg/mL + TSH	13587 ±967	17585 ¹	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 】

【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。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	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 】

【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。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	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 】

【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 ¹	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 】

【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 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	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 】

【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

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 ¹	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 】

【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

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 L y s 1 8 3 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。

5 C 9 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	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 ¹	22442 ±2489	113
5C9 0.01 µg/mL + TSH	17974 ¹	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 】

【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 】

【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 [†]	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 】

【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 ¹	248 ±94	775

説明注釈については表 7 a を参照。

【 0 1 6 0 】

【表 7 q】

[表 7 q]

野生型 TSHR および A r g 2 5 5 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。

5 C 9 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	620 ±33	616 ¹	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 】

【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。

5 C 9 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 】

【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 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	496 ±72	1094 ±132	221
TSHのみ	13562 ±3416	26450 ¹	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 】

【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

	TSH-ビオチン定量アッセイ			5C9 IgG-ビオチンアッセイ		
テストサンプル	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 TSH R をコートしたチューブへの

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。

【 0 1 6 4 】

【 表 9 】

[表9]

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

テストサンプル ^a	TSMa b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 ^b 100 µg/mL
TSMa b 1 1 µg/mL	18.94 ± 7.4	1.24 ± 0.07	16.5 ± 1.1
TSMa b 2 1 µg/mL	9.71 ± 0.96	2.26 ± 0.05	8.96 ± 1.28
TSMa b 4 10 ng/mL	34.5 ± 2.04	2.20 ± 0.20	33.1 ± 1.25
TSMa b 5 100 ng/mL	27.26 ± 2.14	0.85 ± 0.01	22.5 ± 2.4
TSMa b 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

^a サイクリックAMPアッセイ緩衝液による希釈液

^b 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。

【 0 1 6 5 】

【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 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG.	32.7 ± 4.0
天然ブタ TSH 0.3 ng/mL および 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	28.2 ± 2.04
天然ブタ TSH 0.3 ng/mL および 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	18.0 ± 1.36
天然ブタ TSH 0.3 ng/mL および 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	2.14 ± 0.85
天然ブタ TSH 0.3 ng/mL および 10 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	0.20 ± 0.14
天然ブタ TSH 0.3 ng/mL および 100 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG.	38.2 ± 2.54
天然ブタ TSH 0.3 ng/mL および 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	26.6 ± 3.22
天然ブタ TSH 0.3 ng/mL および 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	10.1 ± 1.79
天然ブタ TSH 0.3 ng/mL および 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	2.28 ± 0.71
天然ブタ TSH 0.3 ng/mL および 10 $\mu\text{g/mL}$ 5C9 IgG	0.68 ± 0.21
天然ブタ TSH 0.3 ng/mL および 100 $\mu\text{g/mL}$ 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 281I 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 ± S D、n = 3)
緩衝液のみ	9.90 ± 1.51
0.001 µg/mL 2G4 IgG ^a	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

^a 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 I568T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	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 ^a
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

^a 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
p TSH 刺激の遮断に対する 5 C 9 プラス 9 D 3 3 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

【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

【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 1 3 - 1】

[表 1 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
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 1 3 - 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 $\pm$ SD、n = 3)
緩衝液のみ	0.86 ± 0.12
M22 0.3 ng/mL	21.8 ± 3.23
100 μ g/mL 9D33	0.88 ± 0.30
100 μ g/mL 5C9	0.58 ± 0.28
100 μ g/mL 9D33 + 100 μ g/mL 5C9	0.81 ± 0.36
100 μ g/mL 9D33 + M22	1.03 ± 0.32
100 μ g/mL 5C9 + M22	0.05 (n=2)
100 μ g/mL 9D33 + 100 μ g/mL 5C9 + M22	0.06 (n=2)
10 μ g/mL 9D33 + M22	0.97 ± 0.48
10 μ g/mL 5C9 + M22	0.20 (n=2)
10 μ g/mL 9D33 + 10 μ g/mL 5C9 + M22	0.14 ± 0.08
1 μ g/mL 9D33 + M22	0.83 ± 0.21
1 μ g/mL 5C9 + M22	0.02 (n=2)
1 μ g/mL 9D33 + 1 μ g/mL 5C9 + M22	0.13 ± 0.13
0.1 μ g/mL 9D33 + M22	5.38 ± 1.71
0.1 μ g/mL 5C9 + M22	1.43 ± 1.09
0.1 μ g/mL 9D33 + 0.1 μ g/mL 5C9 + M22	2.39 ± 1.0
0.01 μ g/mL 9D33 + M22	15.2 ± 1.42
0.01 μ g/mL 5C9 + M22	13.1 ± 1.34
0.01 μ g/mL 9D33 + 0.01 μ g/mL 5C9 + M22	12.7 ± 3.4
0.001 μ g/mL 9D33 + M22	12.8 ± 1.60
0.001 μ g/mL 5C9 + M22	13.3 ± 0.89
0.001 μ g/mL 9D33 + 0.001 μ g/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

【 0 1 7 1 】

【表 1 4 - 1】

[表 1 4]

野生型 T S H R を発現する C H O 細胞 (細胞あたり約 5×10^5 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 5 C 9 I g G および 9 D 3 3 I g G 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 ± S D、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 ^a IgG 100 µg/mL	44.5 ± 5.2	5.3
5B3 ^a IgG 10 µg/mL	45.4 ± 6.3	3.4
5B3 ^a 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

コントロールの C H O 細胞では、T S H R 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 ± 0.06 pmol/mL (平均 ± S D ; n = 3) であり、3 ng/mL T S H の存在下では 0.74 ± 0.32 pmol/mL (平均 ± S D ; 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。

^b 5 B 3 はグルタミン酸デカルボキシラーゼ (G A D) ヒトモノクローナル抗体である (5 C 9 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 ^a IgG 100 µg/mL	52.7 ± 7.8	9.1
5B3 ^a IgG 10 µg/mL	43.7 ± 10.4	24.7
5B3 ^a 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

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。

^b 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 - 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 (ab') 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

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 pmol/mL (平均±SD; $n=2$)であり、 3 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。

-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')₂ F(ab')₂の還元により準備される；詳細な説明の記載を参照

【0172】

10

20

30

【表 15 - 1】

[表 15]

I 5 6 8 T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

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

【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

- 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 = 健康人血液ドナー血清のプール

N1 - N3 = 個々の健康人血液ドナー

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】

【表 17】

[表 17]

A623I 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

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

説明注釈については表 15 を参照。

1 μg/mL の 5C9 IgG は、TSHR A623I 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】

【表 18】

[表 18]

野生型TSHRを発現するCHO細胞株(細胞あたり約 5×10^5 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1 μg/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。

【0177】

20

【表 2 0 a】

[表 2 0 a]

野生型 TSHR および A s p 4 3 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	277 ±109	173 ±81	76
TSH のみ	13924 ±717	11651 ±465	84
5B3 ^a 10 µg/mL + TSH	14263 ±2791	17452 ±2160	122
5B3 ^a 100 µg/mL + TSH	18892 ±1222	12685 ¹	67
5C9 0.01 µg/mL + TSH	13145 ¹	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 ²	37
5C9 100 µg/mL のみ	47 ±23	206 ±107	438

【 0 1 7 8 】

¹二重測定の平均

²一重測定

p TSH 濃度 = 3 n g / m L 。

全ての希釈はサイクリック AMP アッセイ緩衝液で行った。

^a 5 B 3 はグルタミン酸デカルボキシラーゼ (G A D) に対するヒトモノクローナル抗体である (5 C 9 に対するネガティブコントロール) 。

【 0 1 7 9 】

【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 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	210 ±101	146 ±22	70
TSH のみ	12818 ±2224	15398 ±982	120
5B3 ^a 10 µg/mL + TSH	11522 ±2220	19750 ±2950	171
5B3 ^a 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 [†]	328 ±96	162
5C9 100 µg/mL のみ	218 ±46	254 ±48	117

説明注釈については表 2 0 a を参照。

【 0 1 8 0 】

【表 2 0 c】

[表 2 0 c]

野生型 TSHR および His 105 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 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	245 ±98	590 ±72	241
TSHのみ	14214 ±2111	17979 ±1735	126
5B3 ^a 10 µg/mL + TSH	13214 ±3233	21359 ±1501	162
5B3 ^a 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 ¹	134 ¹	60
5C9 100 µg/mL のみ	234 ±50	520 ±198	222

説明注釈については表 2 0 a を参照。

【 0 1 8 1 】

【表 2 0 d - 1】

[表 2 0 d]

野生型TSHRおよびG l u 1 0 7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。

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 ^a 10 µg/mL + TSH	14018 ±3049	17074 ±1442	122
5B3 ^a 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 ¹	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

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 ^a 10 µg/mL + TSH	11692 ±1161	21255 ±2597	182
5B3 ^a 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 ¹	4
5C9 10 µg/mL + TSH	214 ±343	321 ±514	150
5C9 100 µg/mL + TSH	238 ¹	64 ²	27
5C9 100 µg/mL のみ	211 ±75	408 ±138	193

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 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	345 ±119	410 ±85	119
TSH のみ	15897 ±1291	16392 ±1318	103
5B3 ^a 10 µg/mL + TSH	18414 ±1662	15765 ±1088	86
5B3 ^a 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 】

【表 2 0 f】

[表 2 0 f]

野生型 TSHR および G l u 1 7 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、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	183 ±77	366 ±300	200
TSHのみ	8900 ±1185	7666 ±1659	86
5B3 ^a 10 µg/mL + TSH	9160 ±3180	10828 ±1650	118
5B3 ^a 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 ¹	894 ±120	126
5C9 100 µg/mL のみ	196 ±58	134 ±153	68

説明注釈については表 2 0 a を参照。

【 0 1 8 4 】

【表 20 g】

[表 20 g]

野生型 TSHR および Tyr 185 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	139 ±40	163 ±72	117
TSH のみ	12649 ±1577	8305 ±870	66
5B3 ^a 10 µg/mL + TSH	16974 ±205	10088 ±1856	59
5B3 ^a 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

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5C9IG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 ^a 10 µg/mL + TSH	13266 ±1105	12232 ±1819	92
5B3 ^a 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】

【表 20 i】

[表 20 i]

野生型TSHRおよびTy r 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 ^a 10 µg/mL + TSH	15880 ±1150	21000 ±2340	132
5B3 ^a 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

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 ^a 10 µg/mL + TSH	12280 ±610	11200 ±3000	91
5B3 ^a 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 】

【表 20 k】

[表 20 k]

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 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	650 ±87	652 ±300	100
TSH のみ	15681 ±866	14884 ±1587	95
5B3 ^a 10 µg/mL + TSH	15210 ±1697	17800 ±3219	117
5B3 ^a 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 [†]	19

説明注釈については表 20 a を参照。

【0189】

【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	590 ±86	1020 ±104	173
TSHのみ	13332 ±1177	10933 ±1510	82
5B3 ^a 10 µg/mL + TSH	11292 ±1784	13410 ±2930	119
5B3 ^a 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 】

【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 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 ±84	960 ±372	253
TSH のみ	18379 ±987	17492 ±1332	95
5B3 ^a 10 µg/mL + TSH	15152 ±4365	19951 ±2362	132
5B3 ^a 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

説明注釈については表 2 0 a を参照。

【 0 1 9 1 】

【表 2 0 n】

[表 2 0 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 ^a 10 µg/mL + TSH	17542 ±1874	23341 ±4203	133
5B3 ^a 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 2 0 aを参照。

【 0 1 9 2 】

【表 2 0 0】

[表 2 0 0]

野生型 TSHR および A r g 2 7 4 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	124 ±103	86 ±38	69
TSH のみ	21347 ±1112	11432 ±2511	54
5B3 ^a 10 µg/mL + TSH	18654 ±3700	12961 ±2609	69
5B3 ^a 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 ¹	16
5C9 100 µg/mL + TSH	246 ±165	17 ²	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 】

【表 2 0 p - 1】

[表 2 0 p]

野生型 TSHR および A s p 2 7 6 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。

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 ^a 10 µg/mL + TSH	19354 ±1794	25180 ±5609	130
5B3 ^a 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 ¹	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 2 0 a を参照。

【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 ^a 10 µg/mL + TSH	13025 ±3292	17706 ¹	136
5B3 ^a 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

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TS
HR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	+++++ ^a	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。

^a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 ^a	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 ^c	9357 ± 1155		7591 ± 832	
TSH ^c + 1 μg/mL 5C9	1110 ± 811	92	9400 ¹	4
HDP プール / 10	183 ± 67		496 ± 76	
TSH ^c + HBD	13303 ± 1819	0	9756 ¹	0
B2 / 10	110 ± 36		270 ± 72	
TSH ^c + B2 / 10	454 ± 381	97	1963 ± 357	80
B3 / 10	329 ¹		582 ± 74	
TSH ^c + B3 / 10	3407 ± 1341	74	4027 ± 278	59
B4 / 10	59 ± 22		161 ± 36	
TSH ^c + B4 / 10	278 ± 73	98	150 ± 41	98
B5 / 10	647 ± 170		1064 ± 228	
TSH ^c + B5 / 10	4173 ± 515	69	6871 ± 618	30

^aサイクリックAMPアッセイ緩衝液での希釈^bTSHの関与するサイクリックAMP刺激の阻害率 %

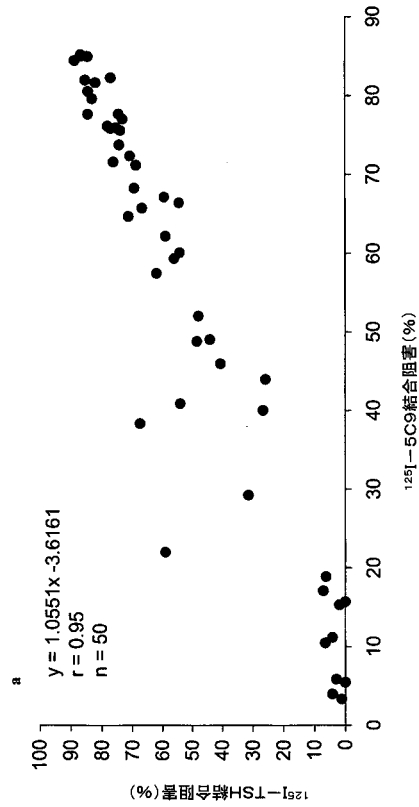
【数 7】

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

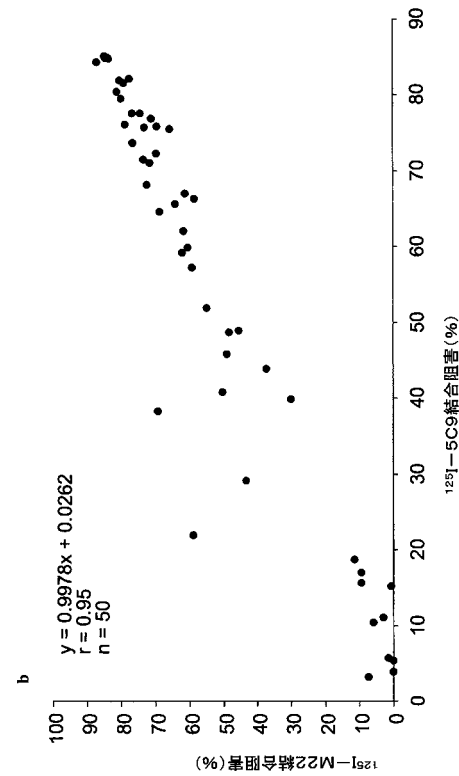
¹二重サンプルの平均^c最終濃度 3 ng / mL で使用された p T S H

H B D プール = 健康人ドナー血清のプール

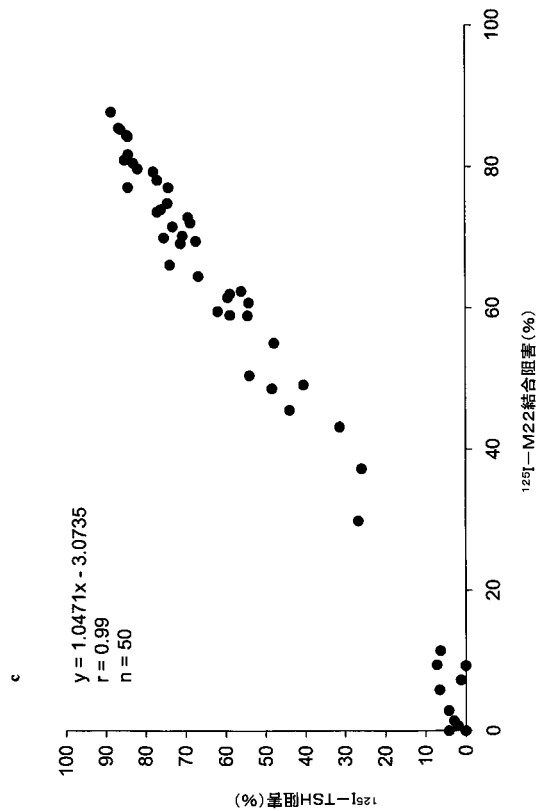
【図 1 - 1】



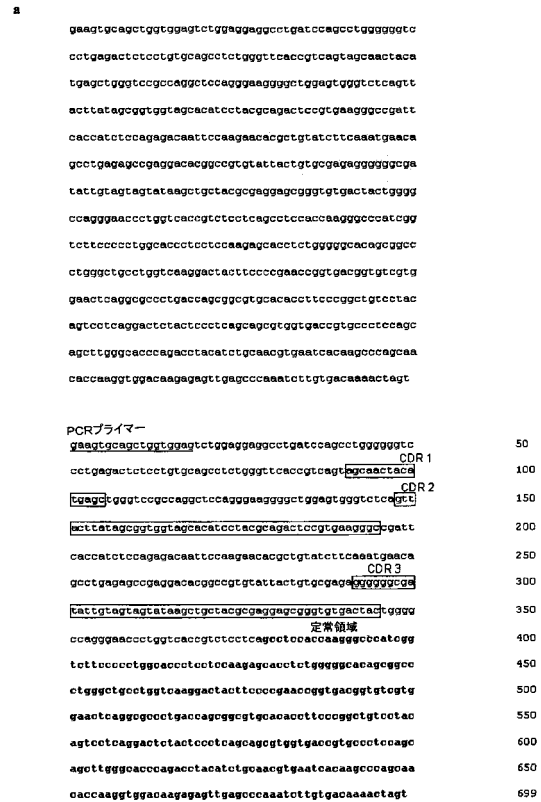
【図 1 - 2】



【図 1 - 3】



【図 2 - 1】



【図 2 - 2】

b

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSNTHSVVRQAPGKGLEWVS
TYSGGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQNNSLRAEDTAVYCARGGR
YCSSISCTYARSGCDYWGQTLTVTVSSASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTS

PCRプライマー
EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSNTHSVVRQAPGKGLEWVS
TYSGGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQNNSLRAEDTAVYCARGGR
YCSSISCTYARSGCDYWGQTLTVTVSSASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTS

CDR 1
CDR 2
CDR 3
定常領域

50
100
150
200
233

【図 3 - 1】

a

gcaatccagatgaccacagttcccttcctccctgtctgcactctgtaggaga
cagagtcaccatcactctgcggggaagtcagagcattagcaactatttaa
attggatccagcagaaacagggaagccctcaagctcctgactctatgct
gcattccagtttgcgaagtggggtcccatcaaggttcagtggcagtggtac
tgggacagatttcaactctccatccagcagctctgcgaactgaagatttg
caacttactactgtcaacagaggttacagttccccctcccaacttttggc
caggggaccacagctggagatcaaacgaactgtggctgcacatctgtctt
catcttcccgcatctgatgagcagttgaaatctggcaactgctctgttg
tgtgctgtgtaacttctatccagagagggcgaagtcacagtggag
gtggataacgcccctccaatcgggtaactccagggagaggtgtcacagagca
ggacagcagggcagcagcctccagcctcagcagcaccctgacgctgagca
aagcagactacgagaacacaaagtcctacgctgcgaagtcaccatcag
ggctgagctgcgcctg

PCRプライマー
gcaatccagatgaccacagttcccttcctccctgtctgcactctgtaggaga
cagagtcaccatcactctgcggggaagtcagagcattagcaactatttaa
attggatccagcagaaacagggaagccctcaagctcctgactctatgct
gcattccagtttgcgaagtggggtcccatcaaggttcagtggcagtggtac
tgggacagatttcaactctccatccagcagctctgcgaactgaagatttg
caacttactactgtcaacagagttacagttccccctcccaacttttggc
caggggaccacagctggagatcaaacgaactgtggctgcacatctgtctt
catcttcccgcatctgatgagcagttgaaatctggcaactgctctgttg
tgtgctgtgtaacttctatccagagagggcgaagtcacagtggag
gtggataacgcccctccaatcgggtaactccagggagaggtgtcacagagca
ggacagcagggcagcagcctccagcctcagcagcaccctgacgctgagca
aagcagactacgagaacacaaagtcctacgctgcgaagtcaccatcag
ggctgagctgcgcctg

CDR 1
CDR 2
CDR 3
定常領域

50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600
617

【図 3 - 2】

b

AIQNTQSPSSLASVGDRTVITCRASQSIISNLYWYQKPKAPKLLIYA
ASSLQSGVPSRFSGSGSDTFTLTISLQPEDFATTYCCQSYSPSTTFG
QGTLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLMNFPYREARVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSP

PCRプライマー
AIQNTQSPSSLASVGDRTVITCRASQSIISNLYWYQKPKAPKLLIYA
ASSLQSGVPSRFSGSGSDTFTLTISLQPEDFATTYCCQSYSPSTTFG
QGTLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLMNFPYREARVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSP

CDR 1
CDR 2
CDR 3
定常領域

50
100
150
200
205

【図 4】

60 120 180 240 300 360 420 480 540 600 660 720 764
MRPADLQLV LIAIDPDLG GNGCSSPCE CHOEDFRVT CKDIQRIPLS PPSTOTKLI
ETHLRTIPSH AFSNLEISR IYSDIVTLQ QLESHSFYNL SKVTHIEIRN TENLYIDPD
ALKELELKF LGIFNLGM FDLTKVST DIFFLEITD NPYMTSIPN AFQICNETL
TLKLYNGFT SVQYAFNGT KLDAYLNKN KLYTVIDKA FGGVYSGPSL LDVSGTSTA
LPSKGLEHLK ELIARTWTIL KKLPLSLSEL HLTRADLSVP SHCCAFKNOK KIRGTLSLM
CNSSMQSLR QRKSVNALNS PLHQBYEENL GDSIVGYEK SKPQTHNNA HYVFFEOR
DEIGFGQEL KNPQETLQA FDSHYDYIC GDSEDWCTP KSDEFNCPD INGYFRLIV
VMFYSLALL GNVFILLIL TSHYKLNVR FLACNLAFAD FCMGMILLI ASVDLYTHSE
YNNHADWQT GPCNTAGFF TVFASLSVY TLVTITLERM YALTFMRLD RKIRLRACA
INWGWCCCF LIALPLVGI SSVAKVSLI EMDTETPLAL AYIVFVLIN IVAFVIVCC
YKLYITVRN PQINPDROT KIKARMAVLI PTFDIFCMAP I SFVALSAILN KPLITVNSK
ILLVLYPLN SCANPELYAI FTKAFQDVF ILLSKGICK RQAQVIRGQR VPENSTDIQ
VQKYTHDMRQ GLHNMEDVYE LIENSHLTPA KQGISSEYM QTVL

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

【配列表】

0005345556000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 5/10 (2006.01)		A 6 1 P 5/10	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)		A 6 1 P 27/02	
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

(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)

前置審査

- (72)発明者 リース, スミス パーナード
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 サンダーズ, 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

審査官 池上 文緒

- (56)参考文献 特表2006-524486(JP, A)
国際公開第00/049050(WO, A1)
特表2002-517757(JP, A)
国際公開第2004/046306(WO, A1)
J. Clin. Endocrinol. Metab., 1997年, Vol.82, No.12, p.3998-4009
PNAS, 1982年, Vol.79, p.6680-6684
J. Biol. Chem., 1988年, Vol.263, No.31, p.16341-16347
Clin. Endocrinol., 1986年, Vol.24, p.79-88
Clin. Dev. Immunol., 2005年, Vol.12, No.12, p.137-143

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 6 / 2 8

P u b M e d

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

T h o m s o n I n n o v a t i o n

专利名称(译)	一种针对促甲状腺激素受体的人单克隆抗体，可作为拮抗剂		
公开(公告)号	JP5345556B2	公开(公告)日	2013-11-20
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		
当前申请(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 ファーマニアックヤドヴィガ サンダーズジェーン		
发明人	リース,スミス バーナード ファーマニアック,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 A61K39/395 A61P35/00 A61P5/10 A61P27/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 C12P21/08 C12N15/00.C C12N5/00.102 A61K39/395.N A61P35/00 A61P5/10 A61P27/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.N G01N33/53.E		
代理人(译)	川口义行		
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 JP2010521139A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

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

サンプル	¹²⁵ I-TSH (阻害率%)	¹²⁵ I-M22 IgG (阻害率%)	¹²⁵ I-SC9 (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