(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115151270 A
(43)申请公布日 2022.10.04

(21)申请号 202080082263.5
(22)申请日 2020.09.30
(30)优先权数据
19200589.0 2019.09.30 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.05.26
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2020/077346 2020.09.30
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/064009 EN 2021.04.08
(71)申请人 希罗姆有限责任公司
地址 德国普拉内格
申请人 纽约救济伤残人维持特殊外科医院协会
(72)发明人 M·施奈德 K·泽勒 J·鲁厄 G·韦斯坎普 C·布洛贝尔
(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司 72002
专利代理师 区斌
(51)Int.Cl.
*A61K 38/00*(2006.01)

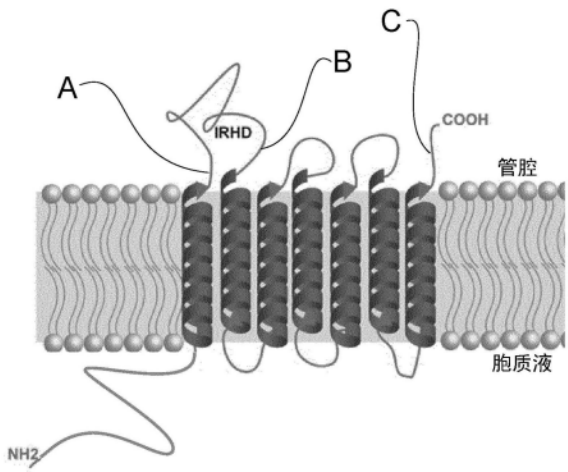
权利要求书3页 说明书92页
序列表110页 附图88页

(54)发明名称

iRhom2表位的蛋白结合剂

(57)摘要

本发明涉及一种蛋白结合剂，其在与人iRhom2结合时至少在人iRhom2的环1的区域内结合。




CN 115151270 A

1.一种蛋白结合剂,其当与人iRhom2结合时至少在人iRhom2的环1的区域内结合。

2.根据权利要求1所述的蛋白结合剂,其在至少跨越从(并包括)W526至(并包括)I566的人iRhom2的区域内结合。

3.根据权利要求1或2所述的蛋白结合剂,其结合包含至少一个选自以下的残基的人iRhom2的区段:W526;Q527;P532;P533;M534;D535;K536;S537;L539;K542;R543;T544;G546;R554;E557;S561;S562和/或I566。

4.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白结合剂,其当与人iRhom2结合时抑制和/或降低TACE/ADAM17活性。

5.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白结合剂,其中TACE/ADAM17活性的抑制或降低是由干扰iRhom2介导的TACE/ADAM17活化引起。

6.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白结合剂,其当与人iRhom2结合时,

- 抑制或降低诱导的TNFα脱落,和/或
- 抑制或降低诱导的IL-6R脱落,和/或
- 抑制或降低诱导的HB-EGF脱落。

7.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白结合剂,其中所述蛋白结合剂所结合的所述人iRhom2包含:

a)SEQ ID NO 181所示的氨基酸序列,或

b)与SEQ ID NO 181具有至少80%序列相同性的氨基酸序列,条件是所述序列保持iRhom2活性。

8.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白结合剂,其为单克隆抗体、或其保留靶结合能力的靶结合片段或衍生物、或抗体模拟物。

9.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白结合剂,其为呈选自以下形式中的至少一种的抗体:IgG、scFv、Fab、或(Fab)2。

10.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白结合剂,其不与人iRhom1交叉反应。

11.根据权利要求8-10中任一项所述的蛋白结合剂,所述蛋白结合剂是抗体,所述抗体

a)包含一组重链/轻链互补决定区(CDR),其包含在以下SEQ ID NO对所示的重链/轻链可变结构域序列对中:

2和7;12和17;22和27;32和37;42和47;52和57;62和67;72和77;82和87;112和117;152和157;162和167;和/或172和177;

b)包含一组重链/轻链互补决定区(CDR),其按顺序(HCDR1;HCDR2;HCDR3;LCDR1;LCDR2和LCDR3)包含以下SEQ ID NO:

- 3、4、5、8、9、10;
- 13、14、15、18、19、20;
- 23、24、25、28、29、30;
- 33、34、35、38、39、40;
- 43、44、45、48、49、50;
- 53、54、55、58、59、60;
- 63、64、65、68、69、70;
- 73、74、75、78、79、80;

• 83、84、85、88、89、90；

• 113、114、115、118、119、120；

• 153、154、155、158、159、160；

• 163、164、165、168、169、170；和/或

• 173、174、175、178、179、180；

c)包含b)的所述重链/轻链互补决定区(CDR)，条件是CDR中的至少一者相对于相应的SEQ ID NO具有至多3个氨基酸取代，和/或

d)包含b)或c)的所述重链/轻链互补决定区(CDR)，条件是CDR中的至少一者与相应的SEQ ID NO具有≥66％序列相同性，

其中所述CDR嵌入在合适的蛋白框架中，以便能够以足够的结合亲和力结合人iRhom2并抑制或降低TACE/ADAM17活性。

12.根据权利要求8-11中任一项所述的蛋白结合剂，其包含

a)以下SEQ ID NO对所示的重链/轻链可变结构域(HCVD/LCVD)对：

2和7；12和17；22和27；32和37；42和47；52和57；62和67；72和77；82和87；112和117；152和157；162和167；和/或172和177；

b)a)的所述重链/轻链可变结构域(HCVD/LCVD)对，条件是

• HCVD与相应的SEQ ID NO具有≥80％的序列相同性，和/或

• LCVD与相应的SEQ ID NO具有≥80％的序列相同性，

c)a)或b)的所述重链/轻链可变结构域(VD)对，条件是HCVD或LCVD中的至少一者相对于相应的SEQ ID NO具有至多10个氨基酸取代，

所述蛋白结合剂仍然能够以足够的结合亲和力结合人iRhom2并抑制或降低TACE/ADAM17活性。

13.根据权利要求8-12中任一项所述的蛋白结合剂，其中至少一个氨基酸取代是保守氨基酸取代。

14.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白结合剂，所述蛋白结合剂具有以下中的至少一者：

• 与根据前述权利要求中任一项所述的蛋白结合剂相比，≥50％的对人iRhom2靶结合亲和力，和/或

• 根据前述权利要求中任一项所述的蛋白结合剂的≥50％的对TACE/ADAM17活性的抑制或降低效应。

15.一种蛋白结合剂，其与人iRhom2结合，并且与以下项竞争性结合人iRhom2：

a)根据权利要求8-14中任一项所述的抗体，或

b)选自克隆#3、#5、#16、#22、#34、#42、#43、#44、#46、#49、#54、#56、或#57的抗体。

16.一种蛋白结合剂，其与以下项结合基本上相同、或相同的人iRhom2上的区域：

a)根据权利要求8-14中任一项所述的抗体，或

b)选自克隆#3、#5、#16、#22、#34、#42、#43、#44、#46、#49、#54、#56、或#57的抗体。

17.一种核酸，其编码根据前述权利要求中任一项所述的结合剂的至少一条链。

18.根据权利要求1-16中任一项所述的蛋白结合剂用于(制备药物)治疗

• 被诊断出炎性病况，

• 患有炎性病况,或者

• 处于发展炎性病况的风险

的人或动物对象,或者用于预防此类病况的用途。

19.一种药物组合物,其包含根据权利要求1-16中任一项所述的蛋白结合剂或根据权利要求17所述的核酸,以及任选地一种或多种药学上可接受的赋形剂。

20.一种组合,其包含(i)根据权利要求1-16中任一项所述的蛋白结合剂、根据权利要求17所述的核酸、或根据权利要求19所述的药物组合物,以及(ii)一种或多种治疗活性化合物。

21.一种用于治疗或预防炎性病况的方法,所述方法包括以治疗上足够的剂量向人或动物对象施用(i)根据权利要求1-16中任一项所述的蛋白结合剂,(ii)根据权利要求17所述的核酸,(iii)根据权利要求19所述的药物组合物,或者(iii)根据权利要求20所述的组合。

22.根据权利要求18所述的用途或根据权利要求21所述的方法,其中所述炎性病况是类风湿性关节炎(RA)。

23.一种治疗试剂盒,其包括:

a)根据权利要求1-16中任一项所述的蛋白结合剂、根据权利要求17所述的核酸、根据权利要求19所述的药物组合物或根据权利要求20所述的组合,

b)用于施用所述组合物、组合物或组合的设备,以及

c)使用说明书。

# iRhom2表位的蛋白结合剂

## 技术领域

[0001] 本申请涉及针对iRhom2的蛋白结合剂。

## 背景技术

[0002] ADAM金属肽酶结构域17(ADAM17)(人ADAM17的NCBI参考:NP_003174)也称为TACE(肿瘤坏死因子-α-转化酶),是属于去整合素和金属蛋白酶的ADAM蛋白家族的酶。其为824个氨基酸的多肽。

[0003] ADAM17被理解为参与肿瘤坏死因子α(TNF-α)在细胞表面的加工,并来自反面高尔基网的胞内膜之内。该过程(也称为"脱落")涉及从膜结合的前蛋白(如pro-TNF-α)切割和释放可溶性胞外域,并且具有已知的生理学重要性。ADAM17是首个被鉴定的"脱落酶",并且还理解为在各种各样的膜锚定细胞因子、细胞粘附分子、受体、配体和酶的释放中发挥作用。

[0004] TNF-α基因的克隆揭示其编码26kDa II型跨膜前多肽,该II型跨膜前多肽在内质网中易位期间插入细胞膜中。在细胞表面,pro-TNF-α呈生物活性,并且能够经由近分泌胞间信号转导来诱导免疫应答。然而,pro-TNF-α可在其Ala76-Val77酰胺键处经历蛋白水解切割,其从pro-TNF-α分子中释放出可溶性17kDa胞外结构域(胞外域)。该可溶性胞外域是通常称为TNF-α的细胞因子,其在该分子的旁分泌信号转导中至关重要。可溶性TNF-α的这种蛋白水解释放由ADAM17催化。

[0005] ADAM17还通过调节乳腺中EGFR配体双调蛋白的切割来调控MAP激酶信号转导途径。ADAM17对于活化EGFR、TGFα、AREG、EREG、HB-EGF、Epigen的几种配体是重要的。此外,ADAM17在细胞粘附分子L-选择素的脱落中起作用。

[0006] 最近,ADAM17被发现是放疗抗性形成的关键介质。还显示放疗活化非小细胞肺癌中的ADAM17,其导致了多种存活因子脱落、生长因子途径活化,以及放疗诱导的治疗抗性。

[0007] 由于ADAM17似乎是包括TNFα在内的不同病原性和非病原性因子释放的关键因素,其作为治疗靶分子已成为关注的焦点。为此,已经作出了不同的尝试来开发ADAM17的抑制剂。

[0008] 然而,迄今为止,尚未证明这样的抑制剂在临床上是成功的。

[0009] 因此,本发明的一个目的在于提供允许控制、调节、降低或抑制ADAM17活性的新方法。

[0010] 本发明的另一个目的在于提供允许治疗炎性疾病的新方法。

[0011] 这些和其他目的通过独立权利要求的特征得到解决。从属权利要求公开了可在特定情况下优选的本发明的实施方案。同样,本说明书公开了可在特定情况下优选的本发明的其他实施方案。

## 发明内容

[0012] 本发明尤其提供了一种蛋白结合剂,其与人iRhom2结合,并且当与人iRhom2结合

时抑制和/或降低TACE/ADAM17活性。

[0013] 附图简述

[0014] 图1提供由用于iRhom2敲除小鼠的DNA免疫的表达载体编码的靶序列的概述。

[0015] 图2显示用于功能性筛选杂交瘤上清液的TNFα释放测定(脱落测定)的结果,表明作为所选候选物的代表性实例的杂交瘤细胞池14C2的上清液(导致本发明抗体3的原材料)有效地干扰THP-1细胞中LPS诱导的TNFα脱落。

[0016] 图3示出了对遗传工程化鼠L929细胞群的荧光激活细胞分选(FACS)分析的结果,表明人iRhom2的两种变体——分别由L929-2041-hiR2-Δ242-T7和L929-2041-hiR2-FL-WT-T7细胞异位表达的缺乏氨基酸1-242(Δ242)的T7标记的缺失突变体以及T7标记的全长(FL)野生型(WT)形式——位于这些细胞的表面上。染色:灰色=仅第二抗体;黑色=抗T7-抗体。

[0017] 图4显示用于基于靶识别筛选杂交瘤上清液的FACS分析的结果,表明作为所选候选物的代表性实例的杂交瘤细胞池14C2的上清液(导致本发明抗体3的原材料)明显识别由L929-2041-hiR2-Δ242-T7和L929-2041-hiR2-FL-WT-T7细胞两者异位表达的两种人iRhom2变体。染色:灰色=仅第二抗体;黑色=14C2上清液。

[0018] 图5示出了用于抗体同种型测定的ELISA分析的结果,表明本发明的纯化抗体3、5、16、22、34、42、43、44、46、47、48、49、50、51、52、54、56和57是小鼠IgG同种型。

[0019] 图6提供用于抗体亲和力测定的FACS卡特卡尔分析的结果,表明纯化抗体3、5、16、22、34、42、43、44、48和50与THP-1细胞结合的$K_D$值在亚纳摩尔至低纳摩尔范围内。

[0020] 图7a示出了对遗传工程化小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)群体的FACS分析的结果,表明分别由MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7(SEQ ID NO 190)和MEF-DKO-miR2-FL-WT-T7(SEQ ID NO 193)细胞异位表达的人和小鼠iRhom2全长野生型的T7标记的变体位于这些细胞的表面上。染色:灰色=仅第二抗体;黑色=抗T7-抗体。

[0021] 图7b显示用于测定本发明抗体的小鼠交叉反应性的FACS分析的结果,表明作为本发明抗体(抗体52除外)的代表性实例的纯化抗体3明显识别由MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7异位表达的人iRhom2变体,但不识别由MEF-DKO-miR2-FL-WT-T7细胞异位表达的小鼠iRhom2变体,并因此不与小鼠iRhom2交叉反应。染色:灰色=仅第二抗体;黑色=抗体3。

[0022] 图8a示出了对遗传工程化MEF群体的FACS分析的结果,表明由MEF-DKO-hiR1-FL-WT-T7细胞异位表达的人iRhom1全长野生型的T7标记形式也位于这些细胞的表面上。染色:灰色=仅第二抗体;黑色=抗T7-抗体。

[0023] 图8b显示用于测定本发明抗体的特异性的FACS分析的结果,表明作为本发明抗体的代表性实例的纯化抗体3——与由MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7细胞异位表达的人iRhom2变体形成对照——并不识别由MEF-DKO-hiR1-FL-WT-T7细胞异位表达的密切相关的人iRhom1变体,并因此对人iRhom2具有特异性。染色:灰色=仅第二抗体;黑色=抗体3。

[0024] 图9a显示TNFα释放测定的结果,表明本发明的纯化抗体3、5、16、22、34、42、43和44干扰THP-1细胞中LPS诱导的TNFα脱落,而纯化抗体48和50对TNFα释放不具有抑制效应。数据以释放TNFα的绝对数说明了供试品的效应。所分析的抗体从杂交瘤上清液中纯化。

[0025] 图9b是指图9a中示出的结果,并且以抑制百分比说明供试品对TNFα释放的效应。

[0026] 图10a示出了对具有小鼠iRhom2相关的单氨基酸取代或缺失的MEF群体之一的

FACS分析的结果，该MEF群体经遗传工程化以用于表位测定。数据表明——类似于分别由MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7和MEF-DKO-miR2-FL-WT-T7细胞异位表达的人和小鼠iRhom2全长野生型的T7标记变体——由MEF-DKO-hiR2-FL-P533--T7细胞异位表达的T7标记的人iRhom2变体hiR2-FL-P533-(P533缺失)也位于这些细胞的表面上。染色:灰色＝仅第二抗体;黑色＝抗T7-抗体。

[0027] 图10b显示TGFα释放测定(脱落测定)的结果，表明所有25种具有小鼠iRhom2相关的单氨基酸取代(包括单氨基酸缺失hiR2-FL-P533-)的人iRhom2变体均呈功能活性，并且可以在不同程度上支持PMA刺激的TGFα脱落，指示这些变体最有可能是正确折叠的。

[0028] 图11a示出了用于本发明抗体的表位测定的FACS分析的结果。对于25种具有小鼠iRhom2相关的单氨基酸取代或缺失的人iRhom2变体的整个组，示例性地，显示了用于分析异位表达人iRhom2变体hiR2-FL-P533-的MEF-DKO-hiR2-FL-P533--T7细胞的数据。数据表明，人iRhom2中单氨基酸脯氨酸533的缺失较强地削弱，并因此对于作为对TNFα释放具有抑制效应的本发明抗体的代表性实例的纯化抗体3的结合作出贡献。相比之下，该缺失不影响，并因此不对于作为对TNFα释放没有抑制效应的本发明抗体的代表性实例的纯化抗体50的结合作出贡献。染色:灰色＝仅第二抗体;黑色＝抗体3/抗体50。

[0029] 图11b汇总了对于25种异位表达具有小鼠iRhom2相关的单氨基酸取代的人iRhom2变体(包括缺失变体hiR2-FL-P533-)的工程化MEF群体的整个组，本发明的所有纯化抗体的FACS分析的结果。数据揭示了与对TNFα释放具有抑制效应的本发明的抗体3、5、16、22、34、42、43和44的iRhom2结合有关的氨基酸位置的相关(抗体16除外)模式，它们与对于对TNFα释放没有抑制效应的抗体48和50的结合作出贡献的氨基酸位置模式不同。

[0030] 图12a示出了对在大胞外环的中心区(人iRhom2的AA498至AA562)内具有人iRhom1相关的单氨基酸取代或缺失的MEF群体之一的FACS分析的结果，该MEF群体经遗传工程化以用于表位测定。数据表明——类似于分别由MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7和MEF-DKO-hiR1-FL-WT-T7细胞异位表达的人iRhom2和iRhom1全长野生型的T7标记变体——由MEF-DKO-hiR2-FL-L539A-T7细胞异位表达的T7标记的人iRhom2变体hiR2-FL-L539A也位于这些细胞的表面上。染色:灰色＝仅第二抗体;黑色＝抗T7-抗体。

[0031] 图12b显示TGFα释放测定(脱落测定)的结果，表明所有30种在大胞外环的中心区(人iRhom2的AA498至AA562)内具有人iRhom1相关的单氨基酸取代或单氨基酸缺失(如在hiR2-FL-M534-、hiR2-FL-D535-和hiR2-FL-K536-的情况下)的人iRhom2变体均呈功能活性，并且可以在不同程度上支持PMA刺激的TGFα脱落，指示这些变体最有可能是正确折叠的。

[0032] 图13a示出了用于本发明抗体的表位测定的FACS分析的结果。对于30种在大胞外环的中心区(人iRhom2的AA498至AA562)内具有人iRhom1相关的单氨基酸取代或缺失的人iRhom2变体的整个组，示例性地，显示了用于分析异位表达人iRhom2变体hiR2-FL-L539A的MEF-DKO-hiR2-FL-L539A-T7细胞的数据。数据表明人iRhom2中的单氨基酸亮氨酸539用人iRhom1中对应位置处的丙氨酸取代较强地削弱，并因此对于作为对TNFα释放具有抑制效应的本发明抗体的代表性实例的纯化抗体3的结合作出贡献。相比之下，该取代不影响，并因此不对于作为对TNFα释放没有抑制效应的本发明抗体的代表性实例的纯化抗体50的结合作出贡献。染色:灰色＝仅第二抗体;黑色＝抗体3/抗体50。

[0033] 图13b汇总了对于30种异位表达在大胞外环的中心区(人iRhom2的AA498至AA562)内具有人iRhom1相关的单氨基酸取代的人iRhom2变体(包括缺失变体hiR2-FL-M534-、hiR2-FL-D535-和hiR2-FL-K536-)的工程化MEF群体的整个组,本发明的所有纯化抗体的FACS分析的结果。数据同样揭示了与对TNFα释放具有抑制效应的本发明的抗体3、5、16、22、34、42、43和44的iRhom2结合有关的氨基酸位置的相关模式,它们与对于对TNFα释放没有抑制效应的本发明抗体48和50的结合作出贡献的氨基酸位置模式不同。

[0034] 图14a显示TNFα释放测定的结果,表明本发明的抗体3、5、16、22、34、42、43、44、46、49、54、56和57干扰THP-1细胞中LPS诱导的TNFα脱落,而抗体47、48、50、51和52对TNFα释放不具有抑制效应。数据以释放TNFα的绝对数说明了供试品的效应。所分析的抗体在Expi293F细胞中由相应的18种重链/κ轻链对的瞬时表达产生。

[0035] 图14b是指图14a中示出的结果,并且以抑制百分比说明供试品对TNFα释放的效应。

[0036] 图15a和15b显示iRhom2的示意图,其中说明了邻近跨膜结构域1(TMD1)的近膜结构域(JMD)(A)、环1(B)和C末端(C)的位置。图15b中的表显示如SEQ ID NO 181所示的氨基酸位置。

[0037] 图16示出根据SEQ ID NO 181的人iRhom2的氨基酸序列,其中标记了优选的结合区。

[0038] 图17a显示根据SEQ ID NO 181的人iRhom2(>NP_078875.4人iRhom2同种型1)和根据SEQ ID NO 182的人iRhom1(>NP_071895.3人iRhom1)的比对。

[0039] 图17b显示根据SEQ ID NO 181的人iRhom2(>NP_078875.4人iRhom2同种型1)和根据SEQ ID NO 183的小鼠iRhom2(>NP_766160小鼠iRhom2)的比对。

[0040] 图18a显示了用于测定本发明抗体与恒河猴的交叉反应性的FACS分析的结果,表明作为本发明的抗体3、5、16、22、34、42、43、44、46、47、48、49、50、51、54、56和57的代表性实例的抗体16的鼠(上图)和嵌合(下图)形式两者均明显识别由MEF-DKO-恒河猴-iR2-FL-WT-T7异位表达的恒河猴iRhom2变体(UniProt标识符:F6Y4X6),但不识别由MEF-DKO-恒河猴-iR1-FL-WT-T7细胞异位表达的恒河猴iRhom1变体(UniProt标识符:F6ZPC8),并因此与恒河猴iRhom2交叉反应,但不与恒河猴iRhom1结合。所分析的抗体在Expi293F(对于鼠形式)或CHO(对于嵌合形式)细胞中由相应的重链/κ轻链对的瞬时表达产生。染色:灰色=仅第二抗体;黑色=抗体16。

[0041] 图18b显示了用于测定本发明抗体与食蟹猴的交叉反应性的FACS分析的结果,表明作为本发明的抗体3、5、16、22、34、42、43、44、46、47、48、49、50、51、54、56和57的代表性实例的抗体16的鼠(上图)和嵌合(下图)形式两者均明显识别由MEF-DKO-食蟹猴-iR2-FL-WT-T7异位表达的食蟹猴iRhom2变体(UniProt标识符:A0A2K5TX07),但不识别由MEF-DKO-食蟹猴-iR1-FL-WT-T7细胞异位表达的食蟹猴iRhom1变体(UniProt标识符:A0A2K5TUM2),并因此与食蟹猴iRhom2交叉反应,但不与食蟹猴iRhom1结合。所分析的抗体在Expi293F(对于鼠形式)或CHO(对于嵌合形式)细胞中由相应的重链/κ轻链对的瞬时表达产生。染色:灰色=仅第二抗体;黑色=抗体16。

[0042] 图18c显示了用于测定本发明抗体与狗的交叉反应性的FACS分析的结果,表明作为本发明的抗体3、5、16、22、34、42、43、44、46、47、48、49、50、51、54、56和57的代表性实例的

抗体16的鼠(上图)和嵌合(下图)形式两者均明显识别由MEF-DKO-狗-iR2-FL-WT-T7异位表达的狗iRhom2变体(UniProt标识符:Q00M95),但不识别由MEF-DKO-狗-iR1-FL-WT-T7细胞异位表达的狗iRhom1变体(UniProt标识符:A0A5F4CNN3),并因此与狗iRhom2交叉反应,但不与狗iRhom1结合。所分析的抗体在Expi293F(对于鼠形式)或CHO(对于嵌合形式)细胞中由相应的重链/κ轻链对的瞬时表达产生。染色:灰色=仅第二抗体;黑色=抗体16。

[0043] 图18d显示了用于测定本发明抗体与兔的交叉反应性的FACS分析的结果,表明作为本发明的抗体3、5、16、22、34、42、43、44、49、51、54和56的代表性实例的抗体16的鼠(上图)和嵌合(下图)形式两者均明显识别由MEF-DKO-兔-iR2-FL-WT-T7异位表达的兔iRhom2变体(UniProt标识符:G1T7M2),但不识别由MEF-DKO-兔-iR1-FL-WT-T7细胞异位表达的兔iRhom1变体(UniProt标识符:B8K128),并因此与兔iRhom2交叉反应,但不与兔iRhom1结合。所分析的抗体在Expi293F(对于鼠形式)或CHO(对于嵌合形式)细胞中由相应的重链/κ轻链对的瞬时表达产生。染色:灰色=仅第二抗体;黑色=抗体16。

[0044] 图19a示出了对遗传工程化小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)群体的FACS分析的结果,表明分别由MEF-DKO-hiR2-FL-WT-FLAG(SEQ ID NO 198)和MEF-DKO-miR2-FL-WT-FLAG(SEQ ID NO 199)细胞异位表达的人和小鼠iRhom2全长野生型的FLAG标记的变体位于这些细胞的表面上。染色:灰色=仅第二抗体;黑色=抗FLAG-抗体。

[0045] 图19b显示用于测定本发明抗体的小鼠交叉反应性的FACS分析的结果,表明作为本发明抗体(抗体52除外)的代表性实例的鼠抗体3明显识别由MEF-DKO-hiR2-FL-WT-FLAG异位表达的人iRhom2变体,但不识别由MEF-DKO-miR2-FL-WT-FLAG细胞异位表达的小鼠iRhom2变体,并因此不与小鼠iRhom2交叉反应。所分析的鼠抗体在Expi293F细胞中由相应的重链/κ轻链对的瞬时表达产生。染色:灰色=仅第二抗体;黑色=抗体3。

[0046] 图20a显示用于测定本发明抗体的特异性的FACS分析的结果,表明导致作为本发明的抗体3、16、22和42的代表性实例的本发明抗体16的原材料与RPMI-8226(左图)和THP-1细胞(中图)结合,这两种细胞均内源性表达iRhom2,但不与RH-30细胞结合(右图),该RH-30细胞不内源性表达iRhom2,并因此特异性地识别内源性人iRhom2。染色:灰色=仅第二抗体;黑色=导致抗体16的上清液。

[0047] 图20b显示用于测定本发明抗体的特异性的FACS分析的结果,表明作为本发明的抗体16、22和42的代表性实例的抗体16的鼠(上图)和嵌合(下图)形式两者均与RPMI-8226(左图)和THP-1细胞(中图)结合,这两种细胞均内源性表达iRhom2,但不与RH-30细胞结合(右图),该RH-30细胞不内源性表达iRhom2,并因此特异性地识别内源性人iRhom2。所分析的抗体在Expi293F(对于鼠形式)或CHO(对于嵌合形式)细胞中由相应的重链/κ轻链对的瞬时表达产生。染色:灰色=仅第二抗体;黑色=抗体16。

[0048] 图21a示出了对在大胞外环中心区的N末端(人iRhom2的AA431至AA496)具有人iRhom1相关的单氨基酸取代的MEF群体之一的FACS分析的结果,该MEF群体经遗传工程化以用于表位测定。数据表明——类似于由MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7细胞异位表达的人iRhom2全长野生型的T7标记的变体——由MEF-DKO-hiR2-FL-S448N-T7细胞异位表达的T7标记的人iRhom2变体hiR2-FL-S448N也位于这些细胞的表面上。染色:灰色=仅第二抗体;黑色=抗T7-抗体。

[0049] 图21b显示TGFα释放测定(脱落测定)的结果,表明所有23种在大胞外环中心区的N

末端(人iRhom2的AA431至AA496)具有人iRhom1相关的单氨基酸取代的人iRhom2变体均呈功能活性,并且可以在不同程度上支持PMA刺激的TGFα脱落,指示这些变体最有可能是正确折叠的。

[0050] 图22a示出了用于本发明抗体的表位测定的FACS分析的结果。对于23种在大胞外环中心区的N末端(人iRhom2的AA431至AA496)具有人iRhom1相关的单氨基酸取代的人iRhom2变体的整个组,示例性地,显示了用于分析异位表达人iRhom2变体hiR2-FL-S448N的MEF-DKO-hiR2-FL-S448N-T7细胞的数据。数据表明,人iRhom2中的单氨基酸丝氨酸448用人iRhom1中对应位置处的天冬酰胺取代不影响,并因此不对于作为对TNFα释放具有抑制效应的本发明抗体的代表性实例的抗体5以及作为对TNFα释放没有抑制效应的本发明抗体的代表性实例的抗体50两者的结合作出贡献。染色:灰色=仅第二抗体;分别地,黑色=抗体5/抗体50。

[0051] 图22b汇总了对于23种异位表达在大胞外环中心区的N末端(人iRhom2的AA431至AA496)具有人iRhom1相关的单氨基酸取代的人iRhom2变体的工程化MEF群体的整个组,本发明的所有抗体的FACS分析的结果。数据未揭示出与对TNFα释放具有抑制效应的本发明的抗体3、5、16、22、34、42、43和44的iRhom2结合有关的氨基酸位置。相比之下,它们中的一些对于对TNFα释放没有抑制效应的抗体48和50的结合作出贡献。

[0052] 图23a示出了对在大胞外环中心区的C末端(人iRhom2的AA563至AA638)、环5(人iRhom2的AA771)中、或C末端(人iRhom2的AA825至AA844)中具有人iRhom1相关的单氨基酸取代的MEF群体之一的FACS分析的结果,该MEF群体经遗传工程化以用于表位测定。数据表明——类似于由MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7细胞异位表达的人iRhom2全长野生型的T7标记变体——由MEF-DKO-hiR2-FL-I566E-T7细胞异位表达的T7标记的人iRhom2变体hiR2-FL-I566E也位于这些细胞的表面上。染色:灰色=仅第二抗体;黑色=抗T7-抗体。

[0053] 图23b显示TGFα释放测定(脱落测定)的结果,表明所有33种在大胞外环中心区的C末端(人iRhom2的AA563至AA638)、环5(人iRhom2的AA771)中、或C末端(人iRhom2的AA825至AA844)中具有人iRhom1相关的单氨基酸取代的人iRhom2变体均呈功能活性,并且可以在不同程度上支持PMA刺激的TGFα脱落,指示这些变体最有可能是正确折叠的。

[0054] 图24a示出了用于本发明抗体的表位测定的FACS分析的结果。对于33种在大胞外环中心区的C末端(人iRhom2的AA563至AA638)、环5(人iRhom2的AA771)中、或C末端(人iRhom2的AA825至AA844)中具有人iRhom1相关的单氨基酸取代的人iRhom2变体的整个组,示例性地,显示了用于分析异位表达人iRhom2变体hiR2-FL-I566E的MEF-DKO-hiR2-FL-I566E-T7细胞的数据。数据表明人iRhom2中的单氨基酸异亮氨酸566用人iRhom1中对应位置处的谷氨酸取代较强地削弱,并因此对于作为对TNFα释放具有抑制效应的本发明抗体的代表性实例的抗体5的结合作出贡献。相比之下,该取代不影响,并因此不对于作为对TNFα释放没有抑制效应的本发明抗体的代表性实例的抗体50的结合作出贡献。染色:灰色=仅第二抗体;分别地,黑色=抗体5/抗体50。

[0055] 图24b汇总了对于33种异位表达在大胞外环中心区的C末端(人iRhom2的AA563至AA638)、环5(人iRhom2的AA771)中、或C末端(人iRhom2的AA825至AA844)中具有人iRhom1相关的单氨基酸取代的人iRhom2变体的工程化MEF群体的整个组,本发明的所有抗体的FACS分析的结果。数据同样揭示了与对TNFα释放具有抑制效应的本发明的抗体3、5、22、34、42、

43和44的iRhom2结合有关的氨基酸位置的相关模式，它们与对于对TNFα释放没有抑制效应的抗体48和50的结合作出贡献的氨基酸位置模式不同。

[0056] 图25a示出了对在大胞外环的中心区(人iRhom2的AA503至AA593)内具有丙氨酸单氨基酸取代的MEF群体之一的FACS分析的结果，该MEF群体经遗传工程化以用于表位测定。数据表明——类似于由MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7细胞异位表达的人iRhom2全长野生型的T7标记变体——由MEF-DKO-hiR2-FL-K536A-T7细胞异位表达的T7标记的人iRhom2变体hiR2-FL-K536A也位于这些细胞的表面上。染色:灰色＝仅第二抗体;黑色＝抗T7-抗体。

[0057] 图25b显示TGFα释放测定(脱落测定)的结果，表明除了人iRhom2变体hiR2-FL-C516A、hiR2-FL-F523A、hiR2-FL-C549A、hiR2-FL-D552A、hiR2-FL-C556A、hiR2-FL-W567A、hiR2-FL-W574A和hiR2-FL-C577A之外，所有91种在大胞外环的中心区(人iRhom2的AA503至AA593)内单氨基酸取代为丙氨酸的人iRhom2变体均呈功能活性，并且可以在不同程度上支持PMA刺激的TGFα脱落，指示这些变体最有可能是正确折叠的。

[0058] 图26a示出了用于本发明抗体的表位测定的FACS分析的结果。对于83种在大胞外环的中心区(人iRhom2的AA503至AA593)内单氨基酸取代为丙氨酸的功能性人iRhom2变体的整个组，示例性地，显示了用于分析异位表达人iRhom2变体hiR2-FL-K536A的MEF-DKO-hiR2-FL-K536A-T7细胞的数据。数据表明，人iRhom2中的单氨基酸亮氨酸536用丙氨酸取代较强地削弱，并因此对于作为对TNFα释放具有抑制效应的本发明抗体的代表性实例的抗体5的结合作出贡献。相比之下，该取代不影响，并因此不对于作为对TNFα释放没有抑制效应的本发明抗体的代表性实例的抗体50的结合作出贡献。染色:灰色＝仅第二抗体;分别地，黑色＝抗体5/抗体50。

[0059] 图26b汇总了对于83种异位表达在大胞外环的中心区(人iRhom2的AA503至AA593)内单氨基酸取代为丙氨酸的人iRhom2变体的工程化功能性MEF群体的整个组，本发明的所有抗体的FACS分析的结果。数据同样揭示了与对TNFα释放具有抑制效应的本发明的抗体3、5、16、22、34、42、43和44的iRhom2结合有关的氨基酸位置的相关模式，它们与对于对TNFα释放没有抑制效应的抗体48和50的结合作出贡献的氨基酸位置模式不同。

[0060] 图27a显示TNFα释放测定的结果，表明本发明的抗体3、5、16、22、34、42、43和44干扰U937细胞中PMA诱导的TNFα脱落。数据以释放TNFα的绝对数说明了供试品的效应。所分析的鼠抗体在Expi293F细胞中由相应的重链/κ轻链对的瞬时表达产生。

[0061] 图27b是指图27a中示出的结果，并且以抑制百分比说明供试品对TNFα释放的效应。

[0062] 图28a显示TNFα释放测定的结果，表明本发明的抗体16、22、34、42和44的鼠(用m指示，继之以抗体编号)和嵌合(用ch指示，继之以抗体编号)形式两者均干扰U937细胞中PMA诱导的TNFα脱落。数据以释放TNFα的绝对数说明了供试品的效应。所分析的抗体在Expi293F(对于鼠形式)或CHO(对于嵌合形式)细胞中由相应的重链/κ轻链对的瞬时表达产生。

[0063] 图28b是指图28a中示出的结果，并且以抑制百分比说明供试品对TNFα释放的效应。

[0064] 图29a显示IL-6R释放测定的结果，表明本发明的抗体3、5、16、22、34、42、43和44干扰THP-1细胞中PMA诱导的IL-6R脱落。数据以释放IL-6R的绝对数说明了供试品的效应。所

分析的鼠抗体在Expi293F细胞中由相应的重链/κ轻链对的瞬时表达产生。

[0065] 图29b是指图29c中示出的结果，并且以抑制百分比说明供试品对IL-6R释放的效应。

[0066] 图30a显示IL-6R释放测定的结果，表明本发明的抗体3、5、16、22、34、42、43和44干扰U937细胞中PMA诱导的IL-6R脱落。数据以释放IL-6R的绝对数说明了供试品的效应。所分析的鼠抗体在Expi293F细胞中由相应的重链/κ轻链对的瞬时表达产生。

[0067] 图30b是指图30a中示出的结果，并且以抑制百分比说明供试品对IL-6R释放的效应。

[0068] 图31a显示IL-6R释放测定的结果，表明本发明的抗体16、22、34、42和44的鼠(用m指示，继之以抗体编号)和嵌合(用ch指示，继之以抗体编号)形式两者均干扰U937细胞中PMA诱导的IL-6R脱落。数据以释放IL-6R的绝对数说明了供试品的效应。所分析的抗体在Expi293F(对于鼠形式)或CHO(对于嵌合形式)细胞中由相应的重链/κ轻链对的瞬时表达产生。

[0069] 图31b是指图31a中示出的结果，并且以抑制百分比说明供试品对IL-6R释放的效应。

[0070] 图32a显示HB-EGF释放测定的结果，表明本发明的抗体16、22、34、42和44的鼠(用m指示，继之以抗体编号)和嵌合(用ch指示，继之以抗体编号)形式两者均干扰THP-1细胞中PMA诱导的HB-EGF脱落。数据以释放HB-EGF的绝对数说明了供试品的效应。所分析的抗体在Expi293F(对于鼠形式)或CHO(对于嵌合形式)细胞中由相应的重链/κ轻链对的瞬时表达产生。

[0071] 图32b是指图32a中示出的结果，并且以抑制百分比说明供试品对HB-EGF释放的效应。

[0072] 图33a显示HB-EGF释放测定的结果，表明本发明的抗体16、22、34、42和44的鼠(用m指示，继之以抗体编号)和嵌合(用ch指示，继之以抗体编号)形式两者均干扰U937细胞中PMA诱导的HB-EGF脱落。数据以释放HB-EGF的绝对数说明了供试品的效应。所分析的抗体在Expi293F(对于鼠形式)或CHO(对于嵌合形式)细胞中由相应的重链/κ轻链对的瞬时表达产生。

[0073] 图33b是指图33a中示出的结果，并且以抑制百分比说明供试品对HB-EGF释放的效应。

[0074] 图34a显示TGFα释放测定的结果，表明本发明的抗体16、22、42、43和44较弱干扰PC3细胞中PMA诱导的TGFα脱落，而抗体3、5和34不对TGFα释放具有抑制效应。数据以释放TGFα的绝对数说明了供试品的效应。所分析的鼠抗体在Expi293F细胞中由相应的重链/κ轻链对的瞬时表达产生。

[0075] 图34b是指图34a中示出的结果，并且以抑制百分比说明供试品对TGFα释放的效应。

[0076] 图35a显示TNFα释放测定的结果，表明本发明的抗体16、22和42干扰分离自健康供体的人外周血单个核细胞(PBMC)中LPS诱导的TNFα脱落。数据以释放TNFα的绝对数说明了供试品的效应。所分析的鼠抗体在Expi293F细胞中由相应的重链/κ轻链对的瞬时表达产生。

[0077] 图35b是指图35a中示出的结果，并且以抑制百分比说明供试品对TNFα释放的效应。

[0078] 图36a显示TNFα释放测定的结果，表明本发明的抗体16、22和42干扰分离自健康供体的外周血单个核细胞(PBMC)的人巨噬细胞中LPS诱导的TNFα脱落。数据以释放TNFα的绝对数说明了供试品的效应。所分析的鼠抗体在Expi293F细胞中由相应的重链/κ轻链对的瞬时表达产生。

[0079] 图36b是指图36a中示出的结果，并且以抑制百分比说明供试品对TNFα释放的效应。

[0080] 图37a显示IL-6R释放测定的结果，表明本发明的抗体16、22和42干扰分离自健康供体的人外周血单个核细胞(PBMC)中PMA诱导的IL-6R脱落。数据以释放IL-6R的绝对数说明了供试品的效应。所分析的鼠抗体在Expi293F细胞中由相应的重链/κ轻链对的瞬时表达产生。

[0081] 图37b是指图37a中示出的结果，并且以抑制百分比说明供试品对IL-6R释放的效应。

[0082] 图38a显示HB-EGF释放测定的结果，表明本发明的抗体16、22和42干扰分离自健康供体的人外周血单个核细胞(PBMC)中PMA诱导的HB-EGF脱落。数据以释放HB-EGF的绝对数说明了供试品的效应。所分析的鼠抗体在Expi293F细胞中由相应的重链/κ轻链对的瞬时表达产生。

[0083] 图38b是指图38a中示出的结果，并且以抑制百分比说明供试品对HB-EGF释放的效应。

[0084] 图39a显示人源化hsNOG-EXL小鼠(人cd34+)中体内败血性休克模型的结果，表明本发明的抗体16、22和42干扰人源化hsNOG-EXL小鼠中LPS诱导的TNFα脱落。数据以释放TNFα的绝对数说明了供试品的效应。所分析的鼠抗体在Expi293F细胞中由相应的重链/κ轻链对的瞬时表达产生。

[0085] 图39b是指图39a中示出的结果，并且与设定为100％的缓冲液处理的对照动物相比，以百分比说明供试品对TNFα释放的效应。

[0086] 图40a显示TNFα释放测定的结果，表明本发明的抗体16、22、34、42和44干扰分离自患有类风湿性关节炎的患者的人外周血单个核细胞(PBMC)中LPS诱导的TNFα脱落。数据以释放TNFα的绝对数说明了供试品的效应。所分析的嵌合抗体在CHO细胞中由相应的重链/κ轻链对的瞬时表达产生。

[0087] 图40b是指图40a中示出的结果，并且以抑制百分比说明供试品对TNFα释放的效应。

[0088] 图41a显示IL-6R释放测定的结果，表明本发明的抗体16、22、34、42和44干扰分离自患有类风湿性关节炎的患者的人外周血单个核细胞(PBMC)中PMA诱导的IL-6R脱落。数据以释放IL-6R的绝对数说明了供试品的效应。所分析的嵌合抗体在CHO细胞中由相应的重链/κ轻链对的瞬时表达产生。

[0089] 图41b是指图41a中示出的结果，并且以抑制百分比说明供试品对IL-6R释放的效应。

[0090] 图42a显示HB-EGF释放测定的结果，表明本发明的抗体16、22、34、42和44干扰分离

自患有类风湿性关节炎的患者的人外周血单个核细胞(PBMC)中PMA诱导的HB-EGF脱落。数据以释放HB-EGF的绝对数说明了供试品的效应。所分析的嵌合抗体在CHO细胞中由相应的重链/κ轻链对的瞬时表达产生。

[0091] 图42b是指图42a中示出的结果,并且以抑制百分比说明供试品对HB-EGF释放的效应。

[0092] 发明详述

[0093] 根据本发明的一个方面,提供了一种蛋白结合剂,其在与人iRhom2结合时至少在人iRhom2的环1的区域内结合。

[0094] 根据本发明的另一方面,提供了一种与人iRhom2的胞外结构域结合的蛋白结合剂,所述蛋白结合剂是IgG抗体。

[0095] 非活性菱形家族成员2(iRhom2)是人体内由RHBDF2基因编码的蛋白质。其为由约850个氨基酸组成的跨膜蛋白,具有七个跨膜结构域。本发明的发明人首次表明iRhom2可充当蛋白结合剂的靶标以抑制TACE/ADAM17活性。

[0096] iRhom2有不同的同种型。本文进行的实验用定义为NCBI参考NP_078875.4的同种型建立。然而,教导内容可非限制性地转换到iRhom2的其他同种型,如下表所示:

[0097]

| mRNA | 蛋白质 | 名称 |
|---|---|---|
| NM_024599.5 | NP_078875.4 | 非活性菱形蛋白 2 转录物变体 1/<br>同种型 1 |
| NM_001005498.3 | NP_001005498.2 | 非活性菱形蛋白 2 转录物变体 2/<br>同种型 2 |

[0098] Rhom2的环1包含SEQ ID NO 181的氨基酸残基474-660。参见图15中的“B”项进行解释。

[0099] 在本发明的一个实施方案中,蛋白结合剂也与人iRhom2的一个或多个其他区域,如例如位于环1的N末端的近膜结构域(JMD)(在图15中显示为“A”项)结合,或者与C末端附近的区域结合。JMD包含SEQ ID NO 181的氨基酸残基431-473。

[0100] 在另一个实施方案中,蛋白结合剂不与位于环1的N末端侧的近膜结构域(JMD)结合。

[0101] 根据本发明的一个实施方案,根据SEQ ID NO 181中所示的编号,蛋白结合剂在至少跨越从(并包括)W526至(并包括)I566的人iRhom2的区域内结合。

[0102] 优选地,蛋白结合剂在具有至少3个氨基酸长度的区域内结合。

[0103] 在一个或多个实施方案中,蛋白结合剂与以上区域内的≥2、≥3、≥4、≥5、≥6、≥7、≥8、≥9、≥10、≥11、≥12、13、≥14、≥15、≥16、≥17、≥18、≥19、≥20、≥21、≥22、≥23、≥24、或≥25个氨基酸结合。相应的氨基酸残基可以以离散、连续的序列存在,或者以两个或更多个簇存在,每个簇包含一个或多个氨基酸残基。

[0104] 优选地,根据SEQ ID NO 181中所示的编号,蛋白结合剂在至少跨越从(并包括)P533至(并包括)K536的人iRhom2的区域内结合。

[0105] 根据本发明的一个实施方案,根据SEQ ID NO 181中所示的编号,蛋白结合剂结合包含至少一个选自以下的残基的人iRhom2的区段:W526;Q527;P532;P533;M534;D535;

K536;S537;L539;K542;R543;T544;G546;R554;E557;S561;和/或I566。

[0106] 在一个或多个实施方案中,蛋白结合剂与来自以上列表中的≥2、≥3、≥4、≥5、≥6、≥7、≥8、≥9、≥10、≥11、或≥12个氨基酸残基结合。相应的氨基酸残基可以以离散、连续的序列存在,或者以两个或更多个簇存在,每个簇包含一个或多个氨基酸残基。

[0107] 优选地,根据SEQ ID NO 181中所示的编号,蛋白结合剂结合包含至少一个选自以下的残基的iRhom2的区段:P533;M534;D535;K536;和/或L539。

[0108] 在一个或多个实施方案中,蛋白结合剂与来自以上列表中的≥2、≥3、或≥4个氨基酸残基结合。相应的氨基酸残基可以以离散、连续的序列存在,或者以两个或更多个簇存在,每个簇包含一个或多个氨基酸残基。

[0109] 根据本发明的一个实施方案,蛋白结合剂在与人iRhom2结合时抑制和/或降低TACE/ADAM17活性。

[0110] 如本文所用,术语“抑制和/或降低TACE/ADAM17活性”意在描述由阻断或降低TACE/ADAM17活性的蛋白结合剂引起的效应,如例如在相应的脱落测定中所测量(参见例如图9和实施例14)。

[0111] ADAM金属肽酶结构域17(ADAM17)也称为TACE(肿瘤坏死因子-α-转化酶),是属于去整合素和金属蛋白酶的ADAM蛋白家族的酶。ADAM17被理解为参与肿瘤坏死因子α(TNF-α)在细胞表面的加工,并来自反面高尔基网的胞内膜之内。该过程(也称为“脱落”)涉及从膜结合的前蛋白(如pro-TNF-α)切割和释放可溶性胞外域,并且具有已知的生理学重要性。ADAM17是首个被鉴定的“脱落酶”,并且其还理解为在各种各样的膜锚定细胞因子、细胞粘附分子、受体、配体和酶的释放中发挥作用。

[0112] TNF-α基因的克隆揭示其编码26kDa II型跨膜前多肽,其在成熟期间插入细胞膜中。在细胞表面,pro-TNF-α呈生物活性,并且能够经由近分泌胞间信号转导来诱导免疫应答。然而,pro-TNF-α可在其Ala76-Val77酰胺键处经历蛋白水解切割,其从pro-TNF-α分子中释放出可溶性17kDa胞外结构域(胞外域)。该可溶性胞外域是通常称为TNF-α的细胞因子,其在旁分泌信号转导中至关重要。可溶性TNF-α的这种蛋白水解释放由ADAM17催化。

[0113] 最近,ADAM17被发现是放疗抗性的关键介质。还显示放疗活化非小细胞肺癌中的ADAM17,其导致了多种存活因子脱落、生长因子途径活化,以及放疗诱导的治疗抗性。

[0114] ADAM17还通过调节乳腺中EGFR配体双调蛋白的脱落来调节MAP激酶信号转导途径。ADAM17还在细胞粘附分子L-选择素的脱落中起作用。

[0115] 根据本发明的一个实施方案,TACE/ADAM17活性的抑制或降低是由蛋白结合剂干扰iRhom2介导的TACE/ADAM17活化或TACE/ADAM17与其他蛋白质(包括底物分子)的相互作用引起的。

[0116] 根据本发明的一个实施方案,蛋白结合剂在与人iRhom2结合时抑制或降低诱导的TNFα脱落。

[0117] 根据本发明的一个实施方案,蛋白结合剂在与人iRhom2结合时抑制或降低诱导的IL-6R脱落。

[0118] 根据本发明的一个实施方案,蛋白结合剂在与人iRhom2结合时抑制或降低诱导的HB-EGF脱落。

[0119] 如本文所用,肿瘤坏死因子α(TNFα)脱落或释放是指膜锚定肿瘤坏死因子α(mTNF

α/pro-TNFα)在切割时释放到环境中变成可溶性TNFα(sTNFα或简称为TNFα)的过程。该过程尤其由TACE/ADAM17触发。

[0120] 白介素6受体(IL-6R)的释放或脱落是指通过TACE/ADAM17对膜结合IL-6R在细胞表面上靠近其跨膜结构域的蛋白水解位点处进行蛋白水解切割而产生可溶性IL-6R的过程。

[0121] 肝素结合EGF样生长因子(HB-EGF)的释放或脱落是指生成可溶形式的HB-EGF并使其从细胞表面释放的切割过程。肝素结合EGF样生长因子(即对肝素具有亲和力的表皮生长因子)作为膜锚定促有丝分裂和趋化糖蛋白合成。HB-EGF首次在人巨噬样细胞的条件培养基中被鉴定,是一种87个氨基酸的糖蛋白,展示出高度调控的基因表达。

[0122] 测定TNFα脱落效应的合适测定描述于例如图9和实施例14中。测定IL-6R和/或HB-EGF的释放或脱落的合适测定分别描述于例如图29和实施例26或者图32和实施例29中。

[0123] 根据本发明的一个实施方案,蛋白结合剂所结合的人iRhom2包含:

[0124] a)SEQ ID NO 181所示的氨基酸序列,或

[0125] b)与SEQ ID NO 181具有至少80%序列相同性的氨基酸序列,条件是所述序列保持iRhom2活性。

[0126] 在一些实施方案中,人iRhom2包含与SEQ ID NO 181具有≥81%,优选地≥82%,更优选地≥83%、≥84%、≥85%、≥86%、≥87%、≥88%、≥89%、≥90%、≥91%、≥92%、≥93%、≥94%、≥95%、≥96%、≥97%、≥98%或最优选地≥99%序列相同性的氨基酸序列。

[0127] SEQ ID NO 181表示非活性菱形蛋白2(iRhom2)同种型1[智人]的氨基酸序列,可以NCBI参考NP_078875.4获得。通常,存在iRhom2的不同变体和同种型。同样,存在或可能存在包含保守或沉默氨基酸取代的突变体,其保持完全或至少显著的iRhom2活性。这些同种型、变体和突变体由以上指定的相同性范围涵盖,然而,这意味着功能异常的非活性变体和突变体被排除在外。

[0128] 根据本发明的一个实施方案,蛋白结合剂是单克隆抗体或其保留靶结合能力的靶结合片段或衍生物、或抗体模拟物。

[0129] 如本文所用,术语“单克隆抗体(mAb)”应当指具有同质抗体群体的抗体组合物,即具有由全免疫球蛋白或其保留靶结合能力的片段或衍生物组成的同质群体的抗体组合物。

[0130] 尤其优选的这样的抗体是IgG抗体、或其保留靶结合能力的片段或衍生物。免疫球蛋白G(IgG)是抗体的一种类型。代表人体内约75%的血清抗体,IgG是存在于血液循环中的最常见抗体类型。IgG分子由血浆B细胞产生和释放。每个IgG具有两个抗原结合位点。

[0131] IgG抗体是由四条肽链构成的分子量为约150kDa的大分子。其含有两条相同的约50kDa的γ类重链以及两条相同的约25kDa的轻链,因此为四聚体四级结构。两条重链彼此连接,并各自通过二硫键与轻链连接。所得的四聚体具有两个相同的半部,它们一起形成Y形形状。叉的每一端含有相同的抗原结合位点。IgG的Fc区具有高度保守的N-糖基化位点。与该位点连接的N-聚糖主要为复合型核心岩藻糖基化双触角结构。此外,少量的这些N-聚糖还具有二等分GlcNAc和α-2,6-连接的唾液酸残基。

[0132] 人体内有四种IgG亚类(IgG1、2、3和4),以它们在血清中的丰度(IgG1最为丰富)的顺序命名。

[0133] 如本文所用,术语“片段”应当指此类抗体的保留靶结合能力的片段,例如:

[0134] • CDR(互补决定区),

[0135] • 高变区,

[0136] • 可变结构域(Fv),

[0137] • IgG或IgM重链(由VH、CH1、铰链、CH2和CH3区组成),

[0138] • IgG或IgM轻链(由VL和CL区组成),和/或

[0139] • Fab和/或$F(ab)_2$。

[0140] 如本文所用,术语“衍生物”应指在结构上不同于普遍抗体概念,但仍与普遍抗体概念具有一些结构关系的蛋白质构建体,例如scFv、Fab和/或$F(ab)_2$,以及双特异性、三特异性或更高特异性的抗体构建体,并且还保留了靶结合能力。以下解释了所有这些项目。

[0141] 本领域技术人员已知的其他抗体衍生物是双抗体、骆驼抗体、纳米抗体、域抗体、具有由scFv、IgA组成的两条链的二价同源二聚体(由J链和分泌片连接的两个IgG结构)、鲨鱼抗体、由新世界灵长类框架加上非新世界灵长类CDR组成的抗体、包含CH3+VL+VH的二聚化构建体,以及抗体缀合物(例如,与毒素、细胞因子、放射性同位素或标记连接的抗体或片段或衍生物)。这些类型在文献中有充分描述,并且可由本领域技术人员基于本公开使用,而不进一步增加发明活动。

[0142] Köhler&Milstein(1975)中公开了用于产生杂交瘤细胞的方法。

[0143] 用于产生和/或选择嵌合或人源化mAb的方法是本领域已知的。例如,Genentech的US6331415描述了嵌合抗体的产生,而医学研究委员会(Medical Research Council)的US6548640描述了CDR移植技术,并且Celltech的US5859205描述了人源化抗体的产生。

[0144] 产生和/或选择完全人mAb的方法是本领域已知的。这些可包括使用经相应的蛋白质或肽免疫的转基因动物,或者使用合适的展示技术,如酵母展示、噬菌体展示、B细胞展示或核糖体展示,其中在稳定期针对人iRhom2筛选文库中的抗体。

[0145] 体外抗体文库尤其公开于MorphoSys的US6300064和MRC/Scripps/Stratagene的US6248516中。噬菌体展示技术例如公开于Dyax的US5223409中。转基因哺乳动物平台例如描述于TaconicArtemis的EP1480515A2中。

[0146] IgG、IgM、scFv、Fab和/或$F(ab)_2$是本领域技术人员公知的抗体形式。相关的启用技术可从相应的教科书获得。

[0147] 如本文所用,术语“Fab”涉及包含抗原结合区的IgG/IgM片段,所述片段由来自抗体的各重链和轻链的一个恒定区和一个可变区构成。

[0148] 如本文所用,术语“$F(ab)_2$”涉及由通过二硫键彼此连接的两个Fab片段组成的IgG/IgM片段。

[0149] 如本文所用,术语“scFv”涉及单链可变片段,其是免疫球蛋白的重链和轻链的可变区的融合体,用短接头(通常是丝氨酸(S)或甘氨酸(G))连接在一起。该嵌合分子保留了原始免疫球蛋白的特异性,尽管除去了恒定区并引入了接头肽。

[0150] 经修饰抗体形式为例如双特异性或三特异性抗体构建体、基于抗体的融合蛋白、免疫缀合物等。这些类型在文献中有充分描述,并且可由本领域技术人员基于本公开以及进一步增加发明活动来使用。

[0151] 如本文所用,术语“抗体模拟物”涉及有机分子,最常见的是与靶蛋白特异性结合

的蛋白质,类似于抗体,但在结构上不与抗体相关。抗体模拟物通常是具有约3至20kDa摩尔质量的人工肽或蛋白质。该定义尤其涵盖Affibody分子、Affilins、Affimers、Affitins、Alphabodies、Anticalins、Avimers、DARPins、Fynomers、Kunitz结构域肽、Monobodies和nanoCLAMP。

[0152] 在一个或多个实施方案中,蛋白结合剂是分离抗体、或其保留靶结合能力的靶结合片段或衍生物、或分离的抗体模拟物。

[0153] 在一个或多个实施方案中,抗体是工程化或重组抗体、或其保留靶结合能力的靶结合片段或衍生物、或工程化或重组抗体模拟物。

[0154] 根据本发明的一个实施方案,蛋白结合剂是呈选自以下形式中的至少一种的抗体:IgG、scFv、Fab、或(Fab)2。

[0155] 根据本发明的一个实施方案,蛋白结合剂不与人iRhom1交叉反应。

[0156] 根据本发明的一个实施方案,蛋白结合剂是鼠、嵌合、人源化、或人抗体。

[0157] 根据本发明的一个实施方案,蛋白结合剂是如下抗体:

[0158] a)包含一组重链/轻链互补决定区(CDR),其包含在以下SEQ ID NO对所示的重链/轻链可变结构域序列对中:

[0159] 2和7;12和17;22和27;32和37;42和47;52和57;62和67;72和77;82和87;112和117;152和157;162和167;和/或172和177;

[0160] b)包含一组重链/轻链互补决定区(CDR),其按顺序(HCDR1;HCDR2;HCDR3;LCDR1;LCDR2和LCDR3)包含以下SEQ ID NO:

[0161] • 3、4、5、8、9、10;

[0162] • 13、14、15、18、19、20;

[0163] • 23、24、25、28、29、30;

[0164] • 33、34、35、38、39、40;

[0165] • 43、44、45、48、49、50;

[0166] • 53、54、55、58、59、60;

[0167] • 63、64、65、68、69、70;

[0168] • 73、74、75、78、79、80;

[0169] • 83、84、85、88、89、90;

[0170] • 113、114、115、118、119、120;

[0171] • 153、154、155、158、159、160;

[0172] • 163、164、165、168、169、170;和/或

[0173] • 173、174、175、178、179、180;

[0174] c)包含b)的重链/轻链互补决定区(CDR),条件是CDR中的至少一者相对于相应的SEQ ID NO具有多至3个氨基酸取代,和/或

[0175] d)包含b)或c)的重链/轻链互补决定区(CDR),条件是CDR中的至少一者与相应的SEQ ID NO具有≥66%序列相同性,

[0176] 其中CDR被嵌入在合适的蛋白框架中,以便能够以足够的结合亲和力结合至人iRhom2并抑制或降低TACE/ADAM17活性。

[0177] 如本文所用,术语“CDR”或“互补决定区”旨在意指在重链和轻链多肽的可变区内

存在的非连续抗原结合位点。这些特定区域已由Kabat等人(1977),Kabat等人(1991),Chothia等人(1987)和MacCallum等人,(1996)描述,其中当相互比较时,定义包括氨基酸残基的重叠或子集。然而,任一定义用于指抗体或移植性抗体或其变体的CDR均旨在处于如本文所定义和使用的术语的范围之内。涵盖如由每个以上引用的参考文献定义的CDR的氨基酸残基在下表1中示出作为比较。需注意,该编号可能不同于实际公开于所附序列表中的CDR,因为CDR定义因情况而异。

[0178]

| | Kabat | Chothia | MacCallum |
|---|---|---|---|
| VH CDR1 | 31-35 | 26-32 | 30-35 |
| VH CDR2 | 50-65 | 53-55 | 47-58 |
| VH CDR3 | 95-102 | 96-101 | 93-101 |
| VL CDR1 | 24-34 | 26-32 | 30-36 |

[0179]

| | | | |
|---|---|---|---|
| VL CDR2 | 50-56 | 50-52 | 46-55 |
| VL CDR3 | 89-97 | 91-96 | 89-96 |

[0180] 表1:CDR定义

[0181] 如本文所用,术语“框架”在用于涉及抗体可变区时是指抗体可变区内CDR区以外的所有氨基酸残基。因此,可变区框架的长度为约100-120个氨基酸,但仅旨在涉及CDR以外的那些氨基酸。

[0182] 如本文所用,术语“能够以足够的结合亲和力结合靶X”应理解为意指相应的结合结构域以$10^{-4}$或更小的$K_D$结合靶。$K_D$是蛋白结合剂与其抗原之间的平衡解离常数,即$k_{off}/k_{on}$比率。$K_D$与亲和力成反比关系。$K_D$值涉及蛋白结合剂的浓度(特定实验所需的蛋白结合剂的量),因此$K_D$值越低(浓度越低),因此结合结构域的亲和力越高。下表显示单克隆抗体的典型$K_D$范围。

[0183]

| $K_D$值 | 摩尔范围 |
|---|---|
| $10^{-4}$至$10^{-6}$ | 微摩尔(μM) |
| $10^{-7}$至$10^{-9}$ | 纳摩尔(nM) |
| $10^{-10}$至$10^{-12}$ | 皮摩尔(pM) |
| $10^{-13}$至$10^{-15}$ | 飞摩尔(fM) |

[0184] 表2:$K_D$和摩尔值

[0185] 优选地,蛋白结合剂具有多至2个氨基酸取代,并且更优选地多至1个氨基酸取代。

[0186] 优选地,蛋白结合剂的至少一个CDR与相应的SEQ ID NO具有≥67%;≥68%;≥69%;≥70%;≥71%;≥72%;≥73%;≥74%;≥75%;≥76%;≥77%;≥78%;≥79%;≥80%;≥81%;≥82%;≥83%;≥84%;≥85%;≥86%;≥87%;≥88%;≥89%;≥90%;≥91%;≥92%;≥93%;≥94%;≥95%;≥96%;≥97%;≥98%;≥99%,并且最优选地100%的序列相同性。

[0187] 如本文所用,“序列相同性百分比”通过在比较窗口上比较两个最佳比对的生物序列(氨基酸序列或多核苷酸序列)来确定,其中与不包含添加或缺失的参考序列相比,比较

窗口中的对应序列的部分可包含添加或缺失(即空位),以使两个序列最佳比对。通过确定两个序列中出现相同核酸碱基或氨基酸残基的位置的数目以产生匹配位置的数目,将匹配位置的数目除以比较窗口中位置的总数目并将结果乘以100以产生序列相同性的百分比来计算百分比。

[0188] 在两个或更多个核酸或多肽序列的语境中,术语"相同"或"相同性"百分比是指两个或更多个序列或亚序列为相同的序列。当在比较窗口或指定区域上比较和比对以获得最大对应性时,如果两个序列具有指定百分比的相同的氨基酸残基或核苷酸(即,在指定区域上或者未指定时在参考序列的整个序列上至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列相同性),两个序列是"基本上相同的",如使用以下序列比较算法之一或者通过手动比对和视觉检查所测量的。本公开提供了与本文例示的多肽基本上相同的多肽。关于氨基酸序列,相同性或基本上的相同性可存在于长度为至少5、10、15或20个氨基酸,任选地长度为至少约25、30、35、40、50、75或100个氨基酸,任选地长度为至少约150、200或250个氨基酸的区域上,或参考序列的全长上。关于较短的氨基酸序列,例如20个或更少个氨基酸的氨基酸序列,根据本文所定义的保守取代,当一个或两个氨基酸残基被保守取代时,存在基本上的相同性。

[0189] 优选地,至少一个CDR经受CDR序列修饰,包括:

[0190] • 亲和力成熟

[0191] • 免疫原性降低

[0192] 给定抗体的亲和力在体外增加的过程中,亲和力成熟。与天然对应物一样,体外亲和力成熟基于突变和选择的原理。其已成功地用于优化抗体、抗体片段或其他肽分子如抗体模拟物。使用辐射、化学诱变剂或易错PCR引入CDR内的随机突变。此外,遗传多样性可以通过链改组而增加。使用展示方法如噬菌体展示进行两轮或三轮突变和选择通常导致亲和力在低纳摩尔范围内的抗体片段。对于原理,参见Eylenstein等人(2016)或US20050169925A1,其内容出于实现的目的以引用方式并入本文。

[0193] 工程化抗体含有鼠序列衍生的CDR区,其已经连同任何所需的框架回复突变一起移植到序列衍生的V区中。因此,当向患者施用人源化抗体时,CDR自身可引起免疫原性反应。降低由CDR引起的免疫原性的方法公开于Harding等人(2010)、或US2014227251A1,其内容出于实现的目的以引用方式并入本文。

[0194] 根据本发明的一个实施方案,蛋白结合剂是如下抗体:

[0195] a)以下SEQ ID NO对所示的重链/轻链可变结构域(HCVD/LCVD)对:

[0196] 2和7;12和17;22和27;32和37;42和47;52和57;62和67;72和77;82和87;112和117;152和157;162和167;和/或172和177;

[0197] b)a)的重链/轻链可变结构域(HCVD/LCVD)对,条件是

[0198] • HCVD与相应的SEQ ID NO具有≥80%的序列相同性,并且/或者

[0199] • LCVD与相应的SEQ ID NO具有≥80%的序列相同性,

[0200] c)a)或b)的重链/轻链可变结构域(VD)对,条件是HCVD或LCVD中的至少一者相对于相应的SEQ ID NO具有多至10个氨基酸取代,

[0201] 所述蛋白结合剂仍然能够以足够的结合亲和力结合至人iRhom2并抑制或降低TACE/ADAM17活性。

[0202] “可变结构域”当用于涉及抗体或其重链或轻链时，旨在意指赋予抗原结合到分子上且不是恒定区的抗体的部分。该术语旨在包括其功能片段，其保持整个可变区的所有结合功能中的一些。可变区结合片段包括例如功能片段如Fab、F(ab)$_2$、Fv、单链Fv(scfv)等。此类功能片段是本领域技术人员公知的。因此，这些术语在描述异聚可变区的功能片段中的使用旨在对应于本领域技术人员公知的定义。这些术语描述于例如Huston等人，(1993)或Plückthun和Skerra(1990)。

[0203] 优选地，HCVD和/或LCVD与相应的SEQ ID NO具有≥81％；≥82％；≥83％；≥84％；≥85％；≥86％；≥87％；≥88％；≥89％；≥90％；≥91％；≥92％；≥93％；≥94％；≥95％；≥96％；≥97％；≥98％；≥99％；或最优选地100％的序列相同性。

[0204] 根据本发明的一个实施方案，至少一个氨基酸取代是保守氨基酸取代。

[0205] 如本文所用，“保守氨基酸取代”对抗体功能的效应比非保守取代更小。尽管存在将氨基酸分类的许多方式，但通常基于其结构和其R基团的一般化学特征，将它们分成六个主要类别。

[0206] 在一些实施方案中，“保守氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基取代的取代。例如，本领域定义了具有类似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有以下的氨基酸：

[0207] • 碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)，

[0208] • 酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)，

[0209] • 不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)，

[0210] • 非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)，

[0211] • β支化侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和

[0212] • 芳族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0213] 其他保守氨基酸取代也可跨越氨基酸侧链家族发生，如当用天冬酰胺取代天冬氨酸以改变肽的电荷时。保守性改变还可包括化学上同源的非天然氨基酸的取代(即，合成非天然疏水性氨基酸取代亮氨酸，合成非天然芳族氨基酸取代色氨酸)。

[0214] 根据本发明的一个实施方案，蛋白结合剂具有以下中的至少一者：

[0215] • 与根据前述权利要求中任一项所述的蛋白结合剂相比，对人iRhom2≥50％的靶结合亲和力，并且/或者

[0216] • 根据前述权利要求中任一项所述的蛋白结合剂的对TACE/ADAM17活性≥50％的抑制或降低效应。

[0217] 如本文所用，术语“结合亲和力”旨在意指结合相互作用的强度，并因此包括实际结合亲和力以及表观结合亲和力。实际结合亲和力是缔合速率与解离速率的比率。因此，赋予或优化结合亲和力包括改变这些组分中的任一种或两种以实现期望水平的结合亲和力。表观亲和力可包括例如相互作用的亲合力(avidity)。例如，二价异聚可变区结合片段可由于其化合价而表现出改变或优化的结合亲和力。

[0218] 用于测量结合剂的亲和力的合适方法是通过表面等离子体共振(SPR)。该方法基于当表面等离子体波在金属/液体界面处被激发时发生的现象。光被引导到表面不与样品

接触的一侧，并从该侧反射，并且SPR在角度和波长的特定组合下引起反射光强度的降低。生物分子结合事件引起表面层折射率的变化，其被检测为SPR信号的变化。结合事件可以是受体-配体对之间的结合缔合或解离。可基本上瞬时地测量折射率的变化，并因此允许确定亲和常数的各个分量。更具体地，该方法允许精确测量缔合速率($k_{on}$)和解离速率($k_{off}$)。

[0219] $k_{on}$和$k_{off}$值的测量可为有利的，因为它们可识别治疗上更有效的改变的可变区或优化的可变区。例如，改变的可变区或其异聚结合片段可为更有效的，因为与表现出相似结合亲和力的可变区和异聚结合片段相比，其具有例如较高的$k_{on}$值。由于具有较高$k_{on}$值的分子能够以更快的速率特异性地结合和抑制其靶标，因此赋予了增加的功效。类似地，本发明的分子可更有效，因为与具有类似结合亲和力的分子相比，其表现出较低的$k_{off}$值。可以观察到具有较低$k_{off}$速率的分子所观察到的功效增加，因为一旦结合，分子从其靶标较慢地解离。尽管关于本发明的改变的可变区和优化的可变区(包括其异聚可变区结合片段)进行了描述，但上述用于测量缔合和解离速率的方法可应用于基本上任何蛋白结合剂或其片段，以鉴定用于治疗或诊断目的的更有效的结合剂。

[0220] 用于测量结合剂的亲和力的另一种合适的方法是通过表面经由FACS/卡特卡尔分析进行。相应的描述尤其参见实施例10。

[0221] 使用表面等离子体共振测量亲和力(包括缔合和解离速率)的方法是本领域公知的，并且可发现描述于例如Jonsson和Malmquist(1992)和Wu等人(1998)中。此外，本领域公知的用于测量结合相互作用的一种设备是BIAcore 2000仪器，其可通过Pharmacia Biosensor(Uppsala,Sweden)商购获得。

[0222] 优选地，所述靶结合亲和力为相比于参考结合剂的靶结合亲和力的≥51％、≥52％、≥53％、≥54％、≥55％、≥56％、≥57％、≥58％、≥59％、≥60％、≥61％、≥62％、≥63％、≥64％、≥65％、≥66％、≥67％、≥68％、≥69％、≥70％、≥71％、≥72％、≥73％、≥74％、≥75％、≥76％、≥77％、≥78％、≥79％、≥80％、≥81％、≥82％、≥83％、≥84％、≥85％、≥86％、≥87％、≥88％、≥89％、≥90％、≥91％、≥92％、≥93％、≥94％、≥95％、≥96％、≥97％、≥98％，并且最优选地≥99％。

[0223] 如本文所用，与基准结合剂相比，对TACE/ADAM17活性的抑制或降低效应的定量用合适的测定来确定，以确定TNFα脱落效应(如例如描述于例如图9和实施例14中)。

[0224] 根据本发明的另一方面，提供了一种蛋白结合剂，其与人iRhom2结合，并且与以下项竞争性结合人iRhom2：

[0225] a)根据以上描述的抗体，和/或

[0226] b)选自克隆#3、#5、#16、#22、#34、#42、#43、#44、#46、#49、#54、#56、或#57的抗体。

[0227] 根据本发明的另一方面，提供了一种蛋白结合剂，其结合与以下项基本上相同、或相同的人iRhom2上的区域：

[0228] a)根据以上描述的抗体，和/或

[0229] b)选自克隆#3、#5、#16、#22、#34、#42、#43、#44、#46、#49、#54、#56、或#57的抗体。

[0230] 克隆#3、#5、#16、#22、#34、#42、#43、#44、#46、#47、#48、#49、#50、#51、#52、#54、#56、或#57在本文的序列表中标识。

[0231] 关于这样的蛋白结合剂的形式或结构，应用与如上所示相同的优选实施方案。在一个实施方案中，所述蛋白结合剂是单克隆抗体、或其保留靶结合能力的靶结合片段或衍

生物、或抗体模拟物。

[0232] 如本文所用，术语“竞争结合”用于提及由如上序列所定义的抗体之一，这意味着实际蛋白结合剂呈现的活性为与所述序列定义的蛋白结合剂结合至相同的靶标、或靶表位或结构域或亚结构域，并且是后者的变体。结合的效率(例如，动力学或热力学)可等于或大于或小于后者的效率。例如，两种抗体与底物结合的平衡结合常数可以不同。

[0233] 此类结合竞争可以用竞争性结合测定适当地测量。这样的测定公开于Finco等人2011中，其内容出于实现的目的以引用方式并入本文，并且其用于解释专利权利要求的含义公开于Deng等人2018，其内容出于实现的目的以引用方式并入本文。

[0234] 为了测试该特征，可获得合适的表位作图技术，尤其包括：

[0235] • X射线共结晶学和低温电子显微术(cryo-EM)

[0236] • 基于阵列的寡肽扫描

[0237] • 定点诱变作图

[0238] • 高通量鸟枪诱变表位作图

[0239] • 氢-氘交换

[0240] • 交联耦合质谱法

[0241] 这些方法尤其公开和讨论于Banik等人(2010)和DeLisser(1999)，其内容出于实现的目的以引用方式并入本文。

[0242] 根据本发明的另一方面，提供了编码根据以上描述的结合剂的至少一条链的核酸。

[0243] 在一个实施方案中，提供了至少如下酸：分别编码结合剂的重链和轻链，在所述结合剂是具有至少一条轻链和一条重链的异聚结构的单克隆抗体的情况下。

[0244] 通常，由于遗传密码的简并性，存在具有编码这样链的能力的大量不同核酸。本领域技术人员完全能够确定给定的核酸是否满足上述标准。另一方面，本领域技术人员完全能够基于密码子使用表由给定的氨基酸序列逆向工程化合适的编码其的核酸。为此，可以使用软件工具，如由在线工具“序列处理在线工具包”提供的“逆翻译”(https://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html)。

[0245] 这样的核酸也可用于药物目的。在此类情况下，其为施用给患者的RNA衍生的分子，其中患者的蛋白质表达机构表达相应的结合剂。mRNA可例如以合适的脂质体递送，并且包含特异性序列或修饰的尿苷核苷以避免免疫应答和/或改善折叠和翻译效率，有时在5’-和/或3’末端包含帽修饰以将它们靶向特定的细胞类型。

[0246] 这样的核酸可用于转染表达宿主，然后表达实际的结合剂。在此类情况下，分子可为任选地整合进合适的载体中的cDNA。

[0247] 根据本发明的另一方面，提供了根据以上描述的蛋白结合剂或核酸在(制备)用于治疗

[0248] • 被诊断出炎性病况，

[0249] • 患有炎性病况，或者

[0250] • 处于发展炎性病况的风险

[0251] 的人或动物对象中，或者用于预防这样的病况的(药物中的)用途。

[0252] 为了诊断炎性病况，患者可进行身体检查，并且还可被询问医疗病史。执业者可查

找关节炎症、关节僵硬和关节功能丧失。此外，与健康对照相比，执业者可要求X射线和/或血液测试来检测炎性标志物，如例如血清hs-CRP、IL-6、TNF-α和IL-10、红细胞沉降率、血浆粘度、纤维蛋白原和/或铁蛋白。

[0253] 根据本发明的另一方面，提供了一种药物组合物，其包含根据以上描述的蛋白结合剂或核酸，以及任选地一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0254] 根据本发明的另一方面，提供了一种组合，其包含(i)根据以上描述的蛋白结合剂或核酸或药物组合物，以及(ii)一种或多种治疗活性化合物。

[0255] 根据本发明的另一方面，提供了一种用于治疗或预防炎性病况的方法，所述方法包括以治疗上足够的剂量向人或动物对象施用提供的(i)根据以上描述的蛋白结合剂，(ii)根据以上描述的核酸，(iii)根据以上描述的药物组合物，或者(iv)根据以上描述的组合。

[0256] 根据本发明的一个实施方案，炎性病况是类风湿性关节炎(RA)。

[0257] 根据本发明的另一方面，提供了一种治疗试剂盒，其包括：

[0258] a)根据以上描述的蛋白结合剂、根据以上描述的核酸、根据以上描述的药物组合物、或根据以上描述的组合，

[0259] b)用于施用组合物、组合物或组合的设备，以及

[0260] c)使用说明书。

[0261] 本发明的另外实施方案涉及抗体47、48、50、51和52，发明人已显示出其具有如以下表中所显示的特定效应(+意指抑制效应，-意指无抑制效应)

[0262]

| 抗体 | CDR 序列 (HCDR1-3 /LCDR1-3) | 可变结构域 序列(HC/LC) | 对以下项释放的抑制效应 | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | LPS 诱导的 TNFα | PMA 诱导的 IL-6R | PMA 诱导的 HB-EGF |
| 47 | 93-95/98-100 | 92/97 | - | + | + |
| 48 | 103-105/108-110 | 102/107 | - | + | + |
| 50 | 123-125/128-130 | 122/127 | - | + | + |
| 51 | 133-135/138-140 | 132/137 | - | + | + |
| 52 | 143-145/148-150 | 142/147 | - | - | - |

[0263] 上表比较了本发明的抗体47、48、50、51和52对THP-1细胞中LPS诱导的TNFα脱落与PMA诱导的IL-6R和HB-EGF脱落的特性。与其中本发明的抗体47、48、50、51和52不具有抑制效应的THP-1细胞中LPS诱导的TNFα释放形成对照，观察到本发明的抗体47、48、50和51对THP-1细胞中PMA诱导的IL-6R和HB-EGF释放的抑制效应，但本发明的抗体52却非如此。

## 实施例

[0264] 虽然已经在附图和前述描述中详细说明和描述了本发明，但是此类说明和描述被认为是说明性或示例性的而非限制性的；本发明不限于所公开的实施方案。通过研究附图、公开内容和所附权利要求，本领域技术人员在实践所要求保护的本发明时可以理解和实现所公开实施方案的其他变型。在权利要求中，词语“包括”不排除其他元件或步骤，并且不定冠词“一”或“一个”不排除多个。在相互不同的从属权利要求中叙述某些措施的纯粹事实并

不指示不能有利地使用这些措施的组合。权利要求中的任何附图标记不应解释为限制范围。

[0265] 本文所公开的所有氨基酸序列从N末端到C末端显示;本文所公开的所有核酸序列显示为5'->3'。

[0266] 实施例1:用于免疫的表达载体的生成

[0267] 总共生成8种不同的表达载体用于免疫,它们中的3种编码不同的人iRhom2,其余五种编码不同的小鼠iRhom2变体。

[0268] 基因合成在Thermo Fisher Scientific GeneArt GmbH,Regensburg,德国进行。简而言之,使用GeneOptimizer软件来优化提交的DNA序列,以获得最大的蛋白质产量。使用合成寡核苷酸合成基因之后,通过基于引物延伸的PCR组装,将构建体克隆到标准克隆载体中,随后通过测序进行验证。将片段亚克隆到pcDNA 3.1(+)表达载体(Thermo Fisher Scientific,USA)中,从转化的细菌中纯化质粒DNA,并通过UV光谱法测定纯度和浓度。通过限制性酶切作图和测序对最终构建体加以验证。

[0269] 图1示出了用于免疫的表达载体,指示了它们的名称、描述、关于人iRhom2的NCBI参考序列NP_078875.4以及关于小鼠iRhom2的NCBI参考序列NP_766160.2的氨基酸和它们相应的序列标识号(SEQ ID NO)。

[0270] 实施例2:用于免疫的iRhom2敲除小鼠的繁殖

[0271] 由于人对小鼠iRhom2蛋白的高序列同源性(参见对于人iRhom2的NCBI参考序列NP_078875.4,对于小鼠iRhom2的NCBI参考序列NP_766160.2,人对小鼠iRhom2的胞外环1、2、3和C末端尾的氨基酸序列相同性分别计算为89.96%、100.00%、100.00%和96.97%),繁殖iRhom2敲除小鼠而非野生型小鼠进行免疫。

[0272] 简而言之,在University of California,Davis的KOMP小鼠生物学项目(KOMP Mouse Biology Program)订购Rhbdf2tm1b(KOMP)Wtsi小鼠品系(Rhbdf2是iRhom2的别名)以进行复苏,并导致可得到三只杂合雄性小鼠。将这三只处于C57BL/6N背景(C57BL/6N-Rhbdf2tm1b(KOMP)Wtsi)的动物与129Sv/J遗传背景的野生型雌性小鼠交配以产生杂合后代。将这些杂合小鼠彼此交配以生成具有Rhbdf2基因纯合敲除的雄性和雌性小鼠。进一步扩增所得纯合Rhbdf2敲除小鼠群体用于免疫。

[0273] 实施例3:小鼠的免疫和血清滴度分析

[0274] 分别用编码hi2-FL-WT、hi2-FL-I186T、hi2-Δ1-242、mi2-FL-WT&mi2-FL-I156T、mi2-Δ1-212、mi2-Δ1-268、hi2-FL-WT&mi2-FL-WT、hi2-Δ1-242&mi2-Δ1-212、hi2-Δ1-242&mi2-Δ1-268、hi2-Δ1-242&mi2-Δ1-212&mi2-Δ1-268的pBT2-8HAX3-载体遗传免疫十组8至12周龄雄性和雌性iRhom2敲除小鼠(如实施例2所述)。使用Helios™基因枪系统(Biorad,USA),通过在动物的剃毛皮肤上不重叠注射来施用DNA包被的(约5μg DNA)纳米金粒子。

[0275] 每组四至十只小鼠每7天注射四至九次。在最后一次注射后十天,收集血液(血清)并测试抗体滴度。

[0276] 应用FACS方法通过血清抗体滴度分析进行免疫应答的评估。简而言之,使用山羊F(ab')2抗小鼠IgG(H+L)-R-藻红蛋白(RPE)缀合物(Dianova,德国)作为第二抗体,在稳定表达人iRhom2的鼠L929细胞上测试用含有3%FBS的PBS以1:50稀释的血清。作为阴性对照,使

用亲本L929细胞。在Accuri C6 Plus(BD Biosciences,USA)流式细胞仪上进行测试。在免疫方案第0天获取的免疫前血清用作阴性对照。

[0277] 在最终加强免疫后四天,收集所选动物的淋巴结,分离淋巴细胞并直接使用或冷冻保存以供后续融合。

[0278] 实施例4:淋巴细胞的回收和用于生成杂交瘤的融合

[0279] 将得自六至十五只所选动物的新鲜或冷冻保存的淋巴结来源的淋巴细胞与Ag8小鼠骨髓瘤细胞融合以生成杂交瘤细胞。融合和后续细胞生长在液体或半固体培养基中进行。对于在半固体培养基板上的融合和生长,在细胞铺板之前进行IgM耗竭和B细胞富集。对于用CellCelector装置(ALS,德国)自动挑选的最高价值克隆,应用集成机器人先进成像和数据跟踪以进一步增殖和测试。对于使用液体培养基的融合和生长,不进行IgM耗竭和B细胞富集。

[0280] 将融合细胞铺板并在次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶(HAT)培养基存在下在96孔板上生长。

[0281] 实施例5:用于候选物选择的杂交瘤上清液的筛选

[0282] 在本实施例中,描述了筛选杂交瘤上清液的方法。进行功能和结合筛选两者。因此,在以下章节中,将描述用于测定杂交瘤上清液对THP-1细胞中TNFα脱落的效应的筛选、表达不同形式的人iRhom2的鼠L929细胞的生成,以及对这些工程化测试系统的结合筛选。

[0283] 用于候选物选择的杂交瘤上清液的功能筛选

[0284] 培养14天后,收集杂交瘤细胞的上清液,并针对iRhom2活性中和抗体进行基于ELISA的功能筛选。由于iRhom2在TACE介导的肿瘤坏死因子α(TNFα)从巨噬细胞释放中的关键作用已得到非常充分的确认(McIlwain等人,2012,Adrain等人,2012,Siggs等人,2012),在存在和不存在所有DNA免疫衍生的杂交瘤上清液的情况下,使用人TNF-αDuoSet ELISA(R&D Systems,USA)来比较脂多糖(LPS)诱导的内源性TNFα从人THP-1单核细胞的释放。

[0285] 简而言之,在第1天,将Nunc black MaxiSorp®96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)用每孔100μl的小鼠抗人TNFα捕获抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以4μg/ml TBS在4℃下包被过夜。在第2天,除去捕获抗体溶液,并将MaxiSorp®板用每孔300μl的TBS、1%BSA在室温下封闭3小时。将在80μl正常生长培养基中的20,000个THP-1(美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection),USA)细胞接种到Greiner CELLSTAR V形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)的各孔中,并与20μl杂交瘤上清液在37℃、5%$CO_2$下一起预孵育30分钟。在刺激对照的情况下,添加20μl标准生长培养基代替杂交瘤上清液。随后,在37℃、5%$CO_2$下,用每孔20μl的LPS(Sigma-Aldrich,USA)以300ng/ml生长培养基(最终浓度为50ng/ml)刺激细胞(未刺激对照的那些除外)2小时。然后,将96孔板离心以沉淀细胞。平行地,从MaxiSorp®板除去封闭缓冲液,并将板在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次。为了避免干燥,将30μl的TBS立即添加到MaxiSorp®板的各孔中,随后每样品转移70μl的无细胞上清液。另外,将用TBS以限定浓度稀释的100μl重组人TNFα蛋白(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)添加到板中作为标准参考。然后,将每孔100μl的生物素化山羊抗人TNFα检测抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以50ng/ml TBS添加,并避直射光,将板在室温下孵育2小时。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德

国)洗涤4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后,将100μl的用TBS以1:10,000稀释的链霉亲和素-AP(R&D Systems,USA)添加至各孔中,并再次避直射光,将板在室温下孵育30分钟。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤另一轮4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后,添加100μl的AttoPhos底物溶液(Promega,USA)以在室温下暗处孵育1小时。使用infinite M1000 PRO(Tecan Group,瑞士)酶标仪,在435nm的激发波长和555nm的发射波长下收集各孔的荧光。

[0286] 图2显示一个96孔板的这些实验的代表性结果,表明DNA免疫衍生的杂交瘤上清液对LPS诱导的TNFα从THP-1细胞中释放的效应。从板号14第C行第2列(14C2)的杂交瘤细胞群收集的上清液(即作为所选候选物的代表性实例的后期抗体3的起源)有效地干扰THP-1细胞中LPS诱导的TNFα脱落。

[0287] 用于细胞结合FACS分析的细胞群的生成

[0288] 为了生成适于抗体的可比较且可靠的结合分析的细胞系统,将L929(NCTC克隆929)小鼠成纤维细胞(ATCC,USA)遗传修饰以敲除小鼠iRhom2基因。然后,用不同的人iRhom2构建体感染所得的L929小鼠iRhom2敲除细胞系,以获得稳定表达不同人iRhom2蛋白的细胞系衍生物,其允许在相同的遗传背景下对不同iRhom2变体的结合分析。

[0289] 简而言之,将mRhbdf2.3 IVT gRNA(AAGCATGCTATCCTGCTCGC)(SEQ ID NO 197)在Thermo Fisher Scientific GeneArt GmbH,Regensburg,德国合成。在24孔板中接种后一天,使用Lipofectamine CRISPRMAX转染试剂(Thermo Fisher Scientific,USA),根据GeneArt CRISPR Nuclease mRNA用户指南(Thermo Fisher Scientific,USA),用gRNA/GeneArt Platinium Cas9核酸酶(Thermo Fisher Scientific,USA)混合物转染L929亲代细胞。转染后3天,使细胞裂解,并提取DNA,以使用mRhbdf2.3fwd(TCAATGAGCTCTTTATGGGGCA)(SEQ ID NO 195)/mRhbdf2.3rev(AAGGTCTCCATCCCCTCAGGTC)(SEQ ID NO 196)5引物对(Thermo Fisher Scientific,USA)来扩增特定PCR产物。为了选择阳性孔,将GeneArt基因组切割检测试剂盒(Thermo Fisher Scientific,USA)应用于在Invitrogen 2%E-Gel Size Select琼脂糖凝胶(Thermo Fisher Scientific,USA)中具有适当尺寸的显著单一条带的那些样品。切割测定PCR产物也在Invitrogen 2%E-Gel Size Select琼脂糖凝胶上分析。使用用于鉴定阳性亚克隆的切割检测试剂盒,采用有限稀释技术对鉴定的多克隆L929群体进行两轮后续亚克隆。由此,在第一轮中鉴定的最具前景的阳性亚克隆(命名为1029)在第二轮中进一步亚克隆,以获得最终克隆(命名为2041)。源于该亚克隆的单克隆细胞群命名为L929-2041,并用于后续用人iRhom2构建体hiR2-Δ242-T7和hiR2-FL-WT-T7感染(根据实施例13所述的程序),以分别生成两种细胞系L929-2041-hiR2-Δ242-T7和L929-2041-hiR2-FL-WT-T7。

[0290] 用于验证测试系统的FACS分析

[0291] 在选择后,进行荧光激活细胞分选(FACS)分析,以验证由遗传工程化鼠L929细胞群异位表达的人iRhom2变体的质膜定位。

[0292] 简而言之,将经pMSCV空载体稳定感染的鼠L929-2041-EV对照细胞、表达缺失氨基酸1-242且C末端标记3个连续拷贝的T7表位(MASMTGGQQMG)的人iRhom2变体的L929-2041-hiR2-Δ242-T7细胞,以及表达C末端也标记3个连续拷贝的T7表位的人iRhom2全长野生型的L929-2041-hiR2-FL-T7细胞用含10mM EDTA的PBS收获,洗涤,并重悬于FACS缓冲液(PBS,

3%FBS,0.05%叠氮化钠)中,并且以约3×10$^5$个细胞/孔接种到Nunc U形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)中。为了沉淀细胞并除去上清液,将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟。对于初级染色,使细胞重悬于每孔100μl的单独FACS缓冲液(对照)或者3μg/ml的FACS缓冲液中的小鼠单克隆抗T7 IgG(Merck Millipore,USA)中,并在冰上孵育1小时。然后,将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟,并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤两次。对于二次染色,将细胞离心并重悬于每孔100μl的用FACS缓冲液以1:100稀释的PE缀合的山羊抗小鼠IgG F(ab')2检测片段(Dianova,德国)中。避光,将细胞悬浮液在冰上孵育1小时。然后,将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟,并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤三次。最后,将细胞重悬于每孔150μl的FACS缓冲液中,并使用BD Accuri™ C6 Plus流式细胞仪(Becton Dickinson,德国)分析。

[0293] 图3显示本实验的代表性结果。与仅与抗小鼠IgG第二抗体一起孵育的对照样品(灰色)相比,与抗T7标签抗体(黑色)共孵育根本不导致L929-2041-EV对照细胞的背景染色(左侧)。相比之下,对L929-2041-hiR2-Δ242-T7(中间)和甚至更显著的L929-2041-hiR2-FL-T7(右侧)细胞上的抗T7标签抗体的结合分析揭示了相对荧光强度的较强增加,表明两种人iRhom2的T7标记变体——Δ242缺失形式和全长野生型形式——均位于这些遗传工程化细胞群的表面上,并因此验证它们作为用于结合来自杂交瘤上清液的抗体的合适筛选系统。

[0294] 用于候选物选择的杂交瘤上清液的结合筛选

[0295] 接着,应用验证的L929细胞群,针对iRhom2结合抗体来系统地筛选杂交瘤上清液。

[0296] 简而言之,将L929-2041-EV对照细胞、L929-2041-hiR2-Δ242-T7细胞和L929-2041-hiR2-FL-T7细胞用含10mM EDTA的PBS收获,洗涤并重悬于FACS缓冲液(PBS,3%FBS,0.05%叠氮化钠)中,并以约3×10$^5$个细胞/孔接种到Nunc U形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)中。为了沉淀细胞并除去上清液,将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟。对于初级染色,使细胞重悬于每孔100μl的单独FACS缓冲液(对照)或者用FACS缓冲液1:50预稀释的杂交瘤上清液中,并在冰上孵育1小时。然后,将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟,并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤两次。对于二次染色,将细胞离心并重悬于每孔100μl的用FACS缓冲液以1:100稀释的PE缀合的山羊抗小鼠IgG F(ab')2检测片段(Dianova,德国)中。避光,将细胞悬浮液在冰上孵育1小时。然后,将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟,并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤三次。最后,将细胞重悬于每孔150μl的FACS缓冲液中,并使用BD Accuri™ C6 Plus流式细胞仪(Becton Dickinson,德国)分析。

[0297] 图4显示这些实验的代表性结果。将所施加的细胞群与作为所选候选物的代表性实例的杂交瘤细胞池14C2的上清液(导致本发明抗体3的原材料)(黑色)一起孵育,根本不导致L929-2041-EV对照细胞的背景染色(左侧),而在L929-2041-hiR2-Δ242-T7(中间)和L929-2041-hiR2-FL-WT-T7(左侧)细胞上检测到相对荧光强度的较强偏移(类似于或甚至强于用抗T7标签抗体所观察到的),清楚地表明来自杂交瘤上清液14C2的抗体识别两种形式的人iRhom2。

[0298] 实施例6:杂交瘤细胞群的亚克隆

[0299] 由于大部分杂交瘤细胞群似乎是寡克隆来源的,进行应用经典的液体稀释技术的亚克隆以分离单克隆杂交瘤细胞库。

[0300] 简而言之，对寡克隆杂交瘤群体的细胞进行计数，并计算稀释因子，以96孔板中每孔平均两个细胞结束。相应地稀释细胞，并通过基于显微镜的筛选来鉴定单一细胞群生长的孔。在这些单克隆杂交瘤群体扩增约3周后，收集上清液并如实施例5.1所述比较对LPS诱导的TNFα从THP-1细胞中释放的抑制效应。扩增并储存经证实显著干扰TNFα脱落的亚克隆。

[0301] 实施例7：来自单克隆杂交瘤的抗体的纯化

[0302] 在生成单克隆杂交瘤群体后，应用亲和层析从它们相应的杂交瘤上清液中纯化抗体。

[0303] 简而言之，将从单克隆杂交瘤细胞收集的上清液上样到平衡的蛋白G琼脂糖凝胶预填充重力流柱(Protein G GraviTrap™,GE Healthcare,UK)上用于抗体捕获。然后，用结合缓冲液洗涤柱一次，用洗脱缓冲液洗脱捕获的抗体(两种缓冲液均作为Ab Buffer试剂盒;GE Healthcare,UK的一部分提供)。接着，使用PD Miditrap G-25柱(GE Healthcare,UK)使洗脱液级分脱盐，并经由具有30kDa截断值的Amicon Ultra-4离心过滤装置(Sigma-Aldrich,US)浓缩纯化的样品。最后，应用NanoDrop 2000/c分光光度计(Thermo Fisher Scientific,USA)测定纯化蛋白质的浓度。

[0304] 实施例8：本发明的纯化抗体的同种型测定

[0305] 作为下一步，进行小鼠IgG/IgM ELISA以确定本发明的纯化抗体的同种型。简而言之，在第1天，将Nunc black MaxiSorp® 96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)用每孔100μl的山羊抗小鼠IgG+IgM(H+L)捕获抗体(Sigma-Aldrich,USA)以1μg/ml TBS在4℃下包被过夜。在第2天，除去捕获抗体溶液，在室温下用每孔300μl的Pierce无蛋白(TBS)封闭缓冲液(Thermo Fisher Scientific,USA)封闭MaxiSorp®板2小时。然后除去封闭缓冲液，并将板在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次。然后，将每孔100μl TBS作为空白和阴性对照、限定浓度的小鼠IgG(Thermo Fisher Scientific,USA)和小鼠IgM(Sigma-Aldrich,USA)抗体(均以1μg/ml TBS起始1:2滴定)作为标准参考、3μg/ml TBS的小鼠IgG(Thermo Fisher Scientific,USA)和小鼠IgM(Sigma-Aldrich,USA)抗体各自作为阳性和特异性对照，以及3μg/ml TBS的本发明的纯化抗体添加到孔中，并在室温下孵育2小时。随后，将板在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次。对于同种型检测，将各样品的一半避直射光，用每孔100μl的用TBS以1:5,000稀释的AP缀合的山羊抗小鼠IgM(Sigma-Aldrich,USA)或AP缀合的山羊抗小鼠IgG F(ab')2片段(Dianova,德国)检测抗体在室温下孵育1.5小时。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)进行另一轮4个洗涤步骤并在最后一次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后，添加100μl的AttoPhos底物溶液(Promega,USA)以在室温下暗处孵育10分钟。使用infinite M1000(Tecan Group,瑞士)酶标仪，在435nm的激发波长和555nm的发射波长下收集各孔的荧光。

[0306] 图5显示本实验的结果，清楚地表明本发明的抗体3、5、16、22、34、42、43、44、46、47、48、49、50、51、52、54、56和57是小鼠IgG同种型。

[0307] 实施例9：本发明的纯化抗体的CDR序列测定

[0308] 使本发明的所有18种抗体经受序列测定。简而言之，按照Ambion的TRIzol®试剂(Thermo Fisher Scientific,USA)的技术手册，从杂交瘤细胞中分离总RNA。然后，按照PrimeScriptTM 1st Strand cDNA合成试剂盒(Takara,日本)的技术手册，使用同种型特异

性反义引物或通用引物，将总RNA逆转录成cDNA。根据GenScript的cDNA末端快速扩增(RACE)的标准操作程序(SOP)，扩增重链和轻链的抗体片段。将扩增的抗体片段分别克隆到pCE2 TA/Blunt-zero标准克隆载体(Vazyme Biotech Co.,Ltd,中国)中。进行菌落PCR，以筛选具有适当尺寸的插入序列的克隆。在Applied Biosystems 3730DNA分析仪(Thermo Fisher Scientific,USA)上，对每种抗体的总共五个克隆进行测序。

[0309] 实施例10:本发明的纯化抗体的亲和力测定

[0310] 在本研究中，本发明的纯化抗体3、5、16、22、34、42、43、44、48和50的亲和力测量通过对THP-1细胞(即内源性表达iRhom2的人单核细胞系)的间接FACS卡特卡尔分析来进行。

[0311] 简而言之，将人THP-1细胞(美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)，USA)用含10mM EDTA的PBS收获，洗涤并重悬于FACS缓冲液(PBS，3％FBS，0.05％叠氮化钠)中，并以约$3\times10^5$个细胞/孔接种到Nunc U形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)中。为了沉淀细胞并除去上清液，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟。对于初级染色，使细胞重悬于每孔100μl的单独FACS缓冲液(对照)、或者本发明的纯化抗体3、5、16、22、34、42、43、44、48和50以40μg/ml起始在FACS缓冲液中的两倍系列稀释液(总共22个浓度)中，并在冰上孵育1小时。然后，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟，并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤两次。对于二次染色，将细胞离心并重悬于每孔100μl的用FACS缓冲液以1:100稀释的PE缀合的山羊抗小鼠IgG F(ab')2检测片段(Dianova,德国)中。避光，将细胞悬浮液在冰上孵育1小时。然后，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟，并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤三次。最后，将细胞重悬于每孔150μl的FACS缓冲液中，并使用BD AccuriTM C6 Plus流式细胞仪(Becton Dickinson,德国)分析。应用Prism8软件(GraphPad Sowtware,USA)，计算本发明的每种抗体的相应KD值。

[0312] 图6显示本研究的代表性结果，表明本发明的纯化抗体3、5、16、22、34、42、43、44、48和50与THP-1细胞结合的KD值在亚纳摩尔至低纳摩尔范围内。

[0313] 实施例11:iRhom1/2-/-双敲除小鼠胚胎成纤维细胞的生成

[0314] 出于各种目的，特别是以下一些实施例中所描述的结合研究，需要针对缺乏任何内源性iRhom1或iRhom2蛋白的背景而表达限定水平的所关注特定iRhom变体的细胞系统。为此，建立来自对小鼠iRhom1和小鼠iRhom2(iRhom1/2-/-)两者均呈阴性的纯合双敲除(DKO)小鼠的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)。本实施例描述了用于建立iRhom1/2-/-DKO MEF以及生成永生化iRhom1/2-/-DKO MEF细胞系的小鼠品系。

[0315] 用于建立iRhom1/2-/-DKO MEF的小鼠品系

[0316] 简而言之，C57BL/6N背景的Rhbdf2tm1b(KOMP)Wtsi小鼠品系(C57BL/6N-Rhbdf2tm1b(KOMP)Wtsi)获自University of California,Davis,USA的基因敲除小鼠项目(Knockout Mouse Project,KOMP)储存库(Rhbdf2是iRhom2的别名)。将杂合雄性Rhbdf2tm1b小鼠与129Sv/J遗传背景的野生型雌性小鼠交配，以产生混合遗传背景的杂合后代(129Sv/J-C57BL/6N)。将这些杂合小鼠彼此交配以生成Rhbdf2基因缺失的纯合雄性和雌性后代(Rhbdf2-/-小鼠，129Sv/J-C57BL/6N)。通过Rhbdf-/-雄性和雌性小鼠的繁殖来进一步扩增所得的纯合Rhbdf2敲除小鼠群体，以生成足够数量的小鼠。纯合Rhbdf2-/-小鼠有活力且可育，没有明显的自发病理表型。

[0317] Rhbdf1敲除小鼠获自国际敲除小鼠协会(International Knockout Mouse

Consortium,IKMC)的欧洲条件性小鼠诱变计划(European Conditional Mouse Mutagenesis Program,EUCOMM)。这些动物的生成描述于Li等人,PNAS,2015,doi:10.1073/pnas.1505649112。纯合Rhbdf1-/-小鼠有活力且可育,没有明显的自发病理表型。

[0318] 为了生成Rhbdf1和Rhbdf2的DKO小鼠(Rhbdf1/2-/-小鼠),将Rhbdf1-/-小鼠与Rhbdf2-/-小鼠交配以生成Rhbdf1+/-Rhbdf2+/-双杂合小鼠。将这些与Rhbdf2-/-小鼠交配,以产生Rhbdf1+/-Rhbdf2-/-动物,将它们彼此交配以按预期孟德尔比率(所有胚胎的1/4)生成缺乏两种Rhbdf基因的E14.5胚胎(Rhbdf1/2-/-DKO胚胎),以用于产生如下所述的E13.5 Rhbdf1/2-/-DKO MEF。

[0319] 永生化iRhom1/2-/-DKO MEF细胞系的生成

[0320] 简而言之,在E13.5处死妊娠的Rhbdf1+/-Rhbdf2-/-雌性。将子宫角取出到具有冰冷PBS的皿中。使用细尖镊子,从母体组织释放胚胎,并从胎盘取出每个胚胎。然后,用锋利的解剖刀将每个胚胎斩首,除去所有内部器官如肝、心、肺和肠。取出0.5mm尾部区段并转移到1.5ml Eppendorf管中用于基因组DNA分离和后续PCR基因分型,以确认胚胎的适当基因型。然后,将剩余的胚胎组织用PBS洗涤一次,并转移到含有2mL的0.25%胰蛋白酶/EDTA的组织培养皿中。用两个无菌解剖刀将组织充分切碎,并将胰蛋白酶/细胞混合物在37℃下孵育15分钟。通过添加含FCS生长培养基使胰蛋白酶消化停止。为了生成单细胞悬浮液,将混合物上下吸移,首先用10mL血清吸移管进行五次,然后用5mL血清吸移管进行五次,最终用火焰抛光巴斯德吸移管进行数次,以进一步解离任何剩余的细胞簇。随后,将获自一个胚胎的细胞铺板到两个10cm组织培养板上。次日,将培养基用新鲜培养基替换,允许细胞生长直到它们达到90%汇合度。最终,使细胞扩增并储存以备将来使用。

[0321] 对于原代hbdf1/2-/-DKO MEF的永生化,使用pMSCV表达系统(Clontech,USA),用逆转录病毒系统转导细胞。简而言之,如下生成pMSCV-Zeo-SV40:从质粒pMSCV-puro(Clontech,USA)除去编码嘌呤霉素抗性的序列,并用来自pcDNA3.1(+)Zeo载体(Thermo Fisher Scientific,USA)的赋予Zeocin抗性的序列替代。将逆转录病毒包装细胞系GP2-293(Clontech,USA)与包膜载体pVSV-G(Clontech,USA)和pMSCV-Zeo-SV40质粒组合使用,以产生编码SV40大T抗原的逆转录病毒。将病毒过滤并添加到以50%汇合度铺板的原代Rhbdf1/2-/-DKO MEF中保持24小时。然后,允许转导的Rhbdf1/2-/-DKO MEF在无选择压力的生长培养基中生长24小时,然后转移到含有100μg/ml Zeocin的生长培养基中。然后,使细胞在汇合时传代,并在十代后储存以备将来使用。

[0322] 实施例12:本发明的纯化的抗体的小鼠交叉反应性的评价

[0323] 接着,使永生化iRhom1/2-/-DKO MEF重建成具有标记形式的人iRhom2,从而确认杂交瘤上清液的本发明的相应纯化抗体的靶识别(如实施例5所述),并由此验证重构的iRhom1/2-/-DKO MEF作为合适的测试系统。另外,生成稳定表达标记形式的小鼠iRhom2的iRhom1/2-/-DKO MEF,从而测定本发明的纯化的抗体3、5、16、22、34、42、43、44、48和50与iRhom2的小鼠直向同源物的交叉反应性。

[0324] 稳定表达T7标记的人或小鼠iRhom2的iRhom1/2-/-DKO MEF的生成

[0325] 简而言之,在第1天,将Phoenix-ECO细胞(美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection),USA)以$8\times10^5$个细胞/孔接种到6孔组织培养板(Greiner,德国)的标准生长培养基中,并且在37℃、5%$CO_2$下保持过夜。在第2天,将培养基用新鲜培养

基替换，该新鲜培养基补充有最终浓度为25μM的氯喹(Sigma-Aldrich,USA)。应用磷酸钙法，将细胞用2μg/ml的pMSCV(Clontech,USA)空载体、编码C末端标记3个连续拷贝的T7表位(MASMTGGQQMG)的人iRhom2全长野生型的pMSCV-hiR2-FL-WT-T7、或编码C末端标记3个连续拷贝的T7表位的小鼠iRhom2全长野生型的pMSCV-miR2-FL-WT-T7转染，并且保持于37℃、5％$CO_2$。在7小时后，通过用缺乏氯喹的标准生长培养基替换细胞上清液来停止转染，并将细胞在37℃、5％$CO_2$下孵育过夜以允许病毒产生。平行地，将作为用于逆转录病毒感染的靶细胞的永生化iRhom1/2-/-DKO MEF以$1\times10^5$个细胞/孔接种到6孔组织培养板(Greiner,德国)的标准生长培养基中，并且也在37℃、5％$CO_2$下保持过夜。在第3天，收集释放pMSCV、pMSCV-hiR2-FL-WT-T7或pMSCV-miR2-FL-WT-T7同向性病毒的Phoenix-ECO细胞的上清液，用0.45μm CA过滤器过滤，并且补充4μg/ml聚凝胺(Sigma-Aldrich,USA)。在从永生化iRhom1/2-/-DKO MEF除去培养基后，将含有病毒的上清液添加到靶细胞中，在37℃、5％$CO_2$下保持4小时用于第一感染。同时，将Phoenix-ECO细胞与新鲜培养基一起再孵育，再过4小时后，过滤，并且同样在4μg/ml聚凝胺的存在下用于相应靶细胞群的第二感染。同样，进行第三感染循环但过夜。在第4天，用新鲜的标准生长培养基替换含有病毒的细胞上清液。从第5天起，使细胞在2mg/ml遗传霉素(G418,Thermo Fisher Scientific,USA)的存在下生长，以选择pMSCV空载体稳定感染的永生化MEF-DKO-EV对照细胞、稳定表达C末端标记3个连续拷贝的T7表位的人iRhom2全长野生型的MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7细胞，以及稳定表达C末端标记3个连续拷贝的T7表位的小鼠iRhom2全长野生型的MEF-DKO-miR2-FL-WT-T7细胞。在增殖后，将细胞储存以备将来使用。

[0326] 用于测试系统验证和抗体表征的FACS分析

[0327] 简而言之，将永生化MEF-DKO-EV对照细胞、MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7细胞和MEF-DKO-miR2-FL-WT-T7细胞用含10mM EDTA的PBS收获，洗涤并重悬于FACS缓冲液(PBS,3％FBS,0.05％叠氮化钠)中，并且以约$3\times10^5$个细胞/孔接种到Nunc U形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)中。为了沉淀细胞并除去上清液，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟。对于初级染色，使细胞重悬于每孔100μl的单独FACS缓冲液(对照)、3μg/ml的FACS缓冲液中的小鼠单克隆抗T7 IgG(Merck Millipore,USA)、或同样3μg/ml的FACS缓冲液中的本发明纯化抗体3、5、16、22、34、42、43、44、48和50中，并在冰上孵育1小时。然后，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟，并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤两次。对于二次染色，将细胞离心并重悬于每孔100μl的用FACS缓冲液以1:100稀释的PE缀合的山羊抗小鼠IgG F(ab')2检测片段(Dianova,德国)中。避光，将细胞悬浮液在冰上孵育1小时。然后，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟，并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤三次。最后，将细胞重悬于每孔150μl的FACS缓冲液中，并使用BD AccuriTM C6 Plus流式细胞仪(Becton Dickinson,德国)分析。

[0328] 图7a&7b显示本实验的代表性结果。与仅与抗小鼠IgG第二抗体一起孵育的对照样品(7a&7b,灰色)相比，与抗T7标签抗体(图7a,黑色)共孵育导致MEF-DKO-EV对照细胞的极少背景染色(图7a,左侧)。相比之下，抗T7标签抗体对MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7(图7a,中间)和MEF-DKO-miR2-FL-WT-T7(图7a,右侧)细胞两者的结合分析揭示了相对荧光强度的较强增加，表明异位表达的人和小鼠iRhom2变体均位于这些遗传工程化细胞群的表面上，并因此验证它们作为表征本发明抗体的合适测试系统。将这些细胞群与作为本发明的纯化抗体

的代表性实例的纯化的抗体3(图7b,黑色)共孵育根本不导致MEF-DKO-EV对照细胞的背景染色(图7b,左侧),而在MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7细胞上的相对荧光强度的较强偏移(类似于用抗T7标签抗体所观察到的)表明本发明的纯化的抗体3与人iRhom2变体的较强结合(图7b,中间),由此确认实施例5中描述的对应杂交瘤池上清液的结果。相比之下,未检测到本发明的纯化的抗体3与MEF-DKO-miR2-FL-WT-T7细胞的显著结合(图7b,右侧),这提供了用抗T7标签抗体(图7a,右侧)验证的细胞表面上存在的小鼠iRhom2变体不被本发明的纯化的抗体3识别的证据。用本发明的纯化抗体5、16、22、34、42、43、44、48和50获得类似的结果,表明本发明的这些纯化抗体没有一种与小鼠iRhom2交叉反应。

[0329] 实施例13:本发明的纯化的抗体的结合特异性的评估

[0330] 由于人iRhom2蛋白对其密切相关的家族成员人iRhom1的序列同源性(参见对于人iRhom2的NCBI参考序列NP_078875.4.,以及对于人iRhom1的NCBI参考序列NP_071895.3,人iRhom2对人iRhom1的胞外环1、2、3和C末端尾部的氨基酸序列相同性分别计算为67.4%、100.00%、80.00%和63.64%),本发明的纯化的抗体3、5、16、22、34、42、43、44、48和50针对人iRhom2与人iRhom1的结合特异性作为下一步骤进行评估。为此,生成稳定表达标记形式的人iRhom1的iRhom1/2-/-DKO MEF。

[0331] 稳定表达T7标记的人iRhom1的iRhom1/2-/-DKO MEF的生成

[0332] 简而言之,在第1天,将Phoenix-ECO细胞(美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection),USA)以$8\times10^5$个细胞/孔接种到6孔组织培养板(Greiner,德国)的标准生长培养基中,并且在37℃、5%$CO_2$下保持过夜。在第2天,将培养基用新鲜培养基替换,该新鲜培养基补充有最终浓度为25μM的氯喹(Sigma-Aldrich,USA)。应用磷酸钙法,将细胞用2μg/ml的编码C末端标记3个连续拷贝的T7表位的人iRhom1全长野生型的pMSCV-hiR1-FL-WT-T7(SEQ ID NO 189)转染,并且保持于37℃、5%$CO_2$。在7小时后,通过用缺乏氯喹的标准生长培养基替换细胞上清液来停止转染,并将细胞在37℃、5%$CO_2$下孵育过夜以允许病毒产生。平行地,将作为用于逆转录病毒感染的靶细胞的永生化iRhom1/2-/-DKO MEF以$1\times10^5$个细胞/孔接种到6孔组织培养板(Greiner,德国)的标准生长培养基中,并且也在37℃、5%$CO_2$下保持过夜。在第3天,收集释放pMSCV-hiR1-FL-WT-T7同向性病毒的Phoenix-ECO细胞的上清液,用0.45μm CA过滤器过滤,并且补充4μg/ml聚凝胺(Sigma-Aldrich,USA)。在从永生化iRhom1/2-/-DKO MEF除去培养基后,将这些上清液添加到靶细胞中,在37℃、5%$CO_2$下保持4小时用于第一感染。同时,将Phoenix-ECO细胞与新鲜培养基一起再孵育,再过4小时后,过滤,并且同样在4μg/ml聚凝胺的存在下用于相应靶细胞群的第二感染。同样,进行第三感染循环但过夜。在第4天,用新鲜的标准生长培养基替换含有病毒的细胞上清液。从第5天起,使细胞在2mg/ml遗传霉素(G418,Thermo Fisher Scientific,USA)的存在下生长,以选择稳定表达C末端标记3个连续拷贝的T7表位的人iRhom1全长野生型的永生化MEF-DKO-hiR1-FL-WT-T7细胞。在增殖后,将细胞储存以备将来使用。

[0333] 用于抗体表征的FACS分析

[0334] 简而言之,除永生化MEF-DKO-EV对照细胞和MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7细胞(如已经在实施例12中描述)之外,将MEF-DKO-miR2-FL-WT-T7细胞用含10mM EDTA的PBS收获,洗涤并重悬于FACS缓冲液(PBS,3%FBS,0.05%叠氮化钠)中,并且以约$3\times10^5$个细胞/孔接种到

Nunc U形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)中。为了沉淀细胞并除去上清液,将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟。对于初级染色,使细胞重悬于每孔100μl的单独FACS缓冲液(对照)、3μg/ml的FACS缓冲液中的小鼠单克隆抗T7 IgG(Merck Millipore,USA)、或同样3μg/ml的FACS缓冲液中的本发明纯化抗体3、5、16、22、34、42、43、44、48和50中,并在冰上孵育1小时。然后,将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟,并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤两次。对于二次染色,将细胞离心并重悬于每孔100μl的用FACS缓冲液以1:100稀释的PE缀合的山羊抗小鼠IgG F(ab')2检测片段(Dianova,德国)中。避光,将细胞悬浮液在冰上孵育1小时。然后,将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟,并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤三次。最后,将细胞重悬于每孔150μl的FACS缓冲液中,并使用BD AccuriTM C6 Plus流式细胞仪(Becton Dickinson,德国)分析。

[0335] 图8a&8b显示这些分析的代表性结果。当与MEF-DKO-EV对照细胞(图8a,左侧;等同于图7a,左侧)和MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7(图8a,中间;等同于图7a,中间)的染色比较时,抗T7标签抗体对MEF-DKO-hiR1-FL-WT-T7获得的相对荧光强度的较强增加(图8a,左侧)表明,类似于人iRhom2变体,人iRhom1变体也位于该遗传工程化细胞群的表面上,并因此验证它作为表征本发明抗体的合适的测试系统。就此而论,虽然作为本发明的纯化的抗体的代表性实例的抗体3与在MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7细胞上表达的人iRhom2变体的结合(图8b,中间;等同于图7b,中间)已经在实施例12中显示,但未检测到本发明的纯化的抗体3与MEF-DKO-hiR1-FL-WT-T7细胞的显著结合(图8b,右侧),这提供了用抗T7标签抗体(图8a,右侧)验证的细胞表面上存在的人iRhom1变体不被本发明的纯化的抗体3识别的证据。用本发明的纯化的抗体5、16、22、34、42、43、44、48和50获得类似的结果,表明本发明的这些纯化抗体没有一种识别人iRhom1。

[0336] 实施例14:本发明的抗体对体外LPS诱导的TNFα脱落的抑制效应的分析

[0337] 在以下研究中,进行基于ELISA的TNFα释放测定以验证本发明的纯化抗体对LPS诱导的内源性TNFα从人THP-1单核细胞释放的抑制效应。

[0338] 简而言之,在第1天,将Nunc black MaxiSorp® 96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)用每孔100μl的小鼠抗人TNFα捕获抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以4μg/ml TBS在4℃下包被过夜。在第2天,除去捕获抗体溶液,并将MaxiSorp®板用每孔300μl的TBS、1%BSA在室温下封闭3小时。同时,将80μl正常生长培养基中的20,000个THP-1(美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection),USA)细胞接种到Greiner CELLSTAR V形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)的各孔中,并且在37℃、5%$CO_2$下与每孔20μl的标准生长培养基一起预孵育30分钟,该标准生长培养基补充有50μM的巴马司他(BB94,Abcam,UK)作为阳性对照(在所得100μl样品体积中的最终浓度为10μM)、50μg/ml的小鼠IgG抗体(Thermo Fisher Scientific,USA)作为同种型对照(在所得100μl样品体积中的最终浓度为10μg/ml)或50μg/ml的本发明的纯化的抗体(在所得100μl样品体积中的最终浓度为10μg/ml)。在刺激对照的情况下,添加不含供试品的20μl标准生长培养基。随后,在37℃、5%$CO_2$下,用每孔20μl的LPS(Sigma-Aldrich,USA)以300ng/ml生长培养基(最终浓度为50ng/ml)刺激细胞(未刺激对照的那些除外)2小时。然后,将96孔板离心以沉淀细胞。平行地,从MaxiSorp®板除去封闭缓冲液,并将板在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次。为了避免干燥,将30μl的

TBS立即添加到MaxiSorp®板的各孔中,随后每样品转移70μl的无细胞上清液。另外,将用TBS以限定浓度稀释的100μl重组人TNFα蛋白(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)添加到板中作为标准参考。然后,将每孔100μl的以50ng/ml的TBS中的生物素化山羊抗人TNFα检测抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)添加,避直射光,将板在室温下孵育2小时。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后,将100μl的用TBS以1:10,000稀释的链霉亲和素-AP(R&D Systems,USA)添加至各孔中,再次避直射光,将板在室温下孵育30分钟。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤另一轮4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后,添加每孔100μl的AttoPhos底物溶液(Promega,USA)以在室温下暗处孵育1小时。使用infinite M1000(Tecan Group,瑞士)酶标仪,在435nm的激发波长和555nm的发射波长下收集各孔的荧光。

[0339] 图9显示本实验的代表性结果,以绝对数(图9A)和抑制百分比(图9B)表明供试品对LPS诱导的TNFα从THP-1细胞释放的效应。尽管作为金属蛋白酶的小分子抑制剂的巴马司他(Batimastat)(BB94)充当阳性对照并且导致对LPS诱导的TNFα释放的96.2%抑制,但IgG同种型对照的存在对TNFα脱落没有显著效应。相比之下,相等浓度的本发明的纯化的抗体3、5、16、22、34、42、43和44对LPS诱导的TNFα从THP-1细胞的释放分别抑制71.2%、69.0%、65.4%、78.8%、27.3%、76.7%、74.8%和32.2%。同样,相比之下,并因此与IgG同种型对照相当,本发明的纯化的抗体48和50的存在对TNFα脱落没有显著效应。

[0340] 实施例15:基于人iRhom2中物种相关的序列变异的本发明纯化的抗体的表位作图

[0341] 如今,可利用几种方法对抗体识别的表位作图,包括X射线共结晶学、基于阵列的寡肽扫描、氢-氘交换或交联耦合质谱法。遗传方法如定点诱变或高通量鸟枪诱变允许以单氨基酸分辨率进行表位作图。然而,在蛋白质随机位置处氨基酸取代或者被非相关氨基酸取代承担着引起蛋白构象变化和/或功能丧失的风险,并因此可能导致关于取代的氨基酸是否对抗体表位有贡献的误解。规避这些风险的一种巧妙且公认的方式是用结构相关的蛋白质(即直向同源物或密切相关的家族成员)的同源氨基酸替换给定蛋白质的单个氨基酸,条件是这些相关的蛋白质不被所关注的抗体识别。如前所述,这两种情况均适用于本发明的纯化抗人iRhom2抗体3、5、16、22、34、42、43、44、48和50,因为已表明它们既不与小鼠直向同源物交叉反应(实施例12)也不与密切相关的家族成员人iRhom1结合(实施例13)。

[0342] 因此,在鉴定对本发明抗体的结合作出贡献的单氨基酸的第一种方法中,设计了用于一组25种具有小鼠iRhom2相关的单氨基酸取代的人iRhom2变体的质粒。这些25种取代反映了胞外部分(即近膜结构域(JMD)和大胞外环1以及C末端)中的所有氨基酸,它们在人与小鼠iRhom2中是不同的。代替人iRhom2的氨基酸,引入小鼠iRhom2的对应位置处的氨基酸,导致变体hiR2-FL-R441K-T7、hiR2-FL-K443R-T7、hiR2-FL-V459I-T7、hiR2-FL-G481Q-T7、hiR2-FL-L488R-T7、hiR2-FL-L493I-T7、hiR2-FL-D496T-T7、hiR2-FL-H505R-T7、hiR2-FL-Q512L-T7、hiR2-FL-R513K-T7、hiR2-FL-D528N-T7、hiR2-FL-M534S-T7、hiR2-FL-G540S-T7、hiR2-FL-R543Q-T7、hiR2-FL-T544P-T7、hiR2-FL-G546A-T7、hiR2-FL-A547V-T7、hiR2-FL-R582Q-T7、hiR2-FL-F588L-T7、hiR2-FL-M591I-T7、hiR2-FL-E594K-T7、hiR2-FL-E626D-T7、hiR2-FL-L657I-T7和hiR2-FL-H835Y-T7。在小鼠iRhom2中不存在对应氨基酸的情况下,使人iRhom2的相应氨基酸缺失,导致变体hiR2-FL-P533--T7。

[0343] 本实施例描述了表达25种小鼠iRhom2相关的单氨基酸取代变体的iRhom1/2-/-DKO MEF群体的生成，以及它们在细胞表面定位和作为正确蛋白构象的指示的功能活性方面的表征。随后，描述了对于25种表达具有小鼠iRhom2相关的单氨基酸取代的人iRhom2变体(包括P533缺失的变体)的工程化MEF群体的整个组，本发明的纯化的抗体3、5、16、22、34、42、43、44、48和50的结合分析。

[0344] 稳定表达25种具有小鼠iRhom2相关的单氨基酸取代的T7标记的人iRhom2变体的iRhom1/2-/-DKO MEF的生成

[0345] 简而言之，在第1天，将Phoenix-ECO细胞(美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)，USA)以$8\times10^5$个细胞/孔接种到6孔组织培养板(Greiner，德国)的标准生长培养基中，并且在37℃、5％$CO_2$下保持过夜。在第2天，将培养基用新鲜培养基替换，该新鲜培养基补充有最终浓度为25μM的氯喹(Sigma-Aldrich，USA)。应用磷酸钙法，将细胞用2μg/ml的编码C末端标记3个连续拷贝的T7表位(MASMTGGQQMG)的人iRhom2全长单氨基酸取代的pMSCV-hiR2-FL-R441K-T7、pMSCV-hiR2-FL-K443R-T7、pMSCV-hiR2-FL-V459I-T7、pMSCV-hiR2-FL-G481Q-T7、pMSCV-hiR2-FL-L488R-T7、pMSCV-hiR2-FL-L493I-T7、pMSCV-hiR2-FL-D496T-T7、pMSCV-hiR2-FL-H505R-T7、pMSCV-hiR2-FL-Q512L-T7、pMSCV-hiR2-FL-R513K-T7、pMSCV-hiR2-FL-D528N-T7、pMSCV-hiR2-FL-P533--T7、pMSCV-hiR2-FL-M534S-T7、pMSCV-hiR2-FL-G540S-T7、pMSCV-hiR2-FL-R543Q-T7、pMSCV-hiR2-FL-T544P-T7、pMSCV-hiR2-FL-G546A-T7、pMSCV-hiR2-FL-A547V-T7、pMSCV-hiR2-FL-R582Q-T7、pMSCV-hiR2-FL-F588L-T7、pMSCV-hiR2-FL-M591I-T7、pMSCV-hiR2-FL-E594K-T7、pMSCV-hiR2-FL-E626D-T7、pMSCV-hiR2-FL-L657I-T7和pMSCV-hiR2-FL-H835Y-T7转染，并保持于37℃、5％$CO_2$。在7小时后，通过用缺乏氯喹的标准生长培养基替换细胞上清液来停止转染，并将细胞在37℃、5％$CO_2$下孵育过夜以允许病毒产生。平行地，将作为用于逆转录病毒感染的靶细胞的永生化iRhom1/2-/-DKO MEF以$1\times10^5$个细胞/孔接种到6孔组织培养板(Greiner，德国)的标准生长培养基中，并且也在37℃、5％$CO_2$下保持过夜。在第3天，收集释放pMSCV-hiR2-FL-R441K-T7、pMSCV-hiR2-FL-K443R-T7、pMSCV-hiR2-FL-V459I-T7、pMSCV-hiR2-FL-G481Q-T7、pMSCV-hiR2-FL-L488R-T7、pMSCV-hiR2-FL-L493I-T7、pMSCV-hiR2-FL-D496T-T7、pMSCV-hiR2-FL-H505R-T7、pMSCV-hiR2-FL-Q512L-T7、pMSCV-hiR2-FL-R513K-T7、pMSCV-hiR2-FL-D528N-T7、pMSCV-hiR2-FL-P533--T7、pMSCV-hiR2-FL-M534S-T7、pMSCV-hiR2-FL-G540S-T7、pMSCV-hiR2-FL-R543Q-T7、pMSCV-hiR2-FL-T544P-T7、pMSCV-hiR2-FL-G546A-T7、pMSCV-hiR2-FL-A547V-T7、pMSCV-hiR2-FL-R582Q-T7、pMSCV-hiR2-FL-F588L-T7、pMSCV-hiR2-FL-M591I-T7、pMSCV-hiR2-FL-E594K-T7、pMSCV-hiR2-FL-E626D-T7、pMSCV-hiR2-FL-L657I-T7和pMSCV-hiR2-FL-H835Y-T7同向性病毒的Phoenix-ECO细胞的上清液，用0.45μm CA过滤器过滤，并且补充4μg/ml聚凝胺(Sigma-Aldrich，USA)。在从永生化iRhom1/2-/-DKO MEF除去培养基后，将这些上清液添加到靶细胞中，在37℃、5％$CO_2$下保持4小时用于第一感染。同时，将Phoenix-ECO细胞与新鲜培养基一起再孵育，再过4小时后，过滤，并且同样在4μg/ml聚凝胺的存在下用于相应靶细胞群的第二感染。同样，进行第三感染循环但过夜。在第4天，用新鲜的标准生长培养基替换含有病毒的细胞上清液。从第5天起，使细胞在2mg/ml遗传霉素(G418，Thermo Fisher Scientific，USA)的存在下生长，以选择稳定表达C末端标记3个连续拷贝的T7表位的人iRhom2全长单氨基酸取

代的永生化MEF-DKO-hiR2-FL-R441K-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K443R-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-V459I-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G481Q-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L488R-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L493I-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D496T-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H505R-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q512L-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R513K-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D528N-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P533--T7、MEF-DKO-hiR2-FL-M534S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G540S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R543Q-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T544P-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G546A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A547V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R582Q-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-F588L-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-M591I-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E594K-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E626D-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L657I-T7和MEF-DKO-hiR2-FL-H835Y-T7细胞。在增殖后，将细胞储存以备将来使用。

[0346] 用于测试系统验证的FACS分析

[0347] 简而言之，将永生化MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7细胞、MEF-DKO-miR2-FL-WT-T7细胞以及MEF-DKO-hiR2-FL-R441K-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K443R-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-V459I-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G481Q-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L488R-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L493I-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D496T-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H505R-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q512L-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R513K-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D528N-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P533--T7、MEF-DKO-hiR2-FL-M534S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G540S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R543Q-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T544P-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G546A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A547V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R582Q-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-F588L-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-M591I-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E594K-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E626D-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L657I-T7和MEF-DKO-hiR2-FL-H835Y-T7细胞用含10mM EDTA的PBS收获，洗涤并重悬于FACS缓冲液(PBS，3％FBS，0.05％叠氮化钠)中，并且以约$3\times10^5$个细胞/孔接种到Nunc U形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)中。为了沉淀细胞并除去上清液，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟。对于初级染色，使细胞重悬于每孔100μl的单独FACS缓冲液(对照)或者3μg/ml的FACS缓冲液中的小鼠单克隆抗T7 IgG(Merck Millipore,USA)中，并在冰上孵育1小时。然后，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟，并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤两次。对于二次染色，将细胞离心并重悬于每孔100μl的用FACS缓冲液以1:100稀释的PE缀合的山羊抗小鼠IgG F(ab')2检测片段(Dianova,德国)中。避光，将细胞悬浮液在冰上孵育1小时。然后，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟，并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤三次。最后，将细胞重悬于每孔150μl的FACS缓冲液中，并使用BD AccuriTM C6 Plus流式细胞仪(Becton Dickinson,德国)分析。

[0348] 图10a示例性地显示人iRhom2变体hiR2-FL-P533--T7的本实验的代表性结果。抗T7标签抗体(黑色)和抗小鼠IgG第二抗体(灰色)对MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7(左侧)、MEF-DKO-miR2-FL-WT-T7(中间)和MEF-DKO-hiR2-FL-P533--T7细胞(右侧)的结合分析揭示了相对荧光强度的相对较强的增加。这表明，类似于人和小鼠iRhom2野生型(左侧和中间)，人iRhom2变体hiR2-FL-P533--T7同样良好地表达并位于这些细胞的表面上(右侧)。对于在MEF-DKO-hiR2-FL-R441K-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K443R-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-V459I-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G481Q-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L488R-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L493I-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D496T-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H505R-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q512L-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R513K-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D528N-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-M534S-T7、

MEF-DKO-hiR2-FL-G540S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R543Q-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T544P-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G546A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A547V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R582Q-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-F588L-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-M591I-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E594K-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E626D-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L657I-T7和MEF-DKO-hiR2-FL-H835Y-T7细胞上表达的其他人iRhom2全长单氨基酸取代的表达和定位，获得了类似的结果。

[0349] 用于测试系统验证的TGFαELISA

[0350] 为了测试所有25种具有小鼠iRhom2特异性单氨基酸取代或单氨基酸缺失(如在hiR2-FL-P533-的情况下)的人iRhom2变体，使如以上实施例所述生成的稳定表达这些变体的相应MEF-DKO细胞系经受TGFα脱落ELISA分析。为了表明所有变体的功能性作为这些变体被正确折叠的指示，评估PMA诱导的核转染TGFα的释放。由于本分析中使用的细胞是iRhom1/2-/-双敲除小鼠胚胎成纤维细胞(实施例11中所述)的挽救变体，其由具有小鼠iRhom2特异性单氨基酸取代或缺失的相应人iRhom2变体挽救，稳定表达的iRhom2变体是在这些细胞中表达的仅有iRhom蛋白，并因此是这些细胞中唯一对脱落TGFα作出贡献的iRhom。

[0351] 简而言之，在第1天，将Nunc black MaxiSorp® 96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)用每孔100μl的在TBS中400ng/ml的小鼠抗人TGFα捕获抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)在4℃下包被过夜。在使用4D-Nucleofector系统(Lonza,瑞士)，用pcDNA3.1载体骨架中的hTGFα-FL-WT构建体电穿孔MEF-DKO-hiR2-FL-R441K-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K443R-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-V459I-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G481Q-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L488R-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L493I-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D496T-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H505R-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q512L-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R513K-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D528N-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P533--T7、MEF-DKO-hiR2-FL-M534S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G540S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R543Q-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T544P-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G546A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A547V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R582Q-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-F588L-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-M591I-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E594K-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E626D-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L657I-T7和MEF-DKO-hiR2-FL-H835Y-T7细胞之后，将约35,000个携带具有小鼠iRhom2特异性单氨基酸取代或缺失的人iRhom2变体的MEF-DKO细胞接种到F形底96孔细胞培养板(Thermo Fisher Scientific,USA)的各孔的100μl正常生长培养基中。在第2天，除去捕获抗体溶液，并将MaxiSorp®板用每孔300μl的TBS、1％BSA在室温下封闭至少1小时。同时，将细胞用PBS洗涤一次，然后每孔添加80μl的OptiMEM培养基(Thermo Fisher Scientific,USA)。

[0352] 随后，在37℃、5％$CO_2$下，将细胞(未刺激的对照的那些除外)用每孔20μl的PMA(Sigma-Aldrich,USA)以25ng/ml的最终浓度刺激1小时。将20μl的OptiMEM培养基添加到未刺激的对照细胞中。然后，将96孔板离心以沉淀细胞。平行地，从MaxiSorp®板除去封闭缓冲液，并将板在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次。为了避免干燥，将30μl的TBS立即添加到MaxiSorp®板的各孔中，随后每样品转移70μl的无细胞上清液。然后，将每孔100μl的TBS中37.5ng/ml的生物素化山羊抗人TGFα检测抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)添加，避直射光，将板在室温下孵育2小时。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次并在

第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后，将100μl的用TBS以1:10,000稀释的链霉亲和素-AP(R&D Systems,USA)添加至各孔中，再次避直射光，将板在室温下孵育30分钟。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤另一轮4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后，添加每孔100μl的AttoPhos底物溶液(Promega,USA)以在室温下暗处孵育1小时。使用infinite M1000(Tecan Group,瑞士)酶标仪，在435nm的激发波长和555nm的发射波长下收集各孔的荧光。

[0353] 图10b显示这些TGFα释放测定的结果，表明所有25种具有小鼠iRhom2特异性单氨基酸取代或单氨基酸缺失(如在hiR2-FL-P533-的情况下)的人iRhom2变体均在TGFα脱落可被PMA诱导时呈功能活性，指示这些变体正确折叠，与未检测到PMA诱导的TGFα脱落的空载体(EV)阴性对照群体形成对照。

[0354] 表征本发明的纯化的抗体的结合的FACS分析以用于表位作图目的

[0355] 简而言之，将永生化MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7细胞、MEF-DKO-miR2-FL-WT-T7细胞以及MEF-DKO-hiR2-FL-R441K-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K443R-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-V459I-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G481Q-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L488R-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L493I-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D496T-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H505R-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q512L-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R513K-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D528N-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P533--T7、MEF-DKO-hiR2-FL-M534S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G540S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R543Q-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T544P-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G546A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A547V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R582Q-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-F588L-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-M591I-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E594K-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E626D-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L657I-T7和MEF-DKO-hiR2-FL-H835Y-T7细胞用含10mM EDTA的PBS收获，洗涤并重悬于FACS缓冲液(PBS,3％FBS,0.05％叠氮化钠)中，并且以约$3\times10^5$个细胞/孔接种到Nunc U形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)中。为了沉淀细胞并除去上清液，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟。对于初级染色，使细胞重悬于每孔100μl的单独FACS缓冲液(对照)、或3μg/ml的FACS缓冲液中的本发明纯化的抗体3、5、16、22、34、42、43、44、48和50中，并在冰上孵育1小时。然后，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟，并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤两次。对于二次染色，将细胞离心并重悬于每孔100μl的用FACS缓冲液以1:100稀释的PE缀合的山羊抗小鼠IgG F(ab')2检测片段(Dianova,德国)中。避光，将细胞悬浮液在冰上孵育1小时。然后，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟，并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤三次。最后，将细胞重悬于每孔150μl的FACS缓冲液中，并使用BD AccuriTM C6 Plus流式细胞仪(Becton Dickinson,德国)分析。

[0356] 图11a显示本实验的代表性结果。对于25种具有小鼠iRhom2相关的单氨基酸取代或缺失的人iRhom2变体的整个组，示例性地，显示了用于分析表达人iRhom2变体hiR2-FL-P533--T7的细胞的数据。作为对TNFα释放具有抑制效应的本发明抗体的代表性实例的抗体3(黑色，上图)或对TNFα释放没有抑制效应的抗体50(黑色，下图)以及抗小鼠IgG第二抗体(灰色)对MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7细胞(左侧)、MEF-DKO-miR2-FL-WT-T7(中间)和MEF-DKO-hiR2-FL-P533--T7细胞(右侧)的结合分析表明，人iRhom2的单氨基酸脯氨酸533的缺失较强削弱，并因此对于对TNFα释放具有抑制效应的本发明抗体3的结合作出贡献(右侧，上图)。相比之下，其不影响，并且因此不对于对TNFα释放没有抑制效应的抗体50的结合作出

贡献(右侧,下图)。对于两种抗体,与MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7细胞(左侧)和MEF-DKO-miR2-FL-WT-T7(中间)的结合分别充当阳性和阴性对照。

[0357] 图11b汇总了——在图11a的扩展中——对于25种表达具有小鼠iRhom2特异性单氨基酸取代的人iRhom2变体(包括P533缺失的变体)的工程化MEF群体的整个组,对TNFα释放具有抑制效应的本发明的抗体3、5、16、22、34、42、43和44相对于对TNFα释放没有抑制效应的抗体48和50的FACS分析的结果。每种抗体与人iRhom2野生型的结合被认为是100%。与任何变体结合的抗体的30-59%相应下降由展示为浅灰色(并用"1"标记)的细胞指示,60-95%的受损结合由灰色(并用"2"标记)的细胞指示,≥95%的结合损失由深灰色细胞(用"3"标记)突出显示。这些数据揭示了与对TNFα释放具有抑制效应的本发明的抗体3、5、16、22、34、42、43和44与人iRhom2的结合有关的氨基酸位置的相关(本发明的抗体16除外)模式,它们与对于对TNFα释放没有抑制效应的抗体48和50的结合作出贡献的氨基酸位置模式不同。

[0358] 实施例16:基于iRhom2在大胞外环中心区的家族成员特异性序列变异的本发明抗体的表位作图

[0359] 与实施例15互补,在第二种方法中设计了用于一组30种具有人iRhom1相关的单氨基酸取代的人iRhom2变体的质粒,以鉴定对本发明抗体的结合作出贡献的单个氨基酸。这些30种取代反映了人iRhom2与人iRhom1中不相同的大胞外环1的中心区中的氨基酸。代替人iRhom2的氨基酸,引入人iRhom1的对应位置处的氨基酸,产生变体hiR2-FL-G498A-T7、hiR2-FL-Q502R-T7、hiR2-FL-I509V-T7、hiR2-FL-Q512S-T7、hiR2-FL-R513E-T7、hiR2-FL-K514E-T7、hiR2-FL-D515E-T7、hiR2-FL-E518S-T7、hiR2-FL-T522V-T7、hiR2-FL-F523W-T7、hiR2-FL-Q527P-T7、hiR2-FL-D528I--T7、hiR2-FL-D529H-T7、hiR2-FL-T530P-T7、hiR2-FL-G531S-T7、hiR2-FL-P532A-T7、hiR2-FL-S537E-T7、hiR2-FL-D538L-T7、hiR2-FL-L539A-T7、hiR2-FL-Q541H-T7、hiR2-FL-T544Q-T7、hiR2-FL-S545F-T7、hiR2-FL-A547S-T7、hiR2-FL-T555V-T7、hiR2-FL-E557D-T7、hiR2-FL-A560S-T7和hiR2-FL-S562E-T7。在人iRhom1中不存在对应氨基酸的情况下,使人iRhom2的相应氨基酸缺失,产生变体hiR2-FL-M534--T7、hiR2-FL-D535--T7和hiR2-FL-K536--T7。

[0360] 本实施例描述了表达30种人iRhom1相关的单氨基酸取代变体的iRhom1/2-/-DKO MEF群体的生成,以及它们在细胞表面定位和作为正确蛋白构象的指示的功能活性方面的表征。随后,描述了对于30种表达具有人iRhom1相关的单氨基酸取代的人iRhom2变体(包括M534、D535和K536缺失的变体)的工程化MEF群体的整个组,本发明的纯化抗体3、5、16、22、34、42、43、44、48和50的结合分析。

[0361] 稳定表达30种具有人iRhom1相关的单氨基酸取代的T7标记的人iRhom2变体的iRhom1/2-/-DKO MEF的生成

[0362] 简而言之,在第1天,将Phoenix-ECO细胞(美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection),USA)以$8\times10^5$个细胞/孔接种到6孔组织培养板(Greiner,德国)的标准生长培养基中,并且在37℃、5%$CO_2$下保持过夜。在第2天,将培养基用新鲜培养基替换,该新鲜培养基补充有最终浓度为25μM的氯喹(Sigma-Aldrich,USA)。应用磷酸钙法,将细胞用2μg/ml的编码C末端标记3个连续拷贝的T7表位(MASMTGGQQMG)的人iRhom2全长单氨基酸取代的pMSCV-hiR2-FL-G498A-T7、pMSCV-hiR2-FL-Q502R-T7、pMSCV-hiR2-FL-

I509V-T7、pMSCV-hiR2-FL-Q512S-T7、pMSCV-hiR2-FL-R513E-T7、pMSCV-hiR2-FL-K514E-T7、pMSCV-hiR2-FL-D515E-T7、pMSCV-hiR2-FL-E518S-T7、pMSCV-hiR2-FL-T522V-T7、pMSCV-hiR2-FL-F523W-T7、pMSCV-hiR2-FL-Q527P-T7、pMSCV-hiR2-FL-D528I--T7、pMSCV-hiR2-FL-D529H-T7、pMSCV-hiR2-FL-T530P-T7、pMSCV-hiR2-FL-G531S-T7、pMSCV-hiR2-FL-P532A-T7、pMSCV-hiR2-FL-M534--T7、pMSCV-hiR2-FL-D535--T7、pMSCV-hiR2-FL-K536--T7、pMSCV-hiR2-FL-S537E-T7、pMSCV-hiR2-FL-D538L-T7、pMSCV-hiR2-FL-L539A-T7、pMSCV-hiR2-FL-Q541H-T7、pMSCV-hiR2-FL-T544Q-T7、pMSCV-hiR2-FL-S545F-T7、pMSCV-hiR2-FL-A547S-T7、pMSCV-hiR2-FL-T555V-T7、pMSCV-hiR2-FL-E557D-T7、pMSCV-hiR2-FL-A560S-T7和pMSCV-hiR2-FL-S562E-T7转染，并保持于37℃、5％$CO_2$。在7小时后，通过用缺乏氯喹的标准生长培养基替换细胞上清液来停止转染，并将细胞在37℃、5％$CO_2$下孵育过夜以允许病毒产生。平行地，将作为用于逆转录病毒感染的靶细胞的永生化iRhom1/2-/-DKO MEF以$1\times10^5$个细胞/孔接种到6孔组织培养板(Greiner，德国)的标准生长培养基中，并且也在37℃、5％$CO_2$下保持过夜。在第3天，收集释放pMSCV-hiR2-FL-G498A-T7、pMSCV-hiR2-FL-Q502R-T7、pMSCV-hiR2-FL-I509V-T7、pMSCV-hiR2-FL-Q512S-T7、pMSCV-hiR2-FL-R513E-T7、pMSCV-hiR2-FL-K514E-T7、pMSCV-hiR2-FL-D515E-T7、pMSCV-hiR2-FL-E518S-T7、pMSCV-hiR2-FL-T522V-T7、pMSCV-hiR2-FL-F523W-T7、pMSCV-hiR2-FL-Q527P-T7、pMSCV-hiR2-FL-D528I--T7、pMSCV-hiR2-FL-D529H-T7、pMSCV-hiR2-FL-T530P-T7、pMSCV-hiR2-FL-G531S-T7、pMSCV-hiR2-FL-P532A-T7、pMSCV-hiR2-FL-M534--T7、pMSCV-hiR2-FL-D535--T7、pMSCV-hiR2-FL-K536--T7、pMSCV-hiR2-FL-S537E-T7、pMSCV-hiR2-FL-D538L-T7、pMSCV-hiR2-FL-L539A-T7、pMSCV-hiR2-FL-Q541H-T7、pMSCV-hiR2-FL-T544Q-T7、pMSCV-hiR2-FL-S545F-T7、pMSCV-hiR2-FL-A547S-T7、pMSCV-hiR2-FL-T555V-T7、pMSCV-hiR2-FL-E557D-T7、pMSCV-hiR2-FL-A560S-T7和pMSCV-hiR2-FL-S562E-T7同向性病毒的Phoenix-ECO细胞的上清液，用0.45μm CA过滤器过滤，并且补充4μg/ml聚凝胺(Sigma-Aldrich,USA)。在从永生化iRhom1/2-/-DKO MEF除去培养基后，将这些上清液添加到靶细胞中，在37℃、5％$CO_2$下保持4小时用于第一感染。同时，将Phoenix-ECO细胞与新鲜培养基一起再孵育，再过4小时后，过滤，并且同样在4μg/ml聚凝胺的存在下用于相应靶细胞群的第二感染。同样，进行第三感染循环但过夜。在第4天，用新鲜的标准生长培养基替换含有病毒的细胞上清液。从第5天起，使细胞在2mg/ml遗传霉素(G418，Thermo Fisher Scientific,USA)的存在下生长，以选择稳定表达C末端标记3个连续拷贝的T7表位的人iRhom2全长单氨基酸取代的永生化MEF-DKO-hiR2-FL-G498A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q502R-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I509V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q512S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R513E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K514E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D515E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E518S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T522V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-F523W-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q527P-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D528I--T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D529H-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T530P-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G531S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P532A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-M534--T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D535--T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K536--T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S537E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D538L-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L539A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q541H-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T544Q-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S545F-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A547S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T555V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E557D-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A560S-T7

和MEF-DKO-hiR2-FL-S562E-T7细胞。在增殖后,将细胞储存以备将来使用。

[0363] 用于测试系统验证的FACS分析

[0364] 简而言之,将永生化MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7细胞、MEF-DKO-hiR1-FL-WT-T7细胞以及MEF-DKO-hiR2-FL-G498A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q502R-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I509V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q512S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R513E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K514E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D515E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E518S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T522V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-F523W-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q527P-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D528I--T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D529H-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T530P-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G531S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P532A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-M534--T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D535--T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K536--T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S537E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D538L-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L539A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q541H-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T544Q-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S545F-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A547S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T555V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E557D-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A560S-T7和MEF-DKO-hiR2-FL-S562E-T7细胞用含10mM EDTA的PBS收获,洗涤并重悬于FACS缓冲液(PBS,3%FBS,0.05%叠氮化钠)中,并且以约$3\times10^5$个细胞/孔接种到Nunc U形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)中。为了沉淀细胞并除去上清液,将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟。对于初级染色,使细胞重悬于每孔100μl的单独FACS缓冲液(对照)、或者3μg/ml的FACS缓冲液中的小鼠单克隆抗T7 IgG(Merck Millipore,USA)中,并在冰上孵育1小时。然后,将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟,并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤两次。对于二次染色,将细胞离心并重悬于每孔100μl的用FACS缓冲液以1:100稀释的PE缀合的山羊抗小鼠IgG F(ab')2检测片段(Dianova,德国)中。避光,将细胞悬浮液在冰上孵育1小时。然后,将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟,并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤三次。最后,将细胞重悬于每孔150μl的FACS缓冲液中,并使用BD AccuriTM C6 Plus流式细胞仪(Becton Dickinson,德国)分析。

[0365] 图12a示例性地显示人iRhom2变体hiR2-FL-L539A-T7的本实验的代表性结果。抗T7标签抗体(黑色)和抗小鼠IgG第二抗体(灰色)对MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7(左侧)、MEF-DKO-hiR1-FL-WT-T7(中间)和MEF-DKO-hiR2-FL-L539A-T7细胞(右侧)的结合分析揭示了相对荧光强度的相对较强的增加。这表明,类似于人iRhom2和人iRhom1野生型(左侧和中间),人iRhom2变体hiR2-FL-L539A-T7同样良好地表达并位于这些细胞的表面上(右侧)。对于在MEF-DKO-hiR2-FL-G498A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q502R-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I509V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q512S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R513E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K514E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D515E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E518S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T522V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-F523W-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q527P-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D528I--T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D529H-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T530P-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G531S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P532A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S537E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D538L-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q541H-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T544Q-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S545F-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A547S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T555V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E557D-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A560S-T7和MEF-DKO-hiR2-FL-S562E-T7细胞上表达的其他人iRhom2全长单氨基酸取代的表达和定位,以及对于在MEF-DKO-hiR2-FL-M534--T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D535--T7和MEF-DKO-hiR2-FL-K536--T7细胞上表达的人iRhom2全长单氨基酸缺失的表

达和定位,获得了类似的结果。

[0366] 用于测试系统验证的TGFαELISA

[0367] 为了测试所有30种具有人iRhom1特异性单氨基酸取代或单氨基酸缺失(如在hiR2-FL-M534-、hiR2-FL-D535-和hiR2-FL-K536-的情况下)的人iRhom2变体,使如以上实施例所述生成的稳定表达这些变体的相应MEF-DKO细胞系经受TGFα脱落ELISA分析。为了表明所有变体的功能性作为这些变体被正确折叠的指示,评估PMA诱导的核转染TGFα的释放。由于本分析中使用的细胞是iRhom1/2-/-双敲除小鼠胚胎成纤维细胞(实施例11中所述)的挽救变体(其由具有人iRhom1特异性单氨基酸取代或缺失的相应人iRhom2变体挽救),稳定表达的iRhom2变体是在这些细胞中表达的仅有iRhom蛋白,因此是这些细胞中唯一对脱落TGFα作出贡献的iRhom。

[0368] 简而言之,在第1天,将Nunc black MaxiSorp® 96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)用每孔100μl的TBS中的400ng/ml的小鼠抗人TGFα捕获抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)在4℃下包被过夜。在使用4D-Nucleofector系统(Lonza,瑞士),用pcDNA3.1载体骨架中的hTGFα-FL-WT构建体电穿孔MEF-DKO-hiR2-FL-G498A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q502R-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I509V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q512S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R513E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K514E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D515E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E518S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T522V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-F523W-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q527P-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D528I--T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D529H-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T530P-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G531S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P532A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-M534--T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D535--T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K536--T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S537E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D538L-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L539A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q541H-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T544Q-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S545F-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A547S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T555V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E557D-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A560S-T7和MEF-DKO-hiR2-FL-S562E-T7细胞之后,将约35,000个携带具有人iRhom1特异性单氨基酸取代或缺失的人iRhom2变体的MEF-DKO细胞接种到F形底96孔细胞培养板(Thermo Fisher Scientific,USA)的各孔的100μl正常生长培养基中。在第2天,除去捕获抗体溶液,并将MaxiSorp®板用每孔300μl的TBS、1%BSA在室温下封闭至少1小时。同时,将细胞用PBS洗涤一次,然后每孔添加80μl的OptiMEM培养基(Thermo Fisher Scientific,USA)。

[0369] 随后,在37℃、5%$CO_2$下,将细胞(未刺激的对照的那些除外)用每孔20μl的PMA(Sigma-Aldrich,USA)以25ng/ml的最终浓度刺激1小时。将20μl的OptiMEM培养基添加到未刺激的对照细胞中。然后,将96孔板离心以沉淀细胞。平行地,从MaxiSorp®板除去封闭缓冲液,并将板在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次。为了避免干燥,将30μl的TBS立即添加到MaxiSorp®板的各孔中,随后每样品转移70μl的无细胞上清液。然后,将每孔100μl的生物素化山羊抗人TGFα检测抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以37.5ng/ml TBS添加,避直射光,将板在室温下孵育2小时。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后,将100μl的用TBS以1:10,000稀释的链霉亲和素-AP(R&D Systems,USA)添加至各孔中,再次避直射光,将板在室温下孵育30分钟。在96头

板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤另一轮4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后,添加每孔100μl的AttoPhos底物溶液(Promega,USA)以在室温下暗处孵育1小时。使用infinite M1000(Tecan Group,瑞士)酶标仪,在435nm的激发波长和555nm的发射波长下收集各孔的荧光。

[0370] 图12b显示这些TGFα释放测定的结果,表明所有30种具有人iRhom1特异性单氨基酸取代或单氨基酸缺失(如在hiR2-FL-M534-、hiR2-FL-D535-和hiR2-FL-K536-的情况下)的人iRhom2变体均在TGFα脱落可被PMA诱导时呈功能活性,指示这些变体正确折叠,与未检测到PMA诱导的TGFα脱落的空载体(EV)阴性对照群体形成对照。

[0371] 表征本发明的纯化的抗体的结合的FACS分析以用于表位作图目的

[0372] 简而言之,将永生化MEF-DKO-hiR2-FL-G498A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q502R-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I509V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q512S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R513E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K514E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D515E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E518S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T522V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-F523W-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q527P-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D528I--T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D529H-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T530P-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G531S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P532A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-M534--T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D535--T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K536--T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S537E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D538L-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L539A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q541H-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T544Q-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S545F-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A547S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T555V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E557D-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A560S-T7和MEF-DKO-hiR2-FL-S562E-T7细胞用含10mM EDTA的PBS收获,洗涤并重悬于FACS缓冲液(PBS,3%FBS,0.05%叠氮化钠)中,并且以约$3\times10^5$个细胞/孔接种到Nunc U形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)中。为了沉淀细胞并除去上清液,将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟。对于初级染色,使细胞重悬于每孔100μl的单独FACS缓冲液(对照)、或3μg/ml的FACS缓冲液中的本发明纯化抗体3、5、16、22、34、42、43、44、48和50中,并在冰上孵育1小时。然后,将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟,并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤两次。对于二次染色,将细胞离心并重悬于每孔100μl的用FACS缓冲液以1:100稀释的PE缀合的山羊抗小鼠IgG F(ab')2检测片段(Dianova,德国)中。避光,将细胞悬浮液在冰上孵育1小时。然后,将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟,并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤三次。最后,将细胞重悬于每孔150μl的FACS缓冲液中,并使用BD AccuriTM C6 Plus流式细胞仪(Becton Dickinson,德国)分析。

[0373] 图13a显示本实验的代表性结果。对于30种具有人iRhom1相关的单氨基酸取代或缺失的人iRhom2变体的整个组,示例性地,显示了用于分析表达人iRhom2变体hiR2-FL-L539A-T7的细胞的数据。作为对TNFα释放具有抑制效应的本发明抗体的代表性实例的抗体3(黑色,上图)或对TNFα释放没有抑制效应的抗体50(黑色,下图)以及抗小鼠IgG第二抗体(灰色)对MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7细胞(左侧)、MEF-DKO-hiR1-FL-WT-T7(中间)和MEF-DKO-hiR2-FL-L539A-T7细胞(右侧)的结合分析表明,人iRhom2的单氨基酸亮氨酸539用丙氨酸取代较强削弱,并因此对于对TNFα释放具有抑制效应的本发明抗体3的结合作出贡献(右侧,上图)。相比之下,其不影响,并且因此不对于对TNFα释放没有抑制效应的抗体50的结合作出贡献(右侧,下图)。对于两种抗体,与MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7细胞(左侧)和MEF-DKO-

hiR1-FL-WT-T7(中间)的结合分别充当阳性和阴性对照。

[0374] 图13b汇总了——在图13a的扩展中——对于30种表达具有人iRhom1特异性单氨基酸取代的人iRhom2变体(包括M534、D535和K536缺失的变体)的工程化MEF群体的整个组，对TNFα释放具有抑制效应的本发明的抗体3、5、16、22、34、42、43和44相对于对TNFα释放没有抑制效应的抗体48和50的FACS分析的结果。每种抗体与人iRhom2野生型的结合被认为是100％。与任何变体结合的抗体的30-59％相应下降由展示为浅灰色(并用“1”标记)的细胞指示，60-95％的受损结合由灰色(并用“2”标记)的细胞指示，≥95％的结合损失由深灰色细胞(用“3”标记)突出显示。这些数据揭示了与对TNFα释放具有抑制效应的本发明的抗体3、5、16、22、34、42、43和44与人iRhom2的结合有关的氨基酸位置的相关(本发明的抗体16除外)模式，它们与对于对TNFα释放没有抑制效应的抗体48和50的结合作出贡献的氨基酸位置模式不同。

[0375] 实施例17:本发明的抗体对体外LPS诱导的TNFα脱落的抑制效应的分析

[0376] 与其中在基于ELISA的TNFα释放测定中测试本发明的杂交瘤上清液来源的纯化抗体的实施例14形成对照，本分析用本发明的重组产生的抗体进行，以验证它们对LPS诱导的内源性TNFα从人THP-1单核细胞的释放的抑制效应。

[0377] 为了产生重组抗体材料，设计、优化并合成了靶DNA序列。将完整序列亚克隆到pcDNA3.4载体(Thermo Fisher Scientific,USA)中，并大型制备转染级质粒用于Expi293F(Thermo Fisher Scientific,USA)细胞表达。在37℃和8％$CO_2$下，在定轨摇床(VWR Scientific,德国)上，使Expi293F细胞在Erlenmeyer烧瓶(Corning Inc.,USA)中的无血清Expi293FTM表达培养基(Thermo Fisher Scientific,USA)中生长。转染前一天，将细胞以适当的密度接种到新Erlenmeyer烧瓶中。在转染当天，将DNA和转染试剂以最佳比率混合，然后添加到具有准备用于转染的细胞的烧瓶中。将编码靶蛋白的重组质粒瞬时转染到悬浮Expi293F细胞培养物中。转染后第6天收集的细胞培养上清液用于纯化。将细胞培养肉汤离心并过滤。将过滤的细胞培养上清液以适当的流量加载到HiTrap MabSelect SuRe(GE Healthcare,UK)、MabSelect SuRe™ LX(GE Healthcare,UK)或RoboColumn Eshmuno A(Merck Millipore,USA)亲和纯化柱上。在用适当的缓冲液洗涤和洗脱后，合并洗脱的级分并将缓冲液更换为最终制剂缓冲液。通过SDS-PAGE分析来分析纯化蛋白质以进行分子量和纯度测量。最后，应用NanoDrop 2000分光光度计(Thermo Fisher Scientific,USA)测定浓度。

[0378] 本实施例中使用的基于ELISA的TNFα释放测定与实施例14中描述的相同。

[0379] 图14显示本实验的代表性结果，以绝对数(图14A)和抑制百分比(图14B)表明供试品对LPS诱导的TNFα从THP-1细胞释放的效应。尽管作为金属蛋白酶的小分子抑制剂的巴马司他(BB94)充当阳性对照并且导致对LPS诱导的TNFα释放的96.2％抑制，但IgG同种型对照的存在对TNFα脱落没有显著效应。相比之下，相等浓度的本发明的纯化的抗体3、5、16、22、34、42、43、44、46、49、54、56和57对LPS诱导的TNFα从THP-1细胞的释放分别抑制59.9％、70.5％、70.7％、78.4％、73.8％、75.9％、78.5％、73.2％、36.1％、59.9％、67.9％、65.8％和59.7％。同样，相比之下，并因此与IgG同种型对照相当，本发明的纯化的抗体47、48、50、51和52的存在对TNFα脱落没有显著效应。

[0380] 实施例18:本发明的抗体对不同物种的交叉反应性的评价

[0381] 接着,生成稳定表达标记形式的恒河猴、食蟹猴、狗或兔iRhom2的iRhom1/2-/-DKO MEF,从而测定本发明的抗体与iRhom2的相应直向同源物的交叉反应性。生成稳定表达标记形式的恒河猴、食蟹猴、狗或兔iRhom1的iRhom1/2-/-DKO MEF,以确认对这些物种的iRhom2和iRhom1的特异性。

[0382] 稳定表达T7标记的恒河猴、食蟹猴、狗或兔iRhom2的iRhom1/2-/-DKO MEF的生成

[0383] 简而言之,在第1天,将Phoenix-ECO细胞(美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection),USA)以$8\times10^5$个细胞/孔接种到6孔组织培养板(Greiner,德国)的标准生长培养基中,并且在37℃、5%$CO_2$下保持过夜。在第2天,将培养基用新鲜培养基替换,该新鲜培养基补充有最终浓度为25μM的氯喹(Sigma-Aldrich,USA)。应用磷酸钙法,将细胞分别用2μg/ml的pMSCV(Clontech,USA)空载体、编码C末端标记3个连续拷贝的T7表位的恒河猴iRhom2全长野生型的pMSCV-恒河猴-iR2-FL-WT-T7、编码C末端标记3个连续拷贝的T7表位的食蟹猴iRhom2全长野生型的pMSCV-食蟹猴-iR2-FL-WT-T7、编码C末端标记3个连续拷贝的T7表位的狗iRhom2全长野生型的pMSCV-狗-iR2-FL-WT-T7、或编码C末端标记3个连续拷贝的T7表位的兔iRhom2全长野生型的pMSCV-兔-iR2-FL-WT-T7转染,并且保持于37℃、5%$CO_2$。在7小时后,通过用缺乏氯喹的标准生长培养基替换细胞上清液来停止转染,并将细胞在37℃、5%$CO_2$下孵育过夜以允许病毒产生。平行地,将作为用于逆转录病毒感染的靶细胞的永生化iRhom1/2-/-DKO MEF以$1\times10^5$个细胞/孔接种到6孔组织培养板(Greiner,德国)的标准生长培养基中,并且也在37℃、5%$CO_2$下保持过夜。在第3天,分别收集释放pMSCV、pMSCV-恒河猴-iR2-FL-WT-T7、pMSCV-食蟹猴-iR2-FL-WT-T7、pMSCV-狗-iR2-FL-WT-T7或pMSCV-兔-iR2-FL-WT-T7同向性病毒的Phoenix-ECO细胞的上清液,用0.45μm CA过滤器过滤,并且补充4μg/ml聚凝胺(Sigma-Aldrich,USA)。在从永生化iRhom1/2-/-DKO MEF除去培养基后,将含有病毒的上清液添加到靶细胞中,在37℃、5%$CO_2$下保持4小时用于第一感染。同时,将Phoenix-ECO细胞与新鲜培养基一起再孵育,再过4小时后,过滤,并且同样在4μg/ml聚凝胺的存在下用于相应靶细胞群的第二感染。同样,进行第三感染循环但过夜。在第4天,用新鲜的标准生长培养基替换含有病毒的细胞上清液。从第5天起,使细胞在2mg/ml遗传霉素(G418,Thermo Fisher Scientific,USA)的存在下生长,以分别选择pMSCV空载体稳定感染的永生化MEF-DKO-EV对照细胞、稳定表达C末端标记3个连续拷贝的T7表位的恒河猴iRhom2全长野生型的pMSCV-恒河猴-iR2-FL-WT-T7细胞、稳定表达C末端标记3个连续拷贝的T7表位的食蟹猴iRhom2全长野生型的pMSCV-食蟹猴-iR2-FL-WT-T7细胞、稳定表达C末端标记3个连续拷贝的T7表位的狗iRhom2全长野生型的pMSCV-狗-iR2-FL-WT-T7细胞、或稳定表达C末端标记3个连续拷贝的T7表位的兔iRhom2全长野生型的pMSCV-兔-iR2-FL-WT-T7细胞。在增殖后,将细胞储存以备将来使用。平行地,以类似方式生成稳定表达标记形式的恒河猴、食蟹猴、狗或兔iRhom1的iRhom1/2-/-DKO MEF。

[0384] 用于测试系统验证和抗体表征的FACS分析

[0385] 简而言之,将永生化MEF-DKO-EV对照细胞、MEF-DKO-恒河猴-iR2-FL-WT-T7细胞、MEF-DKO-食蟹猴-iR2-FL-WT-T7细胞、MEF-DKO-狗-iR2-FL-WT-T7细胞和MEF-DKO-兔-iR2-FL-WT-T7细胞,以及它们相应的iRhom1对应物用含10mM EDTA的PBS收获,洗涤并重悬于FACS缓冲液(PBS,3%FBS,0.05%叠氮化钠)中,并且以约$3\times10^5$个细胞/孔接种到Nunc U形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)中。为了沉淀细胞并除去上清液,将板在1,

500rpm和4℃下离心3分钟。对于初级染色，使细胞重悬于每孔100μl的单独FACS缓冲液(对照)、3μg/ml的FACS缓冲液中的小鼠单克隆抗T7 IgG(Merck Millipore,USA)、或同样3μg/ml的FACS缓冲液中的本发明抗体中，并在冰上孵育1小时。然后，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟，并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤两次。对于二次染色，将细胞离心并重悬于每孔100μl的用FACS缓冲液以1:100稀释的PE缀合的山羊抗小鼠IgG F(ab')2检测片段(Dianova,德国)中。避光，将细胞悬浮液在冰上孵育1小时。然后，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟，并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤三次。最后，将细胞重悬于每孔150μl的FACS缓冲液中，并使用BD AccuriTM C6 Plus流式细胞仪(Becton Dickinson,德国)分析。

[0386] 图18a、18b、18c&18d显示本实验的代表性结果。与仅与第二抗体一起孵育的对照样品(18a、18b、18c&18d，灰色)相比，MEF-DKO-恒河猴-iR2-FL-WT-T7细胞、MEF-DKO-食蟹猴-iR2-FL-WT-T7细胞、MEF-DKO-狗-iR2-FL-WT-T7细胞和MEF-DKO-兔-iR2-FL-WT-T7细胞上的相对荧光强度的较强偏移分别表明了作为本发明的抗体3、5、16、22、34、42、43、44、46、47、48、49、50、51、54、56和57的代表性实例的本发明抗体16与恒河猴iRhom2变体(图18a，黑色，右侧)、食蟹猴iRhom2变体(图18b，黑色，右侧)、狗iRhom2变体(图18c，黑色，右侧)以及兔iRhom2变体(图18d，黑色，右侧)的较强结合。相比之下，未检测到作为本发明抗体的代表性实例(抗体52除外)的本发明抗体16与MEF-DKO-恒河猴-iR1-FL-WT-T7细胞、MEF-DKO-食蟹猴-iR1-FL-WT-T7细胞、MEF-DKO-狗-iR1-FL-WT-T7细胞和MEF-DKO-兔-iR1-FL-WT-T7细胞的结合，这提供了恒河猴iRhom1变体(图18a，黑色，左侧)、食蟹猴iRhom1变体(图18b，黑色，左侧)、狗iRhom1变体(图18c，黑色，左侧)和兔iRhom1变体(图18d，黑色，左侧)分别不被本发明的抗体16识别的证据。前述对不同iRhom2直向同源物的交叉反应性以及它们对这些物种的iRhom2和iRhom1的特异性在各图中对于抗体16的鼠(上图)和嵌合(下图)形式而言示出。

[0387] 实施例19:本发明的纯化的抗体的小鼠交叉反应性的评价

[0388] 除了其中描述T7标记的iRhom变体的实施例12之外，使永生化iRhom1/2-/-DKO MEF重建成具有FLAG标记形式的人iRhom2，从而确认本发明抗体的靶识别。另外，生成稳定表达FLAG标记形式的小鼠iRhom2的iRhom1/2-/-DKO MEF，从而测定本发明的抗体与iRhom2的小鼠直向同源物的交叉反应性。

[0389] 稳定表达FLAG标记的人或小鼠iRhom2的iRhom1/2-/-DKO MEF的生成

[0390] 简而言之，在第1天，将Phoenix-ECO细胞(美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection),USA)以$8\times10^5$个细胞/孔接种到6孔组织培养板(Greiner,德国)的标准生长培养基中，并且在37℃、5%$CO_2$下保持过夜。在第2天，将培养基用新鲜培养基替换，该新鲜培养基补充有最终浓度为25μM的氯喹(Sigma-Aldrich,USA)。应用磷酸钙法，将细胞用2μg/ml的pMSCV(Clontech,USA)空载体、编码C末端标记三重-FLAG表位(DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK)的人iRhom2全长野生型的pMSCV-hiR2-FL-WT-FLAG、或编码C末端标记三重-FLAG表位的小鼠iRhom2全长野生型的pMSCV-miR2-FL-WT-FLAG转染，并且保持于37℃、5%$CO_2$。在7小时后，通过用缺乏氯喹的标准生长培养基替换细胞上清液来停止转染，并将细胞在37℃、5%$CO_2$下孵育过夜以允许病毒产生。平行地，将作为用于逆转录病毒感染的靶细胞的永生化iRhom1/2-/-DKO MEF以$1\times10^5$个细胞/孔接种到6孔组织培养板(Greiner,德国)的标准生长培养基中，并且也在37℃、5%$CO_2$下保持过夜。在第3天，收集释

放pMSCV、pMSCV-hiR2-FL-WT-FLAG或pMSCV-miR2-FL-WT-FLAG同向性病毒的Phoenix-ECO细胞的上清液，用0.45μm CA过滤器过滤，并且补充4μg/ml聚凝胺(Sigma-Aldrich,USA)。在从永生化iRhom1/2-/-DKO MEF除去培养基后，将含有病毒的上清液添加到靶细胞中，在37℃、5%$CO_2$下保持4小时用于第一感染。同时，将Phoenix-ECO细胞与新鲜培养基一起再孵育，再过4小时后，过滤，并且同样在4μg/ml聚凝胺的存在下用于相应靶细胞群的第二感染。同样，进行第三感染循环但过夜。在第4天，用新鲜的标准生长培养基替换含有病毒的细胞上清液。从第5天起，使细胞在2mg/ml遗传霉素(G418,Thermo Fisher Scientific,USA)的存在下生长，以选择pMSCV空载体稳定感染的永生化MEF-DKO-EV对照细胞、稳定表达C末端标记三重-FLAG表位的人iRhom2全长野生型的MEF-DKO-hiR2-FL-WT-FLAG细胞，以及稳定表达C末端标记三重-FLAG表位的小鼠iRhom2全长野生型的MEF-DKO-miR2-FL-WT-FLAG细胞。在增殖后，将细胞储存以备将来使用。

[0391] 用于测试系统验证和抗体表征的FACS分析

[0392] 简而言之，将永生化MEF-DKO-EV对照细胞、MEF-DKO-hiR2-FL-WT-FLAG细胞和MEF-DKO-miR2-FL-WT-FLAG细胞用含10mM EDTA的PBS收获，洗涤并重悬于FACS缓冲液(PBS,3%FBS,0.05%叠氮化钠)中，并且以约$3\times10^5$个细胞/孔接种到Nunc U形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)中。为了沉淀细胞并除去上清液，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟。对于初级染色，使细胞重悬于每孔100μl的单独FACS缓冲液(对照)、3μg/ml的FACS缓冲液中的小鼠单克隆抗FLAG IgG(Sigma-Aldrich,USA)、或同样3μg/ml的FACS缓冲液中的本发明抗体中，并在冰上孵育1小时。然后，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟，并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤两次。对于二次染色，将细胞离心并重悬于每孔100μl的用FACS缓冲液以1:100稀释的PE缀合的山羊抗小鼠IgG F(ab')2检测片段(Dianova,德国)中。避光，将细胞悬浮液在冰上孵育1小时。然后，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟，并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤三次。最后，将细胞重悬于每孔150μl的FACS缓冲液中，并使用BD AccuriTM C6 Plus流式细胞仪(Becton Dickinson,德国)分析。

[0393] 图19a&19b显示本实验的代表性结果。与仅与抗小鼠IgG第二抗体一起孵育的对照样品(19a&19b,灰色)相比，与抗FLAG标签抗体(图19a,黑色)共孵育不导致MEF-DKO-EV对照细胞的背景染色(图19a,左侧)。相比之下，抗FLAG标签抗体对MEF-DKO-hiR2-FL-WT-FLAG(图19a,中间)和MEF-DKO-miR2-FL-WT-FLAG(图19a,右侧)细胞两者的结合分析揭示了相对荧光强度的较强增加，表明异位表达的人和小鼠iRhom2直向同源物位于这些遗传工程化细胞群的表面上，并因此验证它们作为表征本发明抗体的合适测试系统。将这些细胞群与作为本发明抗体的代表性实例的抗体3(图19b,黑色)共孵育导致MEF-DKO-EV对照细胞几乎没有背景染色(图19b,左侧)，而在MEF-DKO-hiR2-FL-WT-FLAG细胞上的相对荧光强度的较强偏移(类似于用抗FLAG标签抗体所观察到的)表明本发明的抗体3与人iRhom2的较强结合(图19b,中间)。相比之下，未检测到本发明的抗体3与MEF-DKO-miR2-FL-WT-FLAG细胞的显著结合(图19b,右侧)，这提供了用抗FLAG标签抗体(图19a,右侧)验证的细胞表面上存在的小鼠iRhom2不被本发明的抗体3识别的证据。用本发明的抗体5、16、22、34、42、43、44、46、47、48、49、50、51、54、56和57获得类似的结果，表明本发明的这些抗体没有一种与小鼠iRhom2交叉反应。

[0394] 实施例20:本发明的抗体在内源性表达iRhom2的细胞系中的结合特异性的评估

[0395] 在本研究中,在内源性表达iRhom2的细胞系中,对导致作为本发明的抗体3、16、22和42的代表性实例的本发明抗体16的杂交瘤上清液以及作为本发明的抗体16、22和42的代表性实例的本发明抗体16进行结合特异性分析。对RPMI-8226细胞(即内源性表达iRhom2但对iRhom1呈内源性阴性的人B淋巴细胞系)、THP-1细胞(即内源性表达iRhom2和iRhom1两者的人单核细胞系)以及RH-30细胞(即对iRhom2呈内源性阴性但内源性表达iRhom1的人成纤维细胞系)进行研究。

[0396] 简而言之,将人RPMI-8226细胞(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen,德国)、THP-1细胞(美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection),USA)和RH-30细胞(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen,德国)用含10mM EDTA的PBS收获,洗涤并重悬于FACS缓冲液(PBS,3%FBS,0.05%叠氮化钠)中,并且以约$2\times10^5$个细胞/孔接种到Nunc U形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)中。为了沉淀细胞并除去上清液,将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟。对于初级染色,使细胞重悬于每孔100μl的单独FACS缓冲液(对照)、用FACS缓冲液以1:60稀释的杂交瘤上清液(即导致本发明抗体3、16、22和42的原材料)、或3μg/ml的本发明抗体16、22和42的FACS缓冲液,并在冰上孵育1小时。然后,将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟,并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤两次。对于二次染色,将细胞离心并重悬于每孔100μl的用FACS缓冲液以1:100稀释的PE缀合的山羊抗小鼠IgG F(ab')2或山羊抗人IgG F(ab')2检测片段(Dianova,德国)中。避光,将细胞悬浮液在冰上孵育1小时。然后,将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟,并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤三次。最后,将细胞重悬于每孔150μl的FACS缓冲液中,并使用BD AccuriTM C6 Plus流式细胞仪(Becton Dickinson,德国)分析。

[0397] 图20a&20b显示本研究的代表性结果。与仅与第二抗体一起孵育的对照样品(20a&20b,灰色)相比,将RPMI-8226和THP-1细胞两者(这两者均内源性表达iRhom2)与导致作为本发明的抗体3、16、22和42的代表性实例的抗体16的杂交瘤上清液(20a,左侧&中间,黑色)或作为本发明的抗体16、22和42的代表性实例的抗体16(图20b,左侧&中间,黑色)共孵育导致了两种细胞系中相对荧光强度的较强偏移,表明导致抗体16的原材料以及本发明抗体16均与对iRhom2呈内源性阳性的两种人细胞系的较强结合。相比之下,检测不到导致作为本发明的抗体3、16、22和42的代表性实例的抗体16的原材料(20a,右侧,黑色)或作为本发明的抗体16、22和42的代表性实例的抗体16(图20b,右侧,黑色)与不表达iRhom2的RH-30细胞的结合,提供了内源性表达的iRhom2被导致本发明抗体16的原材料以及本发明抗体16两者特异性识别的证据。针对内源表达的蛋白质,iRhom2与iRhom1的前述特异性在图20b中对于抗体16的鼠(上图)和嵌合(下图)形式而言示出。

[0398] 实施例21:基于iRhom2在大胞外环中心区的N末端的家族成员特异性序列变异的本发明抗体的表位作图

[0399] 与实施例15和16互补,在第三种方法中设计了用于一组23种具有人iRhom1相关的单氨基酸取代的人iRhom2变体的质粒,以鉴定对本发明抗体的结合作出贡献的单个氨基酸。这些23种取代反映了人iRhom2与人iRhom1中不相同的大胞外环1中心区的N末端氨基酸。代替人iRhom2的氨基酸,引入人iRhom1的对应位置处的氨基酸,导致变体hiR2-FL-A431S-T7、hiR2-FL-V434E-T7、hiR2-FL-T436V-T7、hiR2-FL-Q437D-T7、hiR2-FL-L438S-T7、hiR2-FL-S448N-T7、hiR2-FL-I452V-T7、hiR2-FL-I464E-T7、hiR2-FL-D465A-T7、hiR2-FL-

I477M-T7、hiR2-FL-K479Q-T7、hiR2-FL-G481P-T7、hiR2-FL-I483V-T7、hiR2-FL-E484H-T7、hiR2-FL-Q485S-T7、hiR2-FL-L486F-T7、hiR2-FL-V487I-T7、hiR2-FL-R489S-T7、hiR2-FL-E490A-T7、hiR2-FL-D492E-T7、hiR2-FL-L493R-T7、hiR2-FL-R495K-T7和hiR2-FL-D496H-T7。

[0400] 本实施例描述了表达23种人iRhom1相关的单氨基酸取代变体的iRhom1/2-/-DKO MEF群体的生成，以及它们在细胞表面定位和作为正确蛋白构象的指示的功能活性方面的表征。随后，描述了对于23种表达具有人iRhom1相关的单氨基酸取代的人iRhom2变体的工程化MEF群体的整个组，本发明的纯化抗体3、5、16、22、34、42、43、44、48和50的结合分析。

[0401] 稳定表达23种具有人iRhom1相关的单氨基酸取代的T7标记的人iRhom2变体的iRhom1/2-/-DKO MEF的生成

[0402] 简而言之，在第1天，将Phoenix-ECO细胞(美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)，USA)以$8\times10^5$个细胞/孔接种到6孔组织培养板(Greiner，德国)的标准生长培养基中，并且在37℃、5%$CO_2$下保持过夜。在第2天，将培养基用新鲜培养基替换，该新鲜培养基补充有最终浓度为25μM的氯喹(Sigma-Aldrich，USA)。应用磷酸钙法，将细胞用2μg/ml的编码C末端标记3个连续拷贝的T7表位(MASMTGGQQMG)的人iRhom2全长单氨基酸取代的pMSCV-hiR2-FL-A431S-T7、pMSCV-hiR2-FL-V434E-T7、pMSCV-hiR2-FL-T436V-T7、pMSCV-hiR2-FL-Q437D-T7、pMSCV-hiR2-FL-L438S-T7、pMSCV-hiR2-FL-S448N-T7、pMSCV-hiR2-FL-I452V-T7、pMSCV-hiR2-FL-I464E-T7、pMSCV-hiR2-FL-D465A-T7、pMSCV-hiR2-FL-I477M-T7、pMSCV-hiR2-FL-K479Q-T7、pMSCV-hiR2-FL-G481P-T7、pMSCV-hiR2-FL-I483V-T7、pMSCV-hiR2-FL-E484H-T7、pMSCV-hiR2-FL-Q485S-T7、pMSCV-hiR2-FL-L486F-T7、pMSCV-hiR2-FL-V487I-T7、pMSCV-hiR2-FL-R489S-T7、pMSCV-hiR2-FL-E490A-T7、pMSCV-hiR2-FL-D492E-T7、pMSCV-hiR2-FL-L493R-T7、pMSCV-hiR2-FL-R495K-T7和pMSCV-hiR2-FL-D496H-T7转染，并保持于37℃、5%$CO_2$。在7小时后，通过用缺乏氯喹的标准生长培养基替换细胞上清液来停止转染，并将细胞在37℃、5%$CO_2$下孵育过夜以允许病毒产生。平行地，将作为用于逆转录病毒感染的靶细胞的永生化iRhom1/2-/-DKO MEF以$1\times10^5$个细胞/孔接种到6孔组织培养板(Greiner，德国)的标准生长培养基中，并且也在37℃、5%$CO_2$下保持过夜。在第3天，收集释放pMSCV-hiR2-FL-A431S-T7、pMSCV-hiR2-FL-V434E-T7、pMSCV-hiR2-FL-T436V-T7、pMSCV-hiR2-FL-Q437D-T7、pMSCV-hiR2-FL-L438S-T7、pMSCV-hiR2-FL-S448N-T7、pMSCV-hiR2-FL-I452V-T7、pMSCV-hiR2-FL-I464E-T7、pMSCV-hiR2-FL-D465A-T7、pMSCV-hiR2-FL-I477M-T7、pMSCV-hiR2-FL-K479Q-T7、pMSCV-hiR2-FL-G481P-T7、pMSCV-hiR2-FL-I483V-T7、pMSCV-hiR2-FL-E484H-T7、pMSCV-hiR2-FL-Q485S-T7、pMSCV-hiR2-FL-L486F-T7、pMSCV-hiR2-FL-V487I-T7、pMSCV-hiR2-FL-R489S-T7、pMSCV-hiR2-FL-E490A-T7、pMSCV-hiR2-FL-D492E-T7、pMSCV-hiR2-FL-L493R-T7、pMSCV-hiR2-FL-R495K-T7和pMSCV-hiR2-FL-D496H-T7同向性病毒的Phoenix-ECO细胞的上清液，用0.45μm CA过滤器过滤，并且补充4μg/ml聚凝胺(Sigma-Aldrich，USA)。在从永生化iRhom1/2-/-DKO MEF除去培养基后，将这些上清液添加到靶细胞中，在37℃、5%$CO_2$下保持4小时用于第一感染。同时，将Phoenix-ECO细胞与新鲜培养基一起再孵育，再过4小时后，过滤，并且同样在4μg/ml聚凝胺的存在下用于相应靶细胞群的第二感染。同样，进行第三感染循环但过夜。在第4天，用新鲜的标准生长培养基替换含有病毒的细胞上清液。从第5天起，

使细胞在2mg/ml遗传霉素(G418,Thermo Fisher Scientific,USA)的存在下生长,以选择稳定表达C末端标记3个连续拷贝的T7表位的人iRhom2全长单氨基酸取代的永生化MEF-DKO-hiR2-FL-A431S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-V434E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T436V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q437D-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L438S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S448N-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I452V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I464E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D465A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I477M-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K479Q-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G481P-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I483V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E484H-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q485S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L486F-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-V487I-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R489S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E490A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D492E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L493R-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R495K-T7和MEF-DKO-hiR2-FL-D496H-T7细胞。在增殖后,将细胞储存以备将来使用。

[0403] 用于测试系统验证的FACS分析

[0404] 简而言之,将永生化MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7细胞以及MEF-DKO-hiR2-FL-A431S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-V434E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T436V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q437D-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L438S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S448N-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I452V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I464E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D465A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I477M-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K479Q-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G481P-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I483V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E484H-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q485S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L486F-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-V487I-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R489S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E490A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D492E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L493R-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R495K-T7和MEF-DKO-hiR2-FL-D496H-T7细胞用含10mM EDTA的PBS收获,洗涤并重悬于FACS缓冲液(PBS,3%FBS,0.05%叠氮化钠)中,并且以约$1\times10^5$个细胞/孔接种到Nunc U形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)中。为了沉淀细胞并除去上清液,将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟。对于初级染色,使细胞重悬于每孔100μl的单独FACS缓冲液(对照)、或者3μg/ml的FACS缓冲液中的小鼠单克隆抗T7 IgG(Merck Millipore,USA)中,并在冰上孵育1小时。然后,将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟,并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤两次。对于二次染色,将细胞离心并重悬于每孔100μl的用FACS缓冲液以1:100稀释的PE缀合的山羊抗小鼠IgG F(ab')2检测片段(Dianova,德国)中。避光,将细胞悬浮液在冰上孵育1小时。然后,将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟,并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤三次。最后,将细胞重悬于每孔150μl的FACS缓冲液中,并使用BD AccuriTM C6 Plus流式细胞仪(Becton Dickinson,德国)分析。

[0405] 图21a示例性地显示人iRhom2变体hiR2-FL-S448N-T7的本实验的代表性结果。抗T7标签抗体(黑色)和抗小鼠IgG第二抗体(灰色)对MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7(左侧)和MEF-DKO-hiR2-FL-S448N-T7细胞(右侧)的结合分析揭示了相对荧光强度的相对较强的增加。这表明,类似于人iRhom2野生型(左侧),人iRhom2变体hiR2-FL-S448N-T7同样良好地表达并位于这些细胞的表面上(右侧)。对于在MEF-DKO-hiR2-FL-A431S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-V434E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T436V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q437D-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L438S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I452V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I464E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D465A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I477M-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K479Q-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-

G481P-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I483V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E484H-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q485S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L486F-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-V487I-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R489S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E490A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D492E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L493R-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R495K-T7和MEF-DKO-hiR2-FL-D496H-T7细胞上表达的其他人iRhom2全长单氨基酸取代的表达和定位，获得了类似的结果。

[0406] 用于测试系统验证的TGFαELISA

[0407] 为了测试所有23种具有人iRhom1特异性单氨基酸取代的人iRhom2变体，使如以上实施例所述生成的稳定表达这些变体的相应MEF-DKO细胞系经受TGFα脱落ELISA分析。为了表明所有变体的功能性作为这些变体被正确折叠的指示，评估PMA诱导的核转染TGFα的释放。由于本分析中使用的细胞是iRhom1/2-/-双敲除小鼠胚胎成纤维细胞(实施例11中所述)的挽救变体——其由具有人iRhom1特异性单氨基酸取代或缺失的相应人iRhom2变体挽救，稳定表达的iRhom2变体是在这些细胞中表达的仅有iRhom蛋白，并因此是这些细胞中唯一对脱落TGFα作出贡献的iRhom。

[0408] 简而言之，在第1天，将Nunc black MaxiSorp®96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)用每孔100μl的小鼠抗人TGFα捕获抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以400ng/ml TBS在4℃下包被过夜。在使用4D-Nucleofector系统(Lonza,瑞士)，用pcDNA3.1载体骨架中的hTGFα-FL-WT构建体电穿孔MEF-DKO-hiR2-FL-A431S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-V434E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T436V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q437D-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L438S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S448N-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I452V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I464E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D465A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I477M-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K479Q-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G481P-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I483V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E484H-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q485S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L486F-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-V487I-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R489S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E490A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D492E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L493R-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R495K-T7和MEF-DKO-hiR2-FL-D496H-T7细胞之后，将约35,000个携带具有人iRhom1特异性单氨基酸取代或缺失的人iRhom2变体的MEF-DKO细胞接种到F形底96孔细胞培养板(Thermo Fisher Scientific,USA)的各孔的100μl正常生长培养基中。在第2天，除去捕获抗体溶液，并将MaxiSorp®板用每孔300μl的TBS、1％BSA在室温下封闭至少1小时。同时，将细胞用PBS洗涤一次，以及然后每孔添加80μl的OptiMEM培养基(Thermo Fisher Scientific,USA)。

[0409] 随后，在37℃、5％$CO_2$下，将细胞(未刺激的对照的那些除外)用每孔20μl的PMA(Sigma-Aldrich,USA)以25ng/ml的最终浓度刺激1小时。将20μl的OptiMEM培养基添加到未刺激的对照细胞中。然后，将96孔板离心以沉淀细胞。平行地，从MaxiSorp®板除去封闭缓冲液，并将板在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次。为了避免干燥，将30μl的TBS立即添加到MaxiSorp®板的各孔中，随后每样品转移70μl的无细胞上清液。然后，将每孔100μl的生物素化山羊抗人TGFα检测抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以37.5ng/ml TBS添加，避直射光，将板在室温下孵育2小时。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后，将100μl的用TBS以1:10,000稀释的链霉亲和素-AP(R&D Systems,USA)添加至各孔中，再次避直射光，将板在室温下孵育30分钟。在96头

板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤另一轮4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后,添加每孔100μl的AttoPhos底物溶液(Promega,USA)以在室温下暗处孵育1小时。使用infinite M1000(Tecan Group,瑞士)酶标仪,在435nm的激发波长和555nm的发射波长下收集各孔的荧光。

[0410] 图21b显示这些TGFα释放测定的结果,表明所有23种具有人iRhom1特异性单氨基酸取代的人iRhom2变体均在TGFα脱落可被PMA诱导时呈功能活性,指示这些变体正确折叠,与未检测到PMA诱导的TGFα脱落的空载体(EV)阴性对照群体形成对照。

[0411] 表征本发明的纯化的抗体的结合的FACS分析以用于表位作图目的

[0412] 简而言之,将永生化MEF-DKO-hiR2-FL-A431S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-V434E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T436V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q437D-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L438S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S448N-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I452V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I464E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D465A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I477M-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K479Q-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G481P-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I483V-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E484H-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q485S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L486F-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-V487I-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R489S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E490A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D492E-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L493R-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R495K-T7和MEF-DKO-hiR2-FL-D496H-T7细胞用含10mM EDTA的PBS收获,洗涤并重悬于FACS缓冲液(PBS,3%FBS,0.05%叠氮化钠)中,并且以约$1\times10^5$个细胞/孔接种到Nunc U形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)中。为了沉淀细胞并除去上清液,将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟。对于初级染色,使细胞重悬于每孔100μl的单独FACS缓冲液(对照)、或3μg/ml的FACS缓冲液中的本发明纯化抗体3、5、16、22、34、42、43、44、48和50中,并在冰上孵育1小时。然后,将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟,并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤两次。对于二次染色,将细胞离心并重悬于每孔100μl的用FACS缓冲液以1:100稀释的PE缀合的山羊抗小鼠IgG F(ab')2检测片段(Dianova,德国)中。避光,将细胞悬浮液在冰上孵育1小时。然后,将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟,并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤三次。最后,将细胞重悬于每孔150μl的FACS缓冲液中,并使用BD AccuriTM C6 Plus流式细胞仪(Becton Dickinson,德国)分析。

[0413] 图22a显示本实验的代表性结果。对于23种具有人iRhom1相关的单氨基酸取代的人iRhom2变体的整个组,示例性地,显示了用于分析表达人iRhom2变体hiR2-FL-S448N-T7的细胞的数据。作为对TNFα释放具有抑制效应的本发明抗体的代表性实例的抗体5(黑色,上图)或对TNFα释放没有抑制效应的抗体50(黑色,下图)以及抗小鼠IgG第二抗体(灰色)对MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7细胞(左侧)和MEF-DKO-hiR2-FL-S448N-T7细胞(右侧)的结合分析表明,人iRhom2的单氨基酸丝氨酸448用天冬酰胺取代不削弱,并因此不对于对TNFα释放具有抑制效应的本发明抗体5的结合作出贡献(右侧,上图)。同样,其不影响,并且因此不对于对TNFα释放没有抑制效应的抗体50的结合作出贡献(右侧,下图)。对于两种抗体,与MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7细胞(左侧)的结合充当阳性对照。

[0414] 图22b汇总了——在图22a的扩展中——对于23种表达具有人iRhom1特异性单氨基酸取代的人iRhom2变体的工程化MEF群体的整个组,对TNFα释放具有抑制效应的本发明的抗体3、5、16、22、34、42、43和44相对于对TNFα释放没有抑制效应的抗体48和50的FACS分析的结果。每种抗体与人iRhom2野生型的结合被认为是100%。与任何变体结合的抗体的

30-59％相应下降由展示为浅灰色(并用“1”标记)的细胞指示,60-95％的受损结合由灰色(并用“2”标记)的细胞指示,≥95％的结合损失由深灰色细胞(用“3”标记)突出显示。这些数据揭示,在本方法中分析的iRhom1特异性单氨基酸取代没有一者与对TNFα释放具有抑制效应的本发明的抗体3、5、16、22、34、42、43和44对人iRhom2的结合有关。相比之下,它们中的一些对于对TNFα释放没有抑制效应的抗体48和50的结合作出贡献。

[0415] 实施例22:基于iRhom2在大胞外环中心区的C末端、环5中以及C末端中的家族成员特异性序列变异的本发明抗体的表位作图

[0416] 与实施例15和16而且与上述实施例21互补,在第四种方法中设计了用于一组33种具有人iRhom1相关的单氨基酸取代的人iRhom2变体的质粒,以鉴定对本发明抗体的结合作出贡献的单个氨基酸。这33种取代反映人iRhom2与人iRhom1中不相同的大胞外环1中心区的C末端、环5中以及C末端中的氨基酸。代替人iRhom2的氨基酸,引入人iRhom1的对应位置处的氨基酸,导致变体hiR2-FL-G563D-T7、hiR2-FL-A564P-T7、hiR2-FL-I566E-T7、hiR2-FL-D569E-T7、hiR2-FL-E579K-T7、hiR2-FL-Q580N-T7、hiR2-FL-A581S-T7、hiR2-FL-R582A-T7、hiR2-FL-S583G-T7、hiR2-FL-G587N-T7、hiR2-FL-F588H-T7、hiR2-FL-L589P-T7、hiR2-FL-E594V-T7、hiR2-FL-K596T-T7、hiR2-FL-S607R-T7、hiR2-FL-T612S-T7、hiR2-FL-E617D-T7、hiR2-FL-H620R-T7、hiR2-FL-L636M-T7、hiR2-FL-K638D-T7、hiR2-FL-I771F-T7、hiR2-FL-I825V-T7、hiR2-FL-I828V-T7、hiR2-FL-N829R-T7、hiR2-FL-W830C-T7、hiR2-FL-P831E-T7、hiR2-FL-I833C-T7、hiR2-FL-H835F-T7、hiR2-FL-F839I-T7、hiR2-FL-S843D-T7、hiR2-FL-Q853A-T7、hiR2-FL-V854Q-T7和hiR2-FL-R844K-T7。

[0417] 本实施例描述了表达33种人iRhom1相关的单氨基酸取代变体的iRhom1/2-/-DKO MEF群体的生成,以及它们在细胞表面定位和作为正确蛋白构象的指示的功能活性方面的表征。随后,描述了对于33种表达具有人iRhom1相关的单氨基酸取代的人iRhom2变体的工程化MEF群体的整个组,本发明的纯化抗体3、5、16、22、34、42、43、44、48和50的结合分析。

[0418] 稳定表达33种具有人iRhom1相关的单氨基酸取代的T7标记的人iRhom2变体的iRhom1/2-/-DKO MEF的生成

[0419] 简而言之,在第1天,将Phoenix-ECO细胞(美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection),USA)以$8\times10^5$个细胞/孔接种到6孔组织培养板(Greiner,德国)的标准生长培养基中,并且在37℃、5％$CO_2$下保持过夜。在第2天,将培养基用新鲜培养基替换,该新鲜培养基补充有最终浓度为25μM的氯喹(Sigma-Aldrich,USA)。应用磷酸钙法,将细胞用2μg/ml的编码C末端标记3个连续拷贝的T7表位(MASMTGGQQMG)的人iRhom2全长单氨基酸取代的pMSCV hiR2-FL-G563D-T7、pMSCV hiR2-FL-A564P-T7、pMSCV hiR2-FL-I566E-T7、pMSCV hiR2-FL-D569E-T7、pMSCV hiR2-FL-E579K-T7、pMSCV hiR2-FL-Q580N-T7、pMSCV hiR2-FL-A581S-T7、pMSCV hiR2-FL-R582A-T7、pMSCV hiR2-FL-S583G-T7、pMSCV hiR2-FL-G587N-T7、pMSCV hiR2-FL-F588H-T7、pMSCV hiR2-FL-L589P-T7、pMSCV hiR2-FL-E594V-T7、pMSCV hiR2-FL-K596T-T7、pMSCV hiR2-FL-S607R-T7、pMSCV hiR2-FL-T612S-T7、pMSCV hiR2-FL-E617D-T7、pMSCV hiR2-FL-H620R-T7、pMSCV hiR2-FL-L636M-T7、pMSCV hiR2-FL-K638D-T7、pMSCV hiR2-FL-I771F-T7、pMSCV hiR2-FL-I825V-T7、pMSCV hiR2-FL-I828V-T7、pMSCV hiR2-FL-N829R-T7、pMSCV hiR2-FL-W830C-T7、pMSCV hiR2-FL-P831E-T7、pMSCV hiR2-FL-I833C-T7、pMSCV hiR2-FL-H835F-T7、pMSCV hiR2-FL-F839I-T7、pMSCV

hiR2-FL-S843D-T7、pMSCV hiR2-FL-Q853A-T7、pMSCV hiR2-FL-V854Q-T7和pMSCV hiR2-FL-R844K-T7转染，并保持于37℃、5％$CO_2$。在7小时后，通过用缺乏氯喹的标准生长培养基替换细胞上清液来停止转染，并将细胞在37℃、5％$CO_2$下孵育过夜以允许病毒产生。平行地，将作为用于逆转录病毒感染的靶细胞的永生化iRhom1/2-/-DKO MEF以$1\times10^5$个细胞/孔接种到6孔组织培养板(Greiner，德国)的标准生长培养基中，并且也在37℃、5％$CO_2$下保持过夜。在第3天，收集释放pMSCV hiR2-FL-G563D-T7、pMSCV hiR2-FL-A564P-T7、pMSCV hiR2-FL-I566E-T7、pMSCV hiR2-FL-D569E-T7、pMSCV hiR2-FL-E579K-T7、pMSCV hiR2-FL-Q580N-T7、pMSCV hiR2-FL-A581S-T7、pMSCV hiR2-FL-R582A-T7、pMSCV hiR2-FL-S583G-T7、pMSCV hiR2-FL-G587N-T7、pMSCV hiR2-FL-F588H-T7、pMSCV hiR2-FL-L589P-T7、pMSCV hiR2-FL-E594V-T7、pMSCV hiR2-FL-K596T-T7、pMSCV hiR2-FL-S607R-T7、pMSCV hiR2-FL-T612S-T7、pMSCV hiR2-FL-E617D-T7、pMSCV hiR2-FL-H620R-T7、pMSCV hiR2-FL-L636M-T7、pMSCV hiR2-FL-K638D-T7、pMSCV hiR2-FL-I771F-T7、pMSCV hiR2-FL-I825V-T7、pMSCV hiR2-FL-I828V-T7、pMSCV hiR2-FL-N829R-T7、pMSCV hiR2-FL-W830C-T7、pMSCV hiR2-FL-P831E-T7、pMSCV hiR2-FL-I833C-T7、pMSCV hiR2-FL-H835F-T7、pMSCV hiR2-FL-F839I-T7、pMSCV hiR2-FL-S843D-T7、pMSCV hiR2-FL-Q853A-T7、pMSCV hiR2-FL-V854Q-T7和pMSCV hiR2-FL-R844K-T7同向性病毒的Phoenix-ECO细胞的上清液，用0.45μm CA过滤器过滤，并且补充4μg/ml聚凝胺(Sigma-Aldrich，USA)。在从永生化iRhom1/2-/-DKO MEF除去培养基后，将这些上清液添加到靶细胞中，在37℃、5％$CO_2$下保持4小时用于第一感染。同时，将Phoenix-ECO细胞与新鲜培养基一起再孵育，再过4小时后，过滤，并且同样在4μg/ml聚凝胺的存在下用于相应靶细胞群的第二感染。同样，进行第三感染循环但过夜。在第4天，用新鲜的标准生长培养基替换含有病毒的细胞上清液。从第5天起，使细胞在2mg/ml遗传霉素(G418，Thermo Fisher Scientific，USA)的存在下生长，以选择稳定表达C末端标记3个连续拷贝的T7表位的人iRhom2全长单氨基酸取代的永生化MEF-DKO hiR2-FL-G563D-T7、MEF-DKO hiR2-FL-A564P-T7、MEF-DKO hiR2-FL-I566E-T7、MEF-DKO hiR2-FL-D569E-T7、MEF-DKO hiR2-FL-E579K-T7、MEF-DKO hiR2-FL-Q580N-T7、MEF-DKO hiR2-FL-A581S-T7、MEF-DKO hiR2-FL-R582A-T7、MEF-DKO hiR2-FL-S583G-T7、MEF-DKO hiR2-FL-G587N-T7、MEF-DKO hiR2-FL-F588H-T7、MEF-DKO hiR2-FL-L589P-T7、MEF-DKO hiR2-FL-E594V-T7、MEF-DKO hiR2-FL-K596T-T7、MEF-DKO hiR2-FL-S607R-T7、MEF-DKO hiR2-FL-T612S-T7、MEF-DKO hiR2-FL-E617D-T7、MEF-DKO hiR2-FL-H620R-T7、MEF-DKO hiR2-FL-L636M-T7、MEF-DKO hiR2-FL-K638D-T7、MEF-DKO hiR2-FL-I771F-T7、MEF-DKO hiR2-FL-I825V-T7、MEF-DKO hiR2-FL-I828V-T7、MEF-DKO hiR2-FL-N829R-T7、MEF-DKO hiR2-FL-W830C-T7、MEF-DKO hiR2-FL-P831E-T7、MEF-DKO hiR2-FL-I833C-T7、MEF-DKO hiR2-FL-H835F-T7、MEF-DKO hiR2-FL-F839I-T7、MEF-DKO hiR2-FL-S843D-T7、MEF-DKO hiR2-FL-Q853A-T7、MEF-DKO hiR2-FL-V854Q-T7和MEF-DKO hiR2-FL-R844K-T7细胞。在增殖后，将细胞储存以备将来使用。

[0420] 用于测试系统验证的FACS分析

[0421] 简而言之，将永生化MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7细胞以及MEF-DKO hiR2-FL-G563D-T7、MEF-DKO hiR2-FL-A564P-T7、MEF-DKO hiR2-FL-I566E-T7、MEF-DKO hiR2-FL-D569E-T7、MEF-DKO hiR2-FL-E579K-T7、MEF-DKO hiR2-FL-Q580N-T7、MEF-DKO hiR2-FL-A581S-

T7、MEF-DKO hiR2-FL-R582A-T7、MEF-DKO hiR2-FL-S583G-T7、MEF-DKO hiR2-FL-G587N-T7、MEF-DKO hiR2-FL-F588H-T7、MEF-DKO hiR2-FL-L589P-T7、MEF-DKO hiR2-FL-E594V-T7、MEF-DKO hiR2-FL-K596T-T7、MEF-DKO hiR2-FL-S607R-T7、MEF-DKO hiR2-FL-T612S-T7、MEF-DKO hiR2-FL-E617D-T7、MEF-DKO hiR2-FL-H620R-T7、MEF-DKO hiR2-FL-L636M-T7、MEF-DKO hiR2-FL-K638D-T7、MEF-DKO hiR2-FL-I771F-T7、MEF-DKO hiR2-FL-I825V-T7、MEF-DKO hiR2-FL-I828V-T7、MEF-DKO hiR2-FL-N829R-T7、MEF-DKO hiR2-FL-W830C-T7、MEF-DKO hiR2-FL-P831E-T7、MEF-DKO hiR2-FL-I833C-T7、MEF-DKO hiR2-FL-H835F-T7、MEF-DKO hiR2-FL-F839I-T7、MEF-DKO hiR2-FL-S843D-T7、MEF-DKO hiR2-FL-Q853A-T7、MEF-DKO hiR2-FL-V854Q-T7和MEF-DKO hiR2-FL-R844K-T7细胞用含10mM EDTA的PBS收获，洗涤并重悬于FACS缓冲液(PBS，3％FBS，0.05％叠氮化钠)中，并且以约$1\times10^5$个细胞/孔接种到Nunc U形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)中。为了沉淀细胞并除去上清液，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟。对于初级染色，使细胞重悬于每孔100μl的单独FACS缓冲液(对照)或者3μg/ml的FACS缓冲液中的小鼠单克隆抗T7 IgG(Merck Millipore,USA)中，并在冰上孵育1小时。然后，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟，并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤两次。对于二次染色，将细胞离心并重悬于每孔100μl的用FACS缓冲液以1:100稀释的PE缀合的山羊抗小鼠IgG F(ab')2检测片段(Dianova,德国)中。避光，将细胞悬浮液在冰上孵育1小时。然后，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟，并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤三次。最后，将细胞重悬于每孔150μl的FACS缓冲液中，并使用BD AccuriTM C6 Plus流式细胞仪(Becton Dickinson,德国)分析。

[0422] 图23a示例性地显示人iRhom2变体hiR2-FL-I566E-T7的本实验的代表性结果。抗T7标签抗体(黑色)和抗小鼠IgG第二抗体(灰色)对MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7(左侧)和MEF-DKO-hiR2-FL-I566E-T7细胞(右侧)的结合分析揭示了相对荧光强度的相对较强的增加。这表明，类似于人iRhom2野生型(左侧)，人iRhom2变体hiR2-FL-I566E-T7同样良好地表达并位于这些细胞的表面上(右侧)。对于在MEF-DKO hiR2-FL-G563D-T7、MEF-DKO hiR2-FL-A564P-T7、MEF-DKO hiR2-FL-D569E-T7、MEF-DKO hiR2-FL-E579K-T7、MEF-DKO hiR2-FL-Q580N-T7、MEF-DKO hiR2-FL-A581S-T7、MEF-DKO hiR2-FL-R582A-T7、MEF-DKO hiR2-FL-S583G-T7、MEF-DKO hiR2-FL-G587N-T7、MEF-DKO hiR2-FL-F588H-T7、MEF-DKO hiR2-FL-L589P-T7、MEF-DKO hiR2-FL-E594V-T7、MEF-DKO hiR2-FL-K596T-T7、MEF-DKO hiR2-FL-S607R-T7、MEF-DKO hiR2-FL-T612S-T7、MEF-DKO hiR2-FL-E617D-T7、MEF-DKO hiR2-FL-H620R-T7、MEF-DKO hiR2-FL-L636M-T7、MEF-DKO hiR2-FL-K638D-T7、MEF-DKO hiR2-FL-I771F-T7、MEF-DKO hiR2-FL-I825V-T7、MEF-DKO hiR2-FL-I828V-T7、MEF-DKO hiR2-FL-N829R-T7、MEF-DKO hiR2-FL-W830C-T7、MEF-DKO hiR2-FL-P831E-T7、MEF-DKO hiR2-FL-I833C-T7、MEF-DKO hiR2-FL-H835F-T7、MEF-DKO hiR2-FL-F839I-T7、MEF-DKO hiR2-FL-S843D-T7、MEF-DKO hiR2-FL-Q853A-T7、MEF-DKO hiR2-FL-V854Q-T7和MEF-DKO hiR2-FL-R844K-T7细胞上表达的其他人iRhom2全长单氨基酸取代的表达和定位，获得了类似的结果。

[0423] 用于测试系统验证的TGFαELISA

[0424] 为了测试所有33种具有人iRhom1特异性单氨基酸取代的人iRhom2变体，使如以上实施例所述生成的稳定表达这些变体的相应MEF-DKO细胞系经受TGFα脱落ELISA分析。为了

表明所有变体的功能性作为这些变体被正确折叠的指示，评估PMA诱导的核转染TGFα的释放。由于本分析中使用的细胞是iRhom1/2-/-双敲除小鼠胚胎成纤维细胞(实施例11中所述)的挽救变体——其由具有人iRhom1特异性单氨基酸取代或缺失的相应人iRhom2变体挽救，稳定表达的iRhom2变体是在这些细胞中表达的唯一iRhom蛋白，并因此是这些细胞中唯一对脱落TGFα作出贡献的iRhom。

[0425] 简而言之，在第1天，将Nunc black MaxiSorp®96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)用每孔100μl的小鼠抗人TGFα捕获抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以400ng/ml TBS在4℃下包被过夜。在使用4D-Nucleofector系统(Lonza,瑞士)，用pcDNA3.1载体骨架中的hTGFα-FL-WT构建体电穿孔MEF-DKO hiR2-FL-G563D-T7、MEF-DKO hiR2-FL-A564P-T7、MEF-DKO hiR2-FL-I566E-T7、MEF-DKO hiR2-FL-D569E-T7、MEF-DKO hiR2-FL-E579K-T7、MEF-DKO hiR2-FL-Q580N-T7、MEF-DKO hiR2-FL-A581S-T7、MEF-DKO hiR2-FL-R582A-T7、MEF-DKO hiR2-FL-S583G-T7、MEF-DKO hiR2-FL-G587N-T7、MEF-DKO hiR2-FL-F588H-T7、MEF-DKO hiR2-FL-L589P-T7、MEF-DKO hiR2-FL-E594V-T7、MEF-DKO hiR2-FL-K596T-T7、MEF-DKO hiR2-FL-S607R-T7、MEF-DKO hiR2-FL-T612S-T7、MEF-DKO hiR2-FL-E617D-T7、MEF-DKO hiR2-FL-H620R-T7、MEF-DKO hiR2-FL-L636M-T7、MEF-DKO hiR2-FL-K638D-T7、MEF-DKO hiR2-FL-I771F-T7、MEF-DKO hiR2-FL-I825V-T7、MEF-DKO hiR2-FL-I828V-T7、MEF-DKO hiR2-FL-N829R-T7、MEF-DKO hiR2-FL-W830C-T7、MEF-DKO hiR2-FL-P831E-T7、MEF-DKO hiR2-FL-I833C-T7、MEF-DKO hiR2-FL-H835F-T7、MEF-DKO hiR2-FL-F839I-T7、MEF-DKO hiR2-FL-S843D-T7、MEF-DKO hiR2-FL-Q853A-T7、MEF-DKO hiR2-FL-V854Q-T7和MEF-DKO hiR2-FL-R844K-T7细胞之后，将约35,000个携带具有人iRhom1特异性单氨基酸取代或缺失的人iRhom2变体的MEF-DKO细胞接种到F形底96孔细胞培养板(Thermo Fisher Scientific,USA)的各孔的100μl正常生长培养基中。在第2天，除去捕获抗体溶液，并将MaxiSorp®板用每孔300μl的TBS、1％BSA在室温下封闭至少1小时。同时，将细胞用PBS洗涤一次，以及然后每孔添加80μl的OptiMEM培养基(Thermo Fisher Scientific,USA)。

[0426] 随后，在37℃、5％$CO_2$下，将细胞(未刺激的对照的那些除外)用每孔20μl的PMA(Sigma-Aldrich,USA)以25ng/ml的最终浓度刺激1小时。将20μl的OptiMEM培养基添加到未刺激的对照细胞中。然后，将96孔板离心以沉淀细胞。平行地，从MaxiSorp®板除去封闭缓冲液，并将板在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次。为了避免干燥，将30μl的TBS立即添加到MaxiSorp®板的各孔中，随后每样品转移70μl的无细胞上清液。然后，将每孔100μl的生物素化山羊抗人TGFα检测抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以37.5ng/ml TBS添加，避直射光，将板在室温下孵育2小时。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后，将100μl的用TBS以1:10,000稀释的链霉亲和素-AP(R&D Systems,USA)添加至各孔中，以及再次避直射光，将板在室温下孵育30分钟。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤另一轮4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后，添加每孔100μl的AttoPhos底物溶液(Promega,USA)以在室温下暗处孵育1小时。使用infinite M1000(Tecan Group,瑞士)酶标仪，在435nm的激发波长和555nm的发射波长下收集各孔的荧光。

[0427] 图23b显示这些TGFα释放测定的结果，表明所有33种具有人iRhom1特异性单氨基酸取代的人iRhom2变体均在TGFα脱落可被PMA诱导时呈功能活性，指示这些变体正确折叠，与未检测到PMA诱导的TGFα脱落的空载体(EV)阴性对照群体形成对照。

[0428] 表征本发明的纯化的抗体的结合的FACS分析以用于表位作图目的

[0429] 简而言之，将永生化MEF-DKO hiR2-FL-G563D-T7、MEF-DKO hiR2-FL-A564P-T7、MEF-DKO hiR2-FL-I566E-T7、MEF-DKO hiR2-FL-D569E-T7、MEF-DKO hiR2-FL-E579K-T7、MEF-DKO hiR2-FL-Q580N-T7、MEF-DKO hiR2-FL-A581S-T7、MEF-DKO hiR2-FL-R582A-T7、MEF-DKO hiR2-FL-S583G-T7、MEF-DKO hiR2-FL-G587N-T7、MEF-DKO hiR2-FL-F588H-T7、MEF-DKO hiR2-FL-L589P-T7、MEF-DKO hiR2-FL-E594V-T7、MEF-DKO hiR2-FL-K596T-T7、MEF-DKO hiR2-FL-S607R-T7、MEF-DKO hiR2-FL-T612S-T7、MEF-DKO hiR2-FL-E617D-T7、MEF-DKO hiR2-FL-H620R-T7、MEF-DKO hiR2-FL-L636M-T7、MEF-DKO hiR2-FL-K638D-T7、MEF-DKO hiR2-FL-I771F-T7、MEF-DKO hiR2-FL-I825V-T7、MEF-DKO hiR2-FL-I828V-T7、MEF-DKO hiR2-FL-N829R-T7、MEF-DKO hiR2-FL-W830C-T7、MEF-DKO hiR2-FL-P831E-T7、MEF-DKO hiR2-FL-I833C-T7、MEF-DKO hiR2-FL-H835F-T7、MEF-DKO hiR2-FL-F839I-T7、MEF-DKO hiR2-FL-S843D-T7、MEF-DKO hiR2-FL-Q853A-T7、MEF-DKO hiR2-FL-V854Q-T7和MEF-DKO hiR2-FL-R844K-T7细胞用含10mM EDTA的PBS收获，洗涤并重悬于FACS缓冲液(PBS，3％FBS，0.05％叠氮化钠)中，并且以约$1\times10^5$个细胞/孔接种到Nunc U形底96孔板(Thermo Fisher Scientific，USA)中。为了沉淀细胞并除去上清液，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟。对于初级染色，使细胞重悬于每孔100μl的单独FACS缓冲液(对照)、或3μg/ml的FACS缓冲液中的本发明纯化抗体3、5、16、22、34、42、43、44、48和50中，并在冰上孵育1小时。然后，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟，并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤两次。对于二次染色，将细胞离心并重悬于每孔100μl的用FACS缓冲液以1:100稀释的PE缀合的山羊抗小鼠IgG F(ab')2检测片段(Dianova，德国)中。避光，将细胞悬浮液在冰上孵育1小时。然后，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟，并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤三次。最后，将细胞重悬于每孔150μl的FACS缓冲液中，并使用BD AccuriTM C6 Plus流式细胞仪(Becton Dickinson，德国)分析。

[0430] 图24a显示本实验的代表性结果。对于33种具有人iRhom1相关的单氨基酸取代的人iRhom2变体的整个组，示例性地，显示了用于分析表达人iRhom2变体hiR2-FL-I566E-T7的细胞的数据。作为对TNFα释放具有抑制效应的本发明抗体的代表性实例的抗体5(黑色，上图)或对TNFα释放没有抑制效应的抗体50(黑色，下图)以及抗小鼠IgG第二抗体(灰色)对MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7细胞(左侧)和MEF-DKO-hiR2-FL-I566E-T7细胞(右侧)的结合分析表明，人iRhom2的单氨基酸异亮氨酸566用谷氨酸取代较强削弱，并因此对于对TNFα释放具有抑制效应的本发明抗体5的结合作出贡献(右侧，上图)。相比之下，其不影响，并且因此不对于对TNFα释放没有抑制效应的抗体50的结合作出贡献(右侧，下图)。对于两种抗体，与MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7细胞(左侧)的结合充当阳性对照。

[0431] 图24b汇总了——在图24a的扩展中——对于33种表达具有人iRhom1特异性单氨基酸取代的人iRhom2变体的工程化MEF群体的整个组，对TNFα释放具有抑制效应的本发明的抗体3、5、16、22、34、42、43和44相对于对TNFα释放没有抑制效应的抗体48和50的FACS分析的结果。每种抗体与人iRhom2野生型的结合被认为是100％。与任何变体结合的抗体的

30-59％相应下降由展示为浅灰色(并用“1”标记)的细胞指示,60-95％的受损结合由灰色(并用“2”标记)的细胞指示,≥95％的结合损失由深灰色细胞(用“3”标记)突出显示。这些数据揭示了与对TNFα释放具有抑制效应的本发明的抗体3、5、16、22、34、42、43和44与人iRhom2的结合有关的氨基酸位置的相关模式(本发明的抗体16除外),它们与对于对TNFα释放没有抑制效应的抗体48和50的结合作出贡献的氨基酸位置模式不同。

[0432] 实施例23:基于大胞外环中心区中的丙氨酸取代的本发明的抗体的表位作图

[0433] 与实施例15和16而且与上述实施例21&22互补,在第五种方法中设计了用于一组91种单氨基酸取代为丙氨酸的人iRhom2变体的质粒,以鉴定对本发明抗体的结合作出贡献的单个氨基酸。代替人iRhom2的氨基酸,在对应位置处引入氨基酸丙氨酸,导致变体hiR2-FL-N503A-T7、hiR2-FL-D504A-T7、hiR2-FL-H505A-T7、hiR2-FL-S506A-T7、hiR2-FL-G507A-T7、hiR2-FL-C508A-T7、hiR2-FL-I509A-T7、hiR2-FL-Q510A-T7、hiR2-FL-T511A-T7、hiR2-FL-Q512A-T7、hiR2-FL-R513A-T7、hiR2-FL-K514A-T7、hiR2-FL-D515A-T7、hiR2-FL-C516A-T7、hiR2-FL-S517A-T7、hiR2-FL-E518A-T7、hiR2-FL-T519A-T7、hiR2-FL-L520A-T7、hiR2-FL-A521S-T7、hiR2-FL-T522A-T7、hiR2-FL-F523A-T7、hiR2-FL-V524A-T7、hiR2-FL-K525A-T7、hiR2-FL-W526A-T7、hiR2-FL-Q527A-T7、hiR2-FL-D528A-T7、hiR2-FL-D529A-T7、hiR2-FL-T530A-T7、hiR2-FL-G531A-T7、hiR2-FL-P532A-T7、hiR2-FL-P533A-T7、hiR2-FL-M534A-T7、hiR2-FL-D535A-T7、hiR2-FL-K536A-T7、hiR2-FL-S537A-T7、hiR2-FL-D538A-T7、hiR2-FL-L539A-T7、hiR2-FL-G540A-T7、hiR2-FL-Q541A-T7、hiR2-FL-K542A-T7、hiR2-FL-R543A-T7、hiR2-FL-T544A-T7、hiR2-FL-S545A-T7、hiR2-FL-G546A-T7、hiR2-FL-A547S-T7、hiR2-FL-V548A-T7、hiR2-FL-C549A-T7、hiR2-FL-H550A-T7、hiR2-FL-Q551A-T7、hiR2-FL-D552A-T7、hiR2-FL-P553A-T7、hiR2-FL-R554A-T7、hiR2-FL-T555A-T7、hiR2-FL-C556A-T7、hiR2-FL-E557A-T7、hiR2-FL-E558A-T7、hiR2-FL-P559A-T7、hiR2-FL-A560S-T7、hiR2-FL-S561A-T7、hiR2-FL-S562A-T7、hiR2-FL-G563A-T7、hiR2-FL-A564S-T7、hiR2-FL-H565A-T7、hiR2-FL-I566A-T7、hiR2-FL-W567A-T7、hiR2-FL-P568A-T7、hiR2-FL-D569A-T7、hiR2-FL-D570A-T7、hiR2-FL-I571A-T7、hiR2-FL-T572A-T7、hiR2-FL-K573A-T7、hiR2-FL-W574A-T7、hiR2-FL-P575A-T7、hiR2-FL-I576A-T7、hiR2-FL-C577A-T7、hiR2-FL-T578A-T7、hiR2-FL-E579A-T7、hiR2-FL-Q580A-T7、hiR2-FL-A581S-T7、hiR2-FL-R582A-T7、hiR2-FL-S583A-T7、hiR2-FL-N584A-T7、hiR2-FL-H585A-T7、hiR2-FL-T586A-T7、hiR2-FL-G587A-T7、hiR2-FL-F588A-T7、hiR2-FL-L589A-T7、hiR2-FL-H590A-T7、hiR2-FL-M591A-T7、hiR2-FL-D592A-T7和hiR2-FL-C593A-T7。

[0434] 本实施例描述了表达91种单丙氨酸氨基酸取代变体的iRhom1/2-/-DKO MEF群体的生成,以及它们在细胞表面定位和作为正确蛋白构象的指示的功能活性方面的表征。随后,描述了对于91种表达单氨基酸取代为丙氨酸的人iRhom2变体的工程化MEF群体的整个组,本发明的纯化抗体3、5、16、22、34、42、43、44、48和50的结合分析。

[0435] 稳定表达91种单氨基酸取代为丙氨酸的T7标记的人iRhom2变体的iRhom1/2-/-DKO MEF的生成

[0436] 简而言之,在第1天,将Phoenix-ECO细胞(美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection),USA)以$8\times10^5$个细胞/孔接种到6孔组织培养板(Greiner,德国)的标准生长培养基中,并且在37℃、5％$CO_2$下保持过夜。在第2天,将培养基用新鲜培养

基替换，该新鲜培养基补充有最终浓度为25μM的氯喹(Sigma-Aldrich,USA)。应用磷酸钙法，将细胞用2μg/ml的编码C末端标记3个连续拷贝的T7表位(MASMTGGQQMG)的人iRhom2全长单氨基酸取代的pMSCV-hiR2-FL-N503A-T7、pMSCV-hiR2-FL-D504A-T7、pMSCV-hiR2-FL-H505A-T7、pMSCV-hiR2-FL-S506A-T7、pMSCV-hiR2-FL-G507A-T7、pMSCV-hiR2-FL-C508A-T7、pMSCV-hiR2-FL-I509A-T7、pMSCV-hiR2-FL-Q510A-T7、pMSCV-hiR2-FL-T511A-T7、pMSCV-hiR2-FL-Q512A-T7、pMSCV-hiR2-FL-R513A-T7、pMSCV-hiR2-FL-K514A-T7、pMSCV-hiR2-FL-D515A-T7、pMSCV-hiR2-FL-C516A-T7、pMSCV-hiR2-FL-S517A-T7、pMSCV-hiR2-FL-E518A-T7、pMSCV-hiR2-FL-T519A-T7、pMSCV-hiR2-FL-L520A-T7、pMSCV-hiR2-FL-A521S-T7、pMSCV-hiR2-FL-T522A-T7、pMSCV-hiR2-FL-F523A-T7、pMSCV-hiR2-FL-V524A-T7、pMSCV-hiR2-FL-K525A-T7、pMSCV-hiR2-FL-W526A-T7、pMSCV-hiR2-FL-Q527A-T7、pMSCV-hiR2-FL-D528A-T7、pMSCV-hiR2-FL-D529A-T7、pMSCV-hiR2-FL-T530A-T7、pMSCV-hiR2-FL-G531A-T7、pMSCV-hiR2-FL-P532A-T7、pMSCV-hiR2-FL-P533A-T7、pMSCV-hiR2-FL-M534A-T7、pMSCV-hiR2-FL-D535A-T7、pMSCV-hiR2-FL-K536A-T7、pMSCV-hiR2-FL-S537A-T7、pMSCV-hiR2-FL-D538A-T7、pMSCV-hiR2-FL-L539A-T7、pMSCV-hiR2-FL-G540A-T7、pMSCV-hiR2-FL-Q541A-T7、pMSCV-hiR2-FL-K542A-T7、pMSCV-hiR2-FL-R543A-T7、pMSCV-hiR2-FL-T544A-T7、pMSCV-hiR2-FL-S545A-T7、pMSCV-hiR2-FL-G546A-T7、pMSCV-hiR2-FL-A547S-T7、pMSCV-hiR2-FL-V548A-T7、pMSCV-hiR2-FL-C549A-T7、pMSCV-hiR2-FL-H550A-T7、pMSCV-hiR2-FL-Q551A-T7、pMSCV-hiR2-FL-D552A-T7、pMSCV-hiR2-FL-P553A-T7、pMSCV-hiR2-FL-R554A-T7、pMSCV-hiR2-FL-T555A-T7、pMSCV-hiR2-FL-C556A-T7、pMSCV-hiR2-FL-E557A-T7、pMSCV-hiR2-FL-E558A-T7、pMSCV-hiR2-FL-P559A-T7、pMSCV-hiR2-FL-A560S-T7、pMSCV-hiR2-FL-S561A-T7、pMSCV-hiR2-FL-S562A-T7、pMSCV-hiR2-FL-G563A-T7、pMSCV-hiR2-FL-A564S-T7、pMSCV-hiR2-FL-H565A-T7、pMSCV-hiR2-FL-I566A-T7、pMSCV-hiR2-FL-W567A-T7、pMSCV-hiR2-FL-P568A-T7、pMSCV-hiR2-FL-D569A-T7、pMSCV-hiR2-FL-D570A-T7、pMSCV-hiR2-FL-I571A-T7、pMSCV-hiR2-FL-T572A-T7、pMSCV-hiR2-FL-K573A-T7、pMSCV-hiR2-FL-W574A-T7、pMSCV-hiR2-FL-P575A-T7、pMSCV-hiR2-FL-I576A-T7、pMSCV-hiR2-FL-C577A-T7、pMSCV-hiR2-FL-T578A-T7、pMSCV-hiR2-FL-E579A-T7、pMSCV-hiR2-FL-Q580A-T7、pMSCV-hiR2-FL-A581S-T7、pMSCV-hiR2-FL-R582A-T7、pMSCV-hiR2-FL-S583A-T7、pMSCV-hiR2-FL-N584A-T7、pMSCV-hiR2-FL-H585A-T7、pMSCV-hiR2-FL-T586A-T7、pMSCV-hiR2-FL-G587A-T7、pMSCV-hiR2-FL-F588A-T7、pMSCV-hiR2-FL-L589A-T7、pMSCV-hiR2-FL-H590A-T7、pMSCV-hiR2-FL-M591A-T7、pMSCV-hiR2-FL-D592A-T7和pMSCV-hiR2-FL-C593A-T7转染，并保持于37℃、5％$CO_2$。在7小时后，通过用缺乏氯喹的标准生长培养基替换细胞上清液来停止转染，并将细胞在37℃、5％$CO_2$下孵育过夜以允许病毒产生。平行地，将作为用于逆转录病毒感染的靶细胞的永生化iRhom1/2-/-DKO MEF以$1\times10^5$个细胞/孔接种到6孔组织培养板(Greiner,德国)的标准生长培养基中，并且也在37℃、5％$CO_2$下保持过夜。在第3天，收集释放pMSCV-hiR2-FL-N503A-T7、pMSCV-hiR2-FL-D504A-T7、pMSCV-hiR2-FL-H505A-T7、pMSCV-hiR2-FL-S506A-T7、pMSCV-hiR2-FL-G507A-T7、pMSCV-hiR2-FL-C508A-T7、pMSCV-hiR2-FL-I509A-T7、pMSCV-hiR2-FL-Q510A-T7、pMSCV-hiR2-FL-T511A-T7、pMSCV-hiR2-FL-Q512A-T7、pMSCV-hiR2-FL-R513A-T7、pMSCV-hiR2-FL-K514A-T7、pMSCV-hiR2-FL-D515A-T7、pMSCV-hiR2-FL-C516A-T7、pMSCV-hiR2-FL-S517A-T7、

pMSCV-hiR2-FL-E518A-T7、pMSCV-hiR2-FL-T519A-T7、pMSCV-hiR2-FL-L520A-T7、pMSCV-hiR2-FL-A521S-T7、pMSCV-hiR2-FL-T522A-T7、pMSCV-hiR2-FL-F523A-T7、pMSCV-hiR2-FL-V524A-T7、pMSCV-hiR2-FL-K525A-T7、pMSCV-hiR2-FL-W526A-T7、pMSCV-hiR2-FL-Q527A-T7、pMSCV-hiR2-FL-D528A-T7、pMSCV-hiR2-FL-D529A-T7、pMSCV-hiR2-FL-T530A-T7、pMSCV-hiR2-FL-G531A-T7、pMSCV-hiR2-FL-P532A-T7、pMSCV-hiR2-FL-P533A-T7、pMSCV-hiR2-FL-M534A-T7、pMSCV-hiR2-FL-D535A-T7、pMSCV-hiR2-FL-K536A-T7、pMSCV-hiR2-FL-S537A-T7、pMSCV-hiR2-FL-D538A-T7、pMSCV-hiR2-FL-L539A-T7、pMSCV-hiR2-FL-G540A-T7、pMSCV-hiR2-FL-Q541A-T7、pMSCV-hiR2-FL-K542A-T7、pMSCV-hiR2-FL-R543A-T7、pMSCV-hiR2-FL-T544A-T7、pMSCV-hiR2-FL-S545A-T7、pMSCV-hiR2-FL-G546A-T7、pMSCV-hiR2-FL-A547S-T7、pMSCV-hiR2-FL-V548A-T7、pMSCV-hiR2-FL-C549A-T7、pMSCV-hiR2-FL-H550A-T7、pMSCV-hiR2-FL-Q551A-T7、pMSCV-hiR2-FL-D552A-T7、pMSCV-hiR2-FL-P553A-T7、pMSCV-hiR2-FL-R554A-T7、pMSCV-hiR2-FL-T555A-T7、pMSCV-hiR2-FL-C556A-T7、pMSCV-hiR2-FL-E557A-T7、pMSCV-hiR2-FL-E558A-T7、pMSCV-hiR2-FL-P559A-T7、pMSCV-hiR2-FL-A560S-T7、pMSCV-hiR2-FL-S561A-T7、pMSCV-hiR2-FL-S562A-T7、pMSCV-hiR2-FL-G563A-T7、pMSCV-hiR2-FL-A564S-T7、pMSCV-hiR2-FL-H565A-T7、pMSCV-hiR2-FL-I566A-T7、pMSCV-hiR2-FL-W567A-T7、pMSCV-hiR2-FL-P568A-T7、pMSCV-hiR2-FL-D569A-T7、pMSCV-hiR2-FL-D570A-T7、pMSCV-hiR2-FL-I571A-T7、pMSCV-hiR2-FL-T572A-T7、pMSCV-hiR2-FL-K573A-T7、pMSCV-hiR2-FL-W574A-T7、pMSCV-hiR2-FL-P575A-T7、pMSCV-hiR2-FL-I576A-T7、pMSCV-hiR2-FL-C577A-T7、pMSCV-hiR2-FL-T578A-T7、pMSCV-hiR2-FL-E579A-T7、pMSCV-hiR2-FL-Q580A-T7、pMSCV-hiR2-FL-A581S-T7、pMSCV-hiR2-FL-R582A-T7、pMSCV-hiR2-FL-S583A-T7、pMSCV-hiR2-FL-N584A-T7、pMSCV-hiR2-FL-H585A-T7、pMSCV-hiR2-FL-T586A-T7、pMSCV-hiR2-FL-G587A-T7、pMSCV-hiR2-FL-F588A-T7、pMSCV-hiR2-FL-L589A-T7、pMSCV-hiR2-FL-H590A-T7、pMSCV-hiR2-FL-M591A-T7、pMSCV-hiR2-FL-D592A-T7和pMSCV-hiR2-FL-C593A-T7同向性病毒的Phoenix-ECO细胞的上清液，用0.45μm CA过滤器过滤，并且补充4μg/ml聚凝胺(Sigma-Aldrich,USA)。在从永生化iRhom1/2-/-DKO MEF除去培养基后，将这些上清液添加到靶细胞中，在37℃、5％$CO_2$下保持4小时用于第一感染。同时，将Phoenix-ECO细胞与新鲜培养基一起再孵育，再过4小时后，过滤，并且同样在4μg/ml聚凝胺的存在下用于相应靶细胞群的第二感染。同样，进行第三感染循环但过夜。在第4天，用新鲜的标准生长培养基替换含有病毒的细胞上清液。从第5天起，使细胞在2mg/ml遗传霉素(G418,Thermo Fisher Scientific,USA)的存在下生长，以选择稳定表达C末端标记3个连续拷贝的T7表位的人iRhom2全长单氨基酸取代的永生化MEF-DKO-hiR2-FL-N503A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D504A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H505A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S506A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G507A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-C508A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I509A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q510A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T511A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q512A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R513A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K514A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D515A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-C516A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S517A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E518A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T519A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L520A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A521S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T522A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-F523A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-V524A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K525A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-W526A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q527A-T7、

MEF-DKO-hiR2-FL-D528A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D529A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T530A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G531A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P532A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P533A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-M534A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D535A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K536A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S537A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D538A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L539A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G540A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q541A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K542A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R543A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T544A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S545A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G546A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A547S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-V548A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-C549A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H550A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q551A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D552A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P553A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R554A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T555A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-C556A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E557A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E558A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P559A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A560S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S561A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S562A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G563A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A564S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H565A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I566A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-W567A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P568A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D569A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D570A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I571A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T572A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K573A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-W574A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P575A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I576A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-C577A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T578A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E579A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q580A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A581S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R582A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S583A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-N584A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H585A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T586A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G587A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-F588A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L589A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H590A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-M591A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D592A-T7和MEF-DKO-hiR2-FL-C593A-T7细胞。在增殖后,将细胞储存以备将来使用。

[0437] 用于测试系统验证的FACS分析

[0438] 简而言之,将永生化MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7细胞以及MEF-DKO-hiR2-FL-N503A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D504A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H505A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S506A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G507A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-C508A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I509A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q510A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T511A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q512A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R513A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K514A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D515A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-C516A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S517A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E518A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T519A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L520A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A521S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T522A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-F523A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-V524A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K525A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-W526A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q527A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D528A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D529A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T530A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G531A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P532A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P533A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-M534A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D535A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K536A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S537A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D538A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L539A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G540A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q541A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K542A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R543A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T544A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S545A-

T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G546A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A547S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-V548A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-C549A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H550A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q551A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D552A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P553A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R554A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T555A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-C556A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E557A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E558A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P559A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A560S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S561A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S562A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G563A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A564S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H565A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I566A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-W567A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P568A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D569A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D570A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I571A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T572A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K573A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-W574A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P575A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I576A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-C577A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T578A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E579A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q580A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A581S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R582A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S583A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-N584A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H585A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T586A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G587A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-F588A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L589A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H590A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-M591A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D592A-T7和MEF-DKO-hiR2-FL-C593A-T7细胞用含10mM EDTA的PBS收获，洗涤并重悬于FACS缓冲液(PBS，3％FBS，0.05％叠氮化钠)中，并且以约$1\times10^5$个细胞/孔接种到Nunc U形底96孔板(Thermo Fisher Scientific，USA)中。为了沉淀细胞并除去上清液，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟。对于初级染色，使细胞重悬于每孔100μl的单独FACS缓冲液(对照)或者3μg/ml的FACS缓冲液中的小鼠单克隆抗T7 IgG(Merck Millipore,USA)中，并在冰上孵育1小时。然后，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟，并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤两次。对于二次染色，将细胞离心并重悬于每孔100μl的用FACS缓冲液以1:100稀释的PE缀合的山羊抗小鼠IgG F(ab')2检测片段(Dianova,德国)中。避光，将细胞悬浮液在冰上孵育1小时。然后，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟，并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤三次。最后，将细胞重悬于每孔150μl的FACS缓冲液中，并使用BD AccuriTM C6 Plus流式细胞仪(Becton Dickinson,德国)分析。

[0439] 图25a示例性地显示人iRhom2变体hiR2-FL-K536A-T7的本实验的代表性结果。抗T7标签抗体(黑色)和抗小鼠IgG第二抗体(灰色)对MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7(左侧)和MEF-DKO-hiR2-FL-K536A-T7细胞(右侧)的结合分析揭示了相对荧光强度的相对较强的增加。这表明，类似于人iRhom2野生型(左侧)，人iRhom2变体hiR2-FL-K536A-T7同样良好地表达并位于这些细胞的表面上(右侧)。对于在MEF-DKO-hiR2-FL-N503A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H505A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S506A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I509A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T511A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q512A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R513A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K514A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D515A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S517A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E518A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T519A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L520A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A521S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T522A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-V524A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K525A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-W526A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q527A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D528A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D529A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T530A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G531A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P532A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P533A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-

M534A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D535A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K536A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S537A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D538A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L539A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G540A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q541A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K542A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R543A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T544A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S545A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G546A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A547S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-V548A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H550A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q551A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P553A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R554A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T555A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E557A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E558A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P559A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A560S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S561A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S562A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G563A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A564S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H565A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I566A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P568A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D569A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D570A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I571A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T572A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K573A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P575A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I576A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T578A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E579A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q580A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A581S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R582A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S583A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-N584A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H585A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T586A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G587A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-F588A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L589A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H590A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-M591A-T7和MEF-DKO-hiR2-FL-D592A-T7细胞上表达的人iRhom2全长单氨基酸取代的表达和定位，获得了类似的结果。此外，对于在MEF-DKO-hiR2-FL-D504A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G507A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-C508A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q510A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-C516A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-F523A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-C549A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D552A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-C556A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-W567A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-W574A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-C577A-T7和MEF-DKO-hiR2-FL-C593A-T7细胞上表达的以下人iRhom2全长单氨基酸取代，获得了相对荧光强度的减小，并因此这些细胞表面上的表达降低。

[0440] 用于测试系统验证的TGFαELISA

[0441] 为了测试所有91种具有人iRhom1特异性单氨基酸取代的人iRhom2变体，使如以上实施例所述生成的稳定表达这些变体的相应MEF-DKO细胞系经受TGFα脱落ELISA分析。为了表明所有变体的功能性作为这些变体被正确折叠的指示，评估PMA诱导的核转染TGFα的释放。由于本分析中使用的细胞是iRhom1/2-/-双敲除小鼠胚胎成纤维细胞(实施例11中所述)的挽救变体——其由具有人iRhom1特异性单氨基酸取代或缺失的相应人iRhom2变体挽救，稳定表达的iRhom2变体是在这些细胞中表达的仅有iRhom蛋白，因此是这些细胞中唯一对脱落TGFα作出贡献的iRhom。

[0442] 简而言之，在第1天，将Nunc black MaxiSorp®96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)用每孔100μl的小鼠抗人TGFα捕获抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以400ng/ml TBS在4℃下包被过夜。在使用4D-Nucleofector系统(Lonza,瑞士)，用pcDNA3.1载体骨架中的hTGFα-FL-WT构建体电穿孔MEF-DKO-hiR2-FL-N503A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D504A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H505A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S506A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G507A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-C508A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I509A-T7、MEF-DKO-

hiR2-FL-Q510A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T511A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q512A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R513A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K514A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D515A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-C516A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S517A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E518A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T519A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L520A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A521S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T522A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-F523A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-V524A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K525A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-W526A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q527A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D528A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D529A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T530A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G531A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P532A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P533A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-M534A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D535A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K536A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S537A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D538A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L539A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G540A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q541A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K542A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R543A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T544A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S545A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G546A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A547S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-V548A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-C549A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H550A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q551A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D552A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P553A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R554A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T555A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-C556A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E557A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E558A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P559A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A560S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S561A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S562A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G563A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A564S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H565A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I566A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-W567A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P568A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D569A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D570A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I571A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T572A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K573A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-W574A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P575A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I576A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-C577A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T578A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E579A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q580A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A581S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R582A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S583A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-N584A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H585A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T586A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G587A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-F588A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L589A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H590A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-M591A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D592A-T7和MEF-DKO-hiR2-FL-C593A-T7细胞之后，将约35,000个携带具有人iRhom1特异性单氨基酸取代或缺失的人iRhom2变体的MEF-DKO细胞接种到F形底96孔细胞培养板(Thermo Fisher Scientific,USA)的各孔的100μl正常生长培养基中。在第2天，除去捕获抗体溶液，并将MaxiSorp®板用每孔300μl的TBS、1％BSA在室温下封闭至少1小时。同时，将细胞用PBS洗涤一次，然后每孔添加80μl的OptiMEM培养基(Thermo Fisher Scientific,USA)。

[0443] 随后，在37℃、5％$CO_2$下，将细胞(未刺激对照的那些除外)用每孔20μl的PMA(Sigma-Aldrich,USA)以25ng/ml的最终浓度刺激1小时。将20μl的OptiMEM培养基添加到未刺激对照细胞中。然后，将96孔板离心以沉淀细胞。平行地，从MaxiSorp®板除去封闭缓冲液，并将板在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次。为了避免干燥，将30μl的TBS立即添加到MaxiSorp®板的各孔中，随后每样品转移70μl的无细胞上清液。然后，将每孔100μl的生物素化山羊抗人TGFα检测抗体(作为DuoSet

ELISA试剂盒的一部分提供)以37.5ng/ml TBS添加,避直射光,将板在室温下孵育2小时。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后,将100μl的用TBS以1:10,000稀释的链霉亲和素-AP(R&D Systems,USA)添加至各孔中,再次避直射光,将板在室温下孵育30分钟。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤另一轮4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后,添加每孔100μl的AttoPhos底物溶液(Promega,USA)以在室温下暗处孵育1小时。使用infinite M1000(Tecan Group,瑞士)酶标仪,在435nm的激发波长和555nm的发射波长下收集各孔的荧光。

[0444] 图25b显示这些TGFα释放测定的结果,表明91种单氨基酸取代为丙氨酸的人iRhom2变体中有83种在TGFα脱落可被PMA诱导时呈功能活性,指示这些变体正确折叠,与未检测到PMA诱导的TGFα脱落的空载体(EV)阴性对照群体形成了对照。人iRhom2变体hi2-FL-WT-3xT7-C516A、hiR2-FL-F523A-T7、hiR2-FL-C549A-T7、hiR2-FL-D552A-T7、hiR2-FL-C556A-T7、hiR2-FL-W567A-T7、hiR2-FL-W574A-T7和hiR2-FL-C577A-T7显示没有或几乎没有功能性,因此排除在进一步分析之外。

[0445] 表征本发明的纯化抗体的结合的FACS分析以用于表位作图目的

[0446] 简而言之,将永生化MEF-DKO-hiR2-FL-N503A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D504A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H505A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S506A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G507A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-C508A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I509A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q510A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T511A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q512A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R513A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K514A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D515A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S517A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E518A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T519A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L520A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A521S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T522A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-V524A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K525A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-W526A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q527A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D528A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D529A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T530A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G531A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P532A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P533A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-M534A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D535A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K536A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S537A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D538A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L539A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G540A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q541A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K542A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R543A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T544A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S545A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G546A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A547S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-V548A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H550A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q551A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P553A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-R554A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T555A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E557A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E558A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P559A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A560S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S561A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S562A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G563A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A564S-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H565A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I566A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P568A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D569A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D570A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I571A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T572A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-K573A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-P575A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-I576A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T578A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-E579A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-Q580A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-A581S-T7、

MEF-DKO-hiR2-FL-R582A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-S583A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-N584A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H585A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-T586A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-G587A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-F588A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-L589A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-H590A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-M591A-T7、MEF-DKO-hiR2-FL-D592A-T7和MEF-DKO-hiR2-FL-C593A-T7细胞用含10mM EDTA的PBS收获，洗涤并重悬于FACS缓冲液(PBS，3％FBS，0.05％叠氮化钠)中，并且以约$1\times10^5$个细胞/孔接种到Nunc U形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)中。为了沉淀细胞并除去上清液，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟。对于初级染色，使细胞重悬于每孔100μl的单独FACS缓冲液(对照)、或3μg/ml的FACS缓冲液中的本发明纯化抗体3、5、16、22、34、42、43、44、48和50中，并在冰上孵育1小时。然后，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟，并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤两次。对于二次染色，将细胞离心并重悬于每孔100μl的用FACS缓冲液以1:100稀释的PE缀合的山羊抗小鼠IgG F(ab')2检测片段(Dianova,德国)中。避光，将细胞悬浮液在冰上孵育1小时。然后，将板在1,500rpm和4℃下离心3分钟，并用每孔200μl的FACS缓冲液洗涤三次。最后，将细胞重悬于每孔150μl的FACS缓冲液中，并使用BD AccuriTM C6 Plus流式细胞仪(Becton Dickinson,德国)分析。

[0447] 图26a显示本实验的代表性结果。对于83种单氨基酸取代为丙氨酸的功能性人iRhom2变体的整个组，示例性地，显示了用于分析表达人iRhom2变体hiR2-FL-K536A-T7的细胞的数据。作为对TNFα释放具有抑制效应的本发明抗体的代表性实例的抗体5(黑色，上图)或对TNFα释放没有抑制效应的抗体50(黑色，下图)以及抗小鼠IgG第二抗体(灰色)对MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7细胞(左侧)和MEF-DKO-hiR2-FL-K536A-T7细胞(右侧)的结合分析表明，人iRhom2的单氨基酸赖氨酸536用丙氨酸取代较强削弱，并因此对于对TNFα释放具有抑制效应的本发明抗体5的结合作出贡献(右侧，上图)。相比之下，其不影响，并且因此不对于对TNFα释放没有抑制效应的抗体50的结合作出贡献(右侧，下图)。对于两种抗体，与MEF-DKO-hiR2-FL-WT-T7细胞(左侧)的结合充当阳性对照。

[0448] 图26b汇总了——在图26a的扩展中——对于83种表达单氨基酸取代为丙氨酸的人iRhom2变体的工程化功能性MEF群体的整个组，对TNFα释放具有抑制效应的本发明的抗体3、5、16、22、34、42、43和44相对于对TNFα释放没有抑制效应的抗体48和50的FACS分析的结果。每种抗体与人iRhom2野生型的结合被认为是100％。与任何变体结合的抗体的30-59％相应下降由展示为浅灰色(并用“1”标记)的细胞指示，60-95％的受损结合由灰色(并用“2”标记)的细胞指示，≥95％的结合损失由深灰色细胞(用“3”标记)突出显示。这些数据揭示了与对TNFα释放具有抑制效应的本发明的抗体3、5、16、22、34、42、43和44与人iRhom2的结合有关的氨基酸位置的相关模式，它们与对于对TNFα释放没有抑制效应的抗体48和50的结合作出贡献的氨基酸位置模式不同。

[0449] 实施例24:本发明的抗体对体外PMA诱导的TNFα脱落的抑制效应的分析

[0450] 与其中测试本发明抗体对LPS诱导的内源性TNFα从人THP-1细胞的释放的抑制效应的实施例14和17形成对照，本分析用本发明的重组产生的鼠抗体进行，以验证它们对PMA诱导的内源性TNFα从人U-937单核细胞的释放的抑制效应。

[0451] 本实施例中使用的重组抗体材料的产生与实施例17中描述的相同。在以下描述了本实施例中使用的基于ELISA的TNFα释放测定。

[0452] 简而言之，在第1天，将Nunc blackMaxiSorp®96孔板(Thermo Fisher Scientific,

USA)用每孔100μl的小鼠抗人TNFα捕获抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以4μg/ml TBS在4℃下包被过夜。在第2天,除去捕获抗体溶液,并将MaxiSorp®板用每孔300μl的TBS、1%BSA在室温下封闭1-2小时。同时,将80μl正常生长培养基中的80,000个U-937(欧洲细胞株/微生物保藏中心(European Collection of Authenticated Cell Cultures),UK)细胞接种到Greiner CELLSTAR V形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)的各孔中,并且在37℃、5%$CO_2$下与每孔20μl的标准生长培养基一起预孵育30分钟,该标准生长培养基补充有50μM的巴马司他(BB94,Abcam,UK)作为阳性对照(在所得100μl样品体积中的最终浓度为10μM)、5μg/ml的小鼠IgG抗体(Thermo Fisher Scientific,USA)作为同种型对照(在所得100μl样品体积中的最终浓度为1μg/ml)或5μg/ml的本发明的抗体(在所得100μl样品体积中的最终浓度为1μg/ml)。在刺激对照的情况下,添加不含供试品的20μl标准生长培养基。随后,在37℃、5%$CO_2$下,用每孔20μl的PMA(Sigma-Aldrich,USA)以150ng/ml生长培养基(最终浓度为25ng/ml)刺激细胞(未刺激对照的那些除外)1小时。然后,将96孔板离心以沉淀细胞。平行地,从MaxiSorp®板除去封闭缓冲液,并将板在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次。为了避免干燥,将30μl的TBS立即添加到MaxiSorp®板的各孔中,随后每样品转移70μl的无细胞上清液。另外,将用TBS以限定浓度稀释的100μl重组人TNFα蛋白(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)添加到板中作为标准参考。然后,将每孔100μl的生物素化山羊抗人TNFα检测抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以50ng/ml TBS添加,避直射光,将板在室温下孵育2小时。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后,将100μl的用TBS以1:10,000稀释的链霉亲和素-AP(R&D Systems,USA)添加至各孔中,再次避直射光,将板在室温下孵育30分钟。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤另一轮4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后,添加每孔100μl的AttoPhos底物溶液(Promega,USA)以在室温下暗处孵育1小时。使用infinite M1000(Tecan Group,瑞士)酶标仪,在435nm的激发波长和555nm的发射波长下收集各孔的荧光。

[0453] 图27显示本实验的代表性结果,以绝对数(图27a)和抑制百分比(图27b)表明供试品对PMA诱导的TNFα从U-937细胞的释放的效应。尽管作为金属蛋白酶的小分子抑制剂的巴马司他(BB94)充当阳性对照并且导致对PMA诱导的TNFα释放的100.1%抑制,但IgG同种型对照的存在对TNFα脱落没有显著效应。相比之下,相等浓度的本发明的抗体3、5、16、22、34、42、43和44对PMA诱导的TNFα从U-937细胞的释放分别抑制65.9%、63.6%、91.6%、86.1%、68.6%、94.5%、78.3%和76.5%。

[0454] 实施例25:本发明的抗体对体外PMA诱导的TNFα脱落的抑制效应的分析

[0455] 与上述实施例24互补,进行基于ELISA的TNFα释放测定以验证本发明的抗体对PMA诱导的内源性TNFα从人U-937细胞释放的抑制效应。然而,用本发明的重组产生的鼠和重组产生的嵌合抗体进行本分析。

[0456] 为了产生重组抗体材料,设计、优化并合成了靶DNA序列。将完整序列对于鼠材料亚克隆到pcDNA3.4载体(Thermo Fisher Scientific,USA)中,或者对于嵌合材料亚克隆到pTT5载体(Thermo Fisher Scientific,USA)中,并且大型制备转染级质粒以对于鼠材料用于Expi293F(Thermo Fisher Scientific,USA),或对于嵌合材料用于CHO-3E7或HD CHO-S

(Thermo Fisher Scientific,USA)细胞表达。在37℃和5-8％$CO_2$下,在定轨摇床(VWR Scientific,德国)上,在Erlenmeyer烧瓶(Corning Inc.,USA)中,使Expi293F细胞在无血清Expi293FTM表达培养基(Thermo Fisher Scientific,USA)中生长,使CHO细胞在无血清FreeStyle™ CHO表达培养基(Thermo Fisher Scientific,USA)中生长。转染前一天,将细胞以适当的密度接种到新Erlenmeyer烧瓶中。在转染当天,将DNA和转染试剂以最佳比率混合,然后添加到具有准备用于转染的细胞的烧瓶中。将编码靶蛋白的重组质粒对于鼠材料瞬时转染到悬浮Expi293F细胞培养物中,或者对于嵌合材料瞬时转染到悬浮CHO细胞培养物中。转染后第6天收集的细胞培养上清液用于纯化。将细胞培养肉汤离心并过滤。将过滤的细胞培养上清液以适当的流量加载到HiTrap MabSelect SuRe(GE Healthcare,UK)、MabSelect SuRe™ LX(GE Healthcare,UK)或RoboColumn Eshmuno A(Merck Millipore,USA)亲和纯化柱上。在用适当的缓冲液洗涤和洗脱后,合并洗脱的级分并将缓冲液更换为最终制剂缓冲液。通过SDS-PAGE分析来分析纯化蛋白质以进行分子量和纯度测量。最后,应用NanoDrop 2000分光光度计(Thermo Fisher Scientific,USA)测定浓度。

[0457] 简而言之,在第1天,将Nunc black MaxiSorp® 96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)用每孔100μl的小鼠抗人TNFα捕获抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以4μg/ml TBS在4℃下包被过夜。在第2天,除去捕获抗体溶液,并将MaxiSorp®板用每孔300μl的TBS、1％BSA在室温下封闭1-2小时。同时,将80μl正常生长培养基中的80,000个U-937(欧洲细胞株/微生物保藏中心(European Collection of Authenticated Cell Cultures),UK)细胞接种到Greiner CELLSTAR V形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)的各孔中,并且在37℃、5％$CO_2$下与每孔20μl的标准生长培养基一起预孵育30分钟,该标准生长培养基补充有50μM的巴马司他(BB94,Abcam,UK)作为阳性对照(在所得100μl样品体积中的最终浓度为10μM)、15μg/ml的小鼠或人IgG抗体(Thermo Fisher Scientific,USA)作为同种型对照(在所得100μl样品体积中的最终浓度为3μg/ml)或15μg/ml的本发明的抗体(在所得100μl样品体积中的最终浓度为3μg/ml)。在刺激对照的情况下,添加不含供试品的20μl标准生长培养基。随后,在37℃、5％$CO_2$下,用每孔20μl的PMA(Sigma-Aldrich,USA)以150ng/ml生长培养基(最终浓度为25ng/ml)刺激细胞(未刺激的对照的那些除外)1小时。然后,将96孔板离心以沉淀细胞。平行地,从MaxiSorp®板除去封闭缓冲液,并将板在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次。为了避免干燥,将30μl的TBS立即添加到MaxiSorp®板的各孔中,随后每样品转移70μl的无细胞上清液。另外,将用TBS以限定浓度稀释的100μl重组人TNFα蛋白(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)添加到板中作为标准参考。然后,将每孔100μl的生物素化山羊抗人TNFα检测抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以50ng/ml TBS添加,避直射光,将板在室温下孵育2小时。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后,将100μl的用TBS以1:10,000稀释的链霉亲和素-AP(R&D Systems,USA)添加至各孔中,再次避直射光,将板在室温下孵育30分钟。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤另一轮4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后,添加每孔100μl的AttoPhos底物溶液(Promega,USA)以在室温下暗处孵育1小时。使用infinite M1000(Tecan Group,瑞士)酶标仪,在435nm的激发波长和555nm的发射波长下收集各孔的荧光。

[0458] 图28显示本实验的代表性结果，以绝对数(图28a)和抑制百分比(图28b)表明供试品对PMA诱导的TNFα从U-937细胞释放的效应。尽管作为金属蛋白酶的小分子抑制剂的巴马司他(BB94)充当阳性对照并且导致对PMA诱导的TNFα释放的98.7％抑制，但小鼠或人IgG同种型对照的存在对TNFα脱落没有显著效应。相比之下，相等浓度的本发明的鼠抗体m16、m22、m34、m42和m44对PMA诱导的TNFα从U-937细胞的释放分别抑制91.9％、93.1％、79.9％、94.1％和86.3％。与用本发明的鼠抗体获得的结果高度相当，相等浓度的本发明的嵌合抗体ch16、ch22、ch34、ch42和ch44对PMA诱导的TNFα从U-937细胞的释放分别抑制93.7％、96.5％、87.4％、96.5％和89.2％。

[0459] 实施例26:本发明的抗体对体外PMA诱导的白介素6受体(IL-6R)脱落的抑制效应的分析

[0460] 在以下研究中，进行基于ELISA的IL-6R释放测定以分析本发明的抗体对PMA诱导的内源性IL-6R从人THP-1单核细胞释放的抑制效应。

[0461] 本实施例中使用的重组抗体材料的产生与实施例17中描述的相同。在以下描述了本实施例中使用的基于ELISA的IL-6R释放测定。

[0462] 简而言之，在第1天，将Nunc black MaxiSorp® 96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)用每孔100μl的小鼠抗人IL-6R捕获抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以2μg/ml TBS在室温下包被7小时。除去捕获抗体溶液，并将MaxiSorp®板用每孔300μl的TBS、1％BSA在室温下封闭1.5小时。同时，将80μl正常生长培养基中的40,000个THP-1(美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection),USA)细胞接种到Greiner CELLSTAR V形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)的各孔中，并且在37℃、5％$CO_2$下与每孔20μl的标准生长培养基一起预孵育30分钟，该标准生长培养基补充有50μM的巴马司他(BB94,Abcam,UK)作为阳性对照(在所得100μl样品体积中的最终浓度为10μM)、5μg/ml的小鼠IgG抗体(Thermo Fisher Scientific,USA)作为同种型对照(在所得100μl样品体积中的最终浓度为1μg/ml)或5μg/ml的本发明的抗体(在所得100μl样品体积中的最终浓度为1μg/ml)。在刺激对照的情况下，添加不含供试品的20μl标准生长培养基。随后，在37℃、5％$CO_2$下，用每孔20μl的PMA(Sigma-Aldrich,USA)以150ng/ml生长培养基(最终浓度为25ng/ml)刺激细胞(未刺激的对照的那些除外)1小时。然后，将96孔板离心以沉淀细胞。平行地，从MaxiSorp®板除去封闭缓冲液，并将板在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次。为了避免干燥，将30μl的TBS立即添加到MaxiSorp®板的各孔中，随后每样品转移70μl的无细胞上清液。另外，将用TBS以限定浓度稀释的100μl重组人IL-6R蛋白(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)添加到板中作为标准参考。然后，将每孔100μl的生物素化山羊抗人IL-6R检测抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以100ng/ml TBS添加，避直射光，将板在室温下孵育2小时。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后，将100μl的用TBS以1:10,000稀释的链霉亲和素-AP(R&D Systems,USA)添加至各孔中，再次避直射光，将板在室温下孵育30分钟。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤另一轮4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后，添加每孔100μl的AttoPhos底物溶液(Promega,USA)以在室温下暗处孵育1小时。使用infinite M1000(Tecan Group,瑞士)酶标仪，在435nm的

激发波长和555nm的发射波长下收集各孔的荧光。

[0463] 图29a&29b显示本实验的代表性结果,以绝对数(图29a)和抑制百分比(图29b)表明供试品对PMA诱导的IL-6R从THP-1细胞的释放的效应。尽管作为金属蛋白酶的小分子抑制剂的巴马司他(BB94)充当阳性对照并且导致对PMA诱导的IL-6R释放的88.6%抑制,但IgG同种型对照的存在对IL-6R脱落没有显著效应。相比之下,相等浓度的本发明的抗体3、5、16、22、34、42、43和44对PMA诱导的IL-6R从THP-1细胞的释放分别抑制46.7%、64.1%、72.5%、67.4%、71.1%、85.9%、72.9%和73.0%。

[0464] 实施例27:本发明的抗体对体外PMA诱导的白介素6受体(IL-6R)脱落的抑制效应的分析

[0465] 与上述实施例26互补,进行基于ELISA的IL-6R释放测定以验证本发明的抗体对PMA诱导的内源性IL-6R从人U-937细胞释放的抑制效应。

[0466] 本实施例中使用的重组抗体材料的产生与实施例17中描述的相同。在以下描述了本实施例中使用的基于ELISA的IL-6R释放测定。

[0467] 简而言之,在第1天,将Nunc black MaxiSorp® 96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)用每孔100µl的小鼠抗人IL-6R捕获抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以2µg/ml TBS在4℃下包被过夜。在第2天,除去捕获抗体溶液,并将MaxiSorp®板用每孔300µl的TBS、1%BSA在室温下封闭1-2小时。同时,将80µl正常生长培养基中的80,000个U-937(欧洲细胞株/微生物保藏中心(European Collection of Authenticated Cell Cultures),UK)细胞接种到Greiner CELLSTAR V形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)的各孔中,并且在37℃、5%$CO_2$下与每孔20µl的标准生长培养基一起预孵育30分钟,该标准生长培养基补充有50µM的巴马司他(BB94,Abcam,UK)作为阳性对照(在所得100µl样品体积中的最终浓度为10µM)、5µg/ml的小鼠IgG抗体(Thermo Fisher Scientific,USA)作为同种型对照(在所得100µl样品体积中的最终浓度为1µg/ml)或5µg/ml的本发明的抗体(在所得100µl样品体积中的最终浓度为1µg/ml)。在刺激对照的情况下,添加不含供试品的20µl标准生长培养基。随后,在37℃、5%$CO_2$下,用每孔20µl的PMA(Sigma-Aldrich,USA)以375ng/ml生长培养基(最终浓度为62.5ng/ml)刺激细胞(未刺激对照的那些除外)1小时。然后,将96孔板离心以沉淀细胞。平行地,从MaxiSorp®板除去封闭缓冲液,并将板在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350µl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次。为了避免干燥,将30µl的TBS立即添加到MaxiSorp®板的各孔中,随后每样品转移70µl的无细胞上清液。另外,将用TBS以限定浓度稀释的100µl重组人IL-6R蛋白(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)添加到板中作为标准参考。然后,将每孔100µl的生物素化山羊抗人IL-6R检测抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以50ng/ml TBS添加,避直射光,将板在室温下孵育2小时。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350µl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后,将100µl的用TBS以1:10,000稀释的链霉亲和素-AP(R&D Systems,USA)添加至各孔中,再次避直射光,将板在室温下孵育30分钟。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350µl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤另一轮4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后,添加每孔100µl的AttoPhos底物溶液(Promega,USA)以在室温下暗处孵育1小时。使用infinite M1000(Tecan Group,瑞士)酶标仪,在435nm的激发波长和555nm的发射波长下收

集各孔的荧光。

[0468] 图30显示本实验的代表性结果,以绝对数(图30a)和抑制百分比(图30b)表明供试品对PMA诱导的IL-6R从U-937细胞释放的效应。尽管作为金属蛋白酶的小分子抑制剂的巴马司他(BB94)充当阳性对照并且导致对PMA诱导的IL-6R释放的86.6%抑制,但IgG同种型对照的存在对IL-6R脱落没有显著效应。相比之下,相等浓度的本发明的抗体3、5、16、22、34、42、43和44对PMA诱导的IL-6R从U-937细胞的释放分别抑制61.8%、67.0%、77.7%、74.5%、69.3%、80.8%、76.1%和71.8%。

[0469] 实施例28:本发明的抗体对体外PMA诱导的IL-6R脱落的抑制效应的分析

[0470] 与上述实施例27互补,进行基于ELISA的IL-6R释放测定以验证本发明的抗体对PMA诱导的内源性IL-6R从人U-937细胞释放的抑制效应。然而,用本发明的重组产生的鼠和重组产生的嵌合抗体进行本分析。

[0471] 本实施例中使用的重组抗体材料的产生与实施例25中描述的相同。在以下描述了本实施例中使用的基于ELISA的IL-6R释放测定。

[0472] 简而言之,在第1天,将Nunc black MaxiSorp®96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)用每孔100μl的小鼠抗人IL-6R捕获抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以2μg/ml TBS在室温下包被7小时。除去捕获抗体溶液,并将MaxiSorp®板用每孔300μl的TBS、1%BSA在室温下封闭1小时。同时,将80μl正常生长培养基中的80,000个U-937(欧洲细胞株/微生物保藏中心(European Collection of Authenticated Cell Cultures),UK)细胞接种到Greiner CELLSTAR V形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)的各孔中,并且在37℃、5%$CO_2$下与每孔20μl的标准生长培养基一起预孵育30分钟,该标准生长培养基补充有50μM的巴马司他(BB94,Abcam,UK)作为阳性对照(在所得100μl样品体积中的最终浓度为10μM)、15μg/ml的小鼠或人IgG抗体(Thermo Fisher Scientific,USA)作为同种型对照(在所得100μl样品体积中的最终浓度为3μg/ml)或15μg/ml的本发明的抗体(在所得100μl样品体积中的最终浓度为3μg/ml)。在刺激对照的情况下,添加不含供试品的20μl标准生长培养基。随后,在37℃、5%$CO_2$下,用每孔20μl的PMA(Sigma-Aldrich,USA)以375ng/ml生长培养基(最终浓度为62.5ng/ml)刺激细胞(未刺激对照的那些除外)1小时。然后,将96孔板离心以沉淀细胞。平行地,从MaxiSorp®板除去封闭缓冲液,并将板在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次。为了避免干燥,将30μl的TBS立即添加到MaxiSorp®板的各孔中,随后每样品转移70μl的无细胞上清液。另外,将用TBS以限定浓度稀释的100μl重组人IL-6R蛋白(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)添加到板中作为标准参考。然后,将每孔100μl的生物素化山羊抗人IL-6R检测抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以50ng/ml TBS添加,避直射光,将板在室温下孵育2小时。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后,将100μl的用TBS以1:10,000稀释的链霉亲和素-AP(R&D Systems,USA)添加至各孔中,再次避直射光,将板在室温下孵育30分钟。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤另一轮4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后,添加每孔100μl的AttoPhos底物溶液(Promega,USA)以在室温下暗处孵育1小时。使用infinite M1000(Tecan Group,瑞士)酶标仪,在435nm的激发波长和555nm的发射波长下收集各孔的荧光。

[0473] 图31显示本实验的代表性结果，以绝对数(图31a)和抑制百分比(图31b)表明供试品对PMA诱导的IL-6R从U-937细胞释放的效应。尽管作为金属蛋白酶的小分子抑制剂的巴马司他(BB94)充当阳性对照并且导致对PMA诱导的IL-6R释放的91.6％抑制，但小鼠或人IgG同种型对照的存在对IL-6R脱落没有显著效应。相比之下，相等浓度的本发明的鼠抗体m16、m22、m34、m42和m44对PMA诱导的IL-6R从U-937细胞的释放分别抑制77.4％、79.0％、74.6％、84.4％和82.0％。与用本发明的鼠抗体获得的结果高度相当，相等浓度的本发明的嵌合抗体ch16、ch22、ch34、ch42和ch44对PMA诱导的IL-6R从U-937细胞的释放分别抑制84.3％、85.6％、82.8％、91.8％和85.2％。

[0474] 实施例29:本发明的抗体对体外PMA诱导的肝素结合EGF样生长因子(HB-EGF)脱落的抑制效应的分析

[0475] 在以下研究中，进行基于ELISA的HB-EGF释放测定以分析本发明的抗体对PMA诱导的内源性HB-EGF从人THP-1单核细胞释放的抑制效应。

[0476] 本实施例中使用的重组抗体材料的产生与实施例25中描述的相同。在以下描述了本实施例中使用的基于ELISA的HB-EGF释放测定。

[0477] 简而言之，在第1天，将Nunc black MaxiSorp®96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)用每孔100μl的大鼠抗人HB-EGF捕获抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以2μg/ml TBS在室温下包被7小时。除去捕获抗体溶液，并将MaxiSorp®板用每孔300μl的TBS、1％BSA在室温下封闭3小时。同时，将80μl正常生长培养基中的80,000个THP-1(美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection),USA)细胞接种到Greiner CELLSTAR V形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)的各孔中，并且在37℃、5％$CO_2$下与每孔20μl的标准生长培养基一起预孵育30分钟，该标准生长培养基补充有50μM的巴马司他(BB94,Abcam,UK)作为阳性对照(在所得100μl样品体积中的最终浓度为10μM)、15μg/ml的小鼠或人IgG抗体(Thermo Fisher Scientific,USA)作为同种型对照(在所得100μl样品体积中的最终浓度为3μg/ml)或15μg/ml的本发明的抗体(在所得100μl样品体积中的最终浓度为3μg/ml)。在刺激对照的情况下，添加不含供试品的20μl标准生长培养基。随后，在37℃、5％$CO_2$下，用每孔20μl的PMA(Sigma-Aldrich,USA)以150ng/ml生长培养基(最终浓度为25ng/ml)刺激细胞(未刺激对照的那些除外)6小时。然后，将96孔板离心以沉淀细胞。平行地，从MaxiSorp®板除去封闭缓冲液，并将板在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次。为了避免干燥，将30μl的TBS立即添加到MaxiSorp®板的各孔中，随后每样品转移70μl的无细胞上清液。另外，将用TBS以限定浓度稀释的100μl重组人HB-EGF蛋白(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)添加到板中作为标准参考。然后，将每孔100μl的生物素化山羊抗人HB-EGF检测抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以50ng/ml TBS添加，避直射光，将板在室温下孵育2小时。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后，将100μl的用TBS以1:10,000稀释的链霉亲和素-AP(R&D Systems,USA)添加至各孔中，再次避直射光，将板在室温下孵育30分钟。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤另一轮4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后，添加每孔100μl的AttoPhos底物溶液(Promega,USA)以在室温下暗处孵育1小时。使用infinite M1000(Tecan Group,瑞士)酶标

仪,在435nm的激发波长和555nm的发射波长下收集各孔的荧光。

[0478] 图32显示本实验的代表性结果,以绝对数(图32a)和抑制百分比(图32b)表明供试品对PMA诱导的HB-EGF从THP-1细胞释放的效应。尽管作为金属蛋白酶的小分子抑制剂的巴马司他(BB94)充当阳性对照并且导致对PMA诱导的HB-EGF释放的98.9%抑制,但小鼠或人IgG同种型对照的存在对HB-EGF脱落没有显著效应。相比之下,相等浓度的本发明的鼠抗体m16、m22、m34、m42和m44对PMA诱导的HB-EGF从THP-1细胞的释放分别抑制71.9%、77.7%、64.2%、76.6%和67.5%。与用本发明的鼠抗体获得的结果高度相当,相等浓度的本发明的嵌合抗体ch16、ch22、ch34、ch42和ch44对PMA诱导的HB-EGF从THP-1细胞的释放分别抑制73.6%、81.9%、76.1%、80.8%和70.7%。

[0479] 实施例30:本发明的抗体对体外PMA诱导的HB-EGF脱落的抑制效应的分析

[0480] 与上述实施例29互补,进行基于ELISA的HB-EGF释放测定以验证本发明的抗体对PMA诱导的内源性HB-EGF从人U-937细胞释放的抑制效应。

[0481] 本实施例中使用的重组抗体材料的产生与实施例25中描述的相同。本实施例中使用的基于ELISA的HB-EGF释放测定与实施例30中描述的相同,唯一的区别在于使用U-937(欧洲细胞株/微生物保藏中心(European Collection of Authenticated Cell Cultures),UK)细胞代替THP-1(美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection),USA)细胞。

[0482] 图33显示本实验的代表性结果,以绝对数(图33a)和抑制百分比(图33b)表明供试品对PMA诱导的HB-EGF从U-937细胞释放的效应。尽管作为金属蛋白酶的小分子抑制剂的巴马司他(BB94)充当阳性对照并且导致对PMA诱导的HB-EGF释放的100.1%抑制,但小鼠或人IgG同种型对照的存在对HB-EGF脱落没有显著效应。相比之下,相等浓度的本发明的鼠抗体m16、m22、m34、m42和m44对PMA诱导的HB-EGF从U-937细胞的释放分别抑制99.6%、101.3%、98.2%、103.5%和100.5%。与用本发明的鼠抗体获得的结果高度相当,相等浓度的本发明的嵌合抗体ch16、ch22、ch34、ch42和ch44对PMA诱导的HB-EGF从U-937细胞的释放分别抑制100.8%、103.2%、98.1%、103.0%和99.2%。

[0483] 实施例31:本发明的抗体对体外PMA诱导的转化生长因子α(TGFα)脱落的抑制效应的分析

[0484] 在以下研究中,进行基于ELISA的TGFα释放测定以分析本发明的抗体对PMA诱导的内源性TGFα从人PC3前列腺癌细胞释放的抑制效应。

[0485] 本实施例中使用的重组抗体材料的产生与实施例17中描述的相同。在以下描述了本实施例中使用的基于ELISA的TGFα释放测定。

[0486] 简而言之,在第1天,将Nunc black MaxiSorp® 96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)用每孔100μl的山羊抗人TGFα捕获抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以0.4μg/ml TBS在4℃下包被过夜。在第2天,除去捕获抗体溶液,并将MaxiSorp®板用每孔300μl的TBS、1%BSA在室温下封闭3小时。同时,将80μl正常生长培养基中的100,000个PC3(欧洲细胞株/微生物保藏中心(European Collection of Authenticated Cell Cultures),UK)细胞接种到F形底96孔细胞培养板(Corning,USA)的各孔中,并且在37℃、5%$CO_2$下与每孔20μl的OptiMEM培养基一起预孵育30分钟,该OptiMEM培养基补充有50μM的巴马司他(BB94,Abcam,UK)作为阳性对照(在所得100μl样品体积中的最终浓度为10μM)、5μ

g/ml的小鼠IgG抗体(Thermo Fisher Scientific,USA)作为同种型对照(在所得100μl样品体积中的最终浓度为1μg/ml)或5μg/ml的本发明的抗体(在所得100μl样品体积中的最终浓度为1μg/ml)。在刺激对照的情况下,添加不含供试品的20μl的OptiMEM培养基。随后,在37℃、5%$CO_2$下,用每孔20μl的PMA(Sigma-Aldrich,USA)以150ng/ml OptiMEM(最终浓度为25ng/ml)刺激细胞(未刺激的对照的那些除外)2小时。平行地,从MaxiSorp®板除去封闭缓冲液,并将板在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次。为了避免干燥,将30μl的TBS立即添加到MaxiSorp®板的各孔中,随后每样品转移70μl的无细胞上清液。另外,将用TBS以限定浓度稀释的100μl重组人TGFα蛋白(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)添加到板中作为标准参考。然后,将每孔100μl的生物素化山羊抗人TGFα检测抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以37.5ng/ml TBS添加,避直射光,将板在室温下孵育2小时。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后,将100μl的用TBS以1:10,000稀释的链霉亲和素-AP(R&D Systems,USA)添加至各孔中,再次避直射光,将板在室温下孵育30分钟。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤另一轮4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后,添加每孔100μl的AttoPhos底物溶液(Promega,USA)以在室温下暗处孵育1小时。使用infinite M1000(Tecan Group,瑞士)酶标仪,在435nm的激发波长和555nm的发射波长下收集各孔的荧光。

[0487] 图34显示本实验的代表性结果,以绝对数(图34a)和抑制百分比(图34b)表明供试品对PMA诱导的TGFα从PC3细胞释放的效应。尽管作为金属蛋白酶的小分子抑制剂的巴马司他(BB94)充当阳性对照并且导致对PMA诱导的TGFα释放的99.1%抑制,但IgG同种型对照的存在对TGFα脱落没有显著效应。同样,在相等浓度的本发明的抗体3、5和34的存在下,未检测到对TGFα脱落的显著效应。此外,在相等浓度的本发明的抗体16、22、42、43和44存在下,仅检测到对TGFα脱落的非常中度的效应,所述抗体对PMA诱导的TGFα从PC3细胞的释放分别抑制13.9%、12.7%、14.3%、12.4%和14.1%。

[0488] 实施例32:本发明的抗体对体外LPS诱导的TNFα在来自健康供体的人原材料中脱落的抑制效应的分析

[0489] 在以下研究中,进行基于ELISA的TNFα释放测定,以使用外周血单个核细胞(PBMC)分析本发明的抗体对LPS诱导的内源性TNFα从获自健康供体的人原材料释放的抑制效应。

[0490] 本实施例中使用的重组抗体材料的产生与实施例17中描述的相同。在以下描述了本实施例中使用的基于ELISA的TNFα释放测定。

[0491] 简而言之,在第1天,将Nunc black MaxiSorp®96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)用每孔100μl的小鼠抗人TNFα捕获抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以4μg/ml TBS在4℃下包被过夜。在第2天,除去捕获抗体溶液,并将MaxiSorp®板用每孔300μl的TBS、1%BSA在室温下封闭3小时。同时,将80μl正常生长培养基中的20,000个来自健康供体的PBMC(STEMCELL Technologies,加拿大)细胞接种到Greiner CELLSTAR V形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)的各孔中,并且在37℃、5%$CO_2$下与每孔20μl的标准生长培养基一起预孵育30分钟,该标准生长培养基补充有50μM的巴马司他(BB94,Abcam,UK)作为阳性对照(在所得100μl样品体积中的最终浓度为10μM)、5μg/ml的小鼠IgG

抗体(Thermo Fisher Scientific,USA)作为同种型对照(在所得100μl样品体积中的最终浓度为1μg/ml)或5μg/ml的本发明的抗体(在所得100μl样品体积中的最终浓度为1μg/ml)。在刺激的对照的情况下,添加不含供试品的20μl标准生长培养基。随后,在37℃、5%$CO_2$下,用每孔20μl的LPS(Sigma-Aldrich,USA)以300ng/ml生长培养基(最终浓度为50ng/ml)刺激细胞(未刺激的对照的那些除外)2小时。然后,将96孔板离心以沉淀细胞。平行地,从MaxiSorp®板除去封闭缓冲液,并将板在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次。为了避免干燥,将30μl的TBS立即添加到MaxiSorp®板的各孔中,随后每样品转移70μl的无细胞上清液。另外,将用TBS以限定浓度稀释的100μl重组人TNFα蛋白(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)添加到板中作为标准参考。然后,将每孔100μl的生物素化山羊抗人TNFα检测抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以50ng/ml TBS添加,避直射光,将板在室温下孵育2小时。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后,将100μl的用TBS以1:10,000稀释的链霉亲和素-AP(R&D Systems,USA)添加至各孔中,再次避直射光,将板在室温下孵育30分钟。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤另一轮4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后,添加每孔100μl的AttoPhos底物溶液(Promega,USA)以在室温下暗处孵育1小时。使用infinite M1000(Tecan Group,瑞士)酶标仪,在435nm的激发波长和555nm的发射波长下收集各孔的荧光。

[0492] 图35显示本实验的代表性结果,以绝对数(图35a)和抑制百分比(图35b)表明供试品对LPS诱导的TNFα从来自健康供体的PBMC释放的效应。尽管作为金属蛋白酶的小分子抑制剂的巴马司他(BB94)充当阳性对照并且导致对LPS诱导的TNFα释放的99.6%抑制,但IgG同种型对照的存在对TNFα脱落没有显著效应。相比之下,相等浓度的本发明的抗体16、22和42对LPS诱导的TNFα从来自健康供体的PBMC的释放分别抑制81.3%、72.8%和77.0%。

[0493] 实施例33:本发明的抗体对体外LPS诱导的TNFα在来自健康供体的人原材料中脱落的抑制效应的分析

[0494] 与上述实施例32互补,进行基于ELISA的TNFα释放测定,以测试抗体对LPS诱导的内源性TNFα从来自健康供体的人巨噬细胞释放的抑制效应。

[0495] 本实施例中使用的重组抗体材料的产生与实施例17中描述的相同。在以下描述了巨噬细胞的分离以及本实施例中使用的基于ELISA的TNFα释放测定。

[0496] 为了获得人巨噬细胞,使用来自4个健康供体的外周血单个核细胞(PBMC)。使来自5ml人血液的细胞重悬于补充有10%FCS(Atlanta Biological,USA)和青霉素/链霉素(Corning,USA)的20ml的DMEM培养基(Corning,USA)(DMEM/FCS)中,然后在37℃、5%$CO_2$下于两个10cm皮氏培养皿(Thermo Fisher,USA)上孵育3小时。随后除去未贴壁的细胞,每个板添加补充有10ng/ml人MCSF(Peprotech,USA)的6ml的DMEM/FCS(DMEM/FCS/MCSF)。将两个板在37℃、5%$CO_2$下孵育2天,然后,在第2天和第4天将2ml的DMEM/FCS/MCSF添加到每个板中。在第5天,除去所有培养基,并用5ml PBS(Corning,USA)洗涤贴壁的细胞一次。将2ml的Accutase(Promocell,USA)溶液添加到每个板中并在37℃下孵育15分钟。将10ml的DMEM/FCS添加到每个板中,并将分离的细胞收集在15ml Falcon管中。随后,将细胞在台式离心机(Eppendorf,USA)中以1,500rpm沉淀5分钟。除去培养基,并使细胞重悬于2ml的DMEM/FCS

中。在血细胞计数器(Thermo Fisher,USA)中,对该细胞悬浮液的10μl进行手动计数。将细胞数调节至2.5×$10^5$个细胞/ml,并将200μl悬浮液铺板在48孔组织培养板(Corning,USA)的一个孔中,导致0.5×$10^5$个细胞/48孔的细胞密度。然后将细胞在37℃下孵育16小时。对于测量TNFα从PBMC细胞的释放,使用OptEIA人TNFαELISA(BD,USA)。简而言之,在第1天,将Costar®96孔板(Corning,USA)用每孔100μl的用PBS以1:250的抗人TNFα捕获抗体(作为OptEIA®ELISA试剂盒的一部分提供)在4℃下包被过夜。在第2天,除去捕获抗体溶液,采用Nunc Immunowash板洗涤器(VWR,USA),将Costar®板用每孔350μlPBS-T(Boston Bio,USA)洗涤4次,然后将板用每孔300μl的PBS、10%FCS在室温下封闭2小时。

[0497] 同时,在第2天,在37℃、5%$CO_2$下,将人巨噬细胞与每孔200μl的DMEM/FCS一起预孵育30分钟,该DMEM/FCS补充有20μM巴马司他(BB94,Abcam,MA,USA)作为阳性对照(在所得400μl样品体积中的最终浓度为10μM)、或20μg/ml的本发明的纯化抗体(在所得400μl样品体积中的最终浓度为10μg/ml)。在未刺激的对照的情况下,添加不含供试品的200μl标准生长培养基。随后,在37℃、5%$CO_2$下,用每孔200μl的LPS(Sigma-Aldrich,USA)以10ng/ml生长培养基(最终浓度为5ng/ml)刺激细胞(未刺激对照的那些除外)2小时。在2小时后,除去上清液,并且在台式离心机(Eppendorf,USA)中在13,000rpm和4℃下离心出碎片,并将澄清的上清液用PBS-T(Boston Bio,USA)以1:10稀释。将稀释的上清液保持于冰上,直至添加到ELISA板中。

[0498] 平行地,从Costar®板中除去封闭缓冲液,并且采用Nunc Immunowash板洗涤器(VWR,USA),将板用每孔350μl的PBS-T(Boston Bio,USA)洗涤4次。紧接着将100μl澄清的经稀释上清液添加到孔中。另外,将用PBS-BSA以限定浓度稀释的100μl重组人TNFα蛋白(作为OptEIA ELISA试剂盒的一部分提供)添加到板中作为标准参考。将样品和标准物在室温下孵育2小时。然后,采用Nunc Immunowash板洗涤器(VWR,USA),将板用每孔350μl的PBS-T(Boston Bio,USA)洗涤4次。然后,每孔添加100μl的用PBS-FCS以1:250稀释的生物素化抗人TNFα检测抗体(作为OptEIA ELISA试剂盒的一部分提供),并将板在室温下孵育2小时。在采用Nunc Immunowash板洗涤器(VWR,USA)用每孔350μl PBS-T(Boston Bio,USA)洗涤4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后,将100μl的用PBS-FCS以1:40稀释的链霉抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶缀合物(作为OptEIA ELISA试剂盒的一部分提供)添加到各孔中,并将板在室温下孵育20分钟。在采用Nunc Immunowash板洗涤器(VWR,USA)用每孔350μl PBS-T(Boston Bio,USA)洗涤另一轮4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后,添加每孔100μl TMB底物溶液(BD,USA)以孵育20分钟。通过添加50μl 2N硫酸(Boston Bio,USA)终止颜色反应,并使用Multiskan Titertek读板器(VWR,USA)在450nm波长下读取ELISA板。

[0499] 图36显示本实验的代表性结果,以绝对数(图36a)和抑制百分比(图36b)表明供试品对LPS诱导的TNFα从来自健康供体的人巨噬细胞释放的效应。作为金属蛋白酶的小分子抑制剂的巴马司他(BB94)充当阳性对照,并且导致对LPS诱导的TNFα释放的68.3%抑制。相等浓度的本发明的抗体16、22和42对LPS诱导的TNFα从来自健康供体的人巨噬细胞的释放分别抑制85.8%、78.8%和93.2%。

[0500] 实施例34:本发明的抗体对体外PMA诱导的IL-6R在来自健康供体的人原材料中脱落的抑制效应的分析

[0501] 在以下研究中，进行基于ELISA的IL-6R释放测定，以使用外周血单个核细胞(PBMC)分析本发明的抗体对PMA诱导的内源性IL-6R从获自健康供体的人原材料释放的抑制效应。

[0502] 本实施例中使用的重组抗体材料的产生与实施例17中描述的相同。在以下描述了本实施例中使用的基于ELISA的IL-6R释放测定。

[0503] 简而言之，在第1天，将Nunc black MaxiSorp®96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)用每孔100μl的小鼠抗人IL-6R捕获抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以4μg/ml TBS在4℃下包被过夜。在第2天，除去捕获抗体溶液，并将MaxiSorp®板用每孔300μl的TBS、1％BSA在室温下封闭3小时。同时，将80μl正常生长培养基中的40,000个来自健康供体的PBMC(STEMCELL Technologies,加拿大)细胞接种到Greiner CELLSTAR V形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)的各孔中，并且在37℃、5％$CO_2$下与每孔20μl的标准生长培养基一起预孵育30分钟，该标准生长培养基补充有50μM的巴马司他(BB94,Abcam,UK)作为阳性对照(在所得100μl样品体积中的最终浓度为10μM)、5μg/ml的小鼠IgG抗体(Thermo Fisher Scientific,USA)作为同种型对照(在所得100μl样品体积中的最终浓度为1μg/ml)或5μg/ml的本发明的抗体(在所得100μl样品体积中的最终浓度为1μg/ml)。在刺激对照的情况下，添加不含供试品的20μl标准生长培养基。随后，在37℃、5％$CO_2$下，用每孔20μl的PMA(Sigma-Aldrich,USA)以150ng/ml生长培养基(最终浓度为25ng/ml)刺激细胞(未刺激对照的那些除外)6小时。然后，将96孔板离心以沉淀细胞。平行地，从MaxiSorp®板除去封闭缓冲液，并将板在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次。为了避免干燥，将30μl的TBS立即添加到MaxiSorp®板的各孔中，随后每样品转移70μl的无细胞上清液。另外，将用TBS以限定浓度稀释的100μl重组人IL-6R蛋白(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)添加到板中作为标准参考。然后，将每孔100μl的生物素化山羊抗人IL-6R检测抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以50ng/ml TBS添加，避直射光，将板在室温下孵育2小时。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后，将100μl的用TBS以1:10,000稀释的链霉亲和素-AP(R&D Systems,USA)添加至各孔中，再次避直射光，将板在室温下孵育30分钟。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤另一轮4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后，添加每孔100μl的AttoPhos底物溶液(Promega,USA)以在室温下暗处孵育1小时。使用infinite M1000(Tecan Group,瑞士)酶标仪，在435nm的激发波长和555nm的发射波长下收集各孔的荧光。

[0504] 图37显示本实验的代表性结果，以绝对数(图37a)和抑制百分比(图37b)表明供试品对PMA诱导的IL-6R从来自健康供体的PBMC释放的效应。尽管作为金属蛋白酶的小分子抑制剂的巴马司他(BB94)充当阳性对照并且导致对PMA诱导的IL-6R释放的114.1％抑制，但IgG同种型对照的存在对IL-6R脱落没有显著效应。相比之下，相等浓度的本发明的抗体16、22和42对PMA诱导的IL-6R从来自健康供体的PBMC的释放分别抑制84.3％、79.3％和85.0％。

[0505] 实施例35:本发明的抗体对体外PMA诱导的HB-EGF在来自健康供体的人原材料中脱落的抑制效应的分析

[0506] 在以下研究中，进行基于ELISA的HB-EGF释放测定，以使用外周血单个核细胞(PBMC)分析本发明的抗体对PMA诱导的内源性HB-EGF从获自健康供体的人原材料释放的抑制效应。

[0507] 本实施例中使用的重组抗体材料的产生与实施例17中描述的相同。在以下描述了本实施例中使用的基于ELISA的HB-EGF释放测定。

[0508] 简而言之，在第1天，将Nunc black MaxiSorp® 96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)用每孔100μl的小鼠抗人HB-EGF捕获抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以4μg/ml TBS在4℃下包被过夜。在第2天，除去捕获抗体溶液，并将MaxiSorp®板用每孔300μl的TBS、1％BSA在室温下封闭3小时。同时，将80μl正常生长培养基中的80,000个来自健康供体的PBMC(STEMCELL Technologies,加拿大)细胞接种到Greiner CELLSTAR V形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)的各孔中，并且在37℃、5％$CO_2$下与每孔20μl的标准生长培养基一起预孵育30分钟，该标准生长培养基补充有50μM的巴马司他(BB94，Abcam,UK)作为阳性对照(在所得100μl样品体积中的最终浓度为10μM)、5μg/ml的小鼠IgG抗体(Thermo Fisher Scientific,USA)作为同种型对照(在所得100μl样品体积中的最终浓度为1μg/ml)或5μg/ml的本发明的抗体(在所得100μl样品体积中的最终浓度为1μg/ml)。在刺激对照的情况下，添加不含供试品的20μl标准生长培养基。随后，在37℃、5％$CO_2$下，用每孔20μl的PMA(Sigma-Aldrich,USA)以150ng/ml生长培养基(最终浓度为25ng/ml)刺激细胞(未刺激对照的那些除外)6小时。然后，将96孔板离心以沉淀细胞。平行地，从MaxiSorp®板除去封闭缓冲液，并将板在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次。为了避免干燥，将30μl的TBS立即添加到MaxiSorp®板的各孔中，随后每样品转移70μl的无细胞上清液。另外，将用TBS以限定浓度稀释的100μl重组人HB-EGF蛋白(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)添加到板中作为标准参考。然后，将每孔100μl的生物素化山羊抗人HB-EGF检测抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以50ng/ml TBS添加，避直射光，将板在室温下孵育2小时。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后，将100μl的用TBS以1:10,000稀释的链霉亲和素-AP(R&D Systems,USA)添加至各孔中，再次避直射光，将板在室温下孵育30分钟。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤另一轮4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后，添加每孔100μl的AttoPhos底物溶液(Promega,USA)以在室温下暗处孵育1小时。使用infinite M1000(Tecan Group,瑞士)酶标仪，在435nm的激发波长和555nm的发射波长下收集各孔的荧光。

[0509] 图38显示本实验的代表性结果，以绝对数(图38a)和抑制百分比(图38b)表明供试品对PMA诱导的HB-EGF从来自健康供体的PBMC释放的效应。尽管作为金属蛋白酶的小分子抑制剂的巴马司他(BB94)充当阳性对照并且导致对PMA诱导的HB-EGF释放的94.9％抑制，但IgG同种型对照的存在对HB-EGF脱落没有显著效应。相比之下，相等浓度的本发明的抗体16、22和42对PMA诱导的HB-EGF从来自健康供体的PBMC的释放分别抑制71.6％、56.5％和77.6％。

[0510] 实施例36:本发明的抗体对体内LPS诱导的TNFα脱落的抑制效应的分析

[0511] 在以下研究中，进行基于ELISA的TNFα释放测定，以验证本发明的抗体对小鼠败血

性休克模型中LPS诱导的内源性TNFα释放的抑制效应。人源化huNOG-EXL小鼠(人CD34+)获自Taconic,USA。到达后,将小鼠笼养最少12小时以适应新环境,然后开始任何处理。所有小鼠实验均获得HSS/Weill Cornell Medicine的机构动物护理与使用委员会(IACUC)规定批准并遵守该规定。

[0512] 在第1天,一组小鼠以500μg/200ul PBS/小鼠(25mg/kg)的浓度注射本发明的抗体。第二组仅注射相同体积的PBS(200μl PBS/小鼠)。12小时后,所有小鼠均接受LPS(Sigma,USA)注射,浓度为500ng/200μl/小鼠。密切监测所有小鼠,并在2小时后通过$CO_2$吸入处以安乐死。从胸腔中取出血液,并在室温下以2000g离心10分钟以除去细胞和碎片。将澄清的血清转移到新管中,随后用PBS以1:100稀释用于ELISA测量。

[0513] 对于测量TNFα释放,使用OptEIA人TNFαELISA(BD,USA)。简而言之,在第1天,将Costar®96孔板(Corning,USA)用每孔100μl的用PBS以1:250的抗人TNFα捕获抗体(作为OptEIA®ELISA试剂盒的一部分提供)在4℃下包被过夜。在第2天,除去捕获抗体溶液,采用Nunc Immunowash板洗涤器(VWR,USA),将Costar®板用每孔350μl PBS-T(Boston Bio,USA)洗涤4次,并且将板用每孔300μl的PBS、10%FCS在室温下封闭2小时。然后,从Costar®板中除去封闭缓冲液,并且采用Nunc Immunowash板洗涤器(VWR,USA),将板用每孔350μl的PBS-T(Boston Bio,USA)洗涤4次。紧接着将100μl澄清稀释的血清添加到孔中。另外,将用PBS-BSA以限定浓度稀释的100μl重组人TNFα蛋白(作为OptEIA ELISA试剂盒的一部分提供)添加到板中作为标准参考。将样品和标准物在室温下孵育2小时。然后,采用Nunc Immunowash板洗涤器(VWR,USA),将板用每孔350μl的PBS-T(Boston Bio,USA)洗涤4次。然后,每孔添加100μl的用PBS-FCS以1:250稀释的生物素化抗人TNFα检测抗体(作为OptEIA ELISA试剂盒的一部分提供),并将板在室温下孵育2小时。在采用Nunc Immunowash板洗涤器(VWR,USA)用每孔350μl PBS-T(Boston Bio,USA)洗涤4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后,将100μl的用PBS-FCS以1:40稀释的链霉抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶缀合物(作为OptEIA ELISA试剂盒的一部分提供)添加到各孔中,并将板在室温下孵育20分钟。在采用Nunc Immunowash板洗涤器(VWR,USA)用每孔350μl PBS-T(Boston Bio,USA)洗涤另一轮4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后,添加每孔100μl TMB底物溶液(BD,USA)以孵育20分钟。通过添加50μl 2N硫酸(Boston Bio,USA)终止颜色反应,并使用Multiskan Titertek读板器(VWR,USA)在450nm波长下读取ELISA板。

[0514] 图39显示本实验的代表性结果,以绝对数(图39a)和释放百分比(图39b)表明供试品对人源化小鼠血清中LPS诱导的TNFα释放的效应。与设定为100%的人源化小鼠血清中LPS诱导的TNFα释放相比,本发明的抗体16、22和42导致人源化小鼠血清中LPS诱导的TNFα释放分别为14.3%、17.5%和6.8%。

[0515] 实施例37:本发明的抗体对体外LPS诱导的TNFα在来自RA患者的人原材料中脱落的抑制效应的分析

[0516] 与其中使用外周血单个核细胞(PBMC)测试本发明抗体对LPS诱导的内源性TNFα从获自健康供体的人原材料释放的抑制效应的实施例32形成对照,进行本分析以分析本发明的抗体对LPS诱导的内源性TNFα从获自患有类风湿性关节炎的患者(RA患者)的人原材料释放的抑制效应。

[0517] 为了产生重组嵌合抗体材料,设计、优化并合成了靶DNA序列。将完整序列亚克隆

到pTT5载体(Thermo Fisher Scientific,USA)中,并大型制备转染级质粒用于CHO-3E7或HD CHO-S(Thermo Fisher Scientific,USA)细胞表达。在37℃和5-8%$CO_2$下,在定轨摇床(VWR Scientific,德国)上,使CHO细胞在Erlenmeyer烧瓶(Corning Inc.,USA)中的无血清FreeStyle™ CHO表达培养基(Thermo Fisher Scientific,USA)中生长。转染前一天,将细胞以适当的密度接种到新Erlenmeyer烧瓶中。在转染当天,将DNA和转染试剂以最佳比率混合,然后添加到具有准备用于转染的细胞的烧瓶中。将编码靶蛋白的重组质粒瞬时转染到悬浮CHO细胞培养物中。转染后第6天收集的细胞培养上清液用于纯化。将细胞培养肉汤离心并过滤。将过滤的细胞培养上清液以适当的流量加载到MabSelect SuRe™LX(GE Healthcare,UK)亲和纯化柱上。在用适当的缓冲液洗涤和洗脱后,合并洗脱的级分并将缓冲液更换为最终制剂缓冲液。通过SDS-PAGE分析来分析纯化蛋白质以进行分子量和纯度测量。最后,应用NanoDrop 2000分光光度计(Thermo Fisher Scientific,USA)测定浓度。

[0518] 在以下描述了本实施例中使用的基于ELISA的TNFα释放测定。

[0519] 简而言之,在第1天,将Nunc black MaxiSorp®96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)用每孔100μl的小鼠抗人TNFα捕获抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以4μg/ml TBS在4℃下包被过夜。在第2天,除去捕获抗体溶液,并将MaxiSorp®板用每孔300μl的TBS、1%BSA在室温下封闭3小时。同时,将80μl正常生长培养基中的20,000个来自患有类风湿性关节炎的患者的PBMC(STEMCELL Technologies,加拿大)细胞接种到Greiner CELLSTAR V形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)的各孔中,并且在37℃、5%$CO_2$下与每孔20μl的标准生长培养基一起预孵育30分钟,该标准生长培养基补充有50μM的巴马司他(BB94,Abcam,UK)作为阳性对照(在所得100μl样品体积中的最终浓度为10μM)、5μg/ml的人IgG抗体(Thermo Fisher Scientific,USA)作为同种型对照(在所得100μl样品体积中的最终浓度为1μg/ml)或5μg/ml的本发明的抗体(在所得100μl样品体积中的最终浓度为1μg/ml)。在刺激对照的情况下,添加不含供试品的20μl标准生长培养基。随后,在37℃、5%$CO_2$下,用每孔20μl的LPS(Sigma-Aldrich,USA)以6ng/ml生长培养基(最终浓度为1ng/ml)刺激细胞(未刺激的对照的那些除外)1.5小时。然后,将96孔板离心以沉淀细胞。平行地,从MaxiSorp®板除去封闭缓冲液,并将板在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次。为了避免干燥,将30μl的TBS立即添加到MaxiSorp®板的各孔中,随后每样品转移70μl的无细胞上清液。另外,将用TBS以限定浓度稀释的100μl重组人TNFα蛋白(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)添加到板中作为标准参考。然后,将每孔100μl的生物素化山羊抗人TNFα检测抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以50ng/ml TBS添加,避直射光,将板在室温下孵育2小时。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后,将100μl的用TBS以1:10,000稀释的链霉亲和素-AP(R&D Systems,USA)添加至各孔中,再次避直射光,将板在室温下孵育30分钟。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤另一轮4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后,添加每孔100μl的AttoPhos底物溶液(Promega,USA)以在室温下暗处孵育1小时。使用infinite M1000(Tecan Group,瑞士)酶标仪,在435nm的激发波长和555nm的发射波长下收集各孔的荧光。

[0520] 图40显示本实验的代表性结果,以绝对数(图40a)和抑制百分比(图40b)表明供试

品对LPS诱导的TNFα从来自患有类风湿性关节炎的患者的PBMC释放的效应。尽管作为金属蛋白酶的小分子抑制剂的巴马司他(BB94)充当阳性对照并且导致对LPS诱导的TNFα释放的99.9％抑制，但IgG同种型对照的存在对TNFα脱落没有显著效应。相比之下，相等浓度的本发明的抗体16、22、34、42和44对LPS诱导的TNFα从来自患有类风湿性关节炎的患者的PBMC的释放分别抑制83.6％、76.5％、66.6％、82.1％和70.2％。

[0521] 实施例38：本发明的抗体对体外PMA诱导的IL-6R在来自RA患者的人原材料中脱落的抑制效应的分析

[0522] 与其中使用外周血单个核细胞(PBMC)测试本发明抗体对PMA诱导的内源性IL-6R从获自健康供体的人原材料释放的抑制效应的实施例34形成对照，进行本分析以分析本发明的抗体对PMA诱导的内源性IL-6R从获自患有类风湿性关节炎的患者(RA患者)的人原材料释放的抑制效应。

[0523] 本实施例中使用的重组抗体材料的产生与实施例37中描述的相同。在以下描述了本实施例中使用的基于ELISA的IL-6R释放测定。

[0524] 简而言之，在第1天，将Nunc black MaxiSorp®96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)用每孔100μl的小鼠抗人IL-6R捕获抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以4μg/ml TBS在4℃下包被过夜。同时，将80μl正常生长培养基中的40,000个来自患有类风湿性关节炎的患者的PBMC(STEMCELL Technologies,加拿大)细胞接种到Greiner CELLSTAR V形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)的各孔中，并且在37℃、5％$CO_2$下与每孔20μl的标准生长培养基一起预孵育30分钟，该标准生长培养基补充有50μM的巴马司他(BB94,Abcam,UK)作为阳性对照(在所得100μl样品体积中的最终浓度为10μM)、5μg/ml的小鼠IgG抗体(Thermo Fisher Scientific,USA)作为同种型对照(在所得100μl样品体积中的最终浓度为1μg/ml)或5μg/ml的本发明的抗体(在所得100μl样品体积中的最终浓度为1μg/ml)。在刺激对照的情况下，添加不含供试品的20μl标准生长培养基。随后，在37℃、5％$CO_2$下，用每孔20μl的PMA(Sigma-Aldrich,USA)以150ng/ml生长培养基(最终浓度为25ng/ml)刺激细胞(未刺激对照的那些除外)24小时。在第2天，除去捕获抗体溶液，并将MaxiSorp®板用每孔300μl的TBS、1％BSA在室温下封闭1小时。然后，将96孔板离心以沉淀细胞。平行地，从MaxiSorp®板除去封闭缓冲液，并将板在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次。为了避免干燥，将30μl的TBS立即添加到MaxiSorp®板的各孔中，随后每样品转移70μl的无细胞上清液。另外，将用TBS以限定浓度稀释的100μl重组人IL-6R蛋白(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)添加到板中作为标准参考。然后，将每孔100μl的生物素化山羊抗人IL-6R检测抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以100ng/ml TBS添加，避直射光，将板在室温下孵育2小时。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后，将100μl的用TBS以1:10,000稀释的链霉亲和素-AP(R&D Systems,USA)添加至各孔中，再次避直射光，将板在室温下孵育30分钟。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤另一轮4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后，添加每孔100μl的AttoPhos底物溶液(Promega,USA)以在室温下暗处孵育1小时。使用infinite M1000(Tecan Group,瑞士)酶标仪，在435nm的激发波长和555nm的发射波长下收集各孔的荧光。

[0525] 图41显示本实验的代表性结果，以绝对数(图41a)和抑制百分比(图41b)表明供试品对PMA诱导的IL-6R从来自患有类风湿性关节炎的患者的PBMC释放的效应。尽管作为金属蛋白酶的小分子抑制剂的巴马司他(BB94)充当阳性对照并且导致对PMA诱导的IL-6R释放的103.6％抑制，但IgG同种型对照的存在对IL-6R脱落没有显著效应。相比之下，相等浓度的本发明的抗体16、22、34、42和44对PMA诱导的IL-6R从来自患有类风湿性关节炎的患者的PBMC的释放分别抑制72.3％、61.1％、45.6％、73.5％和53.1％。

[0526] 实施例39：本发明的抗体对体外PMA诱导的HB-EGF在来自RA患者的人原材料中脱落的抑制效应的分析

[0527] 与其中使用外周血单个核细胞(PBMC)测试本发明抗体对PMA诱导的内源性HB-EGF从获自健康供体的人原材料释放的抑制效应的实施例35形成对照，进行本分析以分析本发明的抗体对PMA诱导的内源性HB-EGF从获自患有类风湿性关节炎的患者(RA患者)的人原材料释放的抑制效应。

[0528] 本实施例中使用的重组抗体材料的产生与实施例37中描述的相同。在以下描述了本实施例中使用的基于ELISA的HB-EGF释放测定。

[0529] 简而言之，在第1天，将Nunc black MaxiSorp®96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)用每孔100μl的大鼠抗人HB-EGF捕获抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以2μg/ml TBS在4℃下包被过夜。在第2天，除去捕获抗体溶液，并将MaxiSorp®板用每孔300μl的TBS、1％BSA在室温下封闭3小时。同时，将80μl正常生长培养基中的80,000个来自患有类风湿性关节炎的患者的PBMC(STEMCELL Technologies,加拿大)细胞接种到Greiner CELLSTAR V形底96孔板(Thermo Fisher Scientific,USA)的各孔中，并且在37℃、5％$CO_2$下与每孔20μl的标准生长培养基一起预孵育30分钟，该标准生长培养基补充有50μM的巴马司他(BB94,Abcam,UK)作为阳性对照(在所得100μl样品体积中的最终浓度为10μM)、5μg/ml的人IgG抗体(Thermo Fisher Scientific,USA)作为同种型对照(在所得100μl样品体积中的最终浓度为1μg/ml)或5μg/ml的本发明的抗体(在所得100μl样品体积中的最终浓度为1μg/ml)。在刺激对照的情况下，添加不含供试品的20μl标准生长培养基。随后，在37℃、5％$CO_2$下，用每孔20μl的PMA(Sigma-Aldrich,USA)以150ng/ml生长培养基(最终浓度为25ng/ml)刺激细胞(未刺激的对照的那些除外)6小时。然后，将96孔板离心以沉淀细胞。平行地，从MaxiSorp®板除去封闭缓冲液，并将板在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次。为了避免干燥，将30μl的TBS立即添加到MaxiSorp®板的各孔中，随后每样品转移70μl的无细胞上清液。另外，将用TBS以限定浓度稀释的100μl重组人HB-EGF蛋白(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)添加到板中作为标准参考。然后，将每孔100μl的生物素化山羊抗人HB-EGF检测抗体(作为DuoSet ELISA试剂盒的一部分提供)以50ng/ml TBS添加，避直射光，将板在室温下孵育2小时。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后，将100μl的用TBS以1:10,000稀释的链霉亲和素-AP(R&D Systems,USA)添加至各孔中，再次避直射光，将板在室温下孵育30分钟。在96头板洗涤器(Tecan Group,瑞士)上用每孔350μl的TBS-T(Carl Roth,德国)洗涤另一轮4次并在第四次循环后小心除去所有缓冲液痕量之后，添加每孔100μl的AttoPhos底物溶液(Promega,USA)以在室温下暗处孵育1小时。使用infinite M1000(Tecan Group,瑞士)酶标仪，在435nm的

激发波长和555nm的发射波长下收集各孔的荧光。

[0530] 图42显示本实验的代表性结果，以绝对数(图42a)和抑制百分比(图42b)表明供试品对PMA诱导的HB-EGF从来自患有类风湿性关节炎的患者的PBMC释放的效应。尽管作为金属蛋白酶的小分子抑制剂的巴马司他(BB94)充当阳性对照并且导致对PMA诱导的HB-EGF释放的101.6％抑制，但IgG同种型对照的存在对HB-EGF脱落没有显著效应。相比之下，相等浓度的本发明的抗体16、22、34、42和44对PMA诱导的HB-EGF从来自患有类风湿性关节炎的患者的PBMC的释放分别抑制66.0％、54.7％、30.6％、76.1％和37.8％。

[0531] 参考文献

[0532] • Köhler,G.&Milstein,C.(1975):Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.In:Nature.Bd.256,S.495-497.Jonsson和Malmquist,Advances in Biosnsors,2:291-336(1992)

[0533] • Wu等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA,95:6037-6042(1998)

[0534] • Banik,SSR;Doranz,BJ(2010)."Mapping complex antibody epitopes".Genetic Engineering&Biotechnology News.3(2):25-8

[0535] • DeLisser,HM(1999).Epitope mapping.Methods Mol Biol.96.第11-20页

[0536] • Finco等人,Comparison of competitive ligand-binding assay and bioassay formats for the measurement of neutralizing antibodies to protein therapeutics.J Pharm Biomed Anal.2011年1月25日;54(2):351-8.

[0537] • Deng等人,Enhancing antibody patent protection using epitope mapping information MAbs.2018年2月-3月;10(2):204-209

[0538] • Huston等人,Cell Biophysics,22:189-224(1993)；

[0539] • Plückthun和Skerra,Meth.Enzymol.,178:497-515(1989)和Day,E.D.,Advanced Immunochemistry,第二版,Wiley-Liss,Inc.,New York,N.Y.(1990)

[0540] • Harding,The immunogenicity of humanized and fully human antibodies.MAbs.2010年5月-6月;2(3):256-265.

[0541] • Eylenstein等人,Molecular basis of in vitro affinity maturation and functional evolution of aneutralizing anti-human GM-CSF antibody,mAbs,8:1,176-186(2016)

[0542] • Kabat等人,J.Biol.Chem.252,6609-6616(1977)和Kabat等人,Sequences of protein of immunological interest.(1991)

[0543] • Chothia等人,J.Mol.Biol.196:901-917(1987)

[0544] • MacCallum等人,J.Mol.Biol.262:732-745(1996)

[0545] • Paul Baran等人,Biol Chem.2013年5月24日;288(21):14756-14768.

[0546] 序列

[0547] 以下序列构成本申请公开内容的一部分。本申请也提供了WIPO ST 25兼容的电子序列表。为避免疑义，如果下表中的序列与电子序列表之间存在差异，则该表中的序列应视为正确的序列。

[0548]

| 克隆 | SEQ ID NO | 限定符 | 序列 |
|---|---|---|---|
| #3 | 1 | HC VD w 信号肽 | MGRLTSSFLLLIVPAYVLSQVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLTTFAMGIGWVRQPSGKGLEWLAHIWWDGEKYNNPVLKSRLTISKDTSKNQVFLRIANVDTPDTATYYCARISSIYYIIDNWGQGTSVTVSS |
| | 2 | HC VD w/o 信号肽 | QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLTTFAMGIGWVRQPSGKGLEWLAHIWWDGEKYNNPVLKSRLTISKDTSKNQVFLRIANVDTPDTATYYCARISSIYYIIDNWGQGTSVTVSS |
| | 3 | HCDR1 | TFAMGIG |
| | 4 | HCDR2 | HIWWDGEKYNNPVLKS |
| | 5 | HCDR3 | ISSIYYIIDN |
| | 6 | LC VD w 信号肽 | MVFTPQILGLMLFWISASRGDIVLTQSPATLSVTPGHSVSLSCRASQSISNNLHWYQKKSHESPRLLIKYVSQSISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVETEDFGMYFCQQSYNWPLTFGAGTKLELK |
| | 7 | LC VD w/o 信号肽 | DIVLTQSPATLSVTPGHSVSLSCRASQSISNNLHWYQKKSHESPRLLIKYVSQSISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVETEDFGMYFCQQSYNWPLTFGAGTKLELK |
| | 8 | LCDR1 | RASQSISNNLH |
| | 9 | LCDR2 | YVSQSIS |
| | 10 | LCDR3 | QQSYNWPLT |

[0549]

| | | | |
|---|---|---|---|
| #5 | 11 | HC VD w 信号肽 | MGRLTSSFLLLIVPAYVLSQVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTFGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDEKYYNSALKSRLTISKATSKNQAFLKIANVDTADTATYYCARISNYGSNYWYFNVWGTGTTVTVSS |
| | 12 | HC VD w/o 信号肽 | QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTFGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDEKYYNSALKSRLTISKATSKNQAFLKIANVDTADTATYYCARISNYGSNYWYFNVWGTGTTVTVSS |
| | 13 | HCDR1 | TFGMGVG |
| | 14 | HCDR2 | HIWWDDEKYYNSALKS |
| | 15 | HCDR3 | ISNYGSNYWYFNV |
| | 16 | LC VD w 信号肽 | MDFQVQIFSFLLISASVILSRGQVVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSAGSSVSCMYWYQQKPGSSPRVLIYDTSNLASGVPARFTGSGSGTSYSLTISRMEAEDAASYYCQQWNSYPLTFGAGTKLELK |
| | 17 | LC VD w/o 信号肽 | QVVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSAGSSVSCMYWYQQKPGSSPRVLIYDTSNLASGVPARFTGSGSGTSYSLTISRMEAEDAASYYCQQWNSYPLTFGAGTKLELK |
| | 18 | LCDR1 | SAGSSVSCMY |
| | 19 | LCDR2 | DTSNLAS |
| | 20 | LCDR3 | QQWNSYPLT |
| #16 | 21 | HC VD w 信号肽 | MGRLTSSFLLLIVPAYVLSQVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTFALGVGWIRQPSGRGLEWLAHIWWDDDKYYNPALKSRLTISKDTSKNHVFLKIANVDTADTATYYCARITTYYYGMDYWGQGTSVTVSS |
| | 22 | HC VD w/o 信号肽 | QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTFALGVGWIRQPSGRGLEWLAHIWWDDDKYYNPALKSRLTISKDTSKNHVFLKIANVDTADTATYYCARITTYYYGMDYWGQGTSVTVSS |
| | 23 | HCDR1 | TFALGVG |
| | 24 | HCDR2 | HIWWDDDKYYNPALKS |
| | 25 | HCDR3 | ITTYYYGMDY |
| | 26 | LC VD w 信号肽 | MVFTPQILGLMLFWISASRGDIVLSQSPATLSVTPGDSVSLFCRASQSIGNHLHWYQQESHASPRLLIKYASQSISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVETEDFGMYFCQQSYNWPLTFGAGTKLELK |
| | 27 | LC VD w/o 信号肽 | DIVLSQSPATLSVTPGDSVSLFCRASQSIGNHLHWYQQESHASPRLLIKYASQSISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVETEDFGMYFCQQSYNWPLTFGAGTKLELK |

[0550]

| | | | |
|---|---|---|---|
| | 28 | LCDR1 | RASQSIGNHLH |
| | 29 | LCDR2 | YASQSIS |
| | 30 | LCDR3 | QQSYNWPLT |
| #22 | 31 | HC VD w 信号肽 | MGRLTSSFLLLIVPAYVLSQVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTFGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDEKYYNSALKSRLTISKATSKNQVFLKIANVDTADTATYYCARISNYGSNYWYFNVWGTGTTVTVSS |
| | 32 | HC VD w/o 信号肽 | QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTFGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDEKYYNSALKSRLTISKATSKNQVFLKIANVDTADTATYYCARISNYGSNYWYFNVWGTGTTVTVSS |
| | 33 | HCDR1 | TFGMGVG |
| | 34 | HCDR2 | HIWWDDEKYYNSALKS |
| | 35 | HCDR3 | ISNYGSNYWYFNV |
| | 36 | LC VD w信号肽 | MDFQVQIFSFLLISASVILSRGQVVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSAGSSVSYMYWYQQKPGSSPRVLIYDTSNLASGVPARFTGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWNSYPLTFGAGTKLELK |
| | 37 | LC VD w/o 信号肽 | QVVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSAGSSVSYMYWYQQKPGSSPRVLIYDTSNLASGVPARFTGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWNSYPLTFGAGTKLELK |
| | 38 | LCDR1 | SAGSSVSYMY |
| | 39 | LCDR2 | DTSNLAS |
| | 40 | LCDR3 | QQWNSYPLT |
| #34 | 41 | HC VD w 信号肽 | MGRLTSSFLLLIVPAYVLSQVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTFSLGVGWIRQSSGKGLEWLAHIWWDDEKYYNPALKSRLTISKDTSKNQVFLKIANVDAADTATYYCARAYYSKSYYALDYWGQGTSVTVSS |
| | 42 | HC VD w/o 信号肽 | QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTFSLGVGWIRQSSGKGLEWLAHIWWDDEKYYNPALKSRLTISKDTSKNQVFLKIANVDAADTATYYCARAYYSKSYYALDYWGQGTSVTVSS |
| | 43 | HCDR1 | TFSLGVG |
| | 44 | HCDR2 | HIWWDDEKYYNPALKS |
| | 45 | HCDR3 | AYYSKSYYALDY |
| | 46 | LC VD w信号肽 | MRVPAHVFGFLLLWFPGTRCDIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQEISGYLSWLQQKPDGTIKRLIYAASTLDSGVPKRFSGSRSGSDYSLAISSLESEDFADYYCLQYANFPFTFGSGTKLEIK |

[0551]

| | | | |
|---|---|---|---|
| | 47 | LC VD w/o 信号肽 | DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQEISGYLSWLQQKPDGTIKRLIYAASTLDSGVPKRFSGSRSGSDYSLAISSLESEDFADYYCLQYANFPFTFGSGTKLEIK |
| | 48 | LCDR1 | RASQEISGYLS |
| | 49 | LCDR2 | AASTLDS |
| | 50 | LCDR3 | LQYANFPFT |
| #42 | 51 | HC VD w 信号肽 | MGRLTSSFLLLIVPAYVLSQVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSLSGFSLSTFGRGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDEKYYNPALKSRLTISKDTSKNQVFLRIANVDTADTATYYCARIQNYGSNYWYFDVWGTGTTVTVSS |
| | 52 | HC VD w/o 信号肽 | QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSLSGFSLSTFGRGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDEKYYNPALKSRLTISKDTSKNQVFLRIANVDTADTATYYCARIQNYGSNYWYFDVWGTGTTVTVSS |
| | 53 | HCDR1 | TFGRGVG |
| | 54 | HCDR2 | HIWWDDEKYYNPALKS |
| | 55 | HCDR3 | IQNYGSNYWYFDV |
| | 56 | LC VD w 信号肽 | MDFQVQIFSFLLISASVILSRGLIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCGATSRISYMFWYQQKPGSSPRVLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDVATYYCQQWNSYPLTFGAGTKLELK |
| | 57 | LC VD w/o 信号肽 | LIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCGATSRISYMFWYQQKPGSSPRVLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDVATYYCQQWNSYPLTFGAGTKLELK |
| | 58 | LCDR1 | GATSRISYMF |
| | 59 | LCDR2 | DTSNLAS |
| | 60 | LCDR3 | QQWNSYPLT |
| #43 | 61 | HC VD w 信号肽 | MGRLTSSFLLLIVPAYVLSQVALKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTFGMGVGWIRQSSGKGLEWLANIWWDDDKYYNPALKSRLTISKDASKNQAFLKIANVDTADTATYYCARIGNYGSNYWYFDVWGTGTTVTVSS |
| | 62 | HC VD w/o 信号肽 | QVALKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTFGMGVGWIRQSSGKGLEWLANIWWDDDKYYNPALKSRLTISKDASKNQAFLKIANVDTADTATYYCARIGNYGSNYWYFDVWGTGTTVTVSS |
| | 63 | HCDR1 | TFGMGVG |
| | 64 | HCDR2 | NIWWDDDKYYNPALKS |
| | 65 | HCDR3 | IGNYGSNYWYFDV |

[0552]

| | | | |
|---|---|---|---|
| | 66 | LC VD w信号肽 | MDFQVQIFSFLLISASVILSRGQIVLTQSPAIMSASPGERVTMTCSA NSRISYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYS LTISRMEAEDAATYNCQQWSSYPLTFGAGTKLELK |
| | 67 | LC VD w/o 信号肽 | QIVLTQSPAIMSASPGERVTMTCSANSRISYMYWYQQKPGSSPRLL IYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYNCQQWSS YPLTFGAGTKLELK |
| | 68 | LCDR1 | SANSRISYMY |
| | 69 | LCDR2 | DTSNLAS |
| | 70 | LCDR3 | QQWSSYPLT |
| #44 | 71 | HC VD w 信号肽 | MGRLTSSFLLLIVPAYVLSQVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSL STFGMGVGWIRQPSEKGLEWLAHIWWDDDKYYNPALKSRLTISK DTSKNQIFLKITNVDTAETATYYCSRIGNYGSNYWYFDVWGTGTT VTVSS |
| | 72 | HC VD w/o 信号肽 | QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTFGMGVGWIRQPSEKGL EWLAHIWWDDDKYYNPALKSRLTISKDTSKNQIFLKITNVDTAET ATYYCSRIGNYGSNYWYFDVWGTGTTVTVSS |
| | 73 | HCDR1 | TFGMGVG |
| | 74 | HCDR2 | HIWWDDDKYYNPALKS |
| | 75 | HCDR3 | IGNYGSNYWYFDV |
| | 76 | LC VD w信号肽 | MDFQVQIFSFLLISASVIVSRGQIVLTQSPAVMSASPGEKVTMTCTA SSSVYYMYWYQQTPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTSY SLTISRMEAEDAATYYCQQWNTYPLTFGAGTKLELK |
| | 77 | LC VD w/o 信号肽 | QIVLTQSPAVMSASPGEKVTMTCTASSSVYYMYWYQQTPGSSPRL LIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQW NTYPLTFGAGTKLELK |
| | 78 | LCDR1 | TASSSVYYMY |
| | 79 | LCDR2 | DTSNLAS |
| | 80 | LCDR3 | QQWNTYPLT |
| #46 | 81 | HC VD w 信号肽 | MGRLTSSFLLLIVPAYVLSQVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSL STFGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDNYYNQALKSRLTISK DNTKNQVFLNIANVDTADTATYYCARIRSYDYDVRYAMDYWGQ GTSVTVSS |
| | 82 | HC VD w/o 信号肽 | QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTFGMGVGWIRQPSGKG LEWLAHIWWDDDNYYNQALKSRLTISKDNTKNQVFLNIANVDTA DTATYYCARIRSYDYDVRYAMDYWGQGTSVTVSS |

[0553]

| | | | |
|---|---|---|---|
| | 83 | HCDR1 | TFGMGVG |
| | 84 | HCDR2 | HIWWDDDNYYNQALKS |
| | 85 | HCDR3 | IRSYDYDVRYAMDY |
| | 86 | LC VD w信号肽 | MRTPAQFLGILLLWFPGIKCDIKMTQSPSSMYASLRERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDLGIYYCQQYYEFPLTFGAGTRLELK |
| | 87 | LC VD w/o 信号肽 | DIKMTQSPSSMYASLRERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDLGIYYCQQYYEFPLTFGAGTRLELK |
| | 88 | LCDR1 | KASQDINSYLS |
| | 89 | LCDR2 | RANRLVD |
| | 90 | LCDR3 | QQYYEFPLT |
| #47 | 91 | HC VD w 信号肽 | MEWSRVFIFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGSGFTNYNEKFKGKAILNADKSSSTAYMQLISLTSEDSAVYFCARDLKRAMDHWGQGTSVTVSS |
| | 92 | HC VD w/o 信号肽 | QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGSGFTNYNEKFKGKAILNADKSSSTAYMQLISLTSEDSAVYFCARDLKRAMDHWGQGTSVTVSS |
| | 93 | HCDR1 | NYLIE |
| | 94 | HCDR2 | VINPGSGFTNYNEKFKG |
| | 95 | HCDR3 | DLKRAMDH |
| | 96 | LC VD w信号肽 | MLTQLLGLLLLWFAGGKCDIQMTQSPASQSASLGESVTITCLASQTIGTWLAWYQQKPGKSPQLLIHAATSLADGVPSRFSGSGSGTKFSFKISSLQAEDFVSYYCQQIYSSPYTFGGGTKLEIK |
| | 97 | LC VD w/o 信号肽 | DIQMTQSPASQSASLGESVTITCLASQTIGTWLAWYQQKPGKSPQLLIHAATSLADGVPSRFSGSGSGTKFSFKISSLQAEDFVSYYCQQIYSSPYTFGGGTKLEIK |
| | 98 | LCDR1 | LASQTIGTWLA |
| | 99 | LCDR2 | AATSLAD |
| | 100 | LCDR3 | QQIYSSPYT |
| #48 | 101 | HC VD w 信号肽 | MEWSRVFIFLLSVTAGVHSQVQLQQSGTELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGSGFTKYNEKFKGKATLTADKSSSTVYMHLSSLTSEDSAVYFCARGLYRAMDYWGQGTSVTVSS |

[0554]

| | | | |
|---|---|---|---|
| | 102 | HC VD w/o 信号肽 | QVQLQQSGTELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQG LEWIGVINPGSGFTKYNEKFKGKATLTADKSSSTVYMHLSSLTSED SAVYFCARGLYRAMDYWGQGTSVTVSS |
| | 103 | HCDR1 | NYLIE |
| | 104 | HCDR2 | VINPGSGFTKYNEKFKG |
| | 105 | HCDR3 | GLYRAMDY |
| | 106 | LC VD w 信号肽 | MLTQLLGLLLLWFAGGKCDIQMTQSPASQSASLGESVTITCLASQT IATWLAWYQQKPGKSPQLLIYGATTLADGVPSRFSGGGSGTKFSF KISSLQAEDFVSYYCQQLYSTPYTFGGGTKLEIK |
| | 107 | LC VD w/o 信号肽 | DIQMTQSPASQSASLGESVTITCLASQTIATWLAWYQQKPGKSPQL LIYGATTLADGVPSRFSGGGSGTKFSFKISSLQAEDFVSYYCQQLY STPYTFGGGTKLEIK |
| | 108 | LCDR1 | LASQTIATWLA |
| | 109 | LCDR2 | GATTLAD |
| | 110 | LCDR3 | QQLYSTPYT |
| #49 | 111 | HC VD w 信号肽 | MGRLTSSFLLLIVPAYVLSQVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSL STFGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKYYNPALQSRLTVS KDTAKNQVFLKIANVDTADTAIYYCARVGNYGSNYWYFAVWGT GTTVTVSS |
| | 112 | HC VD w/o 信号肽 | QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTFGMGVGWIRQPSGKG LEWLAHIWWDDDKYYNPALQSRLTVSKDTAKNQVFLKIANVDTA DTAIYYCARVGNYGSNYWYFAVWGTGTTVTVSS |
| | 113 | HCDR1 | TFGMGVG |
| | 114 | HCDR2 | HIWWDDDKYYNPALQS |
| | 115 | HCDR3 | VGNYGSNYWYFAV |
| | 116 | LC VD w 信号肽 | MDFQVQIFSFLLISASVILSRGQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSA SSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTSY SLTISRMEAEDAATYYCQQWNSYPLTFGAGTKLELK |
| | 117 | LC VD w/o 信号肽 | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRL LIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQW NSYPLTFGAGTKLELK |
| | 118 | LCDR1 | SASSSVSYMY |
| | 119 | LCDR2 | DTSNLAS |
| | 120 | LCDR3 | QQWNSYPLT |
| #50 | 121 | HC VD w 信 | MEWSRVFIFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELVRPGASVKVSCKASG |

[0555]

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | 号肽 | YAFSNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGSGFTKYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGLYRAMDYWGQGTSVTVSS |
| | 122 | HC VD w/o 信号肽 | QVQLQQSGAELVRPGASVKVSCKASGYAFSNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGSGFTKYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGLYRAMDYWGQGTSVTVSS |
| | 123 | HCDR1 | NYLIE |
| | 124 | HCDR2 | VINPGSGFTKYNEKFKG |
| | 125 | HCDR3 | GLYRAMDY |
| | 126 | LC VD w 信号肽 | MLTQLLGLLLLWFAGGKCDIQMTQSPASQSASLGESVTITCLASQTIGTWLAWYQQKPGKSPQLLIYAAASLADGVPSRFSGGGSGTKFSFKISSLQAEDFVNYYCQQIYSTPYTFGGGTKLEIK |
| | 127 | LC VD w/o 信号肽 | DIQMTQSPASQSASLGESVTITCLASQTIGTWLAWYQQKPGKSPQLLIYAAASLADGVPSRFSGGGSGTKFSFKISSLQAEDFVNYYCQQIYSTPYTFGGGTKLEIK |
| | 128 | LCDR1 | LASQTIGTWLA |
| | 129 | LCDR2 | AAASLAD |
| | 130 | LCDR3 | QQIYSTPYT |
| #51 | 131 | HC VD w 信号肽 | MEWPLIFLFLLSGTAGVQSQVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFSNYWMNWVKQRPGKGLEWIGQIYPGDGDTKYNGKFKNKATLTADKSSSTAYMQFSSLTSEDSAVYFCARGDLVFVYWGLGTLVTVSA |
| | 132 | HC VD w/o 信号肽 | QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFSNYWMNWVKQRPGKGLEWIGQIYPGDGDTKYNGKFKNKATLTADKSSSTAYMQFSSLTSEDSAVYFCARGDLVFVYWGLGTLVTVSA |
| | 133 | HCDR1 | NYWMN |
| | 134 | HCDR2 | QIYPGDGDTKYNGKFKN |
| | 135 | HCDR3 | GDLVFVY |
| | 136 | LC VD w 信号肽 | MRFQVQVLGLLLLWISGAQCDVQITQSPSYLAVSPGETITINCRASKNIRKYLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTSQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYCQQHNEYPYTFGGGTKLEIK |
| | 137 | LC VD w/o 信号肽 | DVQITQSPSYLAVSPGETITINCRASKNIRKYLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTSQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYCQQHNEYPYTFGGGTKLEIK |
| | 138 | LCDR1 | RASKNIRKYLA |

[0556]

| | | | |
|---|---|---|---|
| | 139 | LCDR2 | SGSTSQS |
| | 140 | LCDR3 | QQHNEYPYT |
| #52 | 141 | HC VD w 信号肽 | MEWSRVFIFLLSVTAGAHSQVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVFNPESGYINYNEKLKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARTSRRGFDYWGHGTTLTVSS |
| | 142 | HC VD w/o 信号肽 | QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVFNPESGYINYNEKLKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARTSRRGFDYWGHGTTLTVSS |
| | 143 | HCDR1 | NYLIE |
| | 144 | HCDR2 | VFNPESGYINYNEKLKG |
| | 145 | HCDR3 | TSRRGFDY |
| | 146 | LC VD w 信号肽 | MNMLTQLLGLLLLWFAGGKCDIQMTQSPASQSASLGESVTITCLASQTIGTWLAWYQQKPGKSPQLLIYAATSLADGVPSRFSGSGSGTKFSFKISSLQAEDFVSYYCQQLYSTPRTFGGGTKLEIK |
| | 147 | LC VD w/o 信号肽 | DIQMTQSPASQSASLGESVTITCLASQTIGTWLAWYQQKPGKSPQLLIYAATSLADGVPSRFSGSGSGTKFSFKISSLQAEDFVSYYCQQLYSTPRTFGGGTKLEIK |
| | 148 | LCDR1 | LASQTIGTWLA |
| | 149 | LCDR2 | AATSLAD |
| | 150 | LCDR3 | QQLYSTPRT |
| #54 | 151 | HC VD w 信号肽 | MGRLTSSFLLLIVPAYVLSQVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTFGLGVGWIRQPSGKGLECLAHIWWDDDKYSNPALKSRLTISKDTSKNQVFLKIANVDSADTATYFCARILNYGSNYWYFDVWGTGTTVTVSS |
| | 152 | HC VD w/o 信号肽 | QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTFGLGVGWIRQPSGKGLECLAHIWWDDDKYSNPALKSRLTISKDTSKNQVFLKIANVDSADTATYFCARILNYGSNYWYFDVWGTGTTVTVSS |
| | 153 | HCDR1 | TFGLGVG |
| | 154 | HCDR2 | HIWWDDDKYSNPALKS |
| | 155 | HCDR3 | ILNYGSNYWYFDV |
| | 156 | LC VD w 信号肽 | MDFQVQIFSFLLISASVILSRGQIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSSISYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTSFSLTVSRMEAEDAATYYCQQWNSYPLTFGAGTKLELK |
| | 157 | LC VD w/o 信 | QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSSISYMYWYQQKPGSSPRLL |

[0557]

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | 号肽 | IYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTSFSLTVSRMEAEDAATYYCQQWN SYPLTFGAGTKLELK |
| | 158 | LCDR1 | SASSSISYMY |
| | 159 | LCDR2 | DTSNLAS |
| | 160 | LCDR3 | QQWNSYPLT |
| #56 | 161 | HC VD w 信号肽 | MGRLTSSFLLLIVPAYVLSQVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSL STFGMGVGWIRQPSGKGLEWLTNIWWDDDKYYNSVLKSRLTISK DTSKNQVFLKIANVDTADTATYYCARIAAYGSNYWYFDVWGTGT TVTVSS |
| | 162 | HC VD w/o 信号肽 | QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTFGMGVGWIRQPSGKG LEWLTNIWWDDDKYYNSVLKSRLTISKDTSKNQVFLKIANVDTA DTATYYCARIAAYGSNYWYFDVWGTGTTVTVSS |
| | 163 | HCDR1 | TFGMGVG |
| | 164 | HCDR2 | NIWWDDDKYYNSVLKS |
| | 165 | HCDR3 | IAAYGSNYWYFDV |
| | 166 | LC VD w 信号肽 | MDFQVQIFSFLLISASVKLSRGQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSA SSSVSYMYWYQQKPGSSPRVLIYDTSNLSSGVPVRFSGSGSGTSYS LTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGAGTKLELK |
| | 167 | LC VD w/o 信号肽 | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRV LIYDTSNLSSGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWS SYPLTFGAGTKLELK |
| | 168 | LCDR1 | SASSSVSYMY |
| | 169 | LCDR2 | DTSNLSS |
| | 170 | LCDR3 | QQWSSYPLT |
| #57 | 171 | HC VD w 信号肽 | MGRLTSSLLLLIVPAYVLSQVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSL STFGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKYYNPALKSRLTISK DTSKNQIFLKIANVDTADSATFYCARIENYGSNYWYFDVWGTGTT VTVSS |
| | 172 | HC VD w/o 信号肽 | QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTFGMGVGWIRQPSGKG LEWLAHIWWDDDKYYNPALKSRLTISKDTSKNQIFLKIANVDTAD SATFYCARIENYGSNYWYFDVWGTGTTVTVSS |
| | 173 | HCDR1 | TFGMGVG |
| | 174 | HCDR2 | HIWWDDDKYYNPALKS |
| | 175 | HCDR3 | IENYGSNYWYFDV |
| | 176 | LC VD w 信号 | MDFQVQIFSFLLISASVRLSRGQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSA |

[0558]

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | 肽 | SSSVSYMYWYQQKPGSSPRVLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTSY SLTVSRMEAEDAATYYCQQWNSYPLTFGAGTKLELK |
| | 177 | LC VD w/o 信号肽 | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRV LIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTVSRMEAEDAATYYCQQW NSYPLTFGAGTKLELK |
| | 178 | LCDR1 | SASSSVSYMY |
| | 179 | LCDR2 | DTSNLAS |
| | 180 | LCDR3 | QQWNSYPLT |
| 181 | | 人 iRhom2 | MASADKNGGSVSSVSSSRLQSRKPPNLSITIPPPEKETQAPGEQDS MLPEGFQNRRLKKSQPRTWAAHTTACPPSFLPKRKNPAYLKSVSL QEPRSRWQESSEKRPGFRRQASLSQSIRKGAAQWFGVSGDWEGQ RQQWQRRSLHHCSMRYGRLKASCQRDLELPSQEAPSFQGTESPKP CKMPKIVDPLARGRAFRHPEEMDRPHAPHPPLTPGVLSLTSFTSVR SGYSHLPRRKRMSVAHMSLQAAAALLKGRSVLDATGQRCRVVKR SFAFPSFLEEDVVDGADTFDSSFFSKEEMSSMPDDVFESPPLSASYF RGIPHSASPVSPDGVQIPLKEYGRAPVPGPRRGKRIASKVKHFAFD RKKRHYGLGVVGNWLNRSYRRSISSTVQRQLESFDSHRPYFTYW LTFVHVIITLLVICTYGIAPVGFAQHVTTQLVLRNKGVYESVKYIQQ ENFWVGPSSIDLIHLGAKFSPCIRKDGQIEQLVLRERDLERDSGCC VQNDHSGCIQTQRKDCSETLATFVKWQDDTGPPMDKSDLGQKRT SGAVCHQDPRTCEEPASSGAHIWPDDITKWPICTEQARSNHTGFLH MDCEIKGRPCCIGTKGSCEITTREYCEFMHGYFHEEATLCSQVHCL DKVCGLLPFLNPEVPDQFYRLWLSLFLHAGVVHCLVSVVFQMTIL RDLEKLAGWHRIAIIFILSGITGNLASAIFLPYRAEVGPAGSQFGLL ACLFVELFQSWPLLERPWKAFLNLSAIVLFLFICGLLPWIDNIAHIF GFLSGLLLAFAFLPYITFGTSDKYRKRALILVSLLAFAGLFAALVLW LYIYPINWPWIEHLTCFPFTSRFCEKYELDQVLH |
| 182 | | 人 iRhom1 | MSEARRDSTSSLQRKKPPWLKLDIPSAVPLTAEEPSFLQPLRRQAF LRSVSMPAETAHISSPHHELRRPVLQRQTSITQTIRRGTADWFGVS KDSDSTQKWQRKSIRHCSQRYGKLKPQVLRELDLPSQDNVSLTST ETPPPLYVGPCQLGMQKIIDPLARGRAFRVADDTAEGLSAPHTPVT PGAASLCSFSSSRSGFHRLPRRRKRESVAKMSFRAAAALMKGRSV RDGTFRRAQRRSFTPASFLEEDTTDFPDELDTSFFAREGILHEELST YPDEVFESPSEAALKDWEKAPEQADLTGGALDRSELERSHLMLPL ERGWRKQKEGAAAPQPKVRLRQEVVSTAGPRRGQRIAVPVRKLF AREKRPYGLGMVGRLTNRTYRKRIDSFVKRQIEDMDDHRPFFTY |

[0559]

| | | |
|---|---|---|
| | | WLTFVHSLVTILAVCIYGIAPVGFSQHETVDSVLRNRGVYENVKY<br>VQQENFWIGPSSEALIHLGAKFSPCMRQDPQVHSFIRSARE REKHS<br>ACCVRNDRSGCVQTSEEECSSTLAVWVKWPIHPSAPELAGHKRQF<br>GSVCHQDPRVCDEPSSEDPHEWPEDITKWPICTKNSAGNHTNHPH<br>MDCVITGRPCCIGTKGRCEITSREYCDFMRGYFHEEATLCSQVHC<br>MDDVCGLLPFLNPEVPDQFYRLWLSLFLHAGILHCLVSICFQMTV<br>LRDLEKLAGWHRIAIIYLLSGVTGNLASAIFLPYRAEVGPAGSQFGI<br>LACLFVELFQSWQILARPWRAFFKLLAVVLFLFTFGLLPWIDNFAH<br>ISGFISGLFLSFAFLPYISFGKFDLYRKRCQIIIFQVVFLGLLAGLVVL<br>FYVYPVRCEWCEFLTCIPFTDKFCEKYELDAQLH |
| 183 | 小鼠 iRhom2 | MASADKNGSNLPSVSGSRLQSRKPPNLSITIPPPESQAPGEQDSML<br>PERRKNPAYLKSVSLQEPRGRWQEGAEKRPGFRRQASLSQSIRKST<br>AQWFGVSGDWEGKRQNWHRRSLHHCSVHYGRLKASCQRELELP<br>SQEVPSFQGTESPKPCKMPKIVDPLARGRAFRHPDEVDRPHAAHP<br>PLTPGVLSLTSFTSVRSGYSHLPRRKRISVAHMSFQAAAALLKGRS<br>VLDATGQRCRHVKRSFAYPSFLEEDAVDGADTFDSSFFSKEEMSS<br>MPDDVFESPPLSASYFRGVPHSASPVSPDGVHIPLKEYSGGRALGP<br>GTQRGKRIASKVKHFAFDRKKRHYGLGVVGNWLNRSYRRSISST<br>VQRQLESFDSHRPYFTYWLTFVHIIITLLVICTYGIAPVGFAQHVTT<br>QLVLKNRGVYESVKYIQQENFWIGPSSIDLIHLGAKFSPCIRKDQQI<br>EQLVRRERDIERTSGCCVQNDRSGCIQTLKKDCSETLATFVKWQN<br>DTGPSDKSDLSQKQPSAVVCHQDPRTCEEPASSGAHIWPDDITKW<br>PICTEQAQSNHTGLLHIDCKIKGRPCCIGTKGSCEITTREYCEFMHG<br>YFHEDATLCSQVHCLDKVCGLLPFLNPEVPDQFYRIWLSLFLHAGI<br>VHCLVSVVFQMTILRDLEKLAGWHRISIIFILSGITGNLASAIFLPYR<br>AEVGPAGSQFGLLACLFVELFQSWQLLERPWKAFFNLSAIVLFLFI<br>CGLLPWIDNIAHIFGFLSGMLLAFAFLPYITFGTSDKYRKRALILVS<br>LLVFAGLFASLVLWLYIYPINWPWIEYLTCFPFTSRFCEKYELDQVL<br>H |

序列表

<110> 希罗姆有限责任公司 , 纽约救济伤残人维持特殊外科医院协会

<120> iRhom2表位的蛋白结合剂

<130> SD 44676

<160> 199

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 139

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> antibody sequence of fragment

<400> 1

Met Gly Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
1 5 10 15
Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
20 25 30
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45
Thr Thr Phe Ala Met Gly Ile Gly Trp Val Arg Gln Pro Ser Gly Lys
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Glu Lys Tyr Asn
65 70 75 80
Asn Pro Val Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
85 90 95
Asn Gln Val Phe Leu Arg Ile Ala Asn Val Asp Thr Pro Asp Thr Ala
100 105 110
Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Ser Ser Ile Tyr Tyr Ile Ile Asp Asn
115 120 125
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> antibody sequence of fragment

<400> 2

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

<210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 3
Thr Phe Ala Met Gly Ile Gly
1 5

<210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 4
His Ile Trp Trp Asp Gly Glu Lys Tyr Asn Asn Pro Val Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>

<223> antibody sequence of fragment
<400> 5
Ile Ser Ser Ile Tyr Tyr Ile Ile Asp Asn
1 5 10
<210> 6
<211> 127
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 6
Met Val Phe Thr Pro Gln Ile Leu Gly Leu Met Leu Phe Trp Ile Ser
1 5 10 15
Ala Ser Arg Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30
Val Thr Pro Gly His Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45
Ile Ser Asn Asn Leu His Trp Tyr Gln Lys Lys Ser His Glu Ser Pro
50 55 60
Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Val Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser
65 70 75 80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn
85 90 95
Ser Val Glu Thr Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Tyr
100 105 110
Asn Trp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125
<210> 7
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 7
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
His Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
20 25 30
Leu His Trp Tyr Gln Lys Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Tyr Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 8
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu His
1 5 10
<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 9
Tyr Val Ser Gln Ser Ile Ser
1 5
<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 10
Gln Gln Ser Tyr Asn Trp Pro Leu Thr
1 5
<210> 11
<211> 142
<212> PRT

<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 11

Met Gly Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
1 5 10 15
Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
20 25 30
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45
Ser Thr Phe Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Glu Lys Tyr Tyr
65 70 75 80
Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Ala Thr Ser Lys
85 90 95
Asn Gln Ala Phe Leu Lys Ile Ala Asn Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala
100 105 110
Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Ser Asn Tyr Gly Ser Asn Tyr Trp Tyr
115 120 125
Phe Asn Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 12
<211> 123
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 12

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

Phe Leu Lys Ile Ala Asn Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Ile Ser Asn Tyr Gly Ser Asn Tyr Trp Tyr Phe Asn Val
100 105 110
Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 13
Thr Phe Gly Met Gly Val Gly
1 5

<210> 14
<211> 16
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 14
His Ile Trp Trp Asp Asp Glu Lys Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 15
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 15
Ile Ser Asn Tyr Gly Ser Asn Tyr Trp Tyr Phe Asn Val
1 5 10

<210> 16
<211> 128
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment

<400> 16

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15
Val Ile Leu Ser Arg Gly Gln Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu
20 25 30
Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Gly
35 40 45
Ser Ser Val Ser Cys Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60
Pro Arg Val Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80
Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95
Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110
Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

<210> 17

<211> 106

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> antibody sequence of fragment

<400> 17

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

<210> 18

<211> 10
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 18
Ser Ala Gly Ser Ser Val Ser Cys Met Tyr
1 5 10
<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 19
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5
<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 20
Gln Gln Trp Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5
<210> 21
<211> 139
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 21
Met Gly Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
1 5 10 15
Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
20 25 30
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45

Ser Thr Phe Ala Leu Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Arg
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr
65 70 75 80
Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
85 90 95
Asn His Val Phe Leu Lys Ile Ala Asn Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala
100 105 110
Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Thr Thr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr
115 120 125
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 22
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 22

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

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 23
Thr Phe Ala Leu Gly Val Gly
1 5
<210> 24
<211> 16
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 24
His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15
<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 25
Ile Thr Thr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10
<210> 26
<211> 127
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 26
Met Val Phe Thr Pro Gln Ile Leu Gly Leu Met Leu Phe Trp Ile Ser
1 5 10 15
Ala Ser Arg Gly Asp Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30
Val Thr Pro Gly Asp Ser Val Ser Leu Phe Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45
Ile Gly Asn His Leu His Trp Tyr Gln Gln Glu Ser His Ala Ser Pro
50 55 60
Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser

65 70 75 80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn
85 90 95
Ser Val Glu Thr Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Tyr
100 105 110
Asn Trp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125
<210> 27
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 27
Asp Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Asp Ser Val Ser Leu Phe Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn His
20 25 30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Glu Ser His Ala Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr
65 70 75 80
Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Tyr Asn Trp Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105
<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 28
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn His Leu His
1 5 10
<210> 29
<211> 7

<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 29
Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
1 5
<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 30
Gln Gln Ser Tyr Asn Trp Pro Leu Thr
1 5
<210> 31
<211> 142
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 31
Met Gly Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
1 5 10 15
Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
20 25 30
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45
Ser Thr Phe Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Glu Lys Tyr Tyr
65 70 75 80
Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Ala Thr Ser Lys
85 90 95
Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Asn Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala
100 105 110
Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Ser Asn Tyr Gly Ser Asn Tyr Trp Tyr
115 120 125

Phe Asn Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 32
<211> 123
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 32

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

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 33

Thr Phe Gly Met Gly Val Gly
1 5

<210> 34
<211> 16
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>

<223> antibody sequence of fragment
<400> 34
His Ile Trp Trp Asp Asp Glu Lys Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15
<210> 35
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 35
Ile Ser Asn Tyr Gly Ser Asn Tyr Trp Tyr Phe Asn Val
1 5 10
<210> 36
<211> 128
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 36
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15
Val Ile Leu Ser Arg Gly Gln Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu
20 25 30
Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Gly
35 40 45
Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60
Pro Arg Val Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80
Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95
Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110
Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125
<210> 37
<211> 106
<212> PRT

<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 37

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

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 38

```
Ser Ala Gly Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
1               5                  10
```

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 39

```
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1               5
```

<210> 40
<211> 9
<212> PRT

<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 40
Gln Gln Trp Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5
<210> 41
<211> 141
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 41
Met Gly Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
1 5 10 15
Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
20 25 30
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45
Ser Thr Phe Ser Leu Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Ser Ser Gly Lys
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Glu Lys Tyr Tyr
65 70 75 80
Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
85 90 95
Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Asn Val Asp Ala Ala Asp Thr Ala
100 105 110
Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Tyr Tyr Ser Lys Ser Tyr Tyr Ala Leu
115 120 125
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130 135 140
<210> 42
<211> 122
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 42
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln

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

<210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 43
Thr Phe Ser Leu Gly Val Gly
1 5

<210> 44
<211> 16
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 44
His Ile Trp Trp Asp Asp Glu Lys Tyr Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 45
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment

<400> 45
Ala Tyr Tyr Ser Lys Ser Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr
1 5 10
<210> 46
<211> 127
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 46
Met Arg Val Pro Ala His Val Phe Gly Phe Leu Leu Leu Trp Phe Pro
1 5 10 15
Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30
Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu
35 40 45
Ile Ser Gly Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile
50 55 60
Lys Arg Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys
65 70 75 80
Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Ala Ile Ser
85 90 95
Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ala
100 105 110
Asn Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125
<210> 47
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 47
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
20 25 30
Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
35 40 45

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

<210> 48
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 48
Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 49
Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser
1 5

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 50
Leu Gln Tyr Ala Asn Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 51
<211> 142
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 51
Met Gly Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
1 5 10 15
Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
20 25 30
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Leu Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45
Ser Thr Phe Gly Arg Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Glu Lys Tyr Tyr
65 70 75 80
Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
85 90 95
Asn Gln Val Phe Leu Arg Ile Ala Asn Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala
100 105 110
Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Gln Asn Tyr Gly Ser Asn Tyr Trp Tyr
115 120 125
Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135 140
<210> 52
<211> 123
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 52
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Leu Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Phe
20 25 30
Gly Arg Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Glu Lys Tyr Tyr Asn Pro Ala
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80
Phe Leu Arg Ile Ala Asn Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Ile Gln Asn Tyr Gly Ser Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 53
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 53
Thr Phe Gly Arg Gly Val Gly
1 5
<210> 54
<211> 16
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 54
His Ile Trp Trp Asp Asp Glu Lys Tyr Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15
<210> 55
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 55
Ile Gln Asn Tyr Gly Ser Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10
<210> 56
<211> 128
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 56

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15
Val Ile Leu Ser Arg Gly Leu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30
Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Gly Ala Thr
35 40 45
Ser Arg Ile Ser Tyr Met Phe Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60
Pro Arg Val Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80
Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110
Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

<210> 57
<211> 106
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 57

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

<210> 58
<211> 10

<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 58
Gly Ala Thr Ser Arg Ile Ser Tyr Met Phe
1 5 10
<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 59
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5
<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 60
Gln Gln Trp Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5
<210> 61
<211> 142
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 61
Met Gly Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
1 5 10 15
Val Leu Ser Gln Val Ala Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
20 25 30
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45
Ser Thr Phe Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Ser Ser Gly Lys

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Ala Ser Lys
85 90 95

Asn Gln Ala Phe Leu Lys Ile Ala Asn Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala
100 105 110

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Gly Asn Tyr Gly Ser Asn Tyr Trp Tyr
115 120 125

Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 62
<211> 123
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 62

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Phe
20 25 30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Ser Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ala
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Ala Ser Lys Asn Gln Ala
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ala Asn Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Gly Asn Tyr Gly Ser Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 63
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>

<223> antibody sequence of fragment
<400> 63
Thr Phe Gly Met Gly Val Gly
1 5
<210> 64
<211> 16
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 64
Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15
<210> 65
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 65
Ile Gly Asn Tyr Gly Ser Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10
<210> 66
<211> 128
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 66
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15
Val Ile Leu Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30
Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Asn
35 40 45
Ser Arg Ile Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95
Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Asn Cys Gln Gln Trp
100 105 110
Ser Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

<210> 67
<211> 106
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 67

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

<210> 68
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 68

Ser Ala Asn Ser Arg Ile Ser Tyr Met Tyr
1 5 10

<210> 69
<211> 7
<212> PRT

<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 69
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5
<210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 70
Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5
<210> 71
<211> 142
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 71
Met Gly Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
1 5 10 15
Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
20 25 30
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45
Ser Thr Phe Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Glu Lys
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr
65 70 75 80
Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
85 90 95
Asn Gln Ile Phe Leu Lys Ile Thr Asn Val Asp Thr Ala Glu Thr Ala
100 105 110
Thr Tyr Tyr Cys Ser Arg Ile Gly Asn Tyr Gly Ser Asn Tyr Trp Tyr
115 120 125
Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

130 135 140

<210> 72
<211> 123
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 72

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

<210> 73
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 73

Thr Phe Gly Met Gly Val Gly
1 5

<210> 74
<211> 16
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment

<400> 74
His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15
<210> 75
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 75
Ile Gly Asn Tyr Gly Ser Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10
<210> 76
<211> 128
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 76
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15
Val Ile Val Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Val
20 25 30
Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser
35 40 45
Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Ser Ser
50 55 60
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80
Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95
Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110
Asn Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125
<210> 77
<211> 106
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 77
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Val Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met
20 25 30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Thr Tyr Pro Leu Thr
85 90 95
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105
<210> 78
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 78
Thr Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr
1 5 10
<210> 79
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 79
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5
<210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 80
Gln Gln Trp Asn Thr Tyr Pro Leu Thr
1 5
<210> 81
<211> 143
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 81
Met Gly Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
1 5 10 15
Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
20 25 30
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45
Ser Thr Phe Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Asn Tyr Tyr
65 70 75 80
Asn Gln Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Thr Lys
85 90 95
Asn Gln Val Phe Leu Asn Ile Ala Asn Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala
100 105 110
Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Arg Ser Tyr Asp Tyr Asp Val Arg Tyr
115 120 125
Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130 135 140
<210> 82
<211> 124
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 82
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

<210> 83
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 83
Thr Phe Gly Met Gly Val Gly
1 5

<210> 84
<211> 16
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 84
His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Asn Tyr Tyr Asn Gln Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 85
<211> 14
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 85

Ile Arg Ser Tyr Asp Tyr Asp Val Arg Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 86
<211> 127
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 86

Met Arg Thr Pro Ala Gln Phe Leu Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro
1 5 10 15
Gly Ile Lys Cys Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr
20 25 30
Ala Ser Leu Arg Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
35 40 45
Ile Asn Ser Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro
50 55 60
Lys Thr Leu Ile Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser
65 70 75 80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
85 90 95
Ser Leu Glu Tyr Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr
100 105 110
Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Glu Leu Lys
115 120 125

<210> 87
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 87

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
65 70 75 80
Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Glu Phe Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 88
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 88
Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 89
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 89
Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp
1 5

<210> 90
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 90
Gln Gln Tyr Tyr Glu Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 91
<211> 136
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>

<223> antibody sequence of fragment
<400> 91

Met Glu Trp Ser Arg Val Phe Ile Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
20 25 30
Pro Gly Thr Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe
35 40 45
Thr Asn Tyr Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Ile Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Phe Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80
Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Ile Leu Asn Ala Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ile Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Leu Lys Arg Ala Met Asp His Trp Gly Gln
115 120 125
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 92
<211> 117
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 92

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

Ala Arg Asp Leu Lys Arg Ala Met Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 93
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 93
Asn Tyr Leu Ile Glu
1 5
<210> 94
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 94
Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Phe Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 95
<211> 8
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 95
Asp Leu Lys Arg Ala Met Asp His
1 5
<210> 96
<211> 125
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 96

Met Leu Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Phe Ala Gly Gly
1 5 10 15
Lys Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser
20 25 30
Leu Gly Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly
35 40 45
Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu
50 55 60
Leu Ile His Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe
65 70 75 80
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu
85 90 95
Gln Ala Glu Asp Phe Val Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Tyr Ser Ser
100 105 110
Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 97
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 97

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

<210> 98
<211> 11

<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 98
Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp Leu Ala
1 5 10
<210> 99
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 99
Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp
1 5
<210> 100
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 100
Gln Gln Ile Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5
<210> 101
<211> 136
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 101
Met Glu Trp Ser Arg Val Phe Ile Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Leu Val Arg
20 25 30
Pro Gly Thr Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe
35 40 45
Thr Asn Tyr Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60
Glu Trp Ile Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Phe Thr Lys Tyr Asn
65 70 75 80
Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95
Thr Val Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110
Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Leu Tyr Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
115 120 125
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 102
<211> 117
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 102
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Phe Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Leu Tyr Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 103
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>

<223> antibody sequence of fragment
<400> 103
Asn Tyr Leu Ile Glu
1 5
<210> 104
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 104
Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Phe Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 105
<211> 8
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 105
Gly Leu Tyr Arg Ala Met Asp Tyr
1 5
<210> 106
<211> 125
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 106
Met Leu Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Phe Ala Gly Gly
1 5 10 15
Lys Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser
20 25 30
Leu Gly Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Ala
35 40 45
Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu
50 55 60
Leu Ile Tyr Gly Ala Thr Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe

65 70 75 80
Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu
85 90 95
Gln Ala Glu Asp Phe Val Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Thr
100 105 110
Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125
<210> 107
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 107
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Ala Thr Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Ala Thr Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Gly Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asp Phe Val Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Thr Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105
<210> 108
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 108
Leu Ala Ser Gln Thr Ile Ala Thr Trp Leu Ala
1 5 10
<210> 109
<211> 7

<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 109
Gly Ala Thr Thr Leu Ala Asp
1 5
<210> 110
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 110
Gln Gln Leu Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr
1 5
<210> 111
<211> 142
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 111
Met Gly Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
1 5 10 15
Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
20 25 30
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45
Ser Thr Phe Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr
65 70 75 80
Asn Pro Ala Leu Gln Ser Arg Leu Thr Val Ser Lys Asp Thr Ala Lys
85 90 95
Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Asn Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala
100 105 110
Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Gly Asn Tyr Gly Ser Asn Tyr Trp Tyr
115 120 125

Phe Ala Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 112
<211> 123
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 112

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

<210> 113
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 113

Thr Phe Gly Met Gly Val Gly
1 5

<210> 114
<211> 16
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>

<223> antibody sequence of fragment
<400> 114
His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ala Leu Gln Ser
1 5 10 15
<210> 115
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 115
Val Gly Asn Tyr Gly Ser Asn Tyr Trp Tyr Phe Ala Val
1 5 10
<210> 116
<211> 128
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 116
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15
Val Ile Leu Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30
Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
35 40 45
Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80
Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95
Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110
Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125
<210> 117
<211> 106
<212> PRT

<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 117

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

<210> 118
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 118

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

<210> 119
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 119

```
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1               5
```

<210> 120
<211> 9
<212> PRT

<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 120
Gln Gln Trp Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5
<210> 121
<211> 136
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 121
Met Glu Trp Ser Arg Val Phe Ile Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
20 25 30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe
35 40 45
Ser Asn Tyr Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Ile Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Phe Thr Lys Tyr Asn
65 70 75 80
Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110
Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Leu Tyr Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
115 120 125
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130 135
<210> 122
<211> 117
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 122
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala

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

<210> 123
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 123
Asn Tyr Leu Ile Glu
1 5

<210> 124
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 124
Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Phe Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 125
<211> 8
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>

<223> antibody sequence of fragment
<400> 125
Gly Leu Tyr Arg Ala Met Asp Tyr
1 5
<210> 126
<211> 125
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 126
Met Leu Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Phe Ala Gly Gly
1 5 10 15
Lys Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser
20 25 30
Leu Gly Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly
35 40 45
Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu
50 55 60
Leu Ile Tyr Ala Ala Ala Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe
65 70 75 80
Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu
85 90 95
Gln Ala Glu Asp Phe Val Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Tyr Ser Thr
100 105 110
Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125
<210> 127
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 127
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile

35 40 45

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

Gly Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Phe Val Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Tyr Ser Thr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 128
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 128
Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 129
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 129
Ala Ala Ala Ser Leu Ala Asp
1 5

<210> 130
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 130
Gln Gln Ile Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 131
<211> 135
<212> PRT

<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 131

Met Glu Trp Pro Leu Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
1 5 10 15
Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys
20 25 30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45
Ser Asn Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Ile Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asn
65 70 75 80
Gly Lys Phe Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95
Thr Ala Tyr Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110
Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Asp Leu Val Phe Val Tyr Trp Gly Leu Gly
115 120 125
Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
130 135

<210> 132
<211> 116
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 132

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

Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Asp Leu Val Phe Val Tyr Trp Gly Leu Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ala
115
<210> 133
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 133
Asn Tyr Trp Met Asn
1 5
<210> 134
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 134
Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
1 5 10 15
Asn
<210> 135
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 135
Gly Asp Leu Val Phe Val Tyr
1 5
<210> 136
<211> 127
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>

<223> antibody sequence of fragment
<400> 136

Met Arg Phe Gln Val Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15
Gly Ala Gln Cys Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ala
20 25 30
Val Ser Pro Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Asn
35 40 45
Ile Arg Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn
50 55 60
Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Gln Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn
100 105 110
Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 137
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 137

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

<210> 138
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 138
Arg Ala Ser Lys Asn Ile Arg Lys Tyr Leu Ala
1 5 10
<210> 139
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 139
Ser Gly Ser Thr Ser Gln Ser
1 5
<210> 140
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 140
Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Tyr Thr
1 5
<210> 141
<211> 136
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 141
Met Glu Trp Ser Arg Val Phe Ile Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
20 25 30
Pro Gly Thr Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe

35 40 45

Thr Asn Tyr Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Val Phe Asn Pro Glu Ser Gly Tyr Ile Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Leu Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Thr Ser Arg Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly His
115 120 125

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 142
<211> 117
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 142

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Phe Asn Pro Glu Ser Gly Tyr Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Leu
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Thr Ser Arg Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Thr
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 143
<211> 5
<212> PRT

<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 143
Asn Tyr Leu Ile Glu
1 5
<210> 144
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 144
Val Phe Asn Pro Glu Ser Gly Tyr Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Leu Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 145
<211> 8
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 145
Thr Ser Arg Arg Gly Phe Asp Tyr
1 5
<210> 146
<211> 127
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 146
Met Asn Met Leu Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Phe Ala
1 5 10 15
Gly Gly Lys Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser
20 25 30
Ala Ser Leu Gly Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr
35 40 45
Ile Gly Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro

50 55 60
Gln Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
65 70 75 80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser
85 90 95
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Phe Val Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr
100 105 110
Ser Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 147
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 147

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

<210> 148
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 148

Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 149
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 149
Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp
1 5
<210> 150
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 150
Gln Gln Leu Tyr Ser Thr Pro Arg Thr
1 5
<210> 151
<211> 142
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 151
Met Gly Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
1 5 10 15
Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
20 25 30
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45
Ser Thr Phe Gly Leu Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
50 55 60
Gly Leu Glu Cys Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Ser
65 70 75 80
Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
85 90 95
Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Asn Val Asp Ser Ala Asp Thr Ala
100 105 110

Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ile Leu Asn Tyr Gly Ser Asn Tyr Trp Tyr
115 120 125
Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 152
<211> 123
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 152

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

<210> 153
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 153

Thr Phe Gly Leu Gly Val Gly
1 5

<210> 154
<211> 16
<212> PRT

<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 154
His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Ser Asn Pro Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15
<210> 155
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 155
Ile Leu Asn Tyr Gly Ser Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10
<210> 156
<211> 128
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 156
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15
Val Ile Leu Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu
20 25 30
Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80
Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Phe Ser Leu Thr Val
85 90 95
Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110
Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125
<210> 157

<211> 106
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 157

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

<210> 158
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 158

```
Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met Tyr
1               5                  10
```

<210> 159
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 159

```
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1               5
```

<210> 160

<211> 9
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 160
Gln Gln Trp Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5
<210> 161
<211> 142
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 161
Met Gly Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
1 5 10 15
Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
20 25 30
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45
Ser Thr Phe Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Leu Thr Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr
65 70 75 80
Asn Ser Val Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
85 90 95
Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Asn Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala
100 105 110
Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Ala Ala Tyr Gly Ser Asn Tyr Trp Tyr
115 120 125
Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135 140
<210> 162
<211> 123
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment

<400> 162

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

<210> 163
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 163
Thr Phe Gly Met Gly Val Gly
1 5

<210> 164
<211> 16
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 164
Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Ser Val Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 165
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 165
Ile Ala Ala Tyr Gly Ser Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10
<210> 166
<211> 128
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 166
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15
Val Lys Leu Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30
Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
35 40 45
Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60
Pro Arg Val Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ser Ser Gly Val Pro
65 70 75 80
Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95
Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110
Ser Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125
<210> 167
<211> 106
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 167
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

<210> 168
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 168
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
1 5 10

<210> 169
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 169
Asp Thr Ser Asn Leu Ser Ser
1 5

<210> 170
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 170
Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 171
<211> 142

<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 171

Met Gly Arg Leu Thr Ser Ser Leu Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
1 5 10 15
Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
20 25 30
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45
Ser Thr Phe Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr
65 70 75 80
Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
85 90 95
Asn Gln Ile Phe Leu Lys Ile Ala Asn Val Asp Thr Ala Asp Ser Ala
100 105 110
Thr Phe Tyr Cys Ala Arg Ile Glu Asn Tyr Gly Ser Asn Tyr Trp Tyr
115 120 125
Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 172
<211> 123
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 172

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Phe
20 25 30
Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ala
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Ile

65 70 75 80
Phe Leu Lys Ile Ala Asn Val Asp Thr Ala Asp Ser Ala Thr Phe Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Ile Glu Asn Tyr Gly Ser Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110
Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 173
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 173
Thr Phe Gly Met Gly Val Gly
1 5
<210> 174
<211> 16
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 174
His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15
<210> 175
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 175
Ile Glu Asn Tyr Gly Ser Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10
<210> 176
<211> 128
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>

<223> antibody sequence of fragment
<400> 176

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15
Val Arg Leu Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30
Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
35 40 45
Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60
Pro Arg Val Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80
Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Val
85 90 95
Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110
Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

<210> 177
<211> 106
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 177

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

<210> 178
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 178
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
1 5 10
<210> 179
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 179
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5
<210> 180
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> antibody sequence of fragment
<400> 180
Gln Gln Trp Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5
<210> 181
<211> 856
<212> PRT
<213> Homo sapiens iRhom2 wildtype
<400> 181
Met Ala Ser Ala Asp Lys Asn Gly Gly Ser Val Ser Ser Val Ser Ser
1 5 10 15
Ser Arg Leu Gln Ser Arg Lys Pro Pro Asn Leu Ser Ile Thr Ile Pro
20 25 30
Pro Pro Glu Lys Glu Thr Gln Ala Pro Gly Glu Gln Asp Ser Met Leu
35 40 45
Pro Glu Gly Phe Gln Asn Arg Arg Leu Lys Lys Ser Gln Pro Arg Thr

50 55 60

Trp Ala Ala His Thr Thr Ala Cys Pro Pro Ser Phe Leu Pro Lys Arg
65 70 75 80
Lys Asn Pro Ala Tyr Leu Lys Ser Val Ser Leu Gln Glu Pro Arg Ser
85 90 95
Arg Trp Gln Glu Ser Ser Glu Lys Arg Pro Gly Phe Arg Arg Gln Ala
100 105 110
Ser Leu Ser Gln Ser Ile Arg Lys Gly Ala Ala Gln Trp Phe Gly Val
115 120 125
Ser Gly Asp Trp Glu Gly Gln Arg Gln Gln Trp Gln Arg Arg Ser Leu
130 135 140
His His Cys Ser Met Arg Tyr Gly Arg Leu Lys Ala Ser Cys Gln Arg
145 150 155 160
Asp Leu Glu Leu Pro Ser Gln Glu Ala Pro Ser Phe Gln Gly Thr Glu
165 170 175
Ser Pro Lys Pro Cys Lys Met Pro Lys Ile Val Asp Pro Leu Ala Arg
180 185 190
Gly Arg Ala Phe Arg His Pro Glu Glu Met Asp Arg Pro His Ala Pro
195 200 205
His Pro Pro Leu Thr Pro Gly Val Leu Ser Leu Thr Ser Phe Thr Ser
210 215 220
Val Arg Ser Gly Tyr Ser His Leu Pro Arg Arg Lys Arg Met Ser Val
225 230 235 240
Ala His Met Ser Leu Gln Ala Ala Ala Ala Leu Leu Lys Gly Arg Ser
245 250 255
Val Leu Asp Ala Thr Gly Gln Arg Cys Arg Val Val Lys Arg Ser Phe
260 265 270
Ala Phe Pro Ser Phe Leu Glu Glu Asp Val Val Asp Gly Ala Asp Thr
275 280 285
Phe Asp Ser Ser Phe Phe Ser Lys Glu Glu Met Ser Ser Met Pro Asp
290 295 300
Asp Val Phe Glu Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ser Tyr Phe Arg Gly Ile
305 310 315 320
Pro His Ser Ala Ser Pro Val Ser Pro Asp Gly Val Gln Ile Pro Leu
325 330 335
Lys Glu Tyr Gly Arg Ala Pro Val Pro Gly Pro Arg Arg Gly Lys Arg
340 345 350
Ile Ala Ser Lys Val Lys His Phe Ala Phe Asp Arg Lys Lys Arg His
355 360 365

Tyr Gly Leu Gly Val Val Gly Asn Trp Leu Asn Arg Ser Tyr Arg Arg
370 375 380
Ser Ile Ser Ser Thr Val Gln Arg Gln Leu Glu Ser Phe Asp Ser His
385 390 395 400
Arg Pro Tyr Phe Thr Tyr Trp Leu Thr Phe Val His Val Ile Ile Thr
405 410 415
Leu Leu Val Ile Cys Thr Tyr Gly Ile Ala Pro Val Gly Phe Ala Gln
420 425 430
His Val Thr Thr Gln Leu Val Leu Arg Asn Lys Gly Val Tyr Glu Ser
435 440 445
Val Lys Tyr Ile Gln Gln Glu Asn Phe Trp Val Gly Pro Ser Ser Ile
450 455 460
Asp Leu Ile His Leu Gly Ala Lys Phe Ser Pro Cys Ile Arg Lys Asp
465 470 475 480
Gly Gln Ile Glu Gln Leu Val Leu Arg Glu Arg Asp Leu Glu Arg Asp
485 490 495
Ser Gly Cys Cys Val Gln Asn Asp His Ser Gly Cys Ile Gln Thr Gln
500 505 510
Arg Lys Asp Cys Ser Glu Thr Leu Ala Thr Phe Val Lys Trp Gln Asp
515 520 525
Asp Thr Gly Pro Pro Met Asp Lys Ser Asp Leu Gly Gln Lys Arg Thr
530 535 540
Ser Gly Ala Val Cys His Gln Asp Pro Arg Thr Cys Glu Glu Pro Ala
545 550 555 560
Ser Ser Gly Ala His Ile Trp Pro Asp Asp Ile Thr Lys Trp Pro Ile
565 570 575
Cys Thr Glu Gln Ala Arg Ser Asn His Thr Gly Phe Leu His Met Asp
580 585 590
Cys Glu Ile Lys Gly Arg Pro Cys Cys Ile Gly Thr Lys Gly Ser Cys
595 600 605
Glu Ile Thr Thr Arg Glu Tyr Cys Glu Phe Met His Gly Tyr Phe His
610 615 620
Glu Glu Ala Thr Leu Cys Ser Gln Val His Cys Leu Asp Lys Val Cys
625 630 635 640
Gly Leu Leu Pro Phe Leu Asn Pro Glu Val Pro Asp Gln Phe Tyr Arg
645 650 655
Leu Trp Leu Ser Leu Phe Leu His Ala Gly Val Val His Cys Leu Val
660 665 670
Ser Val Val Phe Gln Met Thr Ile Leu Arg Asp Leu Glu Lys Leu Ala

675 680 685
Gly Trp His Arg Ile Ala Ile Ile Phe Ile Leu Ser Gly Ile Thr Gly
690 695 700
Asn Leu Ala Ser Ala Ile Phe Leu Pro Tyr Arg Ala Glu Val Gly Pro
705 710 715 720
Ala Gly Ser Gln Phe Gly Leu Leu Ala Cys Leu Phe Val Glu Leu Phe
725 730 735
Gln Ser Trp Pro Leu Leu Glu Arg Pro Trp Lys Ala Phe Leu Asn Leu
740 745 750
Ser Ala Ile Val Leu Phe Leu Phe Ile Cys Gly Leu Leu Pro Trp Ile
755 760 765
Asp Asn Ile Ala His Ile Phe Gly Phe Leu Ser Gly Leu Leu Leu Ala
770 775 780
Phe Ala Phe Leu Pro Tyr Ile Thr Phe Gly Thr Ser Asp Lys Tyr Arg
785 790 795 800
Lys Arg Ala Leu Ile Leu Val Ser Leu Leu Ala Phe Ala Gly Leu Phe
805 810 815
Ala Ala Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ile Tyr Pro Ile Asn Trp Pro Trp
820 825 830
Ile Glu His Leu Thr Cys Phe Pro Phe Thr Ser Arg Phe Cys Glu Lys
835 840 845
Tyr Glu Leu Asp Gln Val Leu His
850 855

<210> 182
<211> 855
<212> PRT
<213> Homo sapiens iRhom1 wildtype
<400> 182

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

85 90 95
Ser Thr Gln Lys Trp Gln Arg Lys Ser Ile Arg His Cys Ser Gln Arg
100 105 110
Tyr Gly Lys Leu Lys Pro Gln Val Leu Arg Glu Leu Asp Leu Pro Ser
115 120 125
Gln Asp Asn Val Ser Leu Thr Ser Thr Glu Thr Pro Pro Pro Leu Tyr
130 135 140
Val Gly Pro Cys Gln Leu Gly Met Gln Lys Ile Ile Asp Pro Leu Ala
145 150 155 160
Arg Gly Arg Ala Phe Arg Val Ala Asp Asp Thr Ala Glu Gly Leu Ser
165 170 175
Ala Pro His Thr Pro Val Thr Pro Gly Ala Ala Ser Leu Cys Ser Phe
180 185 190
Ser Ser Ser Arg Ser Gly Phe His Arg Leu Pro Arg Arg Arg Lys Arg
195 200 205
Glu Ser Val Ala Lys Met Ser Phe Arg Ala Ala Ala Ala Leu Met Lys
210 215 220
Gly Arg Ser Val Arg Asp Gly Thr Phe Arg Arg Ala Gln Arg Arg Ser
225 230 235 240
Phe Thr Pro Ala Ser Phe Leu Glu Glu Asp Thr Thr Asp Phe Pro Asp
245 250 255
Glu Leu Asp Thr Ser Phe Phe Ala Arg Glu Gly Ile Leu His Glu Glu
260 265 270
Leu Ser Thr Tyr Pro Asp Glu Val Phe Glu Ser Pro Ser Glu Ala Ala
275 280 285
Leu Lys Asp Trp Glu Lys Ala Pro Glu Gln Ala Asp Leu Thr Gly Gly
290 295 300
Ala Leu Asp Arg Ser Glu Leu Glu Arg Ser His Leu Met Leu Pro Leu
305 310 315 320
Glu Arg Gly Trp Arg Lys Gln Lys Glu Gly Ala Ala Ala Pro Gln Pro
325 330 335
Lys Val Arg Leu Arg Gln Glu Val Val Ser Thr Ala Gly Pro Arg Arg
340 345 350
Gly Gln Arg Ile Ala Val Pro Val Arg Lys Leu Phe Ala Arg Glu Lys
355 360 365
Arg Pro Tyr Gly Leu Gly Met Val Gly Arg Leu Thr Asn Arg Thr Tyr
370 375 380
Arg Lys Arg Ile Asp Ser Phe Val Lys Arg Gln Ile Glu Asp Met Asp
385 390 395 400

Asp His Arg Pro Phe Phe Thr Tyr Trp Leu Thr Phe Val His Ser Leu
405 410 415
Val Thr Ile Leu Ala Val Cys Ile Tyr Gly Ile Ala Pro Val Gly Phe
420 425 430
Ser Gln His Glu Thr Val Asp Ser Val Leu Arg Asn Arg Gly Val Tyr
435 440 445
Glu Asn Val Lys Tyr Val Gln Gln Glu Asn Phe Trp Ile Gly Pro Ser
450 455 460
Ser Glu Ala Leu Ile His Leu Gly Ala Lys Phe Ser Pro Cys Met Arg
465 470 475 480
Gln Asp Pro Gln Val His Ser Phe Ile Arg Ser Ala Arg Glu Arg Glu
485 490 495
Lys His Ser Ala Cys Cys Val Arg Asn Asp Arg Ser Gly Cys Val Gln
500 505 510
Thr Ser Glu Glu Glu Cys Ser Ser Thr Leu Ala Val Trp Val Lys Trp
515 520 525
Pro Ile His Pro Ser Ala Pro Glu Leu Ala Gly His Lys Arg Gln Phe
530 535 540
Gly Ser Val Cys His Gln Asp Pro Arg Val Cys Asp Glu Pro Ser Ser
545 550 555 560
Glu Asp Pro His Glu Trp Pro Glu Asp Ile Thr Lys Trp Pro Ile Cys
565 570 575
Thr Lys Asn Ser Ala Gly Asn His Thr Asn His Pro His Met Asp Cys
580 585 590
Val Ile Thr Gly Arg Pro Cys Cys Ile Gly Thr Lys Gly Arg Cys Glu
595 600 605
Ile Thr Ser Arg Glu Tyr Cys Asp Phe Met Arg Gly Tyr Phe His Glu
610 615 620
Glu Ala Thr Leu Cys Ser Gln Val His Cys Met Asp Asp Val Cys Gly
625 630 635 640
Leu Leu Pro Phe Leu Asn Pro Glu Val Pro Asp Gln Phe Tyr Arg Leu
645 650 655
Trp Leu Ser Leu Phe Leu His Ala Gly Ile Leu His Cys Leu Val Ser
660 665 670
Ile Cys Phe Gln Met Thr Val Leu Arg Asp Leu Glu Lys Leu Ala Gly
675 680 685
Trp His Arg Ile Ala Ile Ile Tyr Leu Leu Ser Gly Val Thr Gly Asn
690 695 700
Leu Ala Ser Ala Ile Phe Leu Pro Tyr Arg Ala Glu Val Gly Pro Ala

705 710 715 720
Gly Ser Gln Phe Gly Ile Leu Ala Cys Leu Phe Val Glu Leu Phe Gln
725 730 735
Ser Trp Gln Ile Leu Ala Arg Pro Trp Arg Ala Phe Phe Lys Leu Leu
740 745 750
Ala Val Val Leu Phe Leu Phe Thr Phe Gly Leu Leu Pro Trp Ile Asp
755 760 765
Asn Phe Ala His Ile Ser Gly Phe Ile Ser Gly Leu Phe Leu Ser Phe
770 775 780
Ala Phe Leu Pro Tyr Ile Ser Phe Gly Lys Phe Asp Leu Tyr Arg Lys
785 790 795 800
Arg Cys Gln Ile Ile Ile Phe Gln Val Val Phe Leu Gly Leu Leu Ala
805 810 815
Gly Leu Val Val Leu Phe Tyr Val Tyr Pro Val Arg Cys Glu Trp Cys
820 825 830
Glu Phe Leu Thr Cys Ile Pro Phe Thr Asp Lys Phe Cys Glu Lys Tyr
835 840 845
Glu Leu Asp Ala Gln Leu His
850 855

<210> 183
<211> 827
<212> PRT
<213> Mus musculus iRhom2 wildtype
<400> 183

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

115 120 125

Gln Arg Glu Leu Glu Leu Pro Ser Gln Glu Val Pro Ser Phe Gln Gly
130 135 140

Thr Glu Ser Pro Lys Pro Cys Lys Met Pro Lys Ile Val Asp Pro Leu
145 150 155 160

Ala Arg Gly Arg Ala Phe Arg His Pro Asp Glu Val Asp Arg Pro His
165 170 175

Ala Ala His Pro Pro Leu Thr Pro Gly Val Leu Ser Leu Thr Ser Phe
180 185 190

Thr Ser Val Arg Ser Gly Tyr Ser His Leu Pro Arg Arg Lys Arg Ile
195 200 205

Ser Val Ala His Met Ser Phe Gln Ala Ala Ala Ala Leu Leu Lys Gly
210 215 220

Arg Ser Val Leu Asp Ala Thr Gly Gln Arg Cys Arg His Val Lys Arg
225 230 235 240

Ser Phe Ala Tyr Pro Ser Phe Leu Glu Glu Asp Ala Val Asp Gly Ala
245 250 255

Asp Thr Phe Asp Ser Ser Phe Phe Ser Lys Glu Glu Met Ser Ser Met
260 265 270

Pro Asp Asp Val Phe Glu Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ser Tyr Phe Arg
275 280 285

Gly Val Pro His Ser Ala Ser Pro Val Ser Pro Asp Gly Val His Ile
290 295 300

Pro Leu Lys Glu Tyr Ser Gly Gly Arg Ala Leu Gly Pro Gly Thr Gln
305 310 315 320

Arg Gly Lys Arg Ile Ala Ser Lys Val Lys His Phe Ala Phe Asp Arg
325 330 335

Lys Lys Arg His Tyr Gly Leu Gly Val Val Gly Asn Trp Leu Asn Arg
340 345 350

Ser Tyr Arg Arg Ser Ile Ser Ser Thr Val Gln Arg Gln Leu Glu Ser
355 360 365

Phe Asp Ser His Arg Pro Tyr Phe Thr Tyr Trp Leu Thr Phe Val His
370 375 380

Ile Ile Ile Thr Leu Leu Val Ile Cys Thr Tyr Gly Ile Ala Pro Val
385 390 395 400

Gly Phe Ala Gln His Val Thr Thr Gln Leu Val Leu Lys Asn Arg Gly
405 410 415

Val Tyr Glu Ser Val Lys Tyr Ile Gln Gln Glu Asn Phe Trp Ile Gly
420 425 430

Pro Ser Ser Ile Asp Leu Ile His Leu Gly Ala Lys Phe Ser Pro Cys
435 440 445
Ile Arg Lys Asp Gln Gln Ile Glu Gln Leu Val Arg Arg Glu Arg Asp
450 455 460
Ile Glu Arg Thr Ser Gly Cys Cys Val Gln Asn Asp Arg Ser Gly Cys
465 470 475 480
Ile Gln Thr Leu Lys Lys Asp Cys Ser Glu Thr Leu Ala Thr Phe Val
485 490 495
Lys Trp Gln Asn Asp Thr Gly Pro Ser Asp Lys Ser Asp Leu Ser Gln
500 505 510
Lys Gln Pro Ser Ala Val Val Cys His Gln Asp Pro Arg Thr Cys Glu
515 520 525
Glu Pro Ala Ser Ser Gly Ala His Ile Trp Pro Asp Asp Ile Thr Lys
530 535 540
Trp Pro Ile Cys Thr Glu Gln Ala Gln Ser Asn His Thr Gly Leu Leu
545 550 555 560
His Ile Asp Cys Lys Ile Lys Gly Arg Pro Cys Cys Ile Gly Thr Lys
565 570 575
Gly Ser Cys Glu Ile Thr Thr Arg Glu Tyr Cys Glu Phe Met His Gly
580 585 590
Tyr Phe His Glu Asp Ala Thr Leu Cys Ser Gln Val His Cys Leu Asp
595 600 605
Lys Val Cys Gly Leu Leu Pro Phe Leu Asn Pro Glu Val Pro Asp Gln
610 615 620
Phe Tyr Arg Ile Trp Leu Ser Leu Phe Leu His Ala Gly Ile Val His
625 630 635 640
Cys Leu Val Ser Val Val Phe Gln Met Thr Ile Leu Arg Asp Leu Glu
645 650 655
Lys Leu Ala Gly Trp His Arg Ile Ser Ile Ile Phe Ile Leu Ser Gly
660 665 670
Ile Thr Gly Asn Leu Ala Ser Ala Ile Phe Leu Pro Tyr Arg Ala Glu
675 680 685
Val Gly Pro Ala Gly Ser Gln Phe Gly Leu Leu Ala Cys Leu Phe Val
690 695 700
Glu Leu Phe Gln Ser Trp Gln Leu Leu Glu Arg Pro Trp Lys Ala Phe
705 710 715 720
Phe Asn Leu Ser Ala Ile Val Leu Phe Leu Phe Ile Cys Gly Leu Leu
725 730 735
Pro Trp Ile Asp Asn Ile Ala His Ile Phe Gly Phe Leu Ser Gly Met

740 745 750

Leu Leu Ala Phe Ala Phe Leu Pro Tyr Ile Thr Phe Gly Thr Ser Asp
755 760 765

Lys Tyr Arg Lys Arg Ala Leu Ile Leu Val Ser Leu Leu Val Phe Ala
770 775 780

Gly Leu Phe Ala Ser Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ile Tyr Pro Ile Asn
785 790 795 800

Trp Pro Trp Ile Glu Tyr Leu Thr Cys Phe Pro Phe Thr Ser Arg Phe
805 810 815

Cys Glu Lys Tyr Glu Leu Asp Gln Val Leu His
820 825

<210> 184

<211> 856

<212> PRT

<213> Homo sapiens iRhom2 I186T

<400> 184

Met Ala Ser Ala Asp Lys Asn Gly Gly Ser Val Ser Ser Val Ser Ser
1 5 10 15

Ser Arg Leu Gln Ser Arg Lys Pro Pro Asn Leu Ser Ile Thr Ile Pro
20 25 30

Pro Pro Glu Lys Glu Thr Gln Ala Pro Gly Glu Gln Asp Ser Met Leu
35 40 45

Pro Glu Gly Phe Gln Asn Arg Arg Leu Lys Lys Ser Gln Pro Arg Thr
50 55 60

Trp Ala Ala His Thr Thr Ala Cys Pro Pro Ser Phe Leu Pro Lys Arg
65 70 75 80

Lys Asn Pro Ala Tyr Leu Lys Ser Val Ser Leu Gln Glu Pro Arg Ser
85 90 95

Arg Trp Gln Glu Ser Ser Glu Lys Arg Pro Gly Phe Arg Arg Gln Ala
100 105 110

Ser Leu Ser Gln Ser Ile Arg Lys Gly Ala Ala Gln Trp Phe Gly Val
115 120 125

Ser Gly Asp Trp Glu Gly Gln Arg Gln Gln Trp Gln Arg Arg Ser Leu
130 135 140

His His Cys Ser Met Arg Tyr Gly Arg Leu Lys Ala Ser Cys Gln Arg
145 150 155 160

Asp Leu Glu Leu Pro Ser Gln Glu Ala Pro Ser Phe Gln Gly Thr Glu
165 170 175

Ser Pro Lys Pro Cys Lys Met Pro Lys Thr Val Asp Pro Leu Ala Arg

180 185 190

Gly Arg Ala Phe Arg His Pro Glu Glu Met Asp Arg Pro His Ala Pro

195 200 205

His Pro Pro Leu Thr Pro Gly Val Leu Ser Leu Thr Ser Phe Thr Ser

210 215 220

Val Arg Ser Gly Tyr Ser His Leu Pro Arg Arg Lys Arg Met Ser Val

225 230 235 240

Ala His Met Ser Leu Gln Ala Ala Ala Ala Leu Leu Lys Gly Arg Ser

245 250 255

Val Leu Asp Ala Thr Gly Gln Arg Cys Arg Val Val Lys Arg Ser Phe

260 265 270

Ala Phe Pro Ser Phe Leu Glu Glu Asp Val Val Asp Gly Ala Asp Thr

275 280 285

Phe Asp Ser Ser Phe Phe Ser Lys Glu Glu Met Ser Ser Met Pro Asp

290 295 300

Asp Val Phe Glu Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ser Tyr Phe Arg Gly Ile

305 310 315 320

Pro His Ser Ala Ser Pro Val Ser Pro Asp Gly Val Gln Ile Pro Leu

325 330 335

Lys Glu Tyr Gly Arg Ala Pro Val Pro Gly Pro Arg Arg Gly Lys Arg

340 345 350

Ile Ala Ser Lys Val Lys His Phe Ala Phe Asp Arg Lys Lys Arg His

355 360 365

Tyr Gly Leu Gly Val Val Gly Asn Trp Leu Asn Arg Ser Tyr Arg Arg

370 375 380

Ser Ile Ser Ser Thr Val Gln Arg Gln Leu Glu Ser Phe Asp Ser His

385 390 395 400

Arg Pro Tyr Phe Thr Tyr Trp Leu Thr Phe Val His Val Ile Ile Thr

405 410 415

Leu Leu Val Ile Cys Thr Tyr Gly Ile Ala Pro Val Gly Phe Ala Gln

420 425 430

His Val Thr Thr Gln Leu Val Leu Arg Asn Lys Gly Val Tyr Glu Ser

435 440 445

Val Lys Tyr Ile Gln Gln Glu Asn Phe Trp Val Gly Pro Ser Ser Ile

450 455 460

Asp Leu Ile His Leu Gly Ala Lys Phe Ser Pro Cys Ile Arg Lys Asp

465 470 475 480

Gly Gln Ile Glu Gln Leu Val Leu Arg Glu Arg Asp Leu Glu Arg Asp

485 490 495

Ser Gly Cys Cys Val Gln Asn Asp His Ser Gly Cys Ile Gln Thr Gln
500 505 510
Arg Lys Asp Cys Ser Glu Thr Leu Ala Thr Phe Val Lys Trp Gln Asp
515 520 525
Asp Thr Gly Pro Pro Met Asp Lys Ser Asp Leu Gly Gln Lys Arg Thr
530 535 540
Ser Gly Ala Val Cys His Gln Asp Pro Arg Thr Cys Glu Glu Pro Ala
545 550 555 560
Ser Ser Gly Ala His Ile Trp Pro Asp Asp Ile Thr Lys Trp Pro Ile
565 570 575
Cys Thr Glu Gln Ala Arg Ser Asn His Thr Gly Phe Leu His Met Asp
580 585 590
Cys Glu Ile Lys Gly Arg Pro Cys Cys Ile Gly Thr Lys Gly Ser Cys
595 600 605
Glu Ile Thr Thr Arg Glu Tyr Cys Glu Phe Met His Gly Tyr Phe His
610 615 620
Glu Glu Ala Thr Leu Cys Ser Gln Val His Cys Leu Asp Lys Val Cys
625 630 635 640
Gly Leu Leu Pro Phe Leu Asn Pro Glu Val Pro Asp Gln Phe Tyr Arg
645 650 655
Leu Trp Leu Ser Leu Phe Leu His Ala Gly Val Val His Cys Leu Val
660 665 670
Ser Val Val Phe Gln Met Thr Ile Leu Arg Asp Leu Glu Lys Leu Ala
675 680 685
Gly Trp His Arg Ile Ala Ile Ile Phe Ile Leu Ser Gly Ile Thr Gly
690 695 700
Asn Leu Ala Ser Ala Ile Phe Leu Pro Tyr Arg Ala Glu Val Gly Pro
705 710 715 720
Ala Gly Ser Gln Phe Gly Leu Leu Ala Cys Leu Phe Val Glu Leu Phe
725 730 735
Gln Ser Trp Pro Leu Leu Glu Arg Pro Trp Lys Ala Phe Leu Asn Leu
740 745 750
Ser Ala Ile Val Leu Phe Leu Phe Ile Cys Gly Leu Leu Pro Trp Ile
755 760 765
Asp Asn Ile Ala His Ile Phe Gly Phe Leu Ser Gly Leu Leu Leu Ala
770 775 780
Phe Ala Phe Leu Pro Tyr Ile Thr Phe Gly Thr Ser Asp Lys Tyr Arg
785 790 795 800
Lys Arg Ala Leu Ile Leu Val Ser Leu Leu Ala Phe Ala Gly Leu Phe

805 810 815
Ala Ala Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ile Tyr Pro Ile Asn Trp Pro Trp
820 825 830
Ile Glu His Leu Thr Cys Phe Pro Phe Thr Ser Arg Phe Cys Glu Lys
835 840 845
Tyr Glu Leu Asp Gln Val Leu His
850 855

<210> 185
<211> 614
<212> PRT
<213> Homo sapiens iRhom2, deletion of first 242 AA
<400> 185

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

210 215 220
Ile His Leu Gly Ala Lys Phe Ser Pro Cys Ile Arg Lys Asp Gly Gln
225 230 235 240
Ile Glu Gln Leu Val Leu Arg Glu Arg Asp Leu Glu Arg Asp Ser Gly
245 250 255
Cys Cys Val Gln Asn Asp His Ser Gly Cys Ile Gln Thr Gln Arg Lys
260 265 270
Asp Cys Ser Glu Thr Leu Ala Thr Phe Val Lys Trp Gln Asp Asp Thr
275 280 285
Gly Pro Pro Met Asp Lys Ser Asp Leu Gly Gln Lys Arg Thr Ser Gly
290 295 300
Ala Val Cys His Gln Asp Pro Arg Thr Cys Glu Glu Pro Ala Ser Ser
305 310 315 320
Gly Ala His Ile Trp Pro Asp Asp Ile Thr Lys Trp Pro Ile Cys Thr
325 330 335
Glu Gln Ala Arg Ser Asn His Thr Gly Phe Leu His Met Asp Cys Glu
340 345 350
Ile Lys Gly Arg Pro Cys Cys Ile Gly Thr Lys Gly Ser Cys Glu Ile
355 360 365
Thr Thr Arg Glu Tyr Cys Glu Phe Met His Gly Tyr Phe His Glu Glu
370 375 380
Ala Thr Leu Cys Ser Gln Val His Cys Leu Asp Lys Val Cys Gly Leu
385 390 395 400
Leu Pro Phe Leu Asn Pro Glu Val Pro Asp Gln Phe Tyr Arg Leu Trp
405 410 415
Leu Ser Leu Phe Leu His Ala Gly Val Val His Cys Leu Val Ser Val
420 425 430
Val Phe Gln Met Thr Ile Leu Arg Asp Leu Glu Lys Leu Ala Gly Trp
435 440 445
His Arg Ile Ala Ile Ile Phe Ile Leu Ser Gly Ile Thr Gly Asn Leu
450 455 460
Ala Ser Ala Ile Phe Leu Pro Tyr Arg Ala Glu Val Gly Pro Ala Gly
465 470 475 480
Ser Gln Phe Gly Leu Leu Ala Cys Leu Phe Val Glu Leu Phe Gln Ser
485 490 495
Trp Pro Leu Leu Glu Arg Pro Trp Lys Ala Phe Leu Asn Leu Ser Ala
500 505 510
Ile Val Leu Phe Leu Phe Ile Cys Gly Leu Leu Pro Trp Ile Asp Asn
515 520 525

Ile Ala His Ile Phe Gly Phe Leu Ser Gly Leu Leu Leu Ala Phe Ala
530 535 540
Phe Leu Pro Tyr Ile Thr Phe Gly Thr Ser Asp Lys Tyr Arg Lys Arg
545 550 555 560
Ala Leu Ile Leu Val Ser Leu Leu Ala Phe Ala Gly Leu Phe Ala Ala
565 570 575
Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ile Tyr Pro Ile Asn Trp Pro Trp Ile Glu
580 585 590
His Leu Thr Cys Phe Pro Phe Thr Ser Arg Phe Cys Glu Lys Tyr Glu
595 600 605
Leu Asp Gln Val Leu His
610

<210> 186
<211> 827
<212> PRT
<213> Mus musculus iRhom2, full length, I156T
<400> 186

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

Ala Ala His Pro Pro Leu Thr Pro Gly Val Leu Ser Leu Thr Ser Phe
180 185 190
Thr Ser Val Arg Ser Gly Tyr Ser His Leu Pro Arg Arg Lys Arg Ile
195 200 205
Ser Val Ala His Met Ser Phe Gln Ala Ala Ala Ala Leu Leu Lys Gly
210 215 220
Arg Ser Val Leu Asp Ala Thr Gly Gln Arg Cys Arg His Val Lys Arg
225 230 235 240
Ser Phe Ala Tyr Pro Ser Phe Leu Glu Glu Asp Ala Val Asp Gly Ala
245 250 255
Asp Thr Phe Asp Ser Ser Phe Phe Ser Lys Glu Glu Met Ser Ser Met
260 265 270
Pro Asp Asp Val Phe Glu Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ser Tyr Phe Arg
275 280 285
Gly Val Pro His Ser Ala Ser Pro Val Ser Pro Asp Gly Val His Ile
290 295 300
Pro Leu Lys Glu Tyr Ser Gly Gly Arg Ala Leu Gly Pro Gly Thr Gln
305 310 315 320
Arg Gly Lys Arg Ile Ala Ser Lys Val Lys His Phe Ala Phe Asp Arg
325 330 335
Lys Lys Arg His Tyr Gly Leu Gly Val Val Gly Asn Trp Leu Asn Arg
340 345 350
Ser Tyr Arg Arg Ser Ile Ser Ser Thr Val Gln Arg Gln Leu Glu Ser
355 360 365
Phe Asp Ser His Arg Pro Tyr Phe Thr Tyr Trp Leu Thr Phe Val His
370 375 380
Ile Ile Ile Thr Leu Leu Val Ile Cys Thr Tyr Gly Ile Ala Pro Val
385 390 395 400
Gly Phe Ala Gln His Val Thr Thr Gln Leu Val Leu Lys Asn Arg Gly
405 410 415
Val Tyr Glu Ser Val Lys Tyr Ile Gln Gln Glu Asn Phe Trp Ile Gly
420 425 430
Pro Ser Ser Ile Asp Leu Ile His Leu Gly Ala Lys Phe Ser Pro Cys
435 440 445
Ile Arg Lys Asp Gln Gln Ile Glu Gln Leu Val Arg Arg Glu Arg Asp
450 455 460
Ile Glu Arg Thr Ser Gly Cys Cys Val Gln Asn Asp Arg Ser Gly Cys
465 470 475 480
Ile Gln Thr Leu Lys Lys Asp Cys Ser Glu Thr Leu Ala Thr Phe Val

485 490 495

Lys Trp Gln Asn Asp Thr Gly Pro Ser Asp Lys Ser Asp Leu Ser Gln

500 505 510

Lys Gln Pro Ser Ala Val Val Cys His Gln Asp Pro Arg Thr Cys Glu

515 520 525

Glu Pro Ala Ser Ser Gly Ala His Ile Trp Pro Asp Asp Ile Thr Lys

530 535 540

Trp Pro Ile Cys Thr Glu Gln Ala Gln Ser Asn His Thr Gly Leu Leu

545 550 555 560

His Ile Asp Cys Lys Ile Lys Gly Arg Pro Cys Cys Ile Gly Thr Lys

565 570 575

Gly Ser Cys Glu Ile Thr Thr Arg Glu Tyr Cys Glu Phe Met His Gly

580 585 590

Tyr Phe His Glu Asp Ala Thr Leu Cys Ser Gln Val His Cys Leu Asp

595 600 605

Lys Val Cys Gly Leu Leu Pro Phe Leu Asn Pro Glu Val Pro Asp Gln

610 615 620

Phe Tyr Arg Ile Trp Leu Ser Leu Phe Leu His Ala Gly Ile Val His

625 630 635 640

Cys Leu Val Ser Val Val Phe Gln Met Thr Ile Leu Arg Asp Leu Glu

645 650 655

Lys Leu Ala Gly Trp His Arg Ile Ser Ile Ile Phe Ile Leu Ser Gly

660 665 670

Ile Thr Gly Asn Leu Ala Ser Ala Ile Phe Leu Pro Tyr Arg Ala Glu

675 680 685

Val Gly Pro Ala Gly Ser Gln Phe Gly Leu Leu Ala Cys Leu Phe Val

690 695 700

Glu Leu Phe Gln Ser Trp Gln Leu Leu Glu Arg Pro Trp Lys Ala Phe

705 710 715 720

Phe Asn Leu Ser Ala Ile Val Leu Phe Leu Phe Ile Cys Gly Leu Leu

725 730 735

Pro Trp Ile Asp Asn Ile Ala His Ile Phe Gly Phe Leu Ser Gly Met

740 745 750

Leu Leu Ala Phe Ala Phe Leu Pro Tyr Ile Thr Phe Gly Thr Ser Asp

755 760 765

Lys Tyr Arg Lys Arg Ala Leu Ile Leu Val Ser Leu Leu Val Phe Ala

770 775 780

Gly Leu Phe Ala Ser Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ile Tyr Pro Ile Asn

785 790 795 800

Trp Pro Trp Ile Glu Tyr Leu Thr Cys Phe Pro Phe Thr Ser Arg Phe
805 810 815
Cys Glu Lys Tyr Glu Leu Asp Gln Val Leu His
820 825

<210> 187
<211> 615
<212> PRT
<213> Mus musculus iRhom2, deletion of first 212 AA
<400> 187

Met Ser Phe Gln Ala Ala Ala Ala Leu Leu Lys Gly Arg Ser Val Leu
1 5 10 15
Asp Ala Thr Gly Gln Arg Cys Arg His Val Lys Arg Ser Phe Ala Tyr
20 25 30
Pro Ser Phe Leu Glu Glu Asp Ala Val Asp Gly Ala Asp Thr Phe Asp
35 40 45
Ser Ser Phe Phe Ser Lys Glu Glu Met Ser Ser Met Pro Asp Asp Val
50 55 60
Phe Glu Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ser Tyr Phe Arg Gly Val Pro His
65 70 75 80
Ser Ala Ser Pro Val Ser Pro Asp Gly Val His Ile Pro Leu Lys Glu
85 90 95
Tyr Ser Gly Gly Arg Ala Leu Gly Pro Gly Thr Gln Arg Gly Lys Arg
100 105 110
Ile Ala Ser Lys Val Lys His Phe Ala Phe Asp Arg Lys Lys Arg His
115 120 125
Tyr Gly Leu Gly Val Val Gly Asn Trp Leu Asn Arg Ser Tyr Arg Arg
130 135 140
Ser Ile Ser Ser Thr Val Gln Arg Gln Leu Glu Ser Phe Asp Ser His
145 150 155 160
Arg Pro Tyr Phe Thr Tyr Trp Leu Thr Phe Val His Ile Ile Ile Thr
165 170 175
Leu Leu Val Ile Cys Thr Tyr Gly Ile Ala Pro Val Gly Phe Ala Gln
180 185 190
His Val Thr Thr Gln Leu Val Leu Lys Asn Arg Gly Val Tyr Glu Ser
195 200 205
Val Lys Tyr Ile Gln Gln Glu Asn Phe Trp Ile Gly Pro Ser Ser Ile
210 215 220
Asp Leu Ile His Leu Gly Ala Lys Phe Ser Pro Cys Ile Arg Lys Asp
225 230 235 240

Gln Gln Ile Glu Gln Leu Val Arg Arg Glu Arg Asp Ile Glu Arg Thr
245 250 255
Ser Gly Cys Cys Val Gln Asn Asp Arg Ser Gly Cys Ile Gln Thr Leu
260 265 270
Lys Lys Asp Cys Ser Glu Thr Leu Ala Thr Phe Val Lys Trp Gln Asn
275 280 285
Asp Thr Gly Pro Ser Asp Lys Ser Asp Leu Ser Gln Lys Gln Pro Ser
290 295 300
Ala Val Val Cys His Gln Asp Pro Arg Thr Cys Glu Glu Pro Ala Ser
305 310 315 320
Ser Gly Ala His Ile Trp Pro Asp Asp Ile Thr Lys Trp Pro Ile Cys
325 330 335
Thr Glu Gln Ala Gln Ser Asn His Thr Gly Leu Leu His Ile Asp Cys
340 345 350
Lys Ile Lys Gly Arg Pro Cys Cys Ile Gly Thr Lys Gly Ser Cys Glu
355 360 365
Ile Thr Thr Arg Glu Tyr Cys Glu Phe Met His Gly Tyr Phe His Glu
370 375 380
Asp Ala Thr Leu Cys Ser Gln Val His Cys Leu Asp Lys Val Cys Gly
385 390 395 400
Leu Leu Pro Phe Leu Asn Pro Glu Val Pro Asp Gln Phe Tyr Arg Ile
405 410 415
Trp Leu Ser Leu Phe Leu His Ala Gly Ile Val His Cys Leu Val Ser
420 425 430
Val Val Phe Gln Met Thr Ile Leu Arg Asp Leu Glu Lys Leu Ala Gly
435 440 445
Trp His Arg Ile Ser Ile Ile Phe Ile Leu Ser Gly Ile Thr Gly Asn
450 455 460
Leu Ala Ser Ala Ile Phe Leu Pro Tyr Arg Ala Glu Val Gly Pro Ala
465 470 475 480
Gly Ser Gln Phe Gly Leu Leu Ala Cys Leu Phe Val Glu Leu Phe Gln
485 490 495
Ser Trp Gln Leu Leu Glu Arg Pro Trp Lys Ala Phe Phe Asn Leu Ser
500 505 510
Ala Ile Val Leu Phe Leu Phe Ile Cys Gly Leu Leu Pro Trp Ile Asp
515 520 525
Asn Ile Ala His Ile Phe Gly Phe Leu Ser Gly Met Leu Leu Ala Phe
530 535 540
Ala Phe Leu Pro Tyr Ile Thr Phe Gly Thr Ser Asp Lys Tyr Arg Lys

545 550 555 560
Arg Ala Leu Ile Leu Val Ser Leu Leu Val Phe Ala Gly Leu Phe Ala
565 570 575
Ser Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ile Tyr Pro Ile Asn Trp Pro Trp Ile
580 585 590
Glu Tyr Leu Thr Cys Phe Pro Phe Thr Ser Arg Phe Cys Glu Lys Tyr
595 600 605
Glu Leu Asp Gln Val Leu His
610 615

<210> 188
<211> 559
<212> PRT
<213> Mus musculus iRhom2, deletion of first 268 AA
<400> 188

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

195 200 205

Arg Ser Gly Cys Ile Gln Thr Leu Lys Lys Asp Cys Ser Glu Thr Leu

210 215 220

Ala Thr Phe Val Lys Trp Gln Asn Asp Thr Gly Pro Ser Asp Lys Ser

225 230 235 240

Asp Leu Ser Gln Lys Gln Pro Ser Ala Val Val Cys His Gln Asp Pro

245 250 255

Arg Thr Cys Glu Glu Pro Ala Ser Ser Gly Ala His Ile Trp Pro Asp

260 265 270

Asp Ile Thr Lys Trp Pro Ile Cys Thr Glu Gln Ala Gln Ser Asn His

275 280 285

Thr Gly Leu Leu His Ile Asp Cys Lys Ile Lys Gly Arg Pro Cys Cys

290 295 300

Ile Gly Thr Lys Gly Ser Cys Glu Ile Thr Thr Arg Glu Tyr Cys Glu

305 310 315 320

Phe Met His Gly Tyr Phe His Glu Asp Ala Thr Leu Cys Ser Gln Val

325 330 335

His Cys Leu Asp Lys Val Cys Gly Leu Leu Pro Phe Leu Asn Pro Glu

340 345 350

Val Pro Asp Gln Phe Tyr Arg Ile Trp Leu Ser Leu Phe Leu His Ala

355 360 365

Gly Ile Val His Cys Leu Val Ser Val Val Phe Gln Met Thr Ile Leu

370 375 380

Arg Asp Leu Glu Lys Leu Ala Gly Trp His Arg Ile Ser Ile Ile Phe

385 390 395 400

Ile Leu Ser Gly Ile Thr Gly Asn Leu Ala Ser Ala Ile Phe Leu Pro

405 410 415

Tyr Arg Ala Glu Val Gly Pro Ala Gly Ser Gln Phe Gly Leu Leu Ala

420 425 430

Cys Leu Phe Val Glu Leu Phe Gln Ser Trp Gln Leu Leu Glu Arg Pro

435 440 445

Trp Lys Ala Phe Phe Asn Leu Ser Ala Ile Val Leu Phe Leu Phe Ile

450 455 460

Cys Gly Leu Leu Pro Trp Ile Asp Asn Ile Ala His Ile Phe Gly Phe

465 470 475 480

Leu Ser Gly Met Leu Leu Ala Phe Ala Phe Leu Pro Tyr Ile Thr Phe

485 490 495

Gly Thr Ser Asp Lys Tyr Arg Lys Arg Ala Leu Ile Leu Val Ser Leu

500 505 510

Leu Val Phe Ala Gly Leu Phe Ala Ser Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ile
515 520 525
Tyr Pro Ile Asn Trp Pro Trp Ile Glu Tyr Leu Thr Cys Phe Pro Phe
530 535 540
Thr Ser Arg Phe Cys Glu Lys Tyr Glu Leu Asp Gln Val Leu His
545 550 555

<210> 189
<211> 888
<212> PRT
<213> Homo sapiens iRhom1, full length, wild type, triple T7-Tag
<400> 189

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

Gly Arg Ser Val Arg Asp Gly Thr Phe Arg Arg Ala Gln Arg Arg Ser
225 230 235 240
Phe Thr Pro Ala Ser Phe Leu Glu Glu Asp Thr Thr Asp Phe Pro Asp
245 250 255
Glu Leu Asp Thr Ser Phe Phe Ala Arg Glu Gly Ile Leu His Glu Glu
260 265 270
Leu Ser Thr Tyr Pro Asp Glu Val Phe Glu Ser Pro Ser Glu Ala Ala
275 280 285
Leu Lys Asp Trp Glu Lys Ala Pro Glu Gln Ala Asp Leu Thr Gly Gly
290 295 300
Ala Leu Asp Arg Ser Glu Leu Glu Arg Ser His Leu Met Leu Pro Leu
305 310 315 320
Glu Arg Gly Trp Arg Lys Gln Lys Glu Gly Ala Ala Ala Pro Gln Pro
325 330 335
Lys Val Arg Leu Arg Gln Glu Val Val Ser Thr Ala Gly Pro Arg Arg
340 345 350
Gly Gln Arg Ile Ala Val Pro Val Arg Lys Leu Phe Ala Arg Glu Lys
355 360 365
Arg Pro Tyr Gly Leu Gly Met Val Gly Arg Leu Thr Asn Arg Thr Tyr
370 375 380
Arg Lys Arg Ile Asp Ser Phe Val Lys Arg Gln Ile Glu Asp Met Asp
385 390 395 400
Asp His Arg Pro Phe Phe Thr Tyr Trp Leu Thr Phe Val His Ser Leu
405 410 415
Val Thr Ile Leu Ala Val Cys Ile Tyr Gly Ile Ala Pro Val Gly Phe
420 425 430
Ser Gln His Glu Thr Val Asp Ser Val Leu Arg Asn Arg Gly Val Tyr
435 440 445
Glu Asn Val Lys Tyr Val Gln Gln Glu Asn Phe Trp Ile Gly Pro Ser
450 455 460
Ser Glu Ala Leu Ile His Leu Gly Ala Lys Phe Ser Pro Cys Met Arg
465 470 475 480
Gln Asp Pro Gln Val His Ser Phe Ile Arg Ser Ala Arg Glu Arg Glu
485 490 495
Lys His Ser Ala Cys Cys Val Arg Asn Asp Arg Ser Gly Cys Val Gln
500 505 510
Thr Ser Glu Glu Glu Cys Ser Ser Thr Leu Ala Val Trp Val Lys Trp
515 520 525
Pro Ile His Pro Ser Ala Pro Glu Leu Ala Gly His Lys Arg Gln Phe

530 535 540

Gly Ser Val Cys His Gln Asp Pro Arg Val Cys Asp Glu Pro Ser Ser
545 550 555 560

Glu Asp Pro His Glu Trp Pro Glu Asp Ile Thr Lys Trp Pro Ile Cys
565 570 575

Thr Lys Asn Ser Ala Gly Asn His Thr Asn His Pro His Met Asp Cys
580 585 590

Val Ile Thr Gly Arg Pro Cys Cys Ile Gly Thr Lys Gly Arg Cys Glu
595 600 605

Ile Thr Ser Arg Glu Tyr Cys Asp Phe Met Arg Gly Tyr Phe His Glu
610 615 620

Glu Ala Thr Leu Cys Ser Gln Val His Cys Met Asp Asp Val Cys Gly
625 630 635 640

Leu Leu Pro Phe Leu Asn Pro Glu Val Pro Asp Gln Phe Tyr Arg Leu
645 650 655

Trp Leu Ser Leu Phe Leu His Ala Gly Ile Leu His Cys Leu Val Ser
660 665 670

Ile Cys Phe Gln Met Thr Val Leu Arg Asp Leu Glu Lys Leu Ala Gly
675 680 685

Trp His Arg Ile Ala Ile Ile Tyr Leu Leu Ser Gly Val Thr Gly Asn
690 695 700

Leu Ala Ser Ala Ile Phe Leu Pro Tyr Arg Ala Glu Val Gly Pro Ala
705 710 715 720

Gly Ser Gln Phe Gly Ile Leu Ala Cys Leu Phe Val Glu Leu Phe Gln
725 730 735

Ser Trp Gln Ile Leu Ala Arg Pro Trp Arg Ala Phe Phe Lys Leu Leu
740 745 750

Ala Val Val Leu Phe Leu Phe Thr Phe Gly Leu Leu Pro Trp Ile Asp
755 760 765

Asn Phe Ala His Ile Ser Gly Phe Ile Ser Gly Leu Phe Leu Ser Phe
770 775 780

Ala Phe Leu Pro Tyr Ile Ser Phe Gly Lys Phe Asp Leu Tyr Arg Lys
785 790 795 800

Arg Cys Gln Ile Ile Ile Phe Gln Val Val Phe Leu Gly Leu Leu Ala
805 810 815

Gly Leu Val Val Leu Phe Tyr Val Tyr Pro Val Arg Cys Glu Trp Cys
820 825 830

Glu Phe Leu Thr Cys Ile Pro Phe Thr Asp Lys Phe Cys Glu Lys Tyr
835 840 845

Glu Leu Asp Ala Gln Leu His Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
850 855 860
Met Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Met Ala Ser
865 870 875 880
Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly
885

<210> 190
<211> 889
<212> PRT
<213> Homo sapiens iRhom2, full length, wild type, triple T7-Tag
<400> 190

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

Val Arg Ser Gly Tyr Ser His Leu Pro Arg Arg Lys Arg Met Ser Val
225 230 235 240
Ala His Met Ser Leu Gln Ala Ala Ala Ala Leu Leu Lys Gly Arg Ser
245 250 255
Val Leu Asp Ala Thr Gly Gln Arg Cys Arg Val Val Lys Arg Ser Phe
260 265 270
Ala Phe Pro Ser Phe Leu Glu Glu Asp Val Val Asp Gly Ala Asp Thr
275 280 285
Phe Asp Ser Ser Phe Phe Ser Lys Glu Glu Met Ser Ser Met Pro Asp
290 295 300
Asp Val Phe Glu Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ser Tyr Phe Arg Gly Ile
305 310 315 320
Pro His Ser Ala Ser Pro Val Ser Pro Asp Gly Val Gln Ile Pro Leu
325 330 335
Lys Glu Tyr Gly Arg Ala Pro Val Pro Gly Pro Arg Arg Gly Lys Arg
340 345 350
Ile Ala Ser Lys Val Lys His Phe Ala Phe Asp Arg Lys Lys Arg His
355 360 365
Tyr Gly Leu Gly Val Val Gly Asn Trp Leu Asn Arg Ser Tyr Arg Arg
370 375 380
Ser Ile Ser Ser Thr Val Gln Arg Gln Leu Glu Ser Phe Asp Ser His
385 390 395 400
Arg Pro Tyr Phe Thr Tyr Trp Leu Thr Phe Val His Val Ile Ile Thr
405 410 415
Leu Leu Val Ile Cys Thr Tyr Gly Ile Ala Pro Val Gly Phe Ala Gln
420 425 430
His Val Thr Thr Gln Leu Val Leu Arg Asn Lys Gly Val Tyr Glu Ser
435 440 445
Val Lys Tyr Ile Gln Gln Glu Asn Phe Trp Val Gly Pro Ser Ser Ile
450 455 460
Asp Leu Ile His Leu Gly Ala Lys Phe Ser Pro Cys Ile Arg Lys Asp
465 470 475 480
Gly Gln Ile Glu Gln Leu Val Leu Arg Glu Arg Asp Leu Glu Arg Asp
485 490 495
Ser Gly Cys Cys Val Gln Asn Asp His Ser Gly Cys Ile Gln Thr Gln
500 505 510
Arg Lys Asp Cys Ser Glu Thr Leu Ala Thr Phe Val Lys Trp Gln Asp
515 520 525
Asp Thr Gly Pro Pro Met Asp Lys Ser Asp Leu Gly Gln Lys Arg Thr

530 535 540

Ser Gly Ala Val Cys His Gln Asp Pro Arg Thr Cys Glu Glu Pro Ala
545 550 555 560

Ser Ser Gly Ala His Ile Trp Pro Asp Asp Ile Thr Lys Trp Pro Ile
565 570 575

Cys Thr Glu Gln Ala Arg Ser Asn His Thr Gly Phe Leu His Met Asp
580 585 590

Cys Glu Ile Lys Gly Arg Pro Cys Cys Ile Gly Thr Lys Gly Ser Cys
595 600 605

Glu Ile Thr Thr Arg Glu Tyr Cys Glu Phe Met His Gly Tyr Phe His
610 615 620

Glu Glu Ala Thr Leu Cys Ser Gln Val His Cys Leu Asp Lys Val Cys
625 630 635 640

Gly Leu Leu Pro Phe Leu Asn Pro Glu Val Pro Asp Gln Phe Tyr Arg
645 650 655

Leu Trp Leu Ser Leu Phe Leu His Ala Gly Val Val His Cys Leu Val
660 665 670

Ser Val Val Phe Gln Met Thr Ile Leu Arg Asp Leu Glu Lys Leu Ala
675 680 685

Gly Trp His Arg Ile Ala Ile Ile Phe Ile Leu Ser Gly Ile Thr Gly
690 695 700

Asn Leu Ala Ser Ala Ile Phe Leu Pro Tyr Arg Ala Glu Val Gly Pro
705 710 715 720

Ala Gly Ser Gln Phe Gly Leu Leu Ala Cys Leu Phe Val Glu Leu Phe
725 730 735

Gln Ser Trp Pro Leu Leu Glu Arg Pro Trp Lys Ala Phe Leu Asn Leu
740 745 750

Ser Ala Ile Val Leu Phe Leu Phe Ile Cys Gly Leu Leu Pro Trp Ile
755 760 765

Asp Asn Ile Ala His Ile Phe Gly Phe Leu Ser Gly Leu Leu Leu Ala
770 775 780

Phe Ala Phe Leu Pro Tyr Ile Thr Phe Gly Thr Ser Asp Lys Tyr Arg
785 790 795 800

Lys Arg Ala Leu Ile Leu Val Ser Leu Leu Ala Phe Ala Gly Leu Phe
805 810 815

Ala Ala Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ile Tyr Pro Ile Asn Trp Pro Trp
820 825 830

Ile Glu His Leu Thr Cys Phe Pro Phe Thr Ser Arg Phe Cys Glu Lys
835 840 845

Tyr Glu Leu Asp Gln Val Leu His Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln
850 855 860
Gln Met Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Met Ala
865 870 875 880
Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly
885

<210> 191
<211> 647
<212> PRT
<213> Homo sapiens iRhom2, deletion of first 242 AA, triple T7-Tag
<400> 191

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

Ile His Leu Gly Ala Lys Phe Ser Pro Cys Ile Arg Lys Asp Gly Gln
225 230 235 240
Ile Glu Gln Leu Val Leu Arg Glu Arg Asp Leu Glu Arg Asp Ser Gly
245 250 255
Cys Cys Val Gln Asn Asp His Ser Gly Cys Ile Gln Thr Gln Arg Lys
260 265 270
Asp Cys Ser Glu Thr Leu Ala Thr Phe Val Lys Trp Gln Asp Asp Thr
275 280 285
Gly Pro Pro Met Asp Lys Ser Asp Leu Gly Gln Lys Arg Thr Ser Gly
290 295 300
Ala Val Cys His Gln Asp Pro Arg Thr Cys Glu Glu Pro Ala Ser Ser
305 310 315 320
Gly Ala His Ile Trp Pro Asp Asp Ile Thr Lys Trp Pro Ile Cys Thr
325 330 335
Glu Gln Ala Arg Ser Asn His Thr Gly Phe Leu His Met Asp Cys Glu
340 345 350
Ile Lys Gly Arg Pro Cys Cys Ile Gly Thr Lys Gly Ser Cys Glu Ile
355 360 365
Thr Thr Arg Glu Tyr Cys Glu Phe Met His Gly Tyr Phe His Glu Glu
370 375 380
Ala Thr Leu Cys Ser Gln Val His Cys Leu Asp Lys Val Cys Gly Leu
385 390 395 400
Leu Pro Phe Leu Asn Pro Glu Val Pro Asp Gln Phe Tyr Arg Leu Trp
405 410 415
Leu Ser Leu Phe Leu His Ala Gly Val Val His Cys Leu Val Ser Val
420 425 430
Val Phe Gln Met Thr Ile Leu Arg Asp Leu Glu Lys Leu Ala Gly Trp
435 440 445
His Arg Ile Ala Ile Ile Phe Ile Leu Ser Gly Ile Thr Gly Asn Leu
450 455 460
Ala Ser Ala Ile Phe Leu Pro Tyr Arg Ala Glu Val Gly Pro Ala Gly
465 470 475 480
Ser Gln Phe Gly Leu Leu Ala Cys Leu Phe Val Glu Leu Phe Gln Ser
485 490 495
Trp Pro Leu Leu Glu Arg Pro Trp Lys Ala Phe Leu Asn Leu Ser Ala
500 505 510
Ile Val Leu Phe Leu Phe Ile Cys Gly Leu Leu Pro Trp Ile Asp Asn
515 520 525
Ile Ala His Ile Phe Gly Phe Leu Ser Gly Leu Leu Leu Ala Phe Ala

530 535 540

Phe Leu Pro Tyr Ile Thr Phe Gly Thr Ser Asp Lys Tyr Arg Lys Arg
545 550 555 560

Ala Leu Ile Leu Val Ser Leu Leu Ala Phe Ala Gly Leu Phe Ala Ala
565 570 575

Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ile Tyr Pro Ile Asn Trp Pro Trp Ile Glu
580 585 590

His Leu Thr Cys Phe Pro Phe Thr Ser Arg Phe Cys Glu Lys Tyr Glu
595 600 605

Leu Asp Gln Val Leu His Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met
610 615 620

Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Met Ala Ser Met
625 630 635 640

Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly
645

<210> 192

<211> 889

<212> PRT

<213> Mus musculus iRhom1, full length, wild type, triple T7-Tag

<400> 192

Met Ser Glu Ala Arg Arg Asp Ser Thr Ser Ser Leu Gln Arg Lys Lys
1 5 10 15

Pro Pro Trp Leu Lys Leu Asp Ile Pro Ala Ala Val Pro Pro Ala Ala
20 25 30

Glu Glu Pro Ser Phe Leu Gln Pro Leu Arg Arg Gln Ala Phe Leu Arg
35 40 45

Ser Val Ser Met Pro Ala Glu Thr Ala Arg Val Pro Ser Pro His His
50 55 60

Glu Pro Arg Arg Leu Val Leu Gln Arg Gln Thr Ser Ile Thr Gln Thr
65 70 75 80

Ile Arg Arg Gly Thr Ala Asp Trp Phe Gly Val Ser Lys Asp Ser Asp
85 90 95

Ser Thr Gln Lys Trp Gln Arg Lys Ser Ile Arg His Cys Ser Gln Arg
100 105 110

Tyr Gly Lys Leu Lys Pro Gln Val Ile Arg Glu Leu Asp Leu Pro Ser
115 120 125

Gln Asp Asn Val Ser Leu Thr Ser Thr Glu Thr Pro Pro Pro Leu Tyr
130 135 140

Val Gly Pro Cys Gln Leu Gly Met Gln Lys Ile Ile Asp Pro Leu Ala

145 150 155 160
Arg Gly Arg Ala Phe Arg Met Ala Asp Asp Thr Ala Asp Gly Leu Ser
165 170 175
Ala Pro His Thr Pro Val Thr Pro Gly Ala Ala Ser Leu Cys Ser Phe
180 185 190
Ser Ser Ser Arg Ser Gly Phe Asn Arg Leu Pro Arg Arg Arg Lys Arg
195 200 205
Glu Ser Val Ala Lys Met Ser Phe Arg Ala Ala Ala Ala Leu Val Lys
210 215 220
Gly Arg Ser Ile Arg Asp Gly Thr Leu Arg Arg Gly Gln Arg Arg Ser
225 230 235 240
Phe Thr Pro Ala Ser Phe Leu Glu Glu Asp Met Val Asp Phe Pro Asp
245 250 255
Glu Leu Asp Thr Ser Phe Phe Ala Arg Glu Gly Val Leu His Glu Glu
260 265 270
Met Ser Thr Tyr Pro Asp Glu Val Phe Glu Ser Pro Ser Glu Ala Ala
275 280 285
Leu Lys Asp Trp Glu Lys Ala Pro Asp Gln Ala Asp Leu Thr Gly Gly
290 295 300
Ala Leu Asp Arg Ser Glu Leu Glu Arg Ser His Leu Met Leu Pro Leu
305 310 315 320
Glu Arg Gly Trp Arg Lys Gln Lys Glu Gly Gly Pro Leu Ala Pro Gln
325 330 335
Pro Lys Val Arg Leu Arg Gln Glu Val Val Ser Ala Ala Gly Pro Arg
340 345 350
Arg Gly Gln Arg Ile Ala Val Pro Val Arg Lys Leu Phe Ala Arg Glu
355 360 365
Lys Arg Pro Tyr Gly Leu Gly Met Val Gly Arg Leu Thr Asn Arg Thr
370 375 380
Tyr Arg Lys Arg Ile Asp Ser Tyr Val Lys Arg Gln Ile Glu Asp Met
385 390 395 400
Asp Asp His Arg Pro Phe Phe Thr Tyr Trp Leu Thr Phe Val His Ser
405 410 415
Leu Val Thr Ile Leu Ala Val Cys Ile Tyr Gly Ile Ala Pro Val Gly
420 425 430
Phe Ser Gln His Glu Thr Val Asp Ser Val Leu Arg Lys Arg Gly Val
435 440 445
Tyr Glu Asn Val Lys Tyr Val Gln Gln Glu Asn Phe Trp Ile Gly Pro
450 455 460

Ser Ser Glu Ala Leu Ile His Leu Gly Ala Lys Phe Ser Pro Cys Met
465 470 475 480
Arg Gln Asp Pro Gln Val His Ser Phe Ile Leu Ala Ala Arg Glu Arg
485 490 495
Glu Lys His Ser Ala Cys Cys Val Arg Asn Asp Arg Ser Gly Cys Val
500 505 510
Gln Thr Ser Lys Glu Glu Cys Ser Ser Thr Leu Ala Val Trp Val Lys
515 520 525
Trp Pro Val His Pro Ser Ala Pro Asp Leu Ala Gly Asn Lys Arg Gln
530 535 540
Phe Gly Ser Val Cys His Gln Asp Pro Arg Val Cys Asp Glu Pro Ser
545 550 555 560
Ser Glu Asp Pro His Glu Trp Pro Glu Asp Ile Thr Lys Trp Pro Ile
565 570 575
Cys Thr Lys Ser Ser Ala Gly Asn His Thr Asn His Pro His Met Asp
580 585 590
Cys Val Ile Thr Gly Arg Pro Cys Cys Ile Gly Thr Lys Gly Arg Cys
595 600 605
Glu Ile Thr Ser Arg Glu Tyr Cys Asp Phe Met Arg Gly Tyr Phe His
610 615 620
Glu Glu Ala Thr Leu Cys Ser Gln Val His Cys Met Asp Asp Val Cys
625 630 635 640
Gly Leu Leu Pro Phe Leu Asn Pro Glu Val Pro Asp Gln Phe Tyr Arg
645 650 655
Leu Trp Leu Ser Leu Phe Leu His Ala Gly Ile Leu His Cys Leu Val
660 665 670
Ser Val Cys Phe Gln Met Thr Val Leu Arg Asp Leu Glu Lys Leu Ala
675 680 685
Gly Trp His Arg Ile Ala Ile Ile Tyr Leu Leu Ser Gly Ile Thr Gly
690 695 700
Asn Leu Ala Ser Ala Ile Phe Leu Pro Tyr Arg Ala Glu Val Gly Pro
705 710 715 720
Ala Gly Ser Gln Phe Gly Ile Leu Ala Cys Leu Phe Val Glu Leu Phe
725 730 735
Gln Ser Trp Gln Ile Leu Ala Arg Pro Trp Arg Ala Phe Phe Lys Leu
740 745 750
Leu Ala Val Val Leu Phe Leu Phe Ala Phe Gly Leu Leu Pro Trp Ile
755 760 765
Asp Asn Phe Ala His Ile Ser Gly Phe Val Ser Gly Leu Phe Leu Ser

770 775 780
Phe Ala Phe Leu Pro Tyr Ile Ser Phe Gly Lys Phe Asp Leu Tyr Arg
785 790 795 800
Lys Arg Cys Gln Ile Ile Ile Phe Gln Val Val Phe Leu Gly Leu Leu
805 810 815
Ala Gly Leu Val Val Leu Phe Tyr Phe Tyr Pro Val Arg Cys Glu Trp
820 825 830
Cys Glu Phe Leu Thr Cys Ile Pro Phe Thr Asp Lys Phe Cys Glu Lys
835 840 845
Tyr Glu Leu Asp Ala Gln Leu His Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln
850 855 860
Gln Met Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Met Ala
865 870 875 880
Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly
885

<210> 193
<211> 860
<212> PRT
<213> Mus musculus iRhom2, full length, wild type, triple T7-Tag
<400> 193
Met Ala Ser Ala Asp Lys Asn Gly Ser Asn Leu Pro Ser Val Ser Gly
1 5 10 15
Ser Arg Leu Gln Ser Arg Lys Pro Pro Asn Leu Ser Ile Thr Ile Pro
20 25 30
Pro Pro Glu Ser Gln Ala Pro Gly Glu Gln Asp Ser Met Leu Pro Glu
35 40 45
Arg Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Leu Lys Ser Val Ser Leu Gln Glu Pro
50 55 60
Arg Gly Arg Trp Gln Glu Gly Ala Glu Lys Arg Pro Gly Phe Arg Arg
65 70 75 80
Gln Ala Ser Leu Ser Gln Ser Ile Arg Lys Ser Thr Ala Gln Trp Phe
85 90 95
Gly Val Ser Gly Asp Trp Glu Gly Lys Arg Gln Asn Trp His Arg Arg
100 105 110
Ser Leu His His Cys Ser Val His Tyr Gly Arg Leu Lys Ala Ser Cys
115 120 125
Gln Arg Glu Leu Glu Leu Pro Ser Gln Glu Val Pro Ser Phe Gln Gly
130 135 140
Thr Glu Ser Pro Lys Pro Cys Lys Met Pro Lys Ile Val Asp Pro Leu

145 150 155 160
Ala Arg Gly Arg Ala Phe Arg His Pro Asp Glu Val Asp Arg Pro His
165 170 175
Ala Ala His Pro Pro Leu Thr Pro Gly Val Leu Ser Leu Thr Ser Phe
180 185 190
Thr Ser Val Arg Ser Gly Tyr Ser His Leu Pro Arg Arg Lys Arg Ile
195 200 205
Ser Val Ala His Met Ser Phe Gln Ala Ala Ala Ala Leu Leu Lys Gly
210 215 220
Arg Ser Val Leu Asp Ala Thr Gly Gln Arg Cys Arg His Val Lys Arg
225 230 235 240
Ser Phe Ala Tyr Pro Ser Phe Leu Glu Glu Asp Ala Val Asp Gly Ala
245 250 255
Asp Thr Phe Asp Ser Ser Phe Phe Ser Lys Glu Glu Met Ser Ser Met
260 265 270
Pro Asp Asp Val Phe Glu Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ser Tyr Phe Arg
275 280 285
Gly Val Pro His Ser Ala Ser Pro Val Ser Pro Asp Gly Val His Ile
290 295 300
Pro Leu Lys Glu Tyr Ser Gly Gly Arg Ala Leu Gly Pro Gly Thr Gln
305 310 315 320
Arg Gly Lys Arg Ile Ala Ser Lys Val Lys His Phe Ala Phe Asp Arg
325 330 335
Lys Lys Arg His Tyr Gly Leu Gly Val Val Gly Asn Trp Leu Asn Arg
340 345 350
Ser Tyr Arg Arg Ser Ile Ser Ser Thr Val Gln Arg Gln Leu Glu Ser
355 360 365
Phe Asp Ser His Arg Pro Tyr Phe Thr Tyr Trp Leu Thr Phe Val His
370 375 380
Ile Ile Ile Thr Leu Leu Val Ile Cys Thr Tyr Gly Ile Ala Pro Val
385 390 395 400
Gly Phe Ala Gln His Val Thr Thr Gln Leu Val Leu Lys Asn Arg Gly
405 410 415
Val Tyr Glu Ser Val Lys Tyr Ile Gln Gln Glu Asn Phe Trp Ile Gly
420 425 430
Pro Ser Ser Ile Asp Leu Ile His Leu Gly Ala Lys Phe Ser Pro Cys
435 440 445
Ile Arg Lys Asp Gln Gln Ile Glu Gln Leu Val Arg Arg Glu Arg Asp
450 455 460

Ile Glu Arg Thr Ser Gly Cys Cys Val Gln Asn Asp Arg Ser Gly Cys
465 470 475 480
Ile Gln Thr Leu Lys Lys Asp Cys Ser Glu Thr Leu Ala Thr Phe Val
485 490 495
Lys Trp Gln Asn Asp Thr Gly Pro Ser Asp Lys Ser Asp Leu Ser Gln
500 505 510
Lys Gln Pro Ser Ala Val Val Cys His Gln Asp Pro Arg Thr Cys Glu
515 520 525
Glu Pro Ala Ser Ser Gly Ala His Ile Trp Pro Asp Asp Ile Thr Lys
530 535 540
Trp Pro Ile Cys Thr Glu Gln Ala Gln Ser Asn His Thr Gly Leu Leu
545 550 555 560
His Ile Asp Cys Lys Ile Lys Gly Arg Pro Cys Cys Ile Gly Thr Lys
565 570 575
Gly Ser Cys Glu Ile Thr Thr Arg Glu Tyr Cys Glu Phe Met His Gly
580 585 590
Tyr Phe His Glu Asp Ala Thr Leu Cys Ser Gln Val His Cys Leu Asp
595 600 605
Lys Val Cys Gly Leu Leu Pro Phe Leu Asn Pro Glu Val Pro Asp Gln
610 615 620
Phe Tyr Arg Ile Trp Leu Ser Leu Phe Leu His Ala Gly Ile Val His
625 630 635 640
Cys Leu Val Ser Val Val Phe Gln Met Thr Ile Leu Arg Asp Leu Glu
645 650 655
Lys Leu Ala Gly Trp His Arg Ile Ser Ile Ile Phe Ile Leu Ser Gly
660 665 670
Ile Thr Gly Asn Leu Ala Ser Ala Ile Phe Leu Pro Tyr Arg Ala Glu
675 680 685
Val Gly Pro Ala Gly Ser Gln Phe Gly Leu Leu Ala Cys Leu Phe Val
690 695 700
Glu Leu Phe Gln Ser Trp Gln Leu Leu Glu Arg Pro Trp Lys Ala Phe
705 710 715 720
Phe Asn Leu Ser Ala Ile Val Leu Phe Leu Phe Ile Cys Gly Leu Leu
725 730 735
Pro Trp Ile Asp Asn Ile Ala His Ile Phe Gly Phe Leu Ser Gly Met
740 745 750
Leu Leu Ala Phe Ala Phe Leu Pro Tyr Ile Thr Phe Gly Thr Ser Asp
755 760 765
Lys Tyr Arg Lys Arg Ala Leu Ile Leu Val Ser Leu Leu Val Phe Ala

770 775 780

Gly Leu Phe Ala Ser Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ile Tyr Pro Ile Asn
785 790 795 800

Trp Pro Trp Ile Glu Tyr Leu Thr Cys Phe Pro Phe Thr Ser Arg Phe
805 810 815

Cys Glu Lys Tyr Glu Leu Asp Gln Val Leu His Met Ala Ser Met Thr
820 825 830

Gly Gly Gln Gln Met Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met
835 840 845

Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly
850 855 860

<210> 194

<211> 160

<212> PRT

<213> Homo sapiens TGFa, full length, wild type

<400> 194

Met Val Pro Ser Ala Gly Gln Leu Ala Leu Phe Ala Leu Gly Ile Val
1 5 10 15

Leu Ala Ala Cys Gln Ala Leu Glu Asn Ser Thr Ser Pro Leu Ser Ala
20 25 30

Asp Pro Pro Val Ala Ala Ala Val Val Ser His Phe Asn Asp Cys Pro
35 40 45

Asp Ser His Thr Gln Phe Cys Phe His Gly Thr Cys Arg Phe Leu Val
50 55 60

Gln Glu Asp Lys Pro Ala Cys Val Cys His Ser Gly Tyr Val Gly Ala
65 70 75 80

Arg Cys Glu His Ala Asp Leu Leu Ala Val Val Ala Ala Ser Gln Lys
85 90 95

Lys Gln Ala Ile Thr Ala Leu Val Val Val Ser Ile Val Ala Leu Ala
100 105 110

Val Leu Ile Ile Thr Cys Val Leu Ile His Cys Cys Gln Val Arg Lys
115 120 125

His Cys Glu Trp Cys Arg Ala Leu Ile Cys Arg His Glu Lys Pro Ser
130 135 140

Ala Leu Leu Lys Gly Arg Thr Ala Cys Cys His Ser Glu Thr Val Val
145 150 155 160

<210> 195

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial sequence
<220>
<223> mRhbdf2.3 fwd primer
<400> 195
tcaatgagct ctttatgggg ca 22
<210> 196
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> mRhbdf2.3 rev primer
<400> 196
aaggtctcca tcccctcagg tc 22
<210> 197
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> mRhbdf2.3 IVT gRNA
<400> 197
aagcatgcta tcctgctcgc 20
<210> 198
<211> 878
<212> PRT
<213> Homo sapiens iRhom2, full length, wild type, FLAG-Tag
<400> 198

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

100 105 110
Ser Leu Ser Gln Ser Ile Arg Lys Gly Ala Ala Gln Trp Phe Gly Val
115 120 125
Ser Gly Asp Trp Glu Gly Gln Arg Gln Gln Trp Gln Arg Arg Ser Leu
130 135 140
His His Cys Ser Met Arg Tyr Gly Arg Leu Lys Ala Ser Cys Gln Arg
145 150 155 160
Asp Leu Glu Leu Pro Ser Gln Glu Ala Pro Ser Phe Gln Gly Thr Glu
165 170 175
Ser Pro Lys Pro Cys Lys Met Pro Lys Ile Val Asp Pro Leu Ala Arg
180 185 190
Gly Arg Ala Phe Arg His Pro Glu Glu Met Asp Arg Pro His Ala Pro
195 200 205
His Pro Pro Leu Thr Pro Gly Val Leu Ser Leu Thr Ser Phe Thr Ser
210 215 220
Val Arg Ser Gly Tyr Ser His Leu Pro Arg Arg Lys Arg Met Ser Val
225 230 235 240
Ala His Met Ser Leu Gln Ala Ala Ala Ala Leu Leu Lys Gly Arg Ser
245 250 255
Val Leu Asp Ala Thr Gly Gln Arg Cys Arg Val Val Lys Arg Ser Phe
260 265 270
Ala Phe Pro Ser Phe Leu Glu Glu Asp Val Val Asp Gly Ala Asp Thr
275 280 285
Phe Asp Ser Ser Phe Phe Ser Lys Glu Glu Met Ser Ser Met Pro Asp
290 295 300
Asp Val Phe Glu Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ser Tyr Phe Arg Gly Ile
305 310 315 320
Pro His Ser Ala Ser Pro Val Ser Pro Asp Gly Val Gln Ile Pro Leu
325 330 335
Lys Glu Tyr Gly Arg Ala Pro Val Pro Gly Pro Arg Arg Gly Lys Arg
340 345 350
Ile Ala Ser Lys Val Lys His Phe Ala Phe Asp Arg Lys Lys Arg His
355 360 365
Tyr Gly Leu Gly Val Val Gly Asn Trp Leu Asn Arg Ser Tyr Arg Arg
370 375 380
Ser Ile Ser Ser Thr Val Gln Arg Gln Leu Glu Ser Phe Asp Ser His
385 390 395 400
Arg Pro Tyr Phe Thr Tyr Trp Leu Thr Phe Val His Val Ile Ile Thr
405 410 415

Leu Leu Val Ile Cys Thr Tyr Gly Ile Ala Pro Val Gly Phe Ala Gln
420 425 430
His Val Thr Thr Gln Leu Val Leu Arg Asn Lys Gly Val Tyr Glu Ser
435 440 445
Val Lys Tyr Ile Gln Gln Glu Asn Phe Trp Val Gly Pro Ser Ser Ile
450 455 460
Asp Leu Ile His Leu Gly Ala Lys Phe Ser Pro Cys Ile Arg Lys Asp
465 470 475 480
Gly Gln Ile Glu Gln Leu Val Leu Arg Glu Arg Asp Leu Glu Arg Asp
485 490 495
Ser Gly Cys Cys Val Gln Asn Asp His Ser Gly Cys Ile Gln Thr Gln
500 505 510
Arg Lys Asp Cys Ser Glu Thr Leu Ala Thr Phe Val Lys Trp Gln Asp
515 520 525
Asp Thr Gly Pro Pro Met Asp Lys Ser Asp Leu Gly Gln Lys Arg Thr
530 535 540
Ser Gly Ala Val Cys His Gln Asp Pro Arg Thr Cys Glu Glu Pro Ala
545 550 555 560
Ser Ser Gly Ala His Ile Trp Pro Asp Asp Ile Thr Lys Trp Pro Ile
565 570 575
Cys Thr Glu Gln Ala Arg Ser Asn His Thr Gly Phe Leu His Met Asp
580 585 590
Cys Glu Ile Lys Gly Arg Pro Cys Cys Ile Gly Thr Lys Gly Ser Cys
595 600 605
Glu Ile Thr Thr Arg Glu Tyr Cys Glu Phe Met His Gly Tyr Phe His
610 615 620
Glu Glu Ala Thr Leu Cys Ser Gln Val His Cys Leu Asp Lys Val Cys
625 630 635 640
Gly Leu Leu Pro Phe Leu Asn Pro Glu Val Pro Asp Gln Phe Tyr Arg
645 650 655
Leu Trp Leu Ser Leu Phe Leu His Ala Gly Val Val His Cys Leu Val
660 665 670
Ser Val Val Phe Gln Met Thr Ile Leu Arg Asp Leu Glu Lys Leu Ala
675 680 685
Gly Trp His Arg Ile Ala Ile Ile Phe Ile Leu Ser Gly Ile Thr Gly
690 695 700
Asn Leu Ala Ser Ala Ile Phe Leu Pro Tyr Arg Ala Glu Val Gly Pro
705 710 715 720
Ala Gly Ser Gln Phe Gly Leu Leu Ala Cys Leu Phe Val Glu Leu Phe

725 730 735
Gln Ser Trp Pro Leu Leu Glu Arg Pro Trp Lys Ala Phe Leu Asn Leu
740 745 750
Ser Ala Ile Val Leu Phe Leu Phe Ile Cys Gly Leu Leu Pro Trp Ile
755 760 765
Asp Asn Ile Ala His Ile Phe Gly Phe Leu Ser Gly Leu Leu Leu Ala
770 775 780
Phe Ala Phe Leu Pro Tyr Ile Thr Phe Gly Thr Ser Asp Lys Tyr Arg
785 790 795 800
Lys Arg Ala Leu Ile Leu Val Ser Leu Leu Ala Phe Ala Gly Leu Phe
805 810 815
Ala Ala Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ile Tyr Pro Ile Asn Trp Pro Trp
820 825 830
Ile Glu His Leu Thr Cys Phe Pro Phe Thr Ser Arg Phe Cys Glu Lys
835 840 845
Tyr Glu Leu Asp Gln Val Leu His Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp
850 855 860
Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
865 870 875

<210> 199
<211> 849
<212> PRT
<213> Mus musculus Mus musculus iRhom2, full length, wild type, FLAG-Tag
<400> 199
Met Ala Ser Ala Asp Lys Asn Gly Ser Asn Leu Pro Ser Val Ser Gly
1 5 10 15
Ser Arg Leu Gln Ser Arg Lys Pro Pro Asn Leu Ser Ile Thr Ile Pro
20 25 30
Pro Pro Glu Ser Gln Ala Pro Gly Glu Gln Asp Ser Met Leu Pro Glu
35 40 45
Arg Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Leu Lys Ser Val Ser Leu Gln Glu Pro
50 55 60
Arg Gly Arg Trp Gln Glu Gly Ala Glu Lys Arg Pro Gly Phe Arg Arg
65 70 75 80
Gln Ala Ser Leu Ser Gln Ser Ile Arg Lys Ser Thr Ala Gln Trp Phe
85 90 95
Gly Val Ser Gly Asp Trp Glu Gly Lys Arg Gln Asn Trp His Arg Arg
100 105 110
Ser Leu His His Cys Ser Val His Tyr Gly Arg Leu Lys Ala Ser Cys

115 120 125

Gln Arg Glu Leu Glu Leu Pro Ser Gln Glu Val Pro Ser Phe Gln Gly
130 135 140

Thr Glu Ser Pro Lys Pro Cys Lys Met Pro Lys Ile Val Asp Pro Leu
145 150 155 160

Ala Arg Gly Arg Ala Phe Arg His Pro Asp Glu Val Asp Arg Pro His
165 170 175

Ala Ala His Pro Pro Leu Thr Pro Gly Val Leu Ser Leu Thr Ser Phe
180 185 190

Thr Ser Val Arg Ser Gly Tyr Ser His Leu Pro Arg Arg Lys Arg Ile
195 200 205

Ser Val Ala His Met Ser Phe Gln Ala Ala Ala Ala Leu Leu Lys Gly
210 215 220

Arg Ser Val Leu Asp Ala Thr Gly Gln Arg Cys Arg His Val Lys Arg
225 230 235 240

Ser Phe Ala Tyr Pro Ser Phe Leu Glu Glu Asp Ala Val Asp Gly Ala
245 250 255

Asp Thr Phe Asp Ser Ser Phe Phe Ser Lys Glu Glu Met Ser Ser Met
260 265 270

Pro Asp Asp Val Phe Glu Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ser Tyr Phe Arg
275 280 285

Gly Val Pro His Ser Ala Ser Pro Val Ser Pro Asp Gly Val His Ile
290 295 300

Pro Leu Lys Glu Tyr Ser Gly Gly Arg Ala Leu Gly Pro Gly Thr Gln
305 310 315 320

Arg Gly Lys Arg Ile Ala Ser Lys Val Lys His Phe Ala Phe Asp Arg
325 330 335

Lys Lys Arg His Tyr Gly Leu Gly Val Val Gly Asn Trp Leu Asn Arg
340 345 350

Ser Tyr Arg Arg Ser Ile Ser Ser Thr Val Gln Arg Gln Leu Glu Ser
355 360 365

Phe Asp Ser His Arg Pro Tyr Phe Thr Tyr Trp Leu Thr Phe Val His
370 375 380

Ile Ile Ile Thr Leu Leu Val Ile Cys Thr Tyr Gly Ile Ala Pro Val
385 390 395 400

Gly Phe Ala Gln His Val Thr Thr Gln Leu Val Leu Lys Asn Arg Gly
405 410 415

Val Tyr Glu Ser Val Lys Tyr Ile Gln Gln Glu Asn Phe Trp Ile Gly
420 425 430

Pro Ser Ser Ile Asp Leu Ile His Leu Gly Ala Lys Phe Ser Pro Cys
435 440 445
Ile Arg Lys Asp Gln Gln Ile Glu Gln Leu Val Arg Arg Glu Arg Asp
450 455 460
Ile Glu Arg Thr Ser Gly Cys Cys Val Gln Asn Asp Arg Ser Gly Cys
465 470 475 480
Ile Gln Thr Leu Lys Lys Asp Cys Ser Glu Thr Leu Ala Thr Phe Val
485 490 495
Lys Trp Gln Asn Asp Thr Gly Pro Ser Asp Lys Ser Asp Leu Ser Gln
500 505 510
Lys Gln Pro Ser Ala Val Val Cys His Gln Asp Pro Arg Thr Cys Glu
515 520 525
Glu Pro Ala Ser Ser Gly Ala His Ile Trp Pro Asp Asp Ile Thr Lys
530 535 540
Trp Pro Ile Cys Thr Glu Gln Ala Gln Ser Asn His Thr Gly Leu Leu
545 550 555 560
His Ile Asp Cys Lys Ile Lys Gly Arg Pro Cys Cys Ile Gly Thr Lys
565 570 575
Gly Ser Cys Glu Ile Thr Thr Arg Glu Tyr Cys Glu Phe Met His Gly
580 585 590
Tyr Phe His Glu Asp Ala Thr Leu Cys Ser Gln Val His Cys Leu Asp
595 600 605
Lys Val Cys Gly Leu Leu Pro Phe Leu Asn Pro Glu Val Pro Asp Gln
610 615 620
Phe Tyr Arg Ile Trp Leu Ser Leu Phe Leu His Ala Gly Ile Val His
625 630 635 640
Cys Leu Val Ser Val Val Phe Gln Met Thr Ile Leu Arg Asp Leu Glu
645 650 655
Lys Leu Ala Gly Trp His Arg Ile Ser Ile Ile Phe Ile Leu Ser Gly
660 665 670
Ile Thr Gly Asn Leu Ala Ser Ala Ile Phe Leu Pro Tyr Arg Ala Glu
675 680 685
Val Gly Pro Ala Gly Ser Gln Phe Gly Leu Leu Ala Cys Leu Phe Val
690 695 700
Glu Leu Phe Gln Ser Trp Gln Leu Leu Glu Arg Pro Trp Lys Ala Phe
705 710 715 720
Phe Asn Leu Ser Ala Ile Val Leu Phe Leu Phe Ile Cys Gly Leu Leu
725 730 735
Pro Trp Ile Asp Asn Ile Ala His Ile Phe Gly Phe Leu Ser Gly Met

740 745 750

Leu Leu Ala Phe Ala Phe Leu Pro Tyr Ile Thr Phe Gly Thr Ser Asp

755 760 765

Lys Tyr Arg Lys Arg Ala Leu Ile Leu Val Ser Leu Leu Val Phe Ala

770 775 780

Gly Leu Phe Ala Ser Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ile Tyr Pro Ile Asn

785 790 795 800

Trp Pro Trp Ile Glu Tyr Leu Thr Cys Phe Pro Phe Thr Ser Arg Phe

805 810 815

Cys Glu Lys Tyr Glu Leu Asp Gln Val Leu His Asp Tyr Lys Asp His

820 825 830

Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp

835 840 845

Lys

| 蛋白质 | 参考序列 | 构建体名称 | 构建体描述 | 构建体氨基酸（与参考序列相比） | 构建体长度 | SEQ ID NO |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 人 iRhom2 | NP_078875.4 [856 AA] | hi2-FL-WT | human iRhom2, 全长, 野生型 | 1-856 | 856 AA | 181 |
| | | hi2-FL-I186T | human iRhom2, 全长, I186T | 1-856 | 856 AA | 184 |
| | | hi2-Δ1-242 | human iRhom2, 前242AA缺失 | 243-856 | 614 AA | 185 |
| 小鼠 iRhom2 | NP_766160.2 [827 AA] | mi2-FL-WT | mouse iRhom2, 全长, 野生型 | 1-827 | 827 AA | 183 |
| | | mi2-FL-I156T | mouse iRhom2, 全长, I15T | 1-827 | 827 AA | 186 |
| | | mi2-Δ1-212 | mouse iRhom2, 前212AA缺失 | 213-827 | 615 AA | 187 |
| | | mi2-Δ1-268 | mouse iRhom2, 前268AA缺失 | 269-827 | 559 AA | 188 |

图1

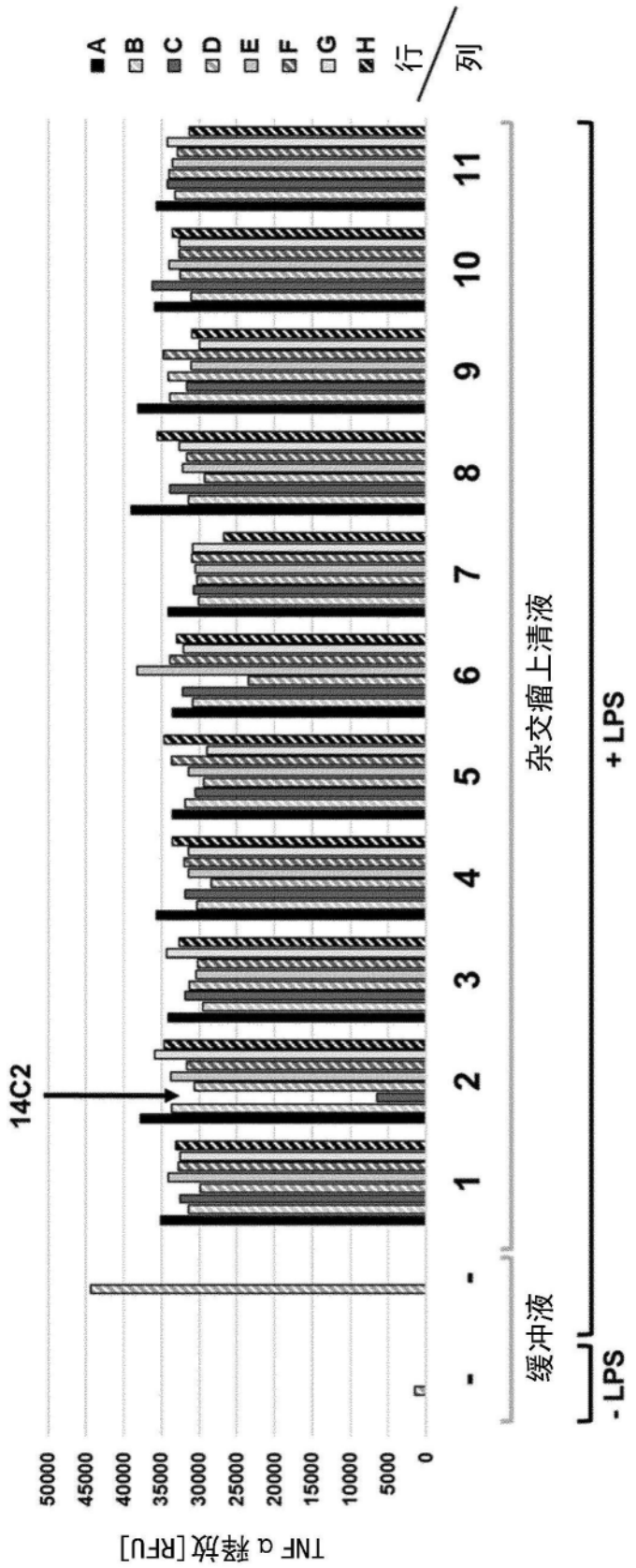

TNF α 释放[RFU]
50000
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
14C2
A
B
C
D
E
F
G
H
行
列
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
- -
缓冲液
杂交瘤上清液
- LPS
+ LPS

图2

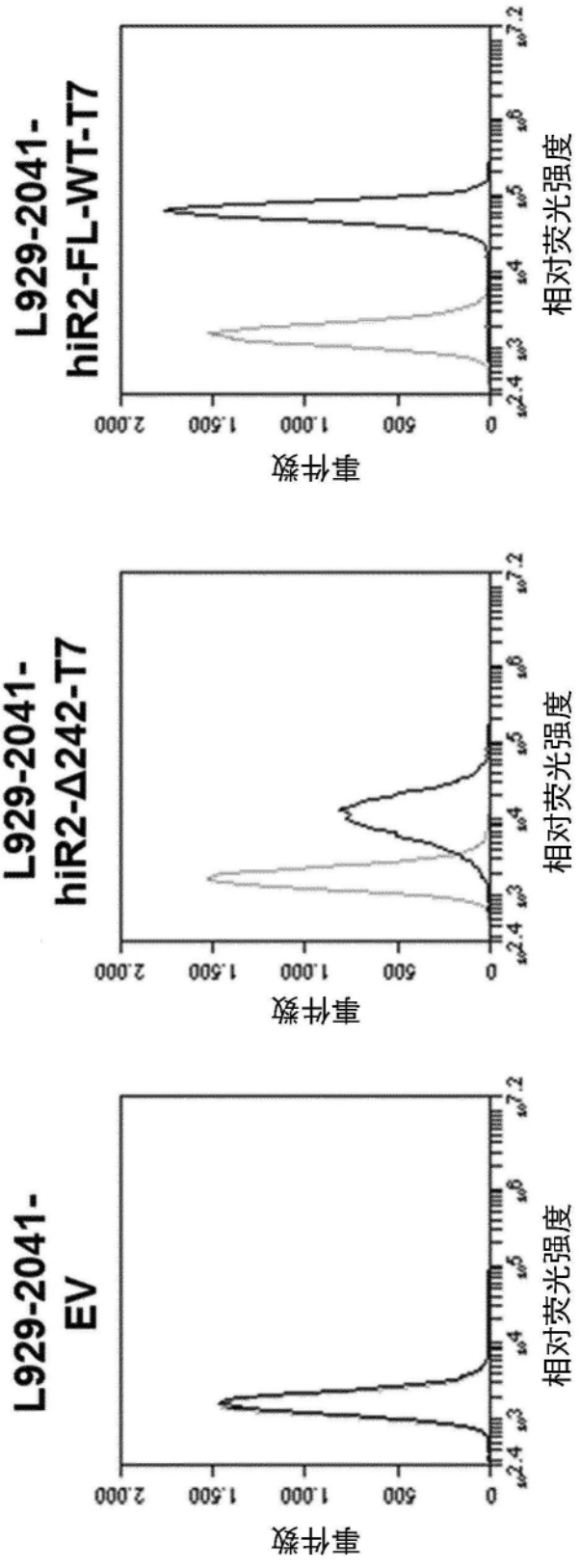

L929-2041-
EV
事件数
相对荧光强度
L929-2041-
hiR2-Δ242-T7
事件数
相对荧光强度
L929-2041-
hiR2-FL-WT-T7
事件数
相对荧光强度

图3

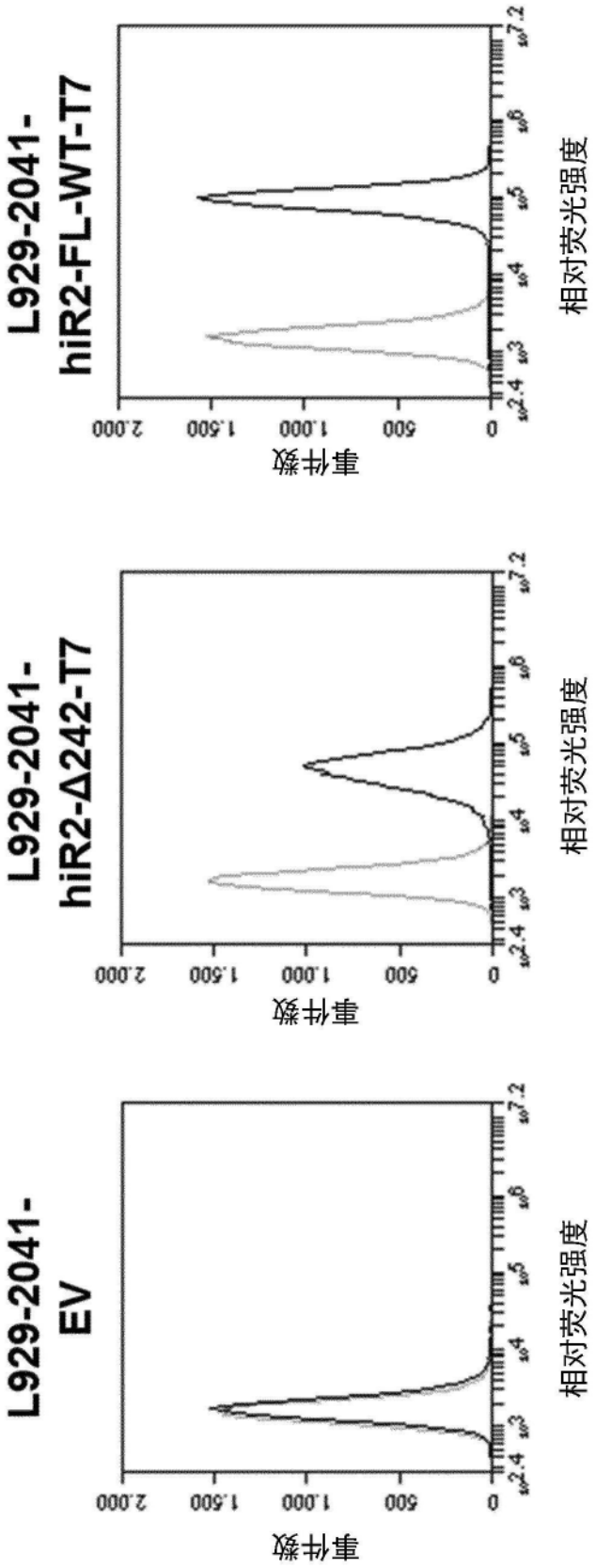

L929-2041-
hiR2-FL-WT-T7
事件数
相对荧光强度
L929-2041-
hiR2-Δ242-T7
事件数
相对荧光强度
L929-2041-
EV
事件数
相对荧光强度

图4

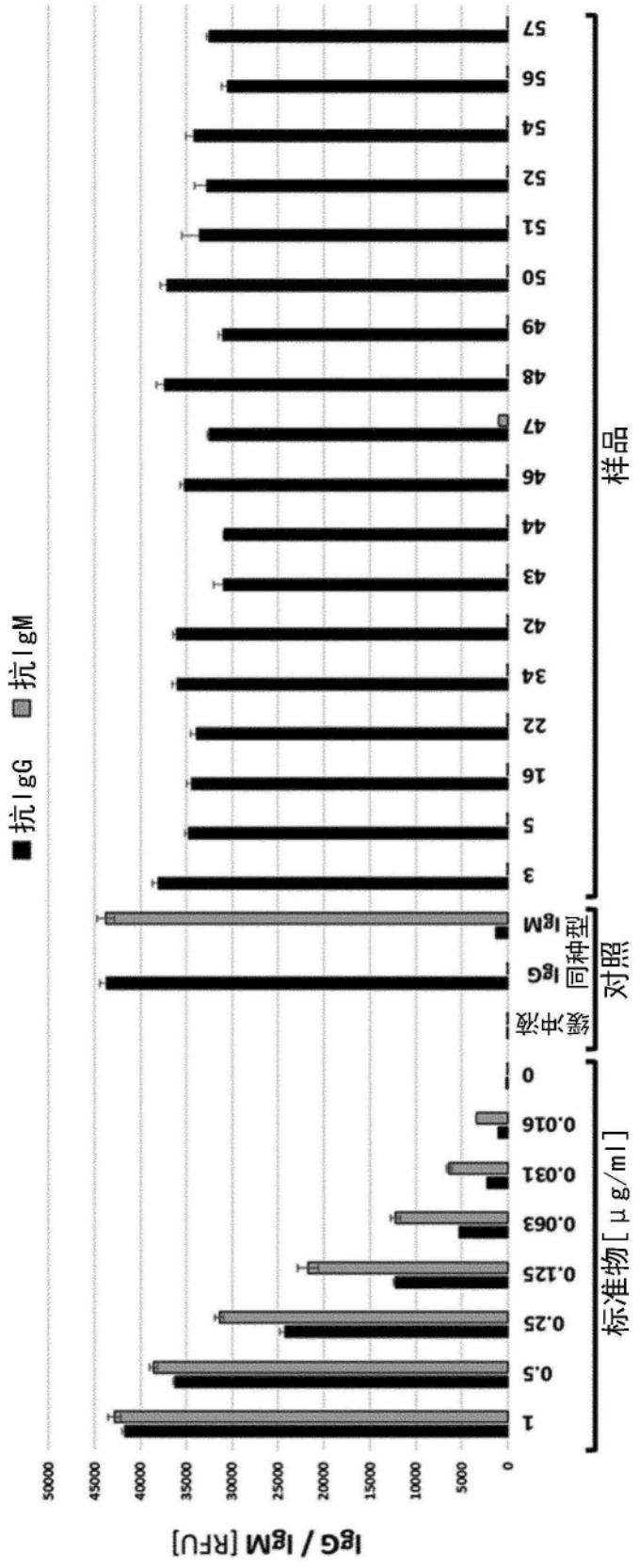

IgG / IgM [RFU]
50000
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
抗IgG
抗IgM
标准物[μg/ml]
1
0.5
0.25
0.125
0.063
0.031
0.016
0
缓冲液
对照
同种型
IgG
IgM
样品
3
5
16
22
34
42
43
44
46
47
48
49
50
51
52
54
56
57

图5

| 克隆 # | Kd [nM] |
|---|---|
| 3 | 2.97 |
| 5 | 3.35 |
| 16 | 0.34 |
| 22 | 2.04 |
| 34 | 1.94 |
| 42 | 1.90 |
| 43 | 4.55 |
| 44 | 0.44 |
| 48 | 1.73 |
| 50 | 1.43 |

图6

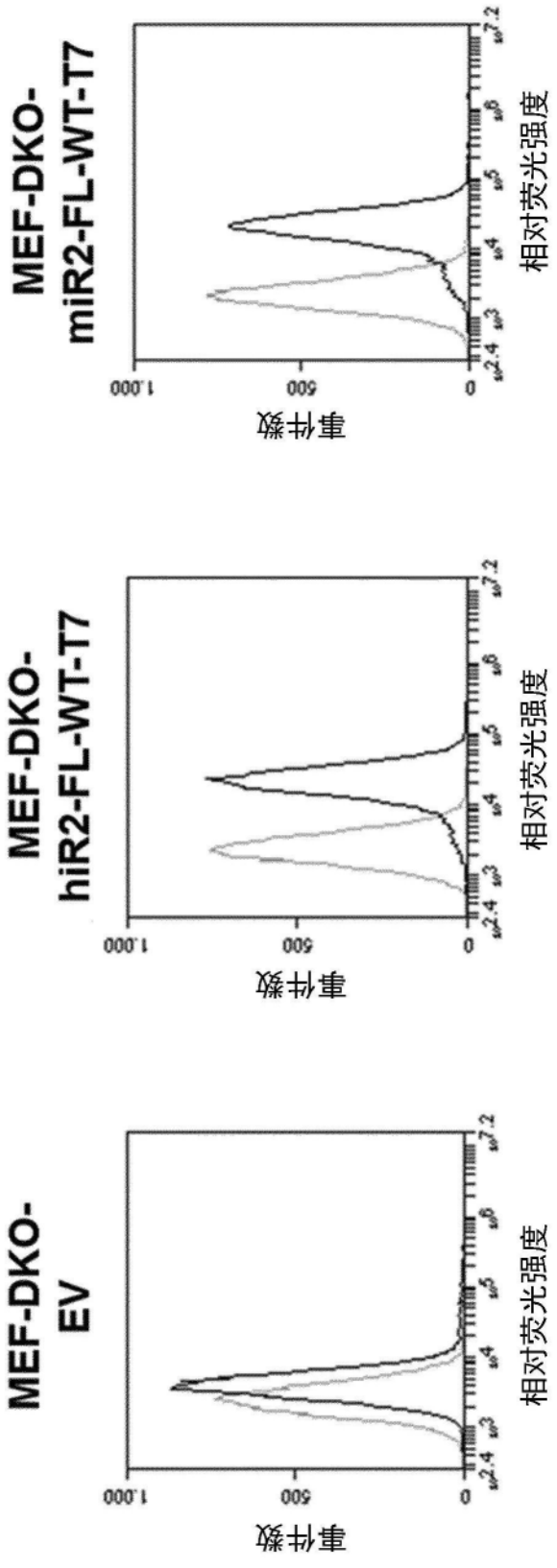

MEF-DKO-
miR2-FL-WT-T7
事件数
相对荧光强度
MEF-DKO-
hiR2-FL-WT-T7
事件数
相对荧光强度
MEF-DKO-
EV
事件数
相对荧光强度

图7a

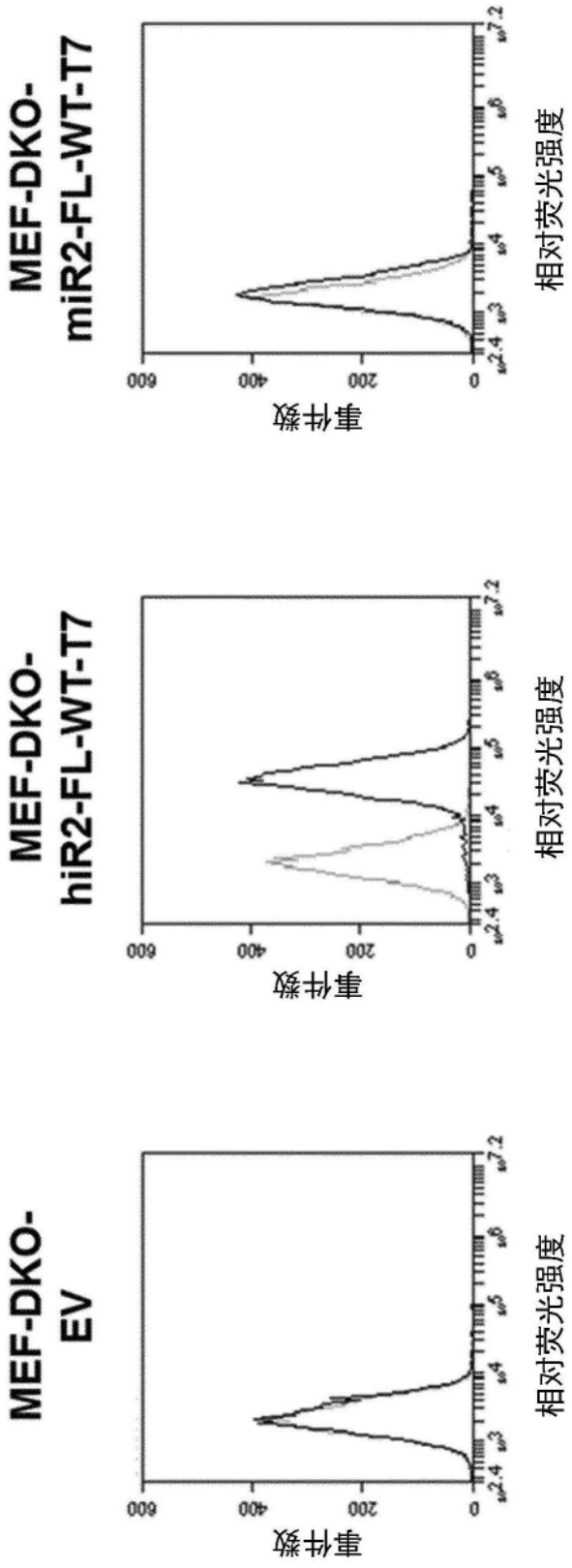

MEF-DKO-
miR2-FL-WT-T7
事件数
相对荧光强度
MEF-DKO-
hiR2-FL-WT-T7
事件数
相对荧光强度
MEF-DKO-
EV
事件数
相对荧光强度

图7b

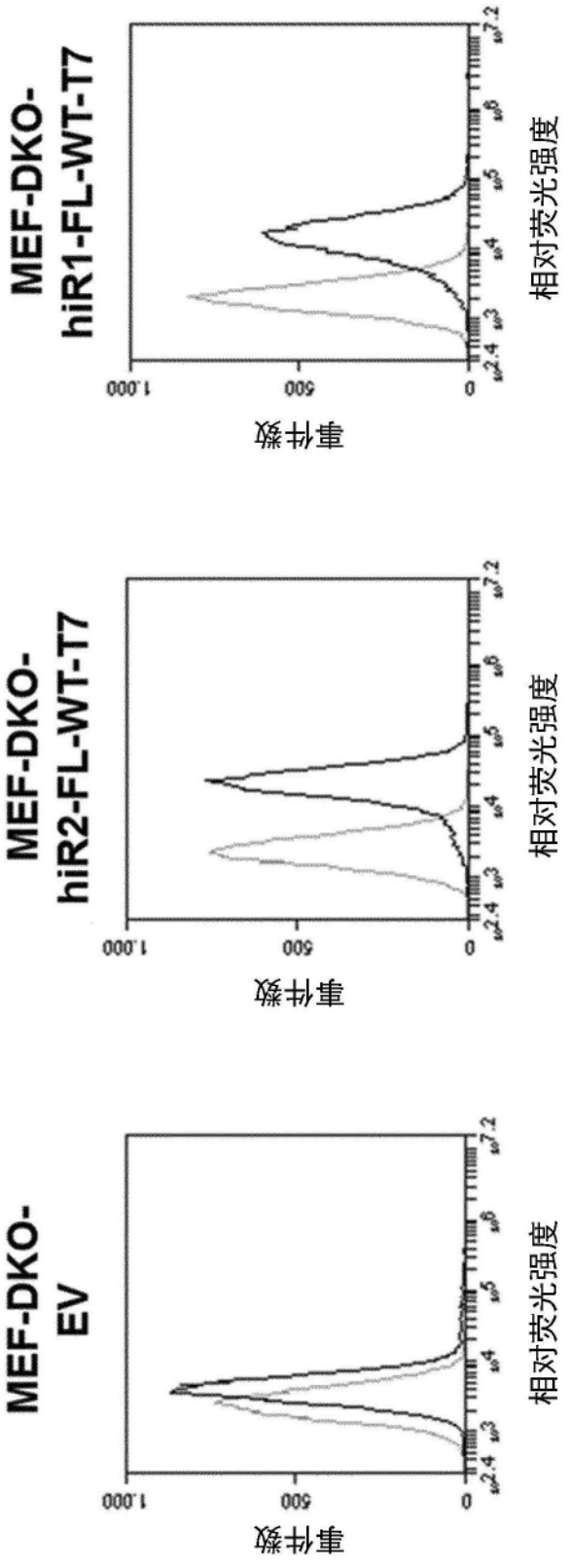

MEF-DKO-
hiR1-FL-WT-T7
事件数
相对荧光强度
MEF-DKO-
hiR2-FL-WT-T7
事件数
相对荧光强度
MEF-DKO-
EV
事件数
相对荧光强度

图8a

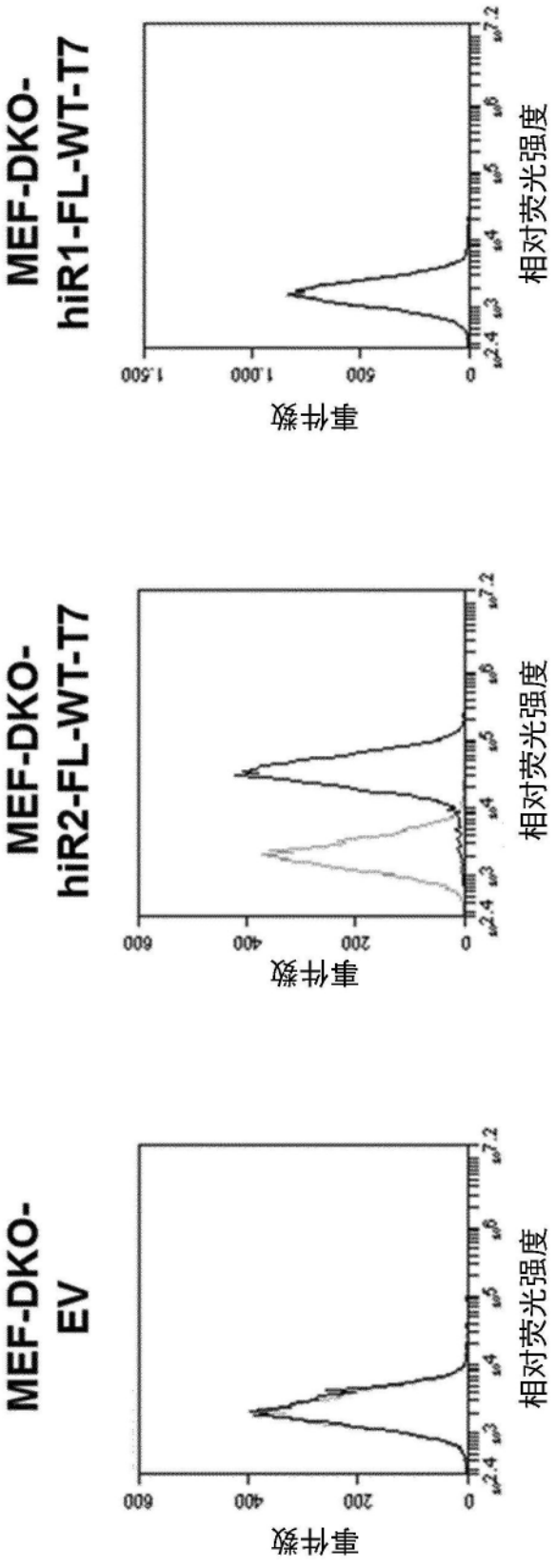

MEF-DKO-
hiR1-FL-WT-T7
事件数
相对荧光强度
MEF-DKO-
hiR2-FL-WT-T7
事件数
相对荧光强度
MEF-DKO-
EV
事件数
相对荧光强度

图8b

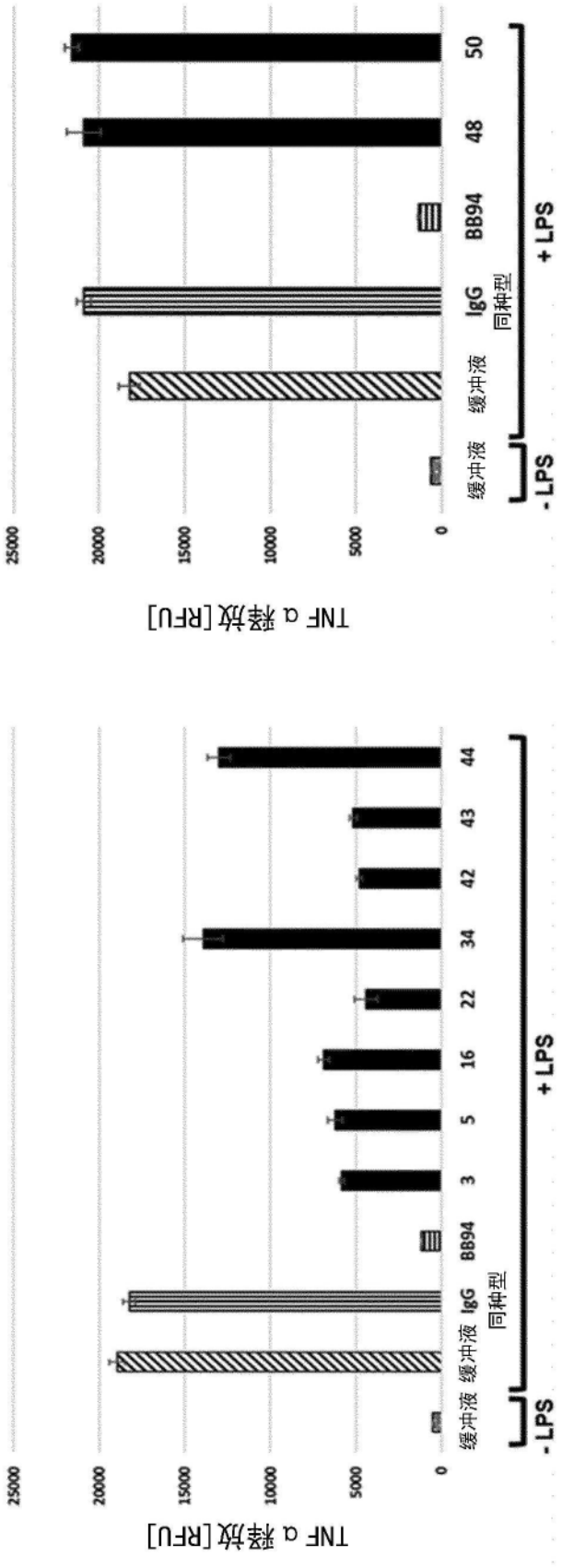

TNF α 释放[RFU]
25000
20000
15000
10000
5000
0
缓冲液
缓冲液
IgG
BB94
48
50
同种型
- LPS
+ LPS
TNF α 释放[RFU]
25000
20000
15000
10000
5000
0
缓冲液
缓冲液
IgG
BB94
3
5
16
22
34
42
43
44
同种型
- LPS
+ LPS

图9a

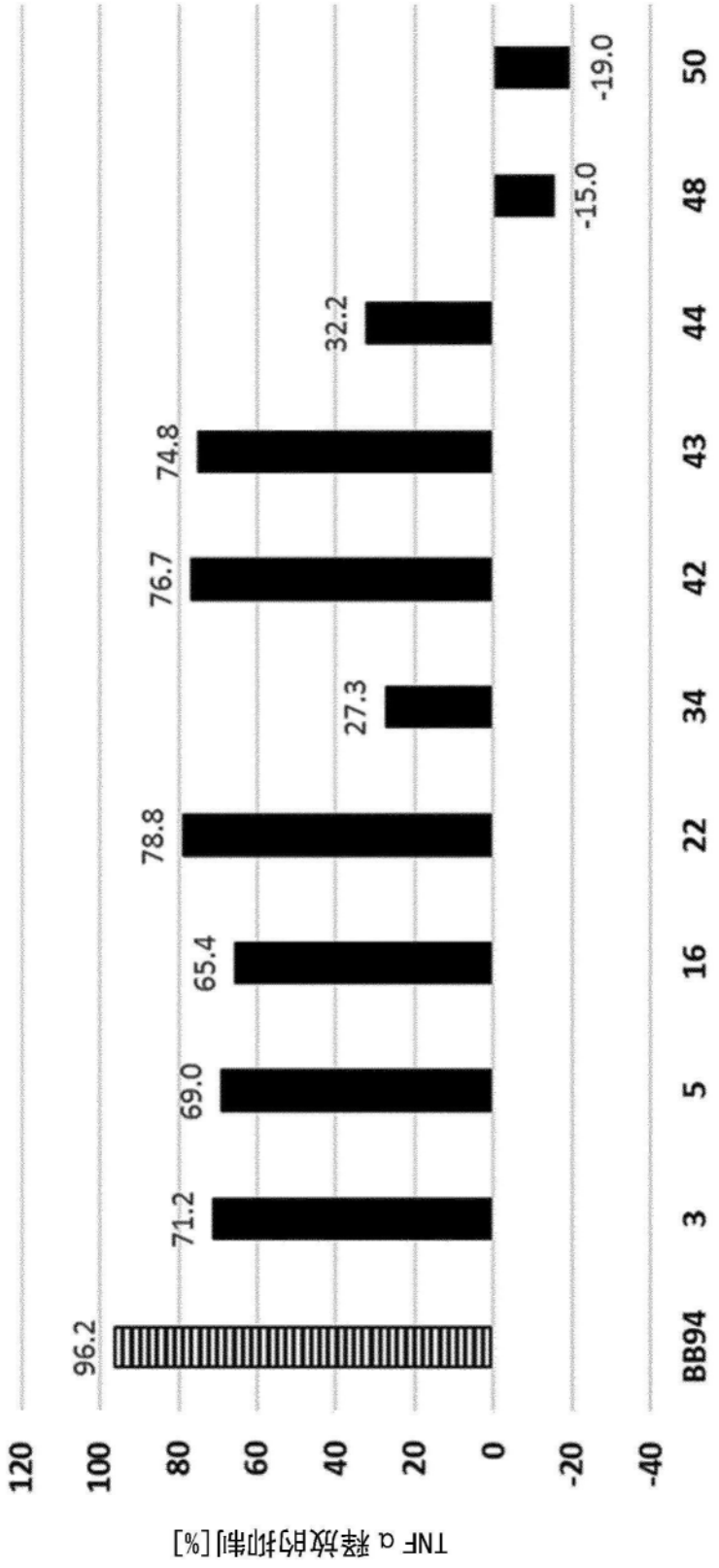

TNF α 释放的抑制[%]
120
100
80
60
40
20
0
-20
-40
BB94
3
5
16
22
34
42
43
44
48
50
96.2
71.2
69.0
65.4
78.8
27.3
76.7
74.8
32.2
-15.0
-19.0

图9b

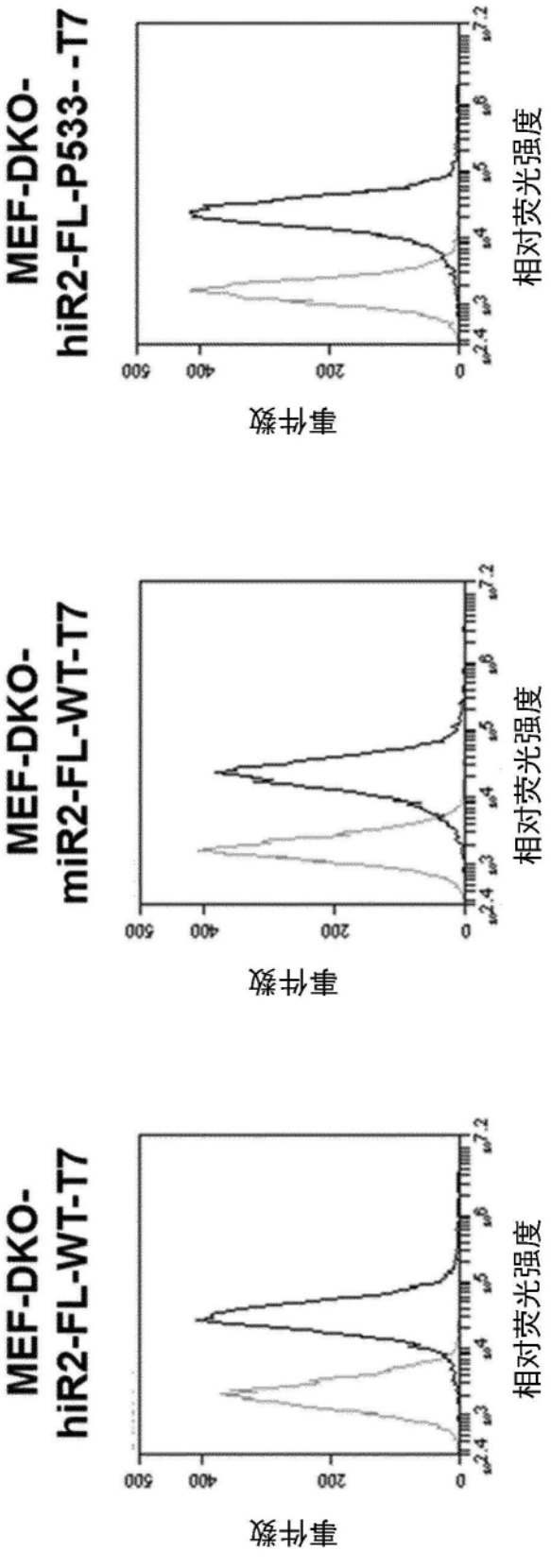

MEF-DKO-
hiR2-FL-P533- -T7
事件数
相对荧光强度
MEF-DKO-
miR2-FL-WT-T7
事件数
相对荧光强度
MEF-DKO-
hiR2-FL-WT-T7
事件数
相对荧光强度

图10a

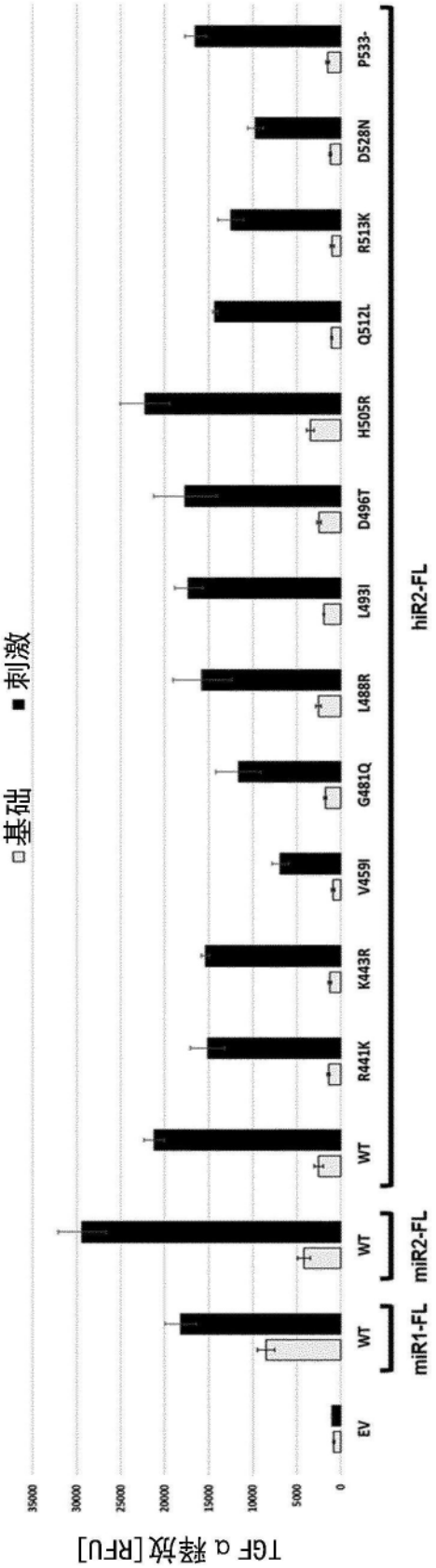

TGF α 释放[RFU]
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
□基础 ■刺激
EV
WT
WT
miR1-FL
miR2-FL
WT
R441K
K443R
V459I
G481Q
L488R
L493I
D496T
H505R
Q512L
R513K
D528N
P533-
hiR2-FL

图10b

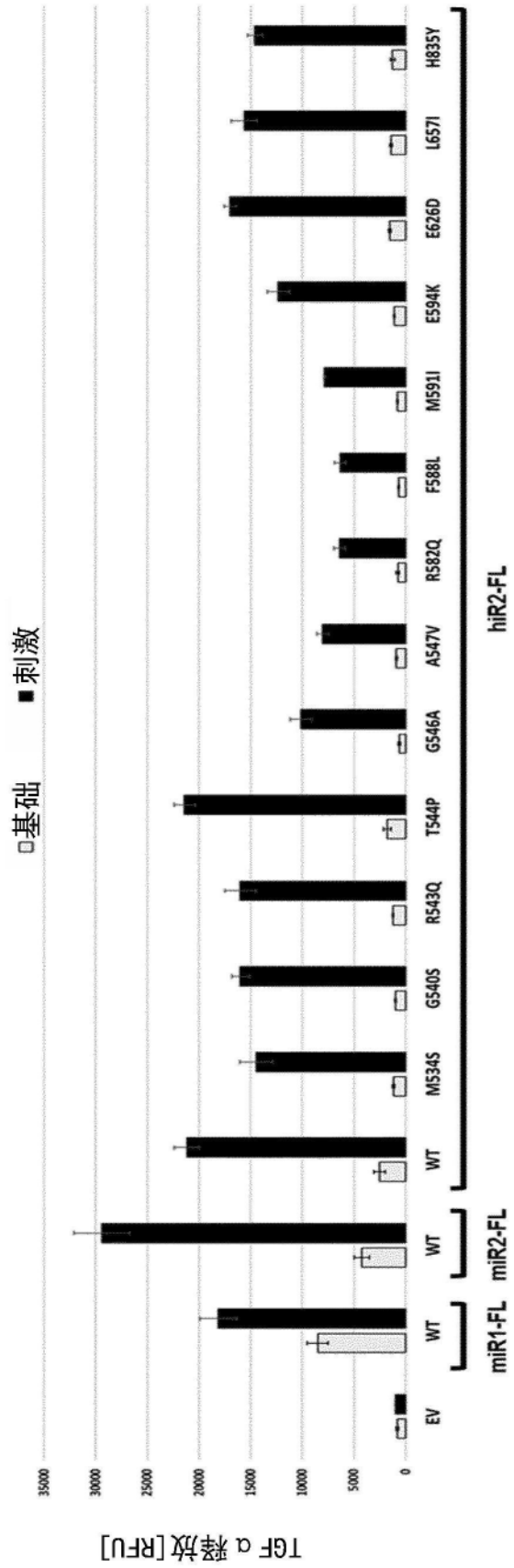

□基础 ■刺激
TGF α 释放[RFU]
0
5000
10000
15000
20000
25000
30000
35000
EV
WT
miR1-FL
WT
WT
miR2-FL
M534S
G540S
R543Q
T544P
G546A
A547V
R582Q
F588L
M591I
E594K
E626D
L657I
H835Y
hiR2-FL

图10b续

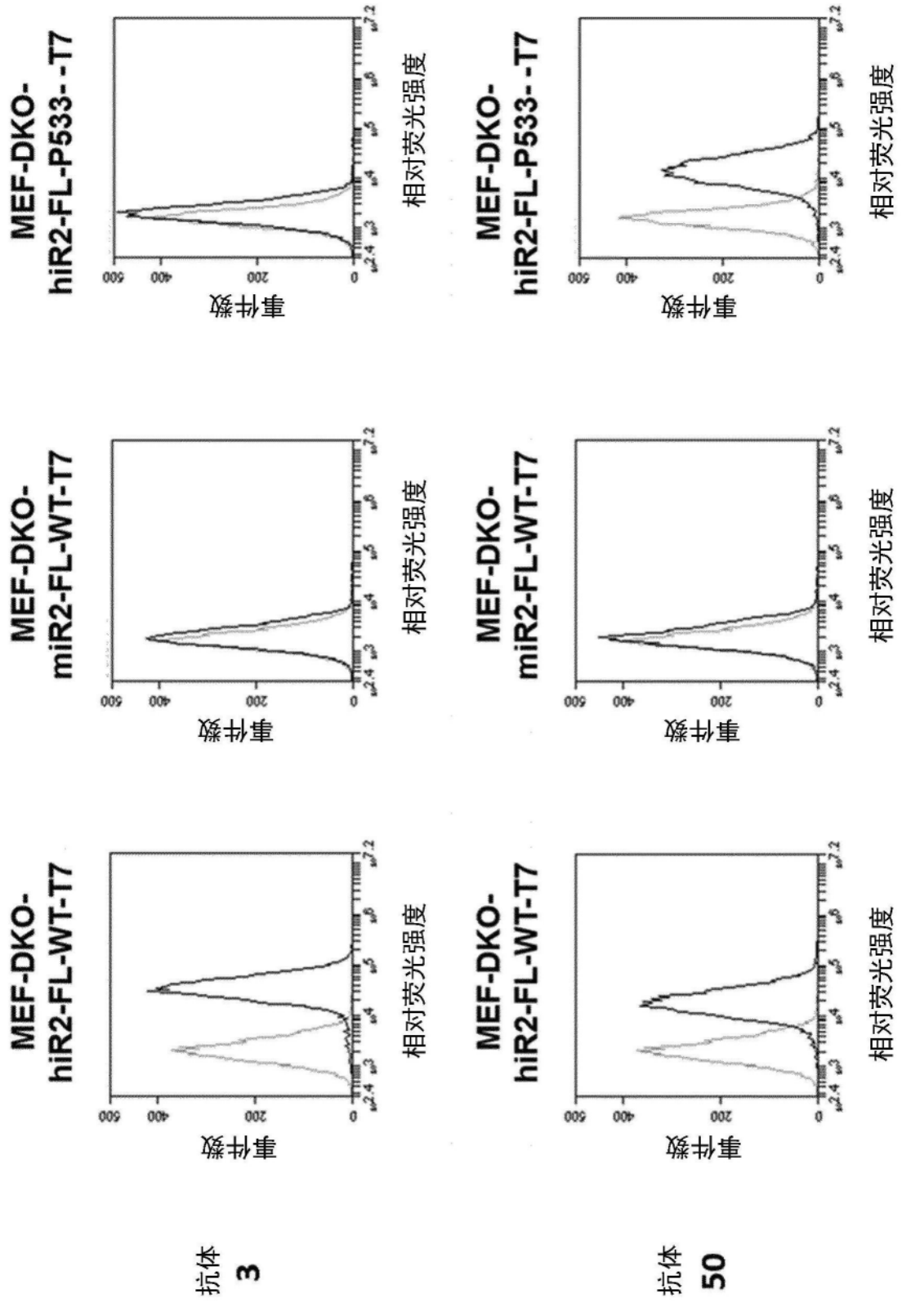

抗体
3
抗体
50
MEF-DKO-
hiR2-FL-WT-T7
MEF-DKO-
miR2-FL-WT-T7
MEF-DKO-
hiR2-FL-P533- -T7
事件数
相对荧光强度

图11a

| 1 =>相对于野生型的30%结合损失 | 具有根据小鼠iRhom2的缺失/取代的人iRhom2 | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 => 相对于野生型的60%结合损失 | 具有抑制活性的抗体克隆 | | | | | | | | | 不具有抑制活性的抗体克隆 | | |
| 3 => 相对于野生型的95%结合损失 | #3 | #5 | #16 | #22 | #34 | #42 | #43 | #44 | #48 | #50 | | |
| 人iR2野生型 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| R441K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| K443R | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| V459I | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| G481Q | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| L488R | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| L493I | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| D496T | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| H505R | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 | 3 | | |
| Q512L | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| R513K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| D528N | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| P533- | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | - | - | | |
| M534S | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| G540S | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| R543Q | 2 | 3 | - | 2 | 3 | 3 | 3 | 2 | - | 1 | | |
| T544P | 2 | 2 | - | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | | |
| G546A | 1 | 3 | - | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | - | 1 | | |
| A547V | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| R582Q | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| F588L | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| M591I | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| E594K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| E626D | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| L657I | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| H835Y | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| 小鼠iR1野生型 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | | |
| 小鼠iR2野生型 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | | |
| 人iR1野生型 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | | |

图11b

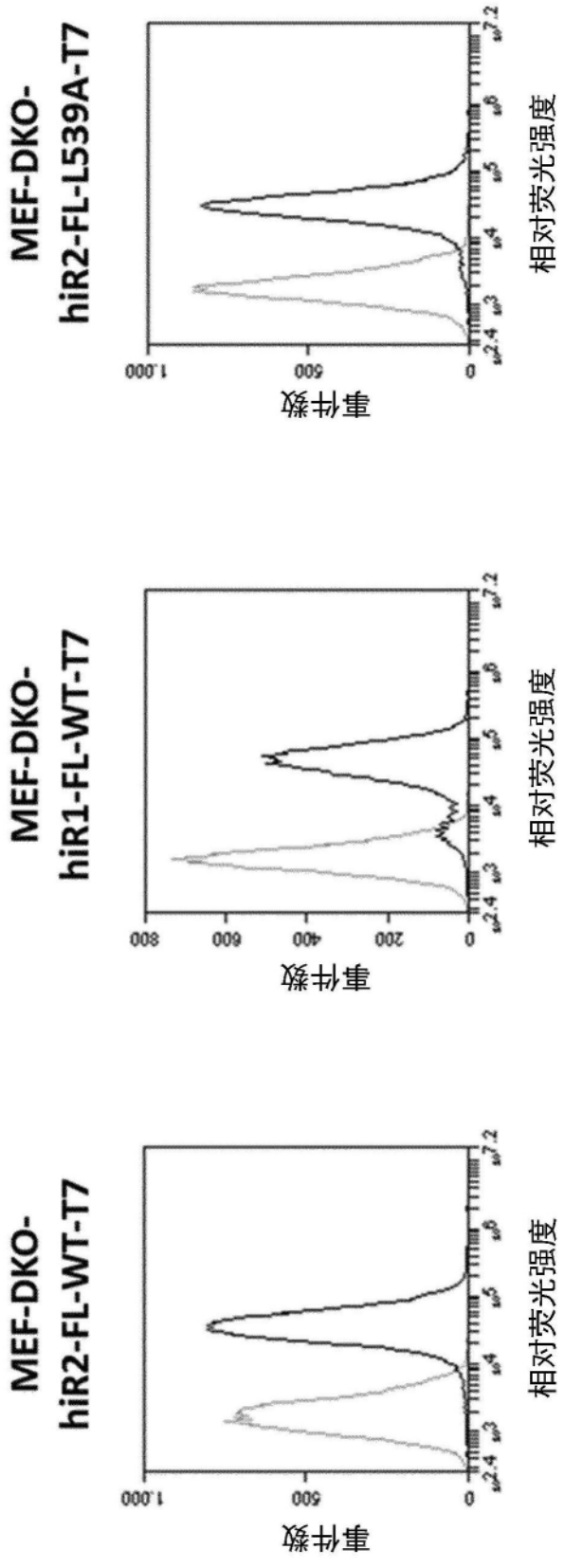

MEF-DKO-
hiR2-FL-L539A-T7
事件数
相对荧光强度
MEF-DKO-
hiR1-FL-WT-T7
事件数
相对荧光强度
MEF-DKO-
hiR2-FL-WT-T7
事件数
相对荧光强度

图12a

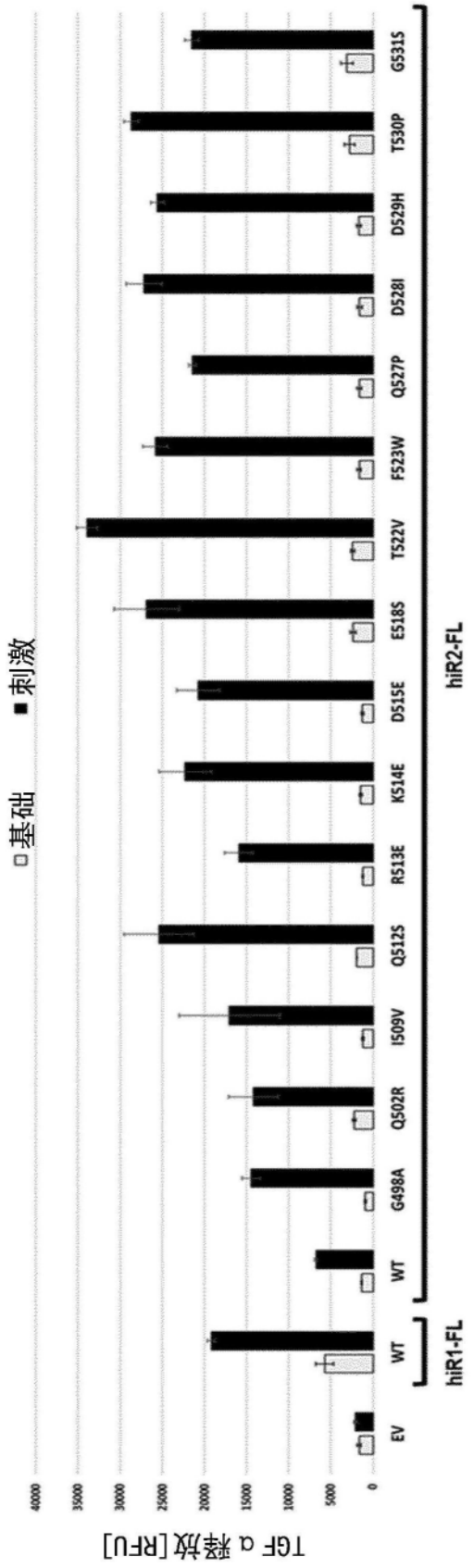

TGF α 释放[RFU]
0
5000
10000
15000
20000
25000
30000
35000
40000
□基础 ■刺激
EV
WT
G498A
Q502R
I509V
Q512S
R513E
K514E
D515E
E518S
T522V
F523W
Q527P
D528I
D529H
T530P
G531S
hiR1-FL
hiR2-FL

图12b

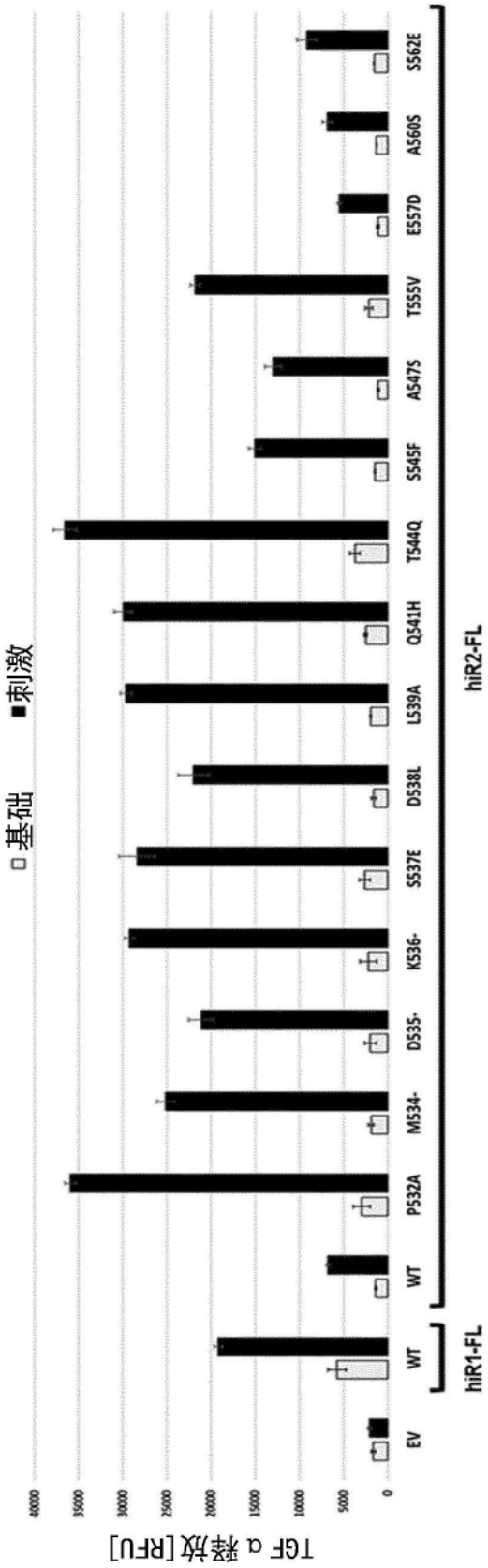

TGF α 释放[RFU]
0
5000
10000
15000
20000
25000
30000
35000
40000
□基础 ■刺激
EV
WT
WT
P532A
M534-
D535-
K536-
S537E
D538L
L539A
Q541H
T544Q
S545F
A547S
T555V
E557D
A560S
S562E
hiR1-FL
hiR2-FL

图12b续

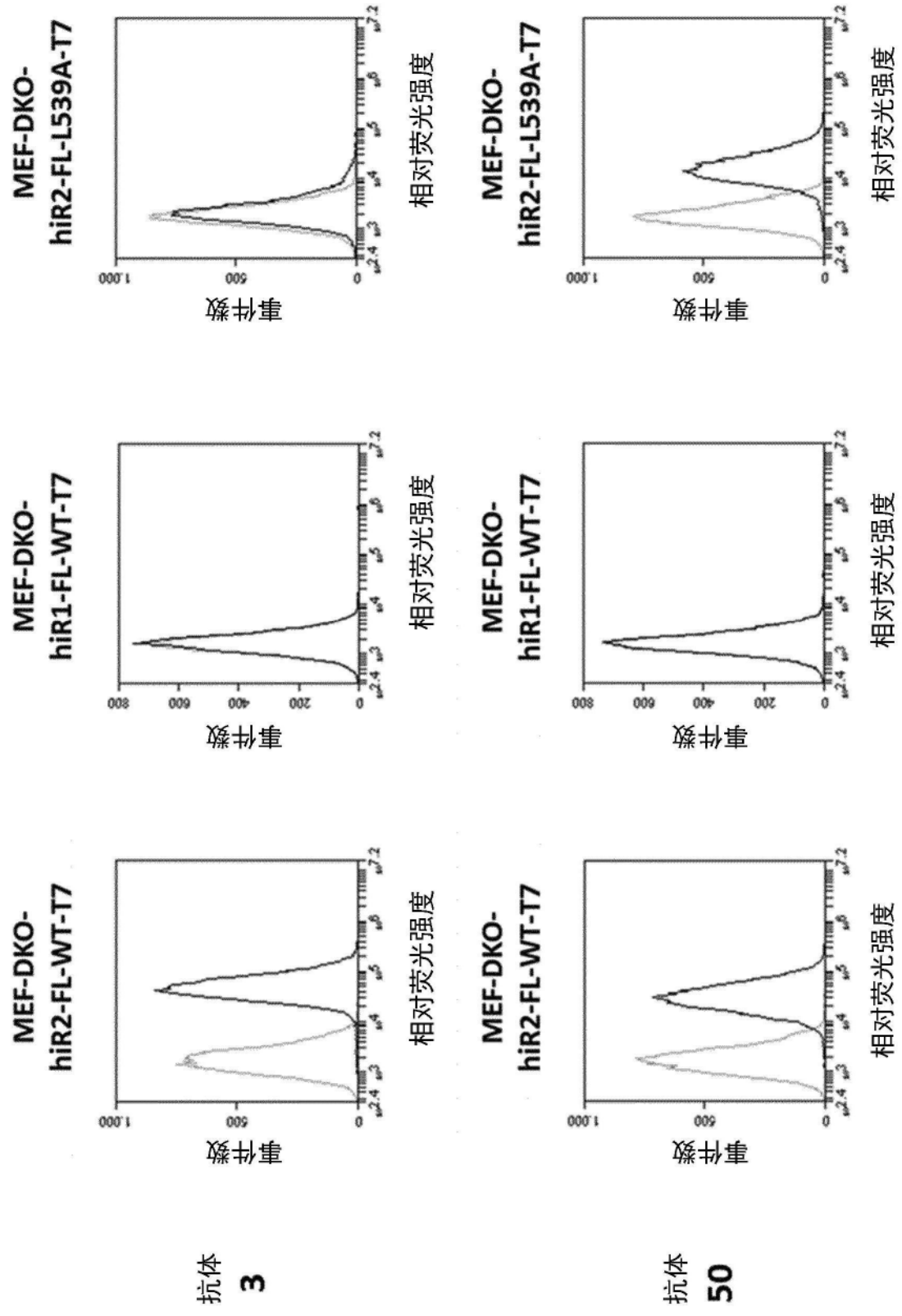

抗体
3
抗体
50
MEF-DKO-
hiR2-FL-WT-T7
MEF-DKO-
hiR1-FL-WT-T7
MEF-DKO-
hiR2-FL-L539A-T7
事件数
相对荧光强度

图13a

| 1 =>相对于野生型的30%结合损失 | 具有根据人iRhom1的缺失/取代的人iRhom2 | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 => 相对于野生型的60%结合损失 | 具有抑制活性的抗体克隆 | | | | | | | | | | 不具有抑制活性的抗体克隆 | |
| 3 => 相对于野生型的95%结合损失 | #3 | #5 | #16 | #22 | #34 | #42 | #43 | #44 | #48 | #50 | | |
| 人iR2野生型 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| G498A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| Q502R | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| I509V | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| Q512S | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| R513E | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| K514E | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| D515E | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | | |
| E518S | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| T522V | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 1 | | |
| F523W | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 1 | | |
| Q527P | 1 | 2 | - | - | - | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | | |
| D528I | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 1 | | |
| D529H | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| T530P | - | - | - | - | - | 1 | - | - | 1 | 1 | | |
| G531S | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 1 | | |
| P532A | - | 2 | - | 1 | - | 2 | 2 | 2 | - | - | | |
| M534- | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | - | - | | |
| D535- | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | - | - | | |
| K536- | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | - | - | | |
| S537E | - | 3 | - | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | - | - | | |
| D538L | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | | |
| L539A | 3 | 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 1 | - | | |
| Q541H | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| T544Q | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| S545F | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | | |
| A547S | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| T555V | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| E557D | 2 | 2 | - | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| A560S | - | - | - | - | - | 1 | - | - | 1 | 1 | | |
| S562E | 1 | 2 | - | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | | |
| 人iR1野生型 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | | |

图13b

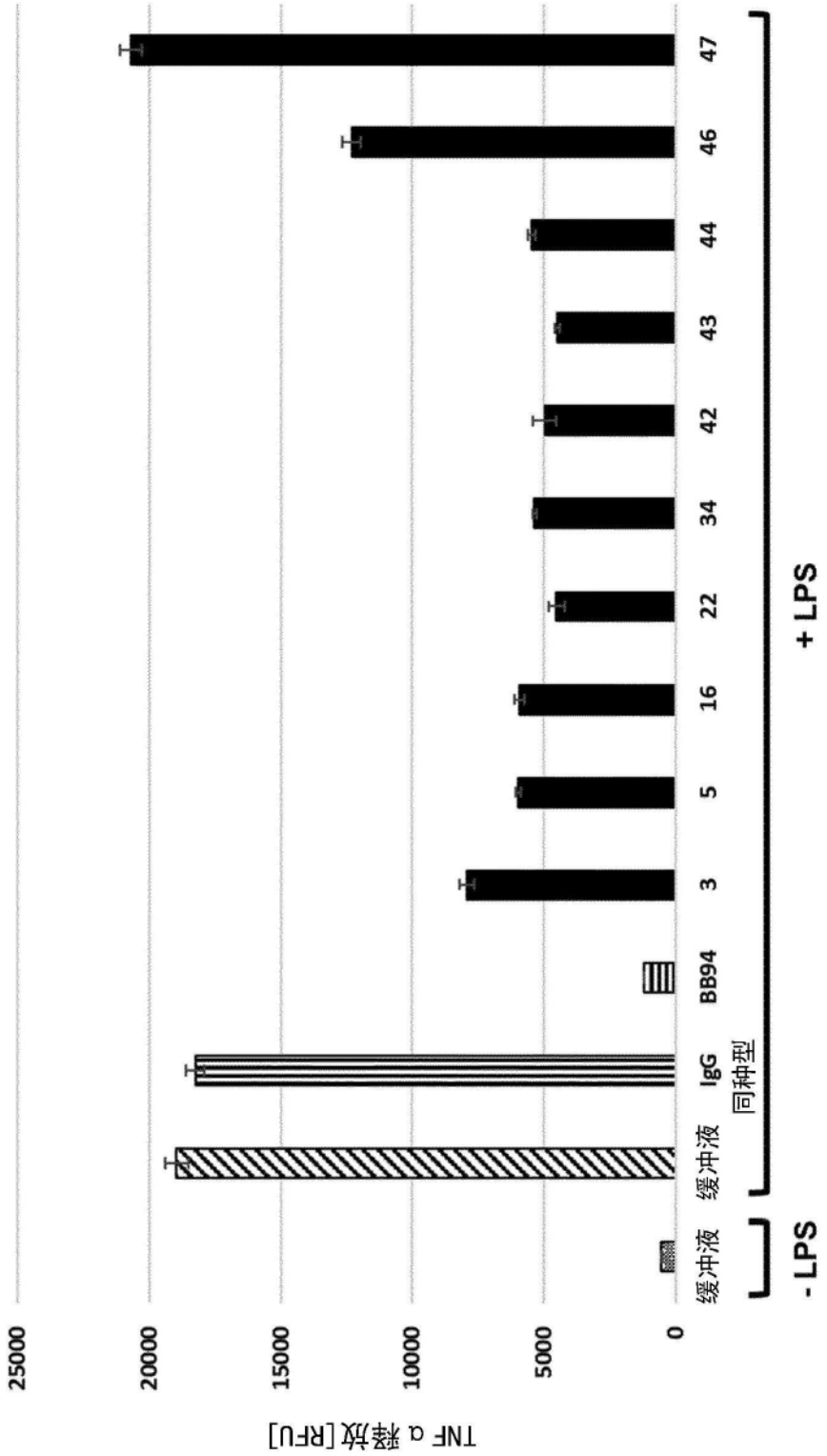

TNF α 释放 [RFU]
25000
20000
15000
10000
5000
0
缓冲液
缓冲液
IgG
同种型
BB94
3
5
16
22
34
42
43
44
46
47
- LPS
+ LPS

图14a

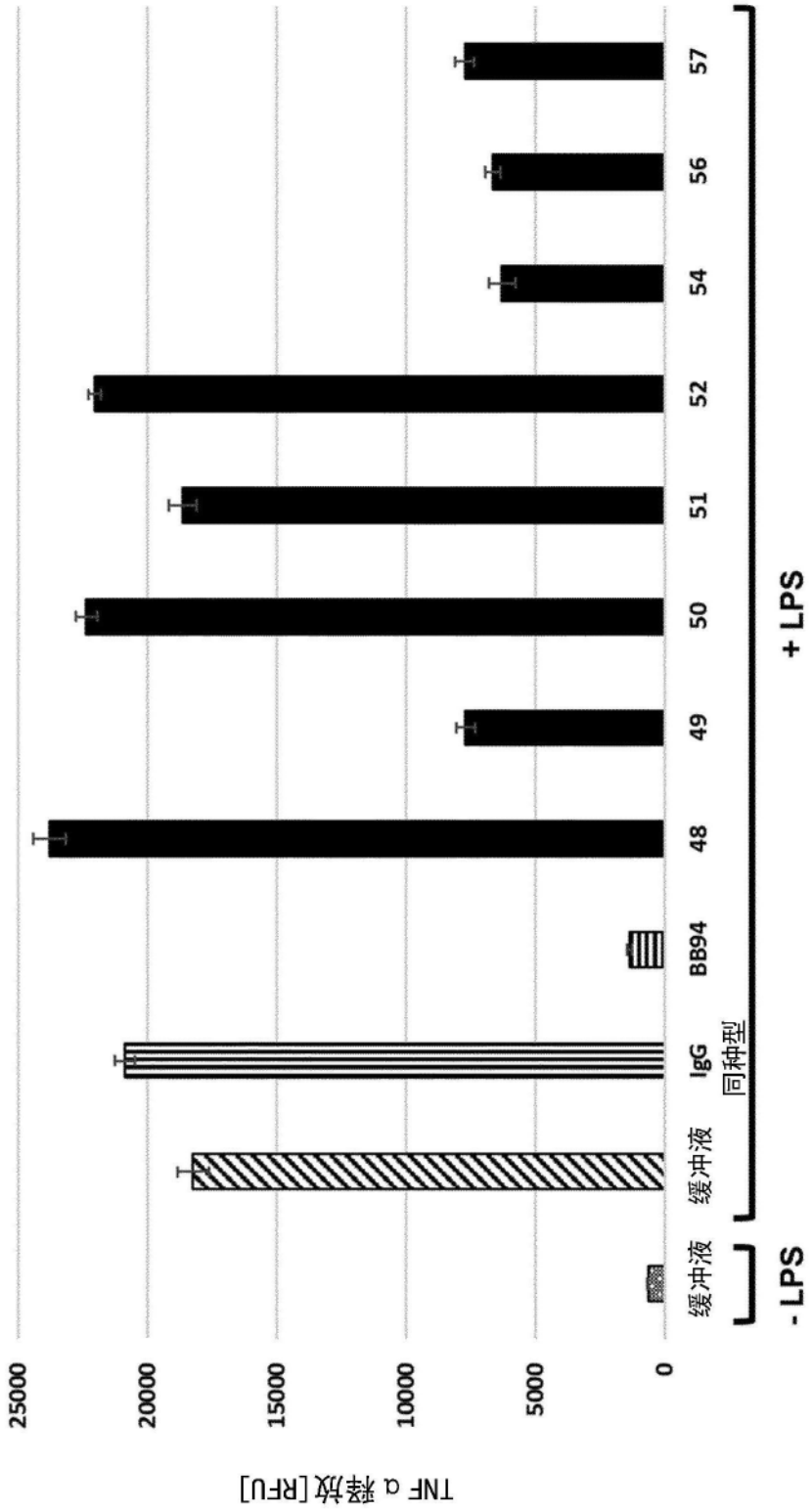

TNF α 释放[RFU]
25000
20000
15000
10000
5000
0
缓冲液
缓冲液
IgG
同种型
BB94
48
49
50
51
52
54
56
57
- LPS
+ LPS

图14a续

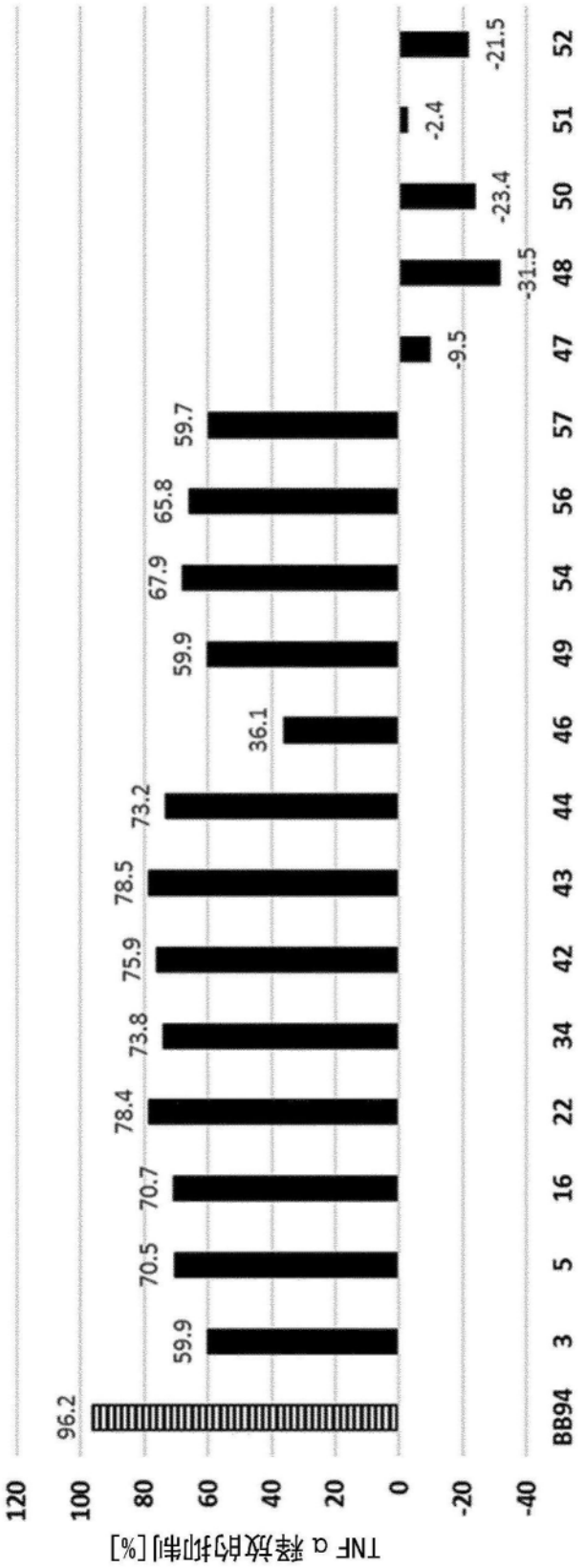

TNF α 释放的抑制[%]
120
100
80
60
40
20
0
-20
-40
BB94
3
5
16
22
34
42
43
44
46
49
54
56
57
47
48
50
51
52
96.2
59.9
70.5
70.7
78.4
73.8
75.9
78.5
73.2
36.1
59.9
67.9
65.8
59.7
-9.5
-31.5
-23.4
-2.4
-21.5

图14b

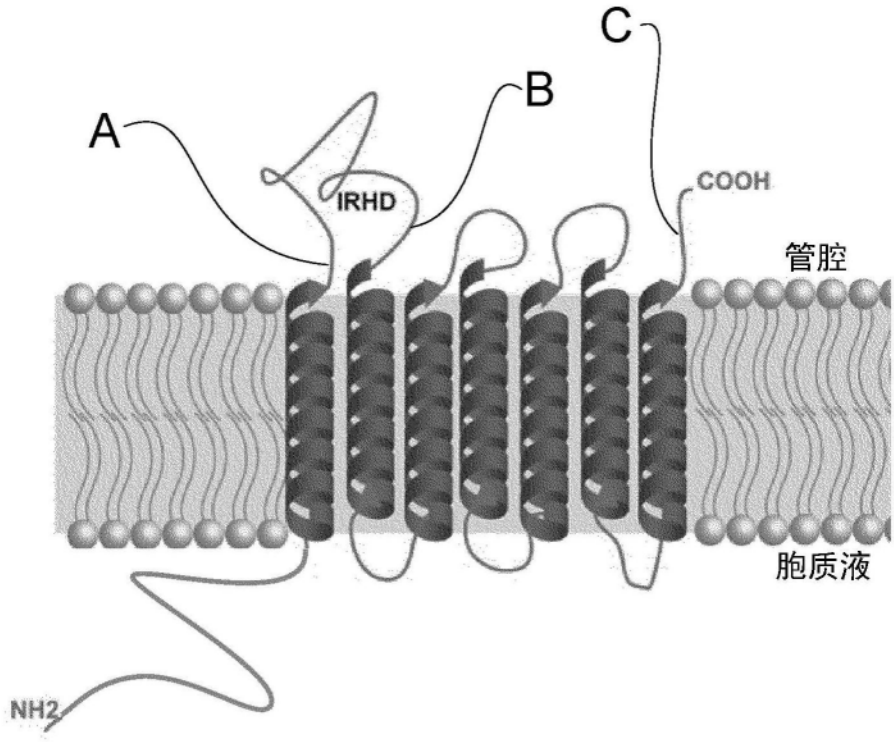



图15a

| 名称 | 位置 | 长度 |
|---|---|---|
| N末端 | 1-409 | 409 |
| TMD1 | 410-430 | 21 |
| JMD | 431-473 | 43 |
| Loop1 | 474-660 | 187 |
| TMD2 | 661-681 | 21 |
| Loop2 | 682-692 | 11 |
| TMD3 | 693-713 | 21 |
| Loop3 | 714-715 | 2 |
| TMD4 | 716-736 | 21 |
| Loop4 | 737-747 | 11 |
| TMD5 | 748-768 | 21 |
| Loop5 | 769-773 | 5 |
| TMD6 | 774-794 | 21 |
| Loop6 | 795-802 | 8 |
| TMD7 | 803-823 | 21 |
| C末端 | 824-856 | 32 |

图15b

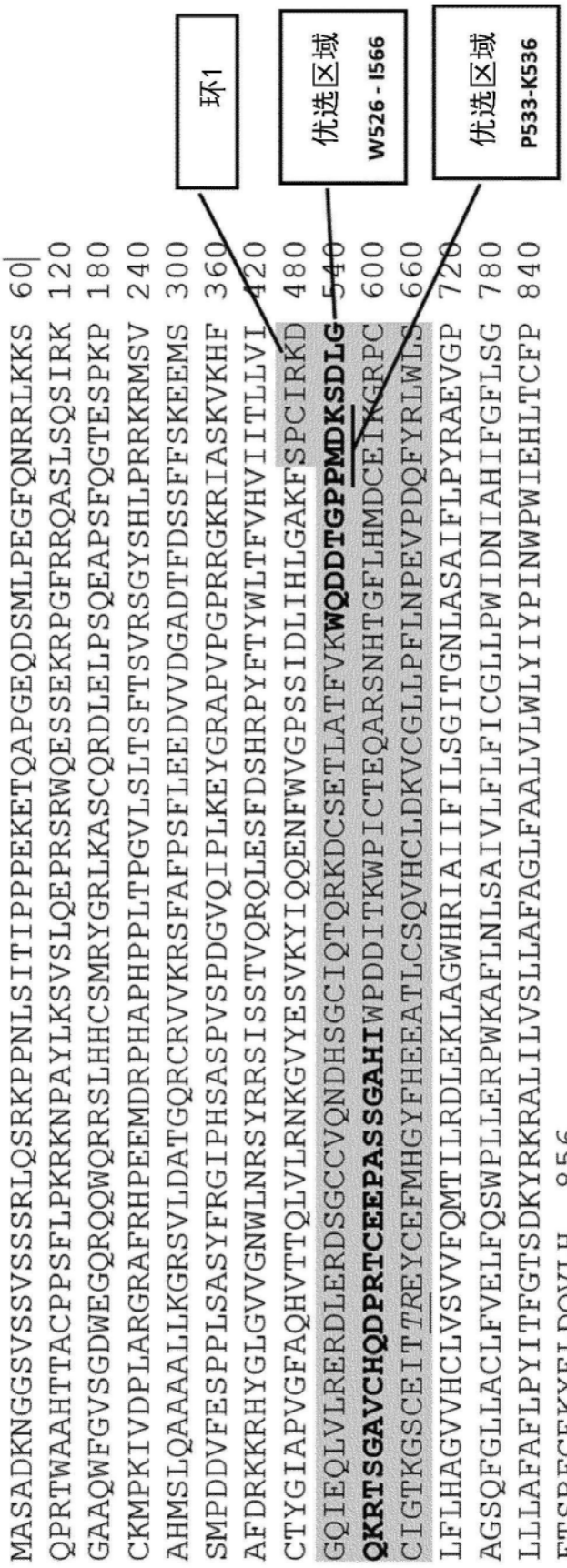

环1
优选区域
W526 - I566
优选区域
P533-K536
MASADKNGGSVSSVSSSRLQSRKPPNLSITIPPPEKETQAPGEQDSMLPEGFQNRRLKKS 60
QPRTWAAHTTACPPSFLPKRKNPAYLKSVSLQEPRSRWQESSEKRPGFRRQASLSQSIRK 120
GAAQWFGVSGDWEGQRQQWQRRSLHHCSMRYGRLKASCQRDLELPSQEAPSFQGTESPKP 180
CKMPKIVDPLARGRAFRHPEEMDRPHAPHPPLTPGVLSLTSFTSVRSGYSHLPRRKRMSV 240
AHMSLQAAAALLKGRSVLDATGQRCRVVKRSFAFPSFLEEDVVDGADTFDSSFFSKEEMS 300
SMPDDVFESPPLSASYFRGIPHSASPVSPDGVQIPLKEYGRAPVPGPRRGKRIASKVKHF 360
AFDRKKRHYGLGVVGNWLNRSYRRSISSTVQRQLESFDSHRPYFTYWLTFVHVIITLLVI 420
CTYGIAPVGFAQHVTTQLVLRNKGVYESVKYIQQENFWVGPSSIDLIHLGAKFSPCIRKD 480
GQIEQLVLRERDLERDSGCCVQNDHSGCIQTQRKDCSETLATFVK**WQDDTGPPMDKSDLG** 540
**QKRTSGAVCHQDPRTCEEPASSGAHI**WPDDITKWPICTEQARSNHTGFLHMDCEIKGRPC 600
CIGTKGSCEIT*TR*EYCEFMHGYFHEEATLCSQVHCLDKVCGLLPFLNPEVPDQFYRLWLS 660
LFLHAGVVHCLVSVVFQMTILRDLEKLAGWHRIAIIFILSGITGNLASAIFLPYRAEVGP 720
AGSQFGLLACLFVELFQSWPLLERPWKAFLNLSAIVLFLFICGLLPWIDNIAHIFGFLSG 780
LLLAFAFLPYITFGTSDKYRKRALILVSLLAFAGLFAALVLWLYIYPINWPWIEHLTCFP 840
FTSRFCEKYELDQVLH 856

图16

```
iRhom2            1 MASADKNGGSVSSVSSSRLQSRKPPNLSITIPPPEKETQAPGEQDSMLPE     50
                    |:.|.::       |:|.||.:|||.|.:.||             |.:|
iRhom1            1 MSEARRD-------STSSLQRKKPPWLKLDIP-------------SAVP-     29

iRhom2           51 GFQNRRLKKSQPRTWAAHTTACPPSFLPKRKNPAYLKSVSLQEPRSRWQE    100
                                .||..||||...:..|:|:|||:  |......
iRhom1           30 ------------------LTAEEPSFLQPLRRQAFLRSVSM--PAETAHI     59

iRhom2          101 SSE----KRPGFRRQASLSQSIRKGAAQWFGVSGDWEGQRQQWQRRSLHH    146
                    ||.    :||..:||.|::|:||:|.|.|||||.| ....|:|||:|:.|
iRhom1           60 SSPHHELRRPVLQRQTSITQTIRRGTADWFGVSKD-SDSTQKWQRKSIRH    108

iRhom2          147 CSMRYGRLKASCQRDLELPSQEAPSFQGTESPK-----PCK--MPKIVDP    189
                    ||.|||:||....|:|:||||:..|...||:|.     ||:  |.||:||
iRhom1          109 CSQRYGKLKPQVLRELDLPSQDNVSLTSTETPPPLYVGPCQLGMQKIIDP    158

iRhom2          190 LARGRAFRHPEE-MDRPHAPHPPLTPGVLSLTSFTSVRSGYSHLP-RRKR    237
                    ||||||||..:: .:...|||.|:|||..||.||:|.|||:..|| ||||
iRhom1          159 LARGRAFRVADDTAEGLSAPHTPVTPGAASLCSFSSSRSGFHRLPRRRKR    208

iRhom2          238 MSVAHMSLQAAAALLKGRSVLDATGQRCRVVKRSFAFPSFLEEDVVDGAD    287
                    .|||.||.:|||||:|||||.|.|.:|.:  :|||...||||||..|..|
iRhom1          209 ESVAKMSFRAAAALMKGRSVRDGTFRRAQ--RRSFTPASFLEEDTTDFPD    256

iRhom2          288 TFDSSFFSK-----EEMSSMPDDVFESPPLSA-SYFRGIPHSA-------    324
                    ..|:|||::     ||:|:.||:|||||..:| ..:...|..|
iRhom1          257 ELDTSFFAREGILHEELSTYPDEVFESPSEAALKDWEKAPEQADLTGGAL    306

iRhom2          325 --SPVSPDGVQIPL-------KEYGRAPVP------------GPRRGKRI    353
                      |.:....:.:||       ||...||.|            |||||:||
iRhom1          307 DRSELERSHLMLPLERGWRKQKEGAAAPQPKVRLRQEVVSTAGPRRGQRI    356

iRhom2          354 ASKVKHFAFDRKKRHYGLGVVGNWLNRSYRRSISSTVQRQLESFDSHRPY    403
                    |..|:.. |.|:||.||||:||...||:||:.|.|.|:||:|..|.|||:
iRhom1          357 AVPVRKL-FAREKRPYGLGMVGRLTNRTYRKRIDSFVKRQIEDMDDHRPF    405

iRhom2          404 FTYWLTFVHVIITLLVICTYGIAPVGFAQHVTTQLVLRNKGVYESVKYIQ    453
                    |||||||||.::|:|.:|.|||||||:||.|...||||:||||:|||:|
iRhom1          406 FTYWLTFVHSLVTILAVCIYGIAPVGFSQHETVDSVLRNRGVYENVKYVQ    455

iRhom2          454 QENFWVGPSSIDLIHLGAKFSPCIRKDGQIEQLVLRERDLERDSGCCVQN    503
                    |||||:||||..||||||||||:|:|.|:...:...|:.|:.|.|||:|
iRhom1          456 QENFWIGPSSEALIHLGAKFSPCMRQDPQVHSFIRSAREREKHSACCVRN    505

iRhom2          504 DHSGCIQTQRKDCSETLATFVKWQDDTGPPMDKSDL-GQKRTSGAVCHQD    552
                    |.|||:||..::||.|||.:|||......|    :| |.||..|:|||||
iRhom1          506 DRSGCVQTSEEECSSTLAVWVKWPIHPSAP----ELAGHKRQFGSVCHQD    551

iRhom2          553 PRTCEEPASSGAHIWPDDITKWPICTEQARSNHTGFLHMDCEIKGRPCCI    602
                    ||.|:||:|...|.||:|||||||||:.:..|||...||||.|.||||||
iRhom1          552 PRVCDEPSSEDPHEWPEDITKWPICTKNSAGNHTNHPHMDCVITGRPCCI    601

iRhom2          603 GTKGSCEITTREYCEFMHGYFHEEATLCSQVHCLDKVCGLLPFLNPEVPD    652
                    ||||.||||:||||:||.|||||||||||||||:|.|||||||||||||||
iRhom1          602 GTKGRCEITSREYCDFMRGYFHEEATLCSQVHCMDDVCGLLPFLNPEVPD    651

iRhom2          653 QFYRLWLSLFLHAGVVHCLVSVVFQMTILRDLEKLAGWHRIAIIFILSGI    702
                    |||||||||||||::||||||:.||||:|||||||||||||||::||||:
iRhom1          652 QFYRLWLSLFLHAGILHCLVSICFQMTVLRDLEKLAGWHRIAIIYLLSGV    701

iRhom2          703 TGNLASAIFLPYRAEVGPAGSQFGLLACLFVELFQSWPLLERPWKAFLNL    752
                    |||||||||||||||||||||||||:||||||||||||.:|.|||:||..|
iRhom1          702 TGNLASAIFLPYRAEVGPAGSQFGILACLFVELFQSWQILARPWRAFFKL    751

iRhom2          753 SAIVLFLFICGLLPWIDNIAHIFGFLSGLLLAFAFLPYITFGTSDKYRKR    802
                    .|:|||||..||||||||.|||.||:|||.|:|||||||:||..|.||||
iRhom1          752 LAVVLFLFTFGLLPWIDNFAHISGFISGLFLSFAFLPYISFGKFDLYRKR    801

iRhom2          803 ALILVSLLAFAGLFAALVLWLYIYPINWPWIEHLTCFPFTSRFCEKYELD    852
                    ..|:..:.|.||.|.||:..|:||:...|.|.|||.|||.:|||||||||
iRhom1          802 CQIIIFQVVFLGLLAGLVVLFYVYPVRCEWCEFLTCIPFTDKFCEKYELD    851

iRhom2          853 QVLH    856
                    ..||
iRhom1          852 AQLH    855
```

图17a

```
hiRhom2          1 MASADKNGGSVSSVSSSRLQSRKPPNLSITIPPPEKETQAPGEQDSMLPE     50
                   ||||||||.:::.|||.||||||||||||||||  |:||||||||||||
miRhom2          1 MASADKNGSNLPSVSGSRLQSRKPPNLSITIPPP--ESQAPGEQDSMLPE     48

hiRhom2         51 GFQNRRLKKSQPRTWAAHTTACPPSFLPKRKNPAYLKSVSLQEPRSRWQE    100
                                          :||||||||||||||||.||||
miRhom2         49 ----------------------------RRKNPAYLKSVSLQEPRGRWQE     70

hiRhom2        101 SSEKRPGFRRQASLSQSIRKGAAQWFGVSGDWEGQRQQWQRRSLHHCSMR    150
                   .:|||||||||||||||||..||||||||||:||.|.||||||||:.
miRhom2         71 GAEKRPGFRRQASLSQSIRKSTAQWFGVSGDWEGKRQNWHRRSLHHCSVH    120

hiRhom2        151 YGRLKASCQRDLELPSQEAPSFQGTESPKPCKMPKIVDPLARGRAFRHPE    200
                   ||||||||||:|||||||.||||||||||||||||||||||||||||||:
miRhom2        121 YGRLKASCQRELELPSQEVPSFQGTESPKPCKMPKIVDPLARGRAFRHPD    170

hiRhom2        201 EMDRPHAPHPPLTPGVLSLTSFTSVRSGYSHLPRRKRMSVAHMSLQAAAA    250
                   |:|||||.|||||||||||||||||||||||||||:||||||.|||||
miRhom2        171 EVDRPHAAHPPLTPGVLSLTSFTSVRSGYSHLPRRKRISVAHMSFQAAAA    220

hiRhom2        251 LLKGRSVLDATGQRCRVVKRSFAFPSFLEEDVVDGADTFDSSFFSKEEMS    300
                   ||||||||||||||||.|||||||:|||||||.||||||||||||||||||
miRhom2        221 LLKGRSVLDATGQRCRHVKRSFAYPSFLEEDAVDGADTFDSSFFSKEEMS    270

hiRhom2        301 SMPDDVFESPPLSASYFRGIPHSASPVSPDGVQIPLKEY--GRAPVPGPR    348
                   ||||||||||||||||||:||||||||||.||||||  |||..||.:||
miRhom2        271 SMPDDVFESPPLSASYFRGVPHSASPVSPDGVHIPLKEYSGGRALGPGTQ    320

hiRhom2        349 RGKRIASKVKHFAFDRKKRHYGLGVVGNWLNRSYRRSISSTVQRQLESFD    398
                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
miRhom2        321 RGKRIASKVKHFAFDRKKRHYGLGVVGNWLNRSYRRSISSTVQRQLESFD    370

hiRhom2        399 SHRPYFTYWLTFVHVIITLLVICTYGIAPVGFAQHVTTQLVLRNKGVYES    448
                   ||||||||||||||:|||||||||||||||||||||||:|:|||||||
miRhom2        371 SHRPYFTYWLTFVHIIITLLVICTYGIAPVGFAQHVTTQLVLKNRGVYES    420

hiRhom2        449 VKYIQQENFWVGPSSIDLIHLGAKFSPCIRKDGQIEQLVLRERDLERDSG    498
                   ||||||||||:|||||||||||||||||||.||||||.||||:||.||
miRhom2        421 VKYIQQENFWIGPSSIDLIHLGAKFSPCIRKDQQIEQLVRRERDIERTSG    470

hiRhom2        499 CCVQNDHSGCIQTQRKDCSETLATFVKWQDDTGPPMDKSDLGQKRTSGAV    548
                   ||||||.||||||.:|||||||||||||:||| |.|||||.||:.|..|
miRhom2        471 CCVQNDRSGCIQTLKKDCSETLATFVKWQNDTG-PSDKSDLSQKQPSAVV    519

hiRhom2        549 CHQDPRTCEEPASSGAHIWPDDITKWPICTEQARSNHTGFLHMDCEIKGR    598
                   ||||||||||||||||||||||||||||||||:|||||.||:||:||||
miRhom2        520 CHQDPRTCEEPASSGAHIWPDDITKWPICTEQAQSNHTGLLHIDCKIKGR    569

hiRhom2        599 PCCIGTKGSCEITTREYCEFMHGYFHEEATLCSQVHCLDKVCGLLPFLNP    648
                   |||||||||||||||||||||||||:||||||||||||||||||||||||
miRhom2        570 PCCIGTKGSCEITTREYCEFMHGYFHEDATLCSQVHCLDKVCGLLPFLNP    619

hiRhom2        649 EVPDQFYRLWLSLFLHAGVVHCLVSVVFQMTILRDLEKLAGWHRIAIIFI    698
                   ||||||||:|||||||||:||||||||||||||||||||||||:||||
miRhom2        620 EVPDQFYRIWLSLFLHAGIVHCLVSVVFQMTILRDLEKLAGWHRISIIFI    669

hiRhom2        699 LSGITGNLASAIFLPYRAEVGPAGSQFGLLACLFVELFQSWPLLERPWKA    748
                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||.||||||||
miRhom2        670 LSGITGNLASAIFLPYRAEVGPAGSQFGLLACLFVELFQSWQLLERPWKA    719

hiRhom2        749 FLNLSAIVLFLFICGLLPWIDNIAHIFGFLSGLLLAFAFLPYITFGTSDK    798
                   |.|||||||||||||||||||||||||:||||||||||||||||||||||
miRhom2        720 FFNLSAIVLFLFICGLLPWIDNIAHIFGFLSGMLLAFAFLPYITFGTSDK    769

hiRhom2        799 YRKRALILVSLLAFAGLFAALVLWLYIYPINWPWIEHLTCFPFTSRFCEK    848
                   ||||||||||||.|||||:||||||||||||||||:||||||||||||||
miRhom2        770 YRKRALILVSLLVFAGLFASLVLWLYIYPINWPWIEYLTCFPFTSRFCEK    819

hiRhom2        849 YELDQVLH    856
                   ||||||||
miRhom2        820 YELDQVLH    827
```

图17b

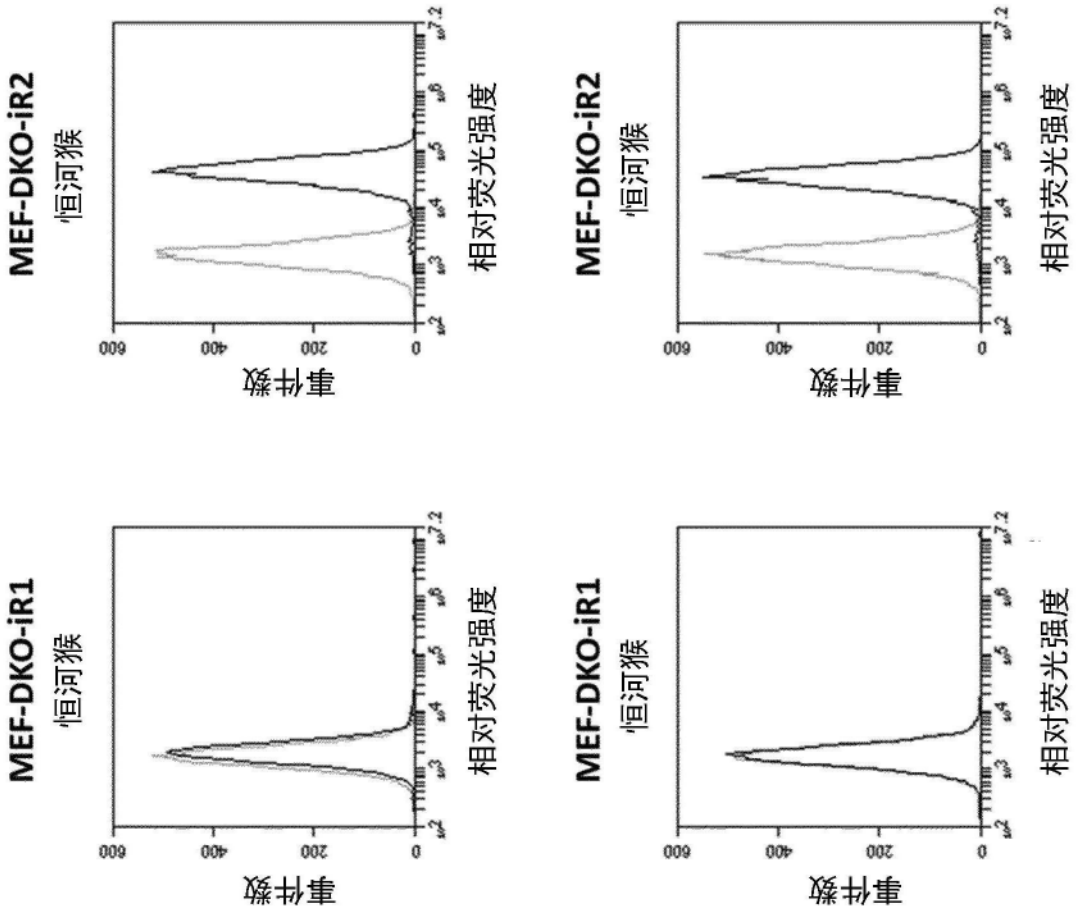

MEF-DKO-iR2
恒河猴
事件数
相对荧光强度
MEF-DKO-iR2
恒河猴
事件数
相对荧光强度
MEF-DKO-iR1
恒河猴
事件数
相对荧光强度
MEF-DKO-iR1
恒河猴
事件数
相对荧光强度

图18a

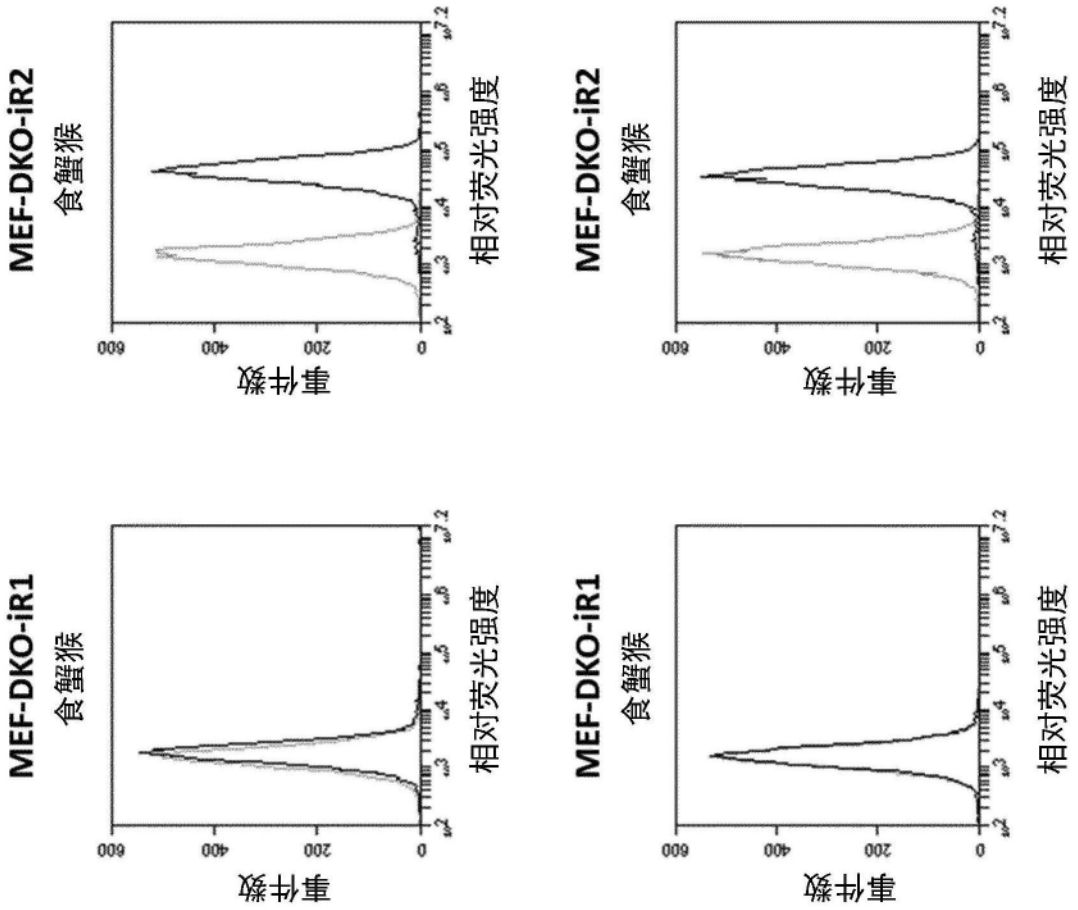

MEF-DKO-iR2
食蟹猴
事件数
相对荧光强度
MEF-DKO-iR2
食蟹猴
事件数
相对荧光强度
MEF-DKO-iR1
食蟹猴
事件数
相对荧光强度
MEF-DKO-iR1
食蟹猴
事件数
相对荧光强度

图18b

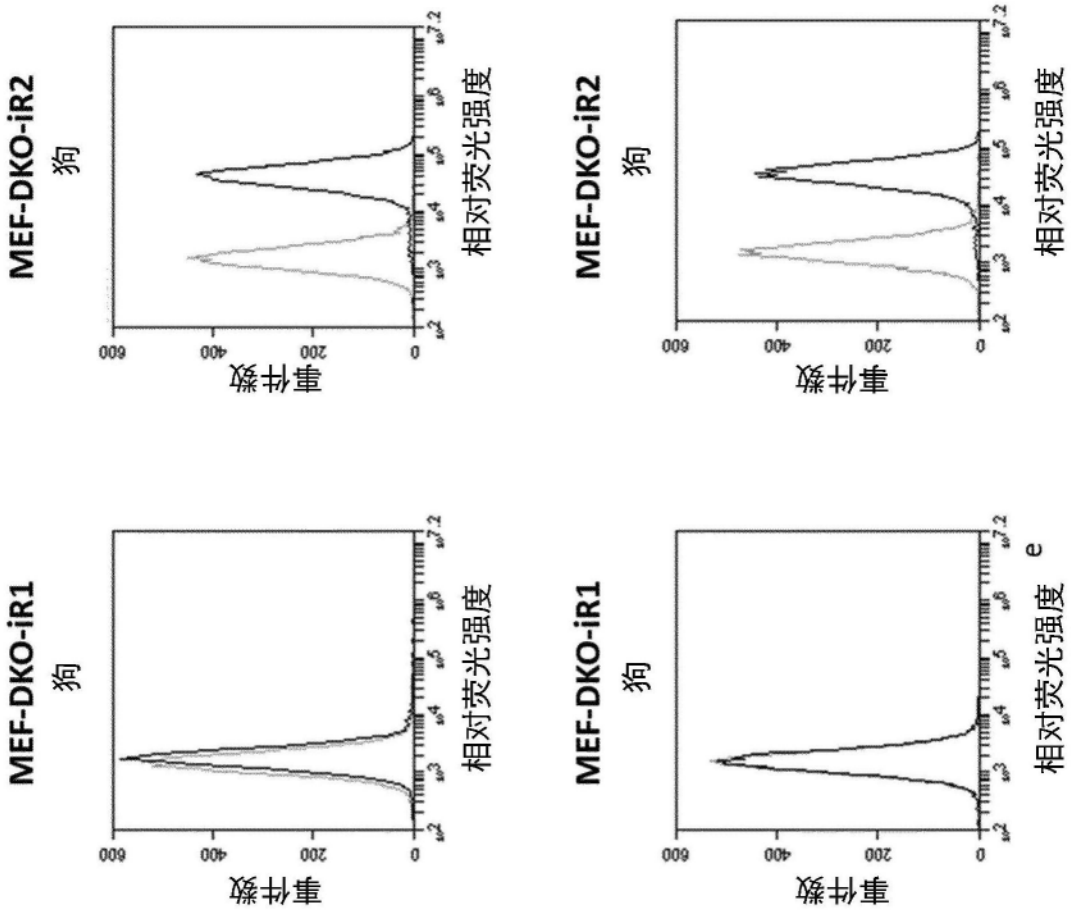

MEF-DKO-iR2
狗
事件数
相对荧光强度
MEF-DKO-iR2
狗
事件数
相对荧光强度
MEF-DKO-iR1
狗
事件数
相对荧光强度
MEF-DKO-iR1
狗
事件数
相对荧光强度
e

图18c

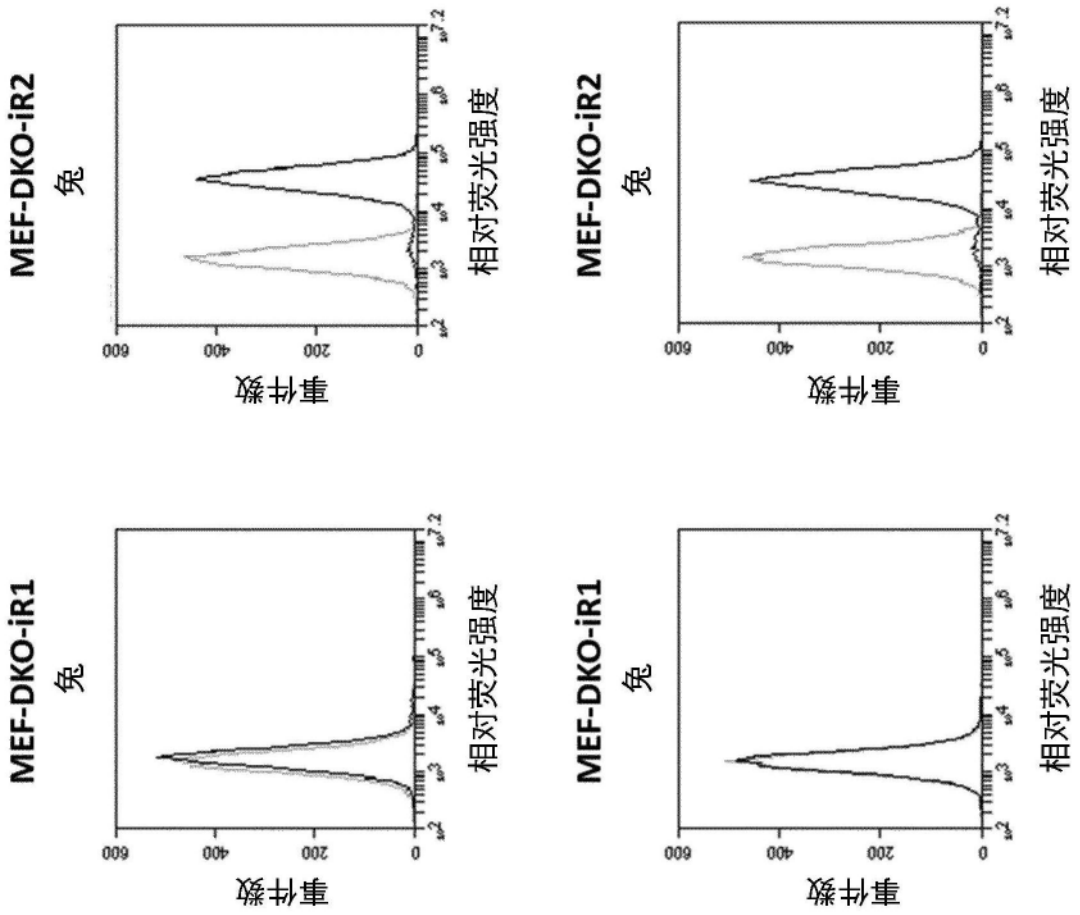

MEF-DKO-iR2
兔
事件数
相对荧光强度
MEF-DKO-iR2
兔
事件数
相对荧光强度
MEF-DKO-iR1
兔
事件数
相对荧光强度
MEF-DKO-iR1
兔
事件数
相对荧光强度

图18d

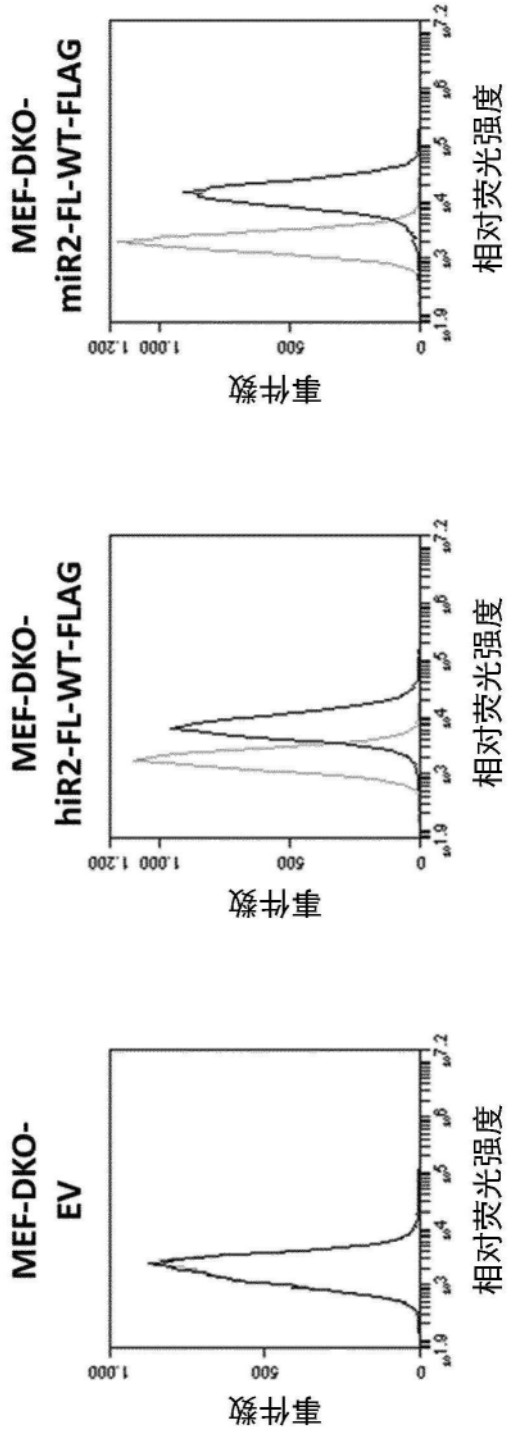

MEF-DKO-
miR2-FL-WT-FLAG
相对荧光强度
事件数
0
500
1,000
1,200
MEF-DKO-
hiR2-FL-WT-FLAG
相对荧光强度
事件数
0
500
1,000
1,200
MEF-DKO-
EV
相对荧光强度
事件数
0
500
1,000

图19a

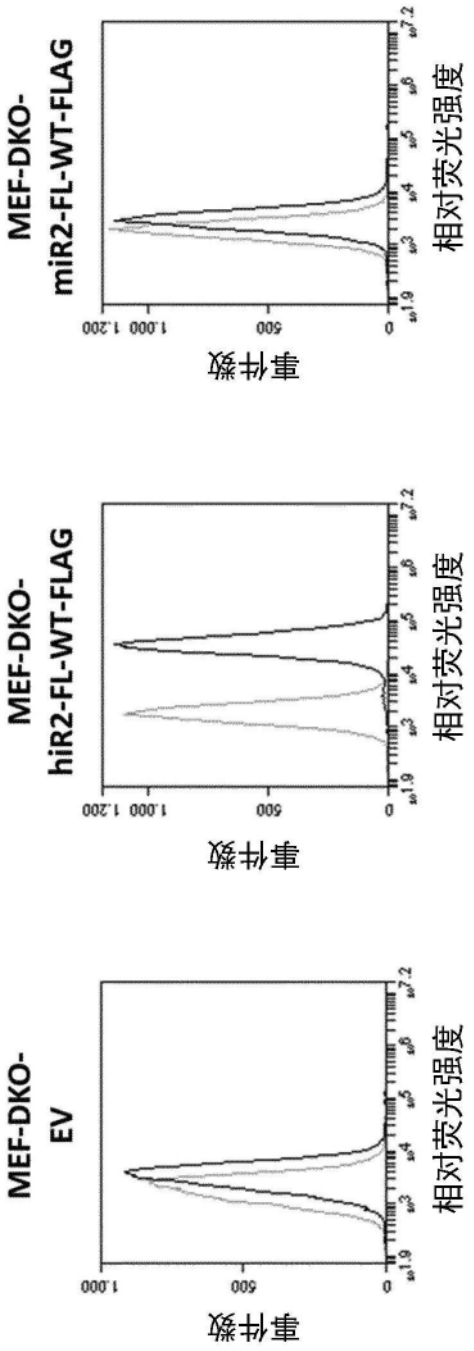

MEF-DKO-
miR2-FL-WT-FLAG
相对荧光强度
事件数
MEF-DKO-
hiR2-FL-WT-FLAG
相对荧光强度
事件数
MEF-DKO-
EV
相对荧光强度
事件数

图19b

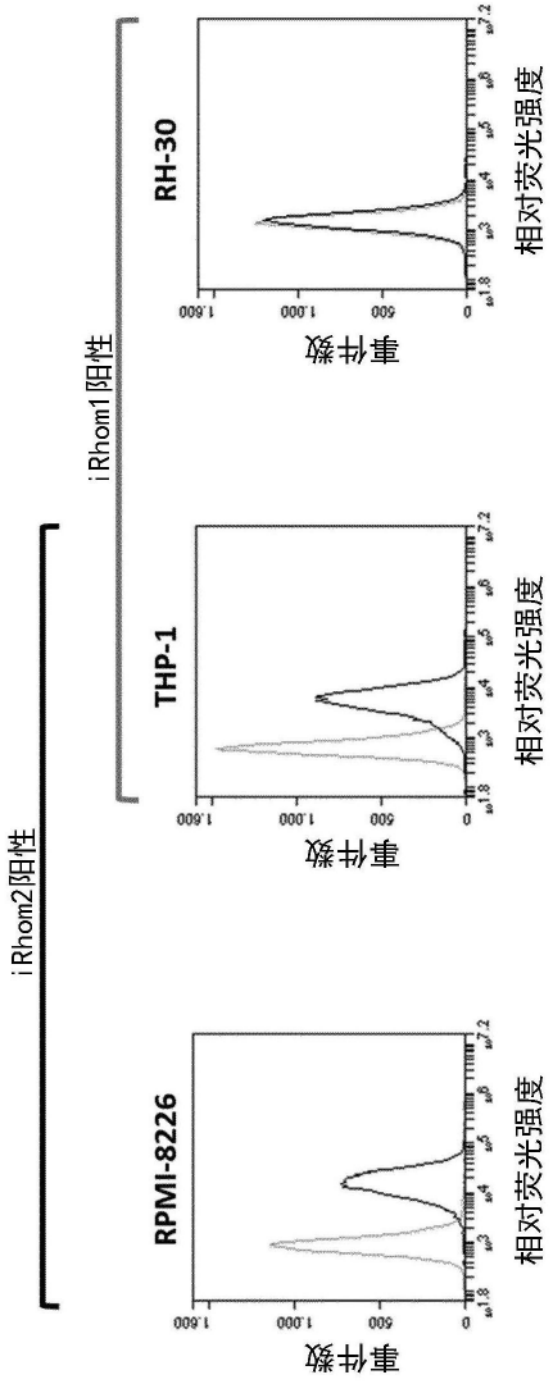

iRhom2阳性
iRhom1阳性
RPMI-8226
THP-1
RH-30
事件数
相对荧光强度
0
500
1,000
1,600

图20a

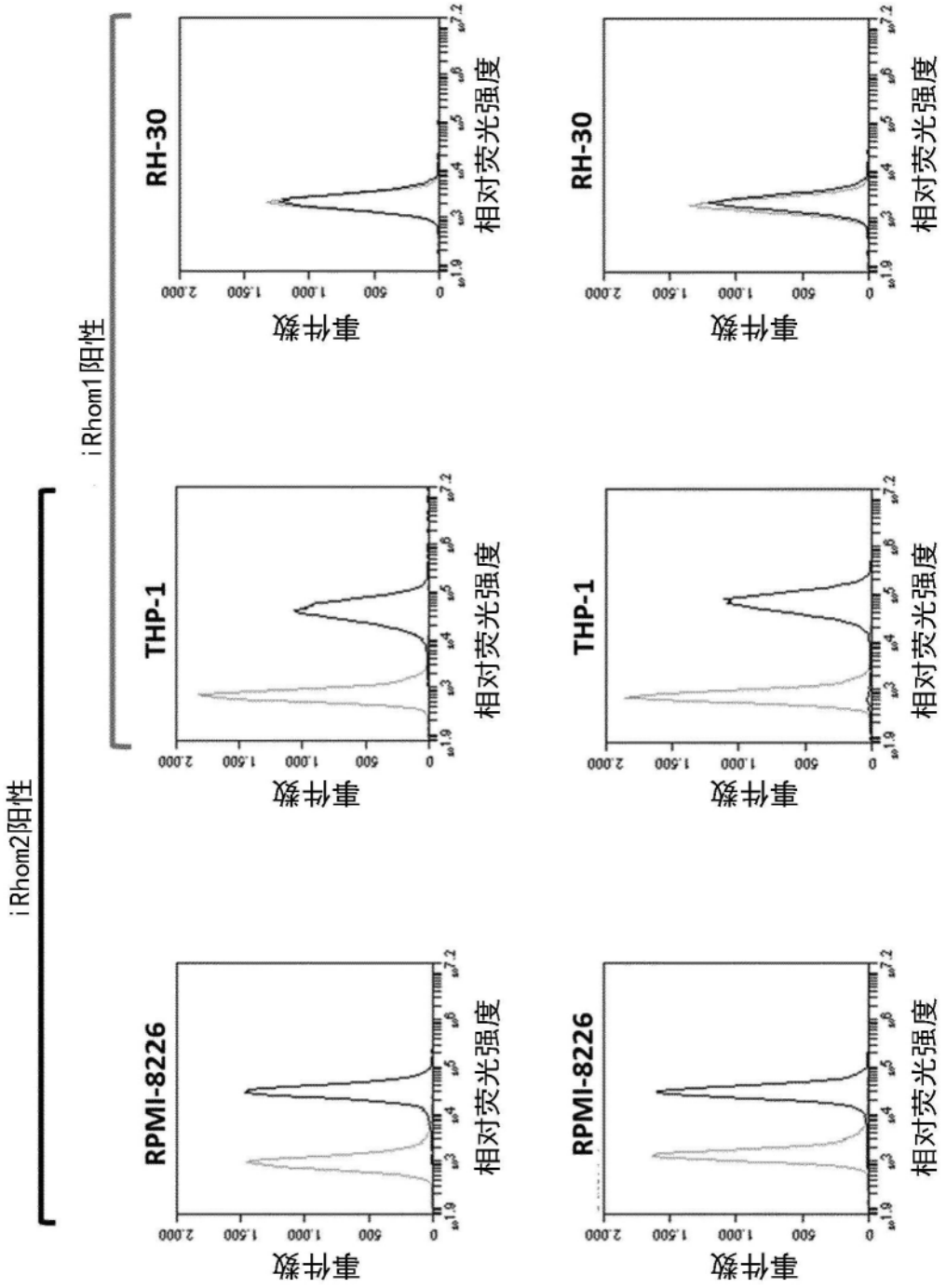

iRhom2阳性
iRhom1阳性
RPMI-8226
THP-1
RH-30
事件数
相对荧光强度
0
500
1,000
1,500
2,000

图20b

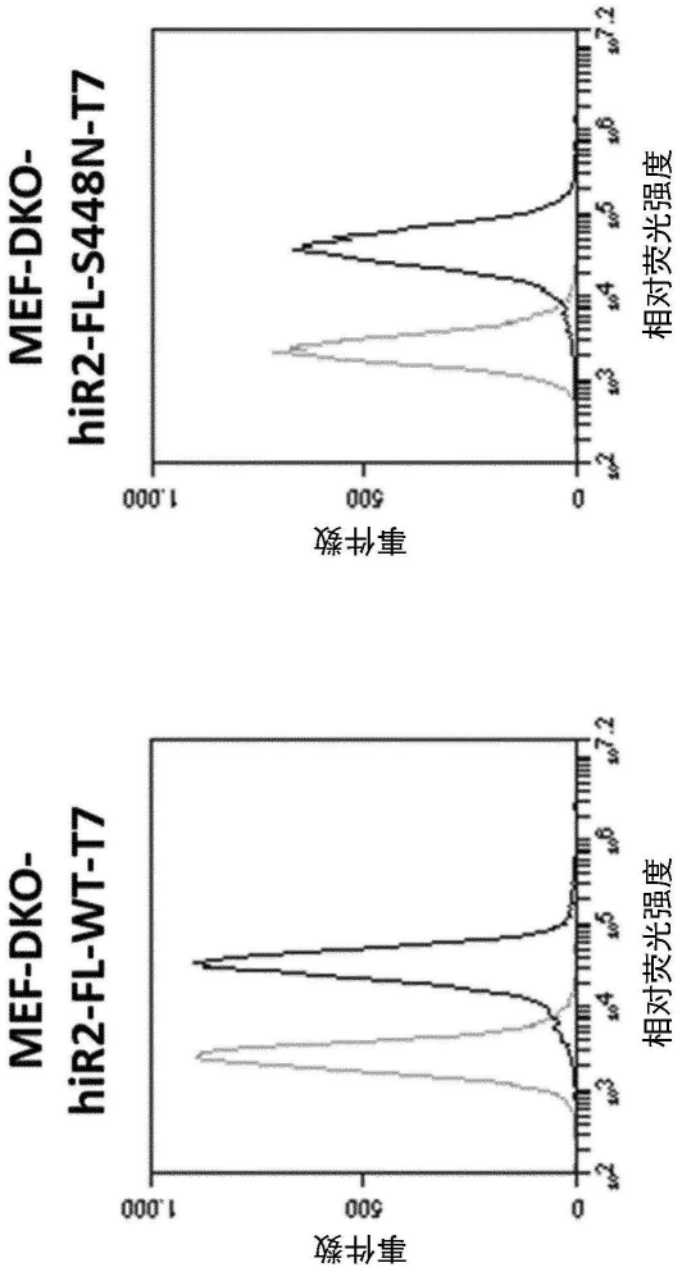

MEF-DKO-
hiR2-FL-S448N-T7
事件数
相对荧光强度
MEF-DKO-
hiR2-FL-WT-T7
事件数
相对荧光强度

图21a

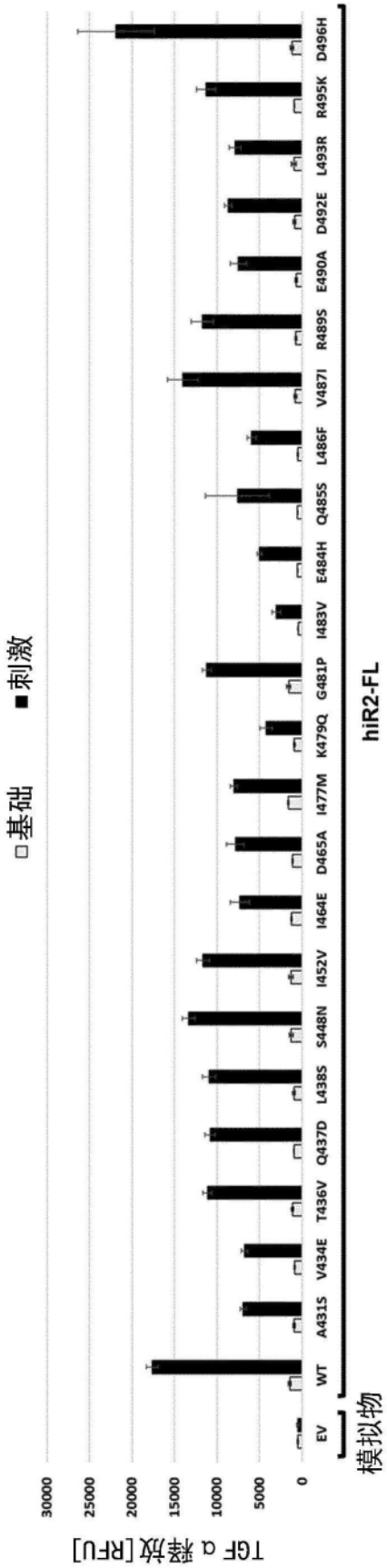

□基础 ■刺激
TGF α 释放[RFU]
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
EV
WT
A431S
V434E
T436V
Q437D
L438S
S448N
I452V
I464E
D465A
I477M
K479Q
G481P
I483V
E484H
Q485S
L486F
V487I
R489S
E490A
D492E
L493R
R495K
D496H
模拟物
hiR2-FL

图21b

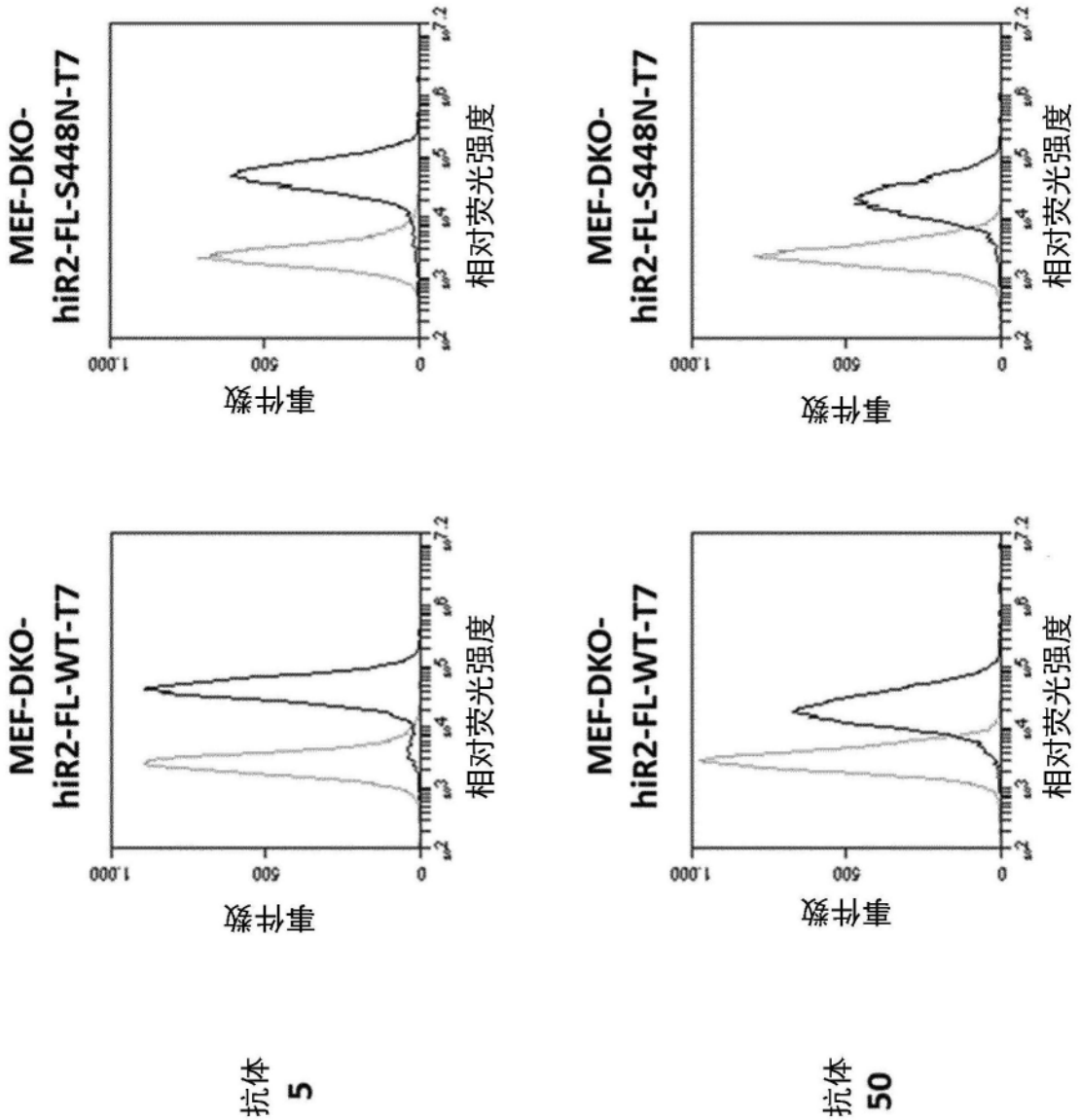

抗体
5
抗体
50
MEF-DKO-
hiR2-FL-WT-T7
MEF-DKO-
hiR2-FL-S448N-T7
事件数
相对荧光强度
0
600
1,000

图22a

| 1 => 相对于野生型的30%结合损失 | 具有根据人iRhom1的缺失/取代的人iRhom2 | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 => 相对于野生型的60%结合损失 | 具有抑制活性的抗体克隆 | | | | | | | | 不具有抑制活性的抗体克隆 | | |
| 3 => 相对于野生型的95%结合损失 | #3 | #5 | #16 | #22 | #34 | #42 | #43 | #44 | #48 | #50 | |
| 人iR2野生型 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| A431S | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| V434E | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 1 | |
| T436V | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 1 | |
| Q437D | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 1 | |
| L438S | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | |
| S448N | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| I452V | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| I464E | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| D465A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| I477M | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 1 | |
| K479Q | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| G481P | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| I483V | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 1 | |
| E484H | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Q485S | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| L486F | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| V487I | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| R489S | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| E490A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| D492E | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| L493R | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| R495K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| D496H | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |

图22b

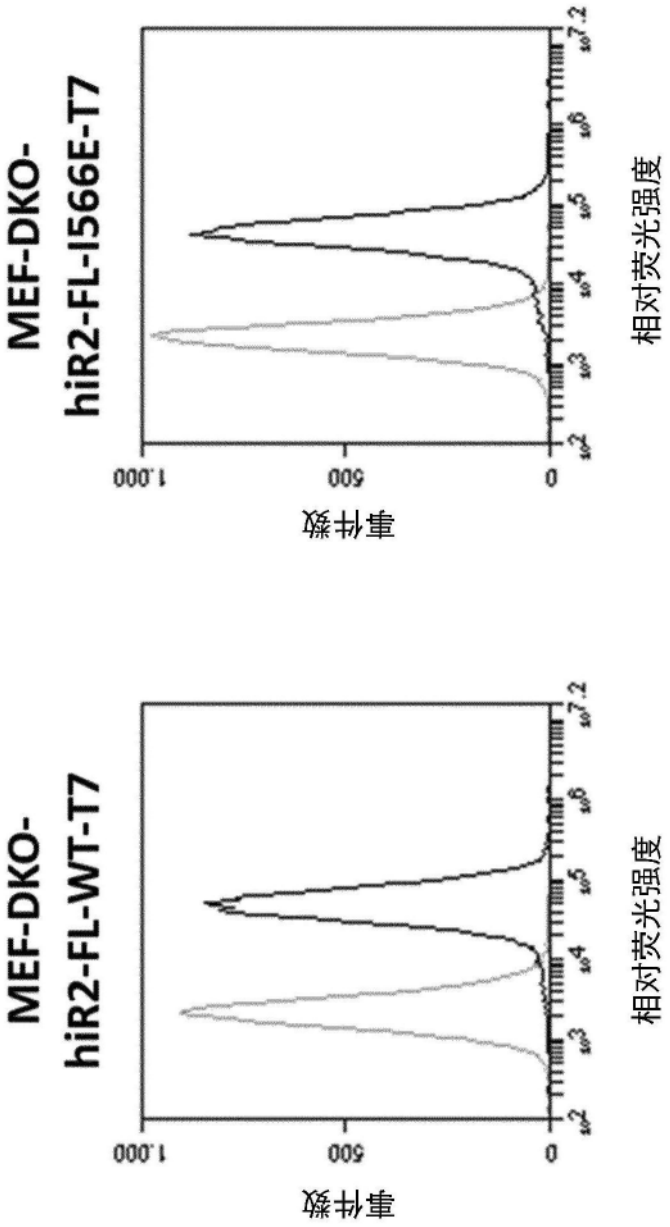

MEF-DKO-
hiR2-FL-I566E-T7
相对荧光强度
事件数
MEF-DKO-
hiR2-FL-WT-T7
相对荧光强度
事件数

图23a

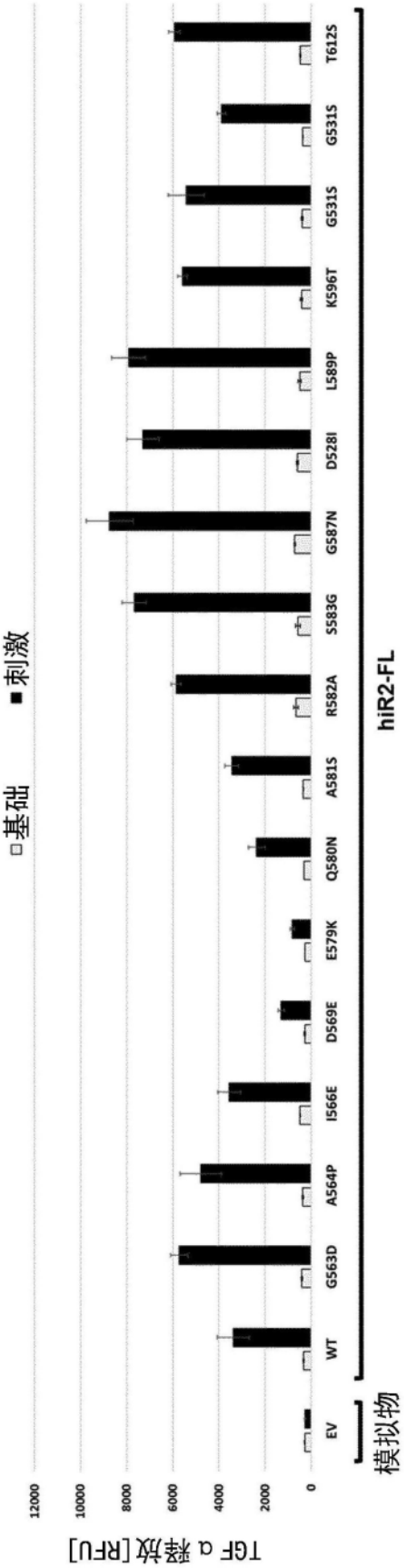

TGF α 释放[RFU]
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
□基础 ■刺激
EV
WT
G563D
A564P
I566E
D569E
E579K
Q580N
A581S
R582A
S583G
G587N
D528I
L589P
K596T
G531S
G531S
T612S
模拟物
hiR2-FL

图23b

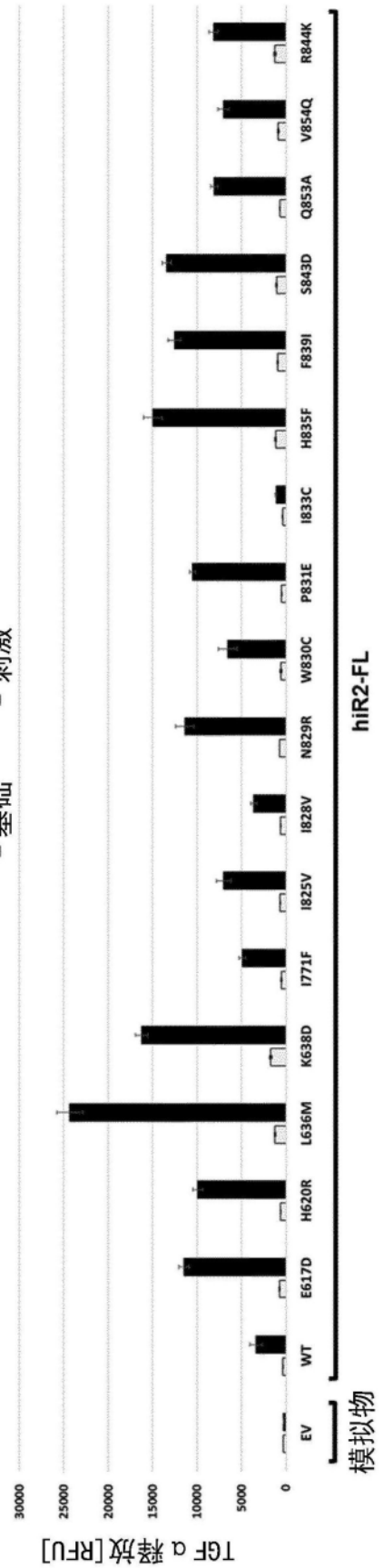

TGFα释放[RFU]
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
□基础 ■刺激
EV
WT
E617D
H620R
L636M
K638D
I771F
I825V
I828V
N829R
W830C
P831E
I833C
H835F
F839I
S843D
Q853A
V854Q
R844K
模拟物
hiR2-FL

图23b续

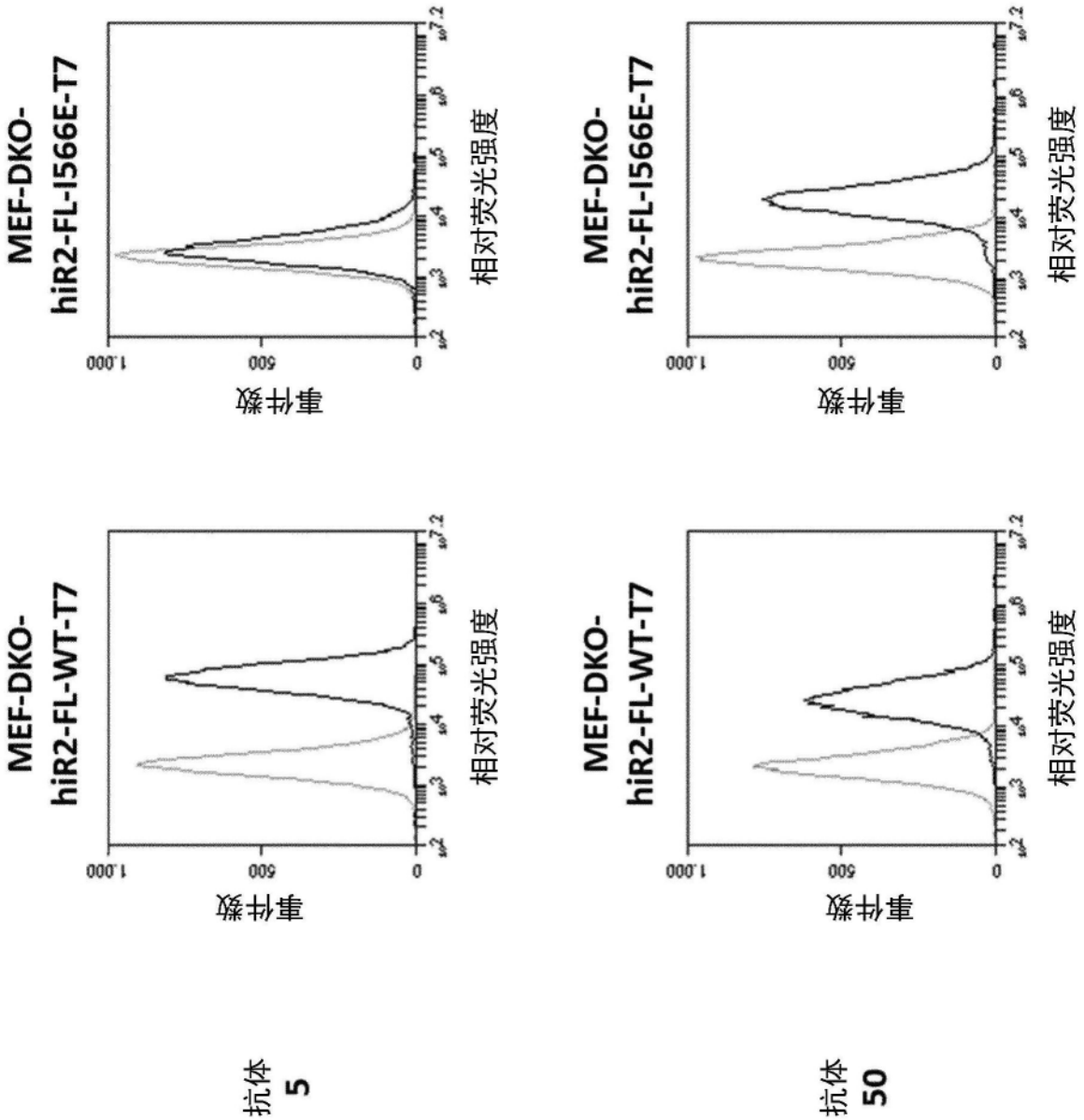

抗体
5
抗体
50
MEF-DKO-
hiR2-FL-WT-T7
MEF-DKO-
hiR2-FL-I566E-T7
事件数
相对荧光强度
0
600
1,000

图24a

| 1 =相对于野生型的30%结合损失 | 具有根据人iRhom1的缺失/取代的人iRhom2 | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 =相对于野生型的60%结合损失 | 具有抑制活性的抗体克隆 | | | | | | | | | 不具有抑制活性的抗体克隆 | | |
| 3 =>相对于野生型的95%结合损失 | #3 | #5 | #16 | #22 | #34 | #42 | #43 | #44 | #48 | #50 | | |
| 人iR2野生型 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| G563D | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | | |
| A564P | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| I566E | 1 | 3 | - | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | - | - | | |
| D569E | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 1 | | |
| E579K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| Q580N | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| A581S | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| R582A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| S583G | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| G587N | - | - | - | - | - | - | 1 | - | 2 | 2 | | |
| F588H | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| L589P | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 | 3 | | |
| E594V | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 1 | | |
| K596T | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| S607R | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 1 | | |
| T612S | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| E617D | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 1 | | |
| H620R | - | - | - | - | - | - | 1 | - | 1 | 1 | | |
| L636M | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| K638D | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| I771F | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| I825V | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| I828V | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| N829R | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| W830C | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| P831E | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| I833C | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| H835F | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| F839I | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| S843D | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| Q853A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| V854Q | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| R844K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |

图24b

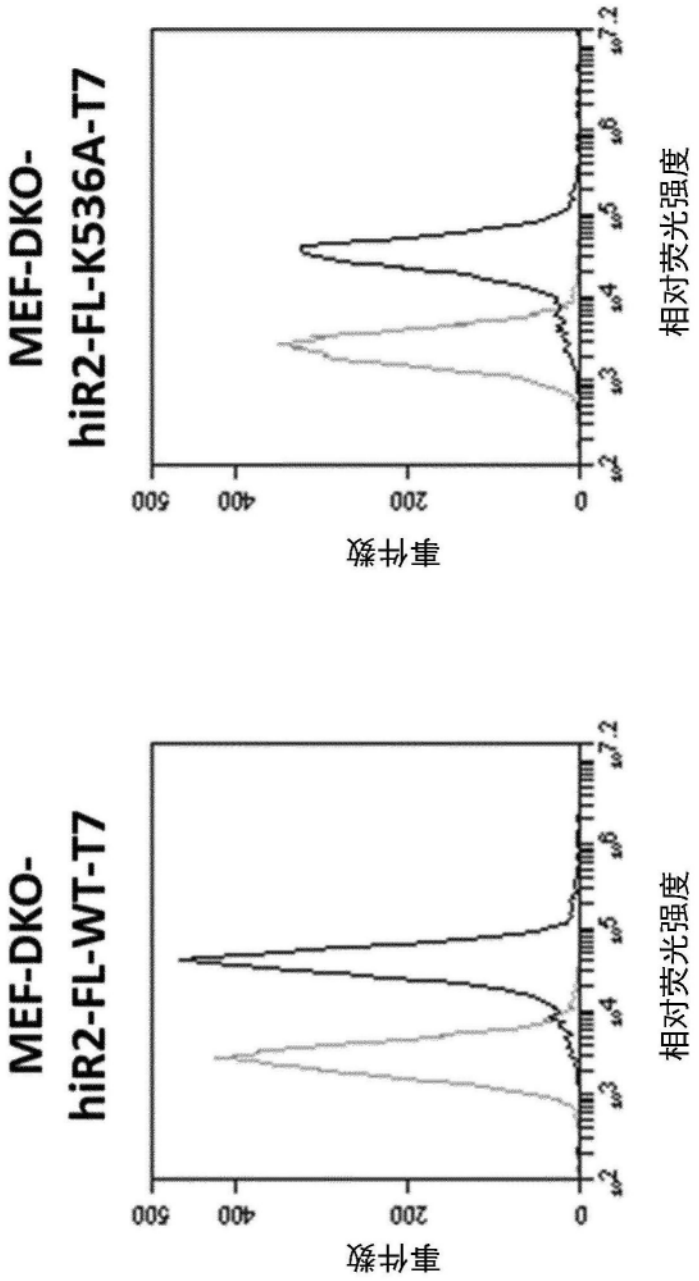

MEF-DKO-
hiR2-FL-K536A-T7
事件数
相对荧光强度
MEF-DKO-
hiR2-FL-WT-T7
事件数
相对荧光强度

图25a

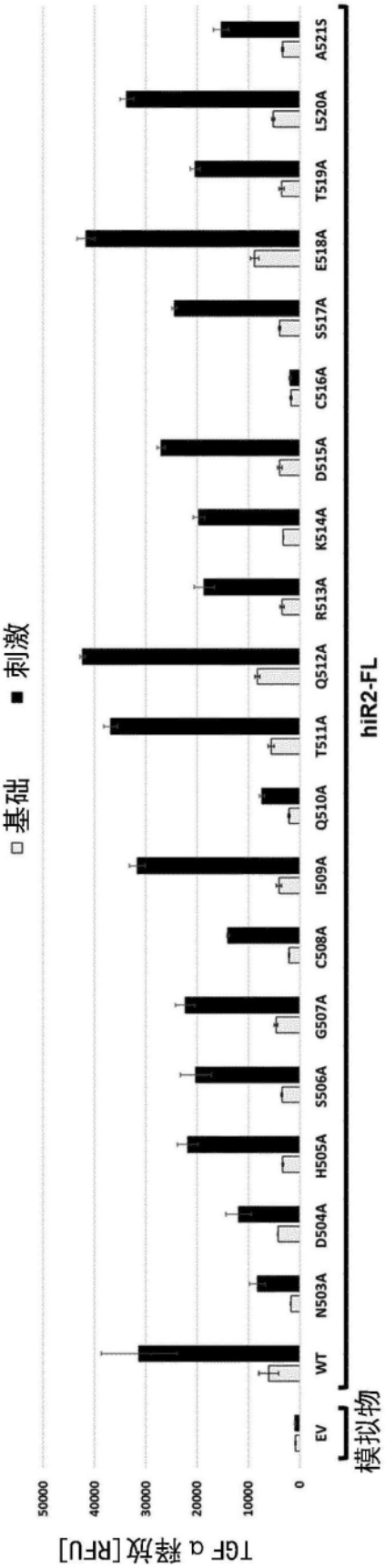

TGF α 释放[RFU]
50000
40000
30000
20000
10000
0
□基础 ■刺激
EV
WT
N503A
D504A
H505A
S506A
G507A
C508A
I509A
Q510A
T511A
Q512A
R513A
K514A
D515A
C516A
S517A
E518A
T519A
L520A
A521S
模拟物
hiR2-FL

图25b

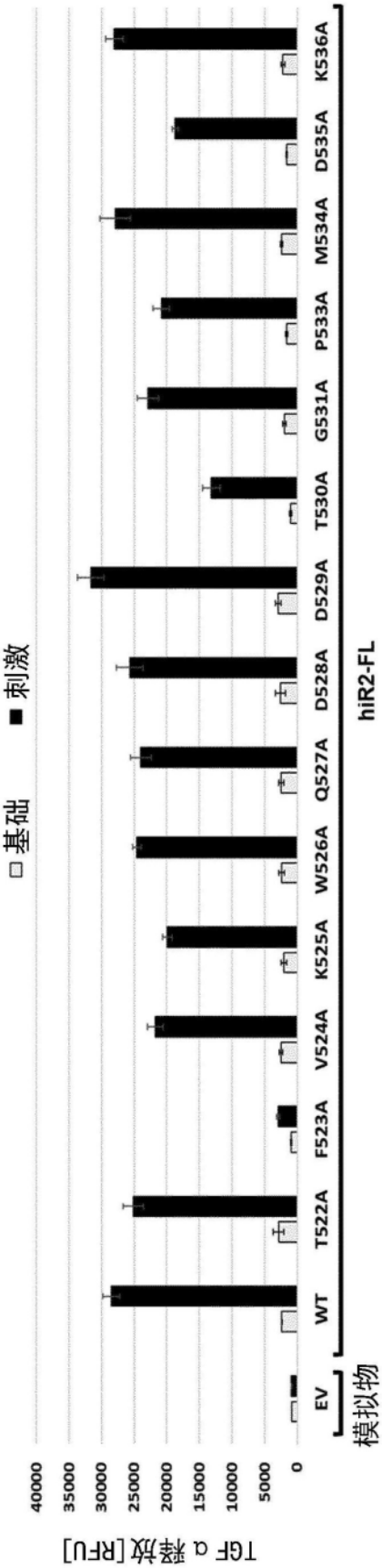

TGF α 释放[RFU]
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
□基础 ■刺激
EV
WT
T522A
F523A
V524A
K525A
W526A
Q527A
D528A
D529A
T530A
G531A
P533A
M534A
D535A
K536A
模拟物
hiR2-FL

图25b续1

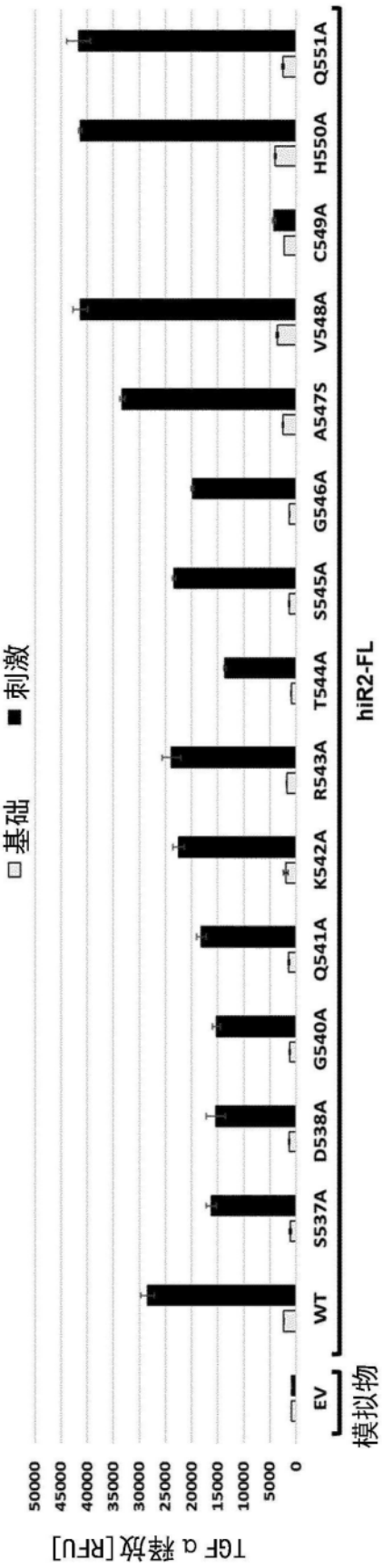

TGF α 释放[RFU]
50000
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
□基础 ■刺激
EV
WT
S537A
D538A
G540A
Q541A
K542A
R543A
T544A
S545A
G546A
A547S
V548A
C549A
H550A
Q551A
模拟物
hiR2-FL

图25b续2

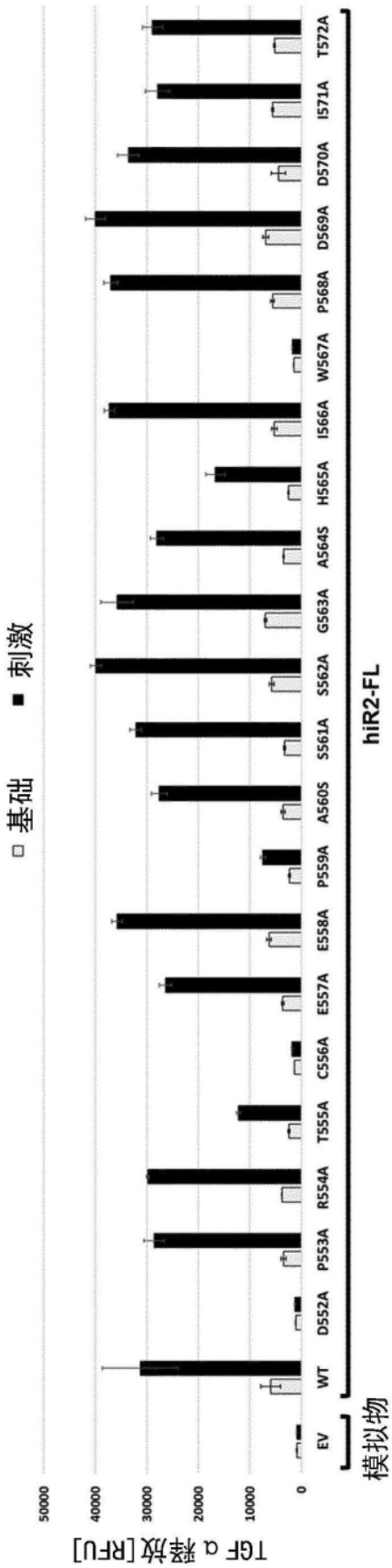

□ 基础 ■ 刺激
TGF α 释放 [RFU]
50000
40000
30000
20000
10000
0
EV
WT
D552A
P553A
R554A
T555A
C556A
E557A
E558A
P559A
A560S
S561A
S562A
G563A
A564S
H565A
I566A
W567A
P568A
D569A
D570A
I571A
T572A
模拟物
hiR2-FL

图25b续3

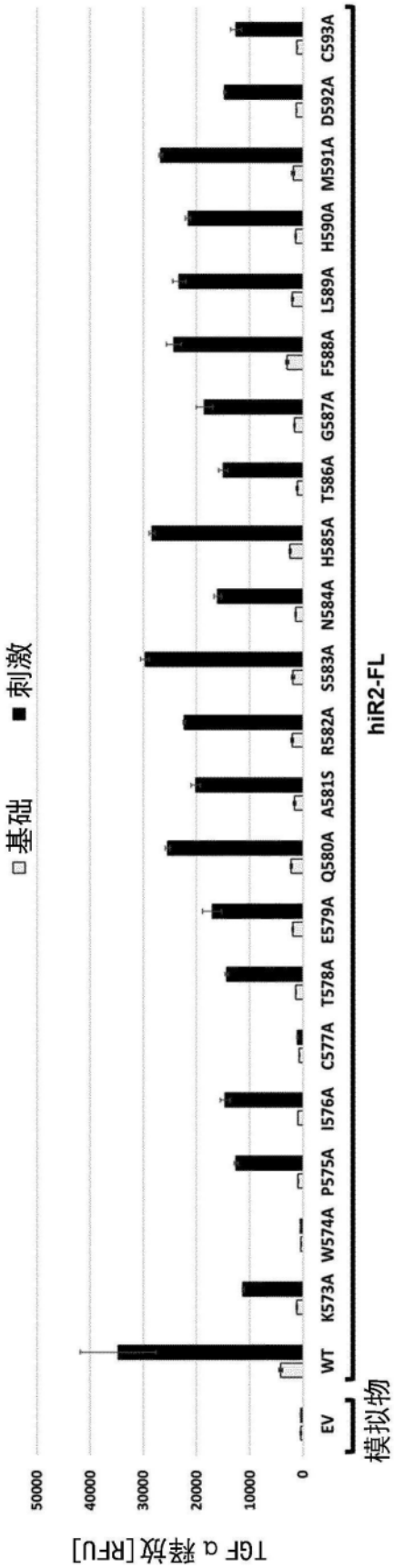

□基础 ■刺激
TGF α 释放[RFU]
50000
40000
30000
20000
10000
0
EV
WT
K573A
W574A
P575A
I576A
C577A
T578A
E579A
Q580A
A581S
R582A
S583A
N584A
H585A
T586A
G587A
F588A
L589A
H590A
M591A
D592A
C593A
模拟物
hiR2-FL

图25b续4

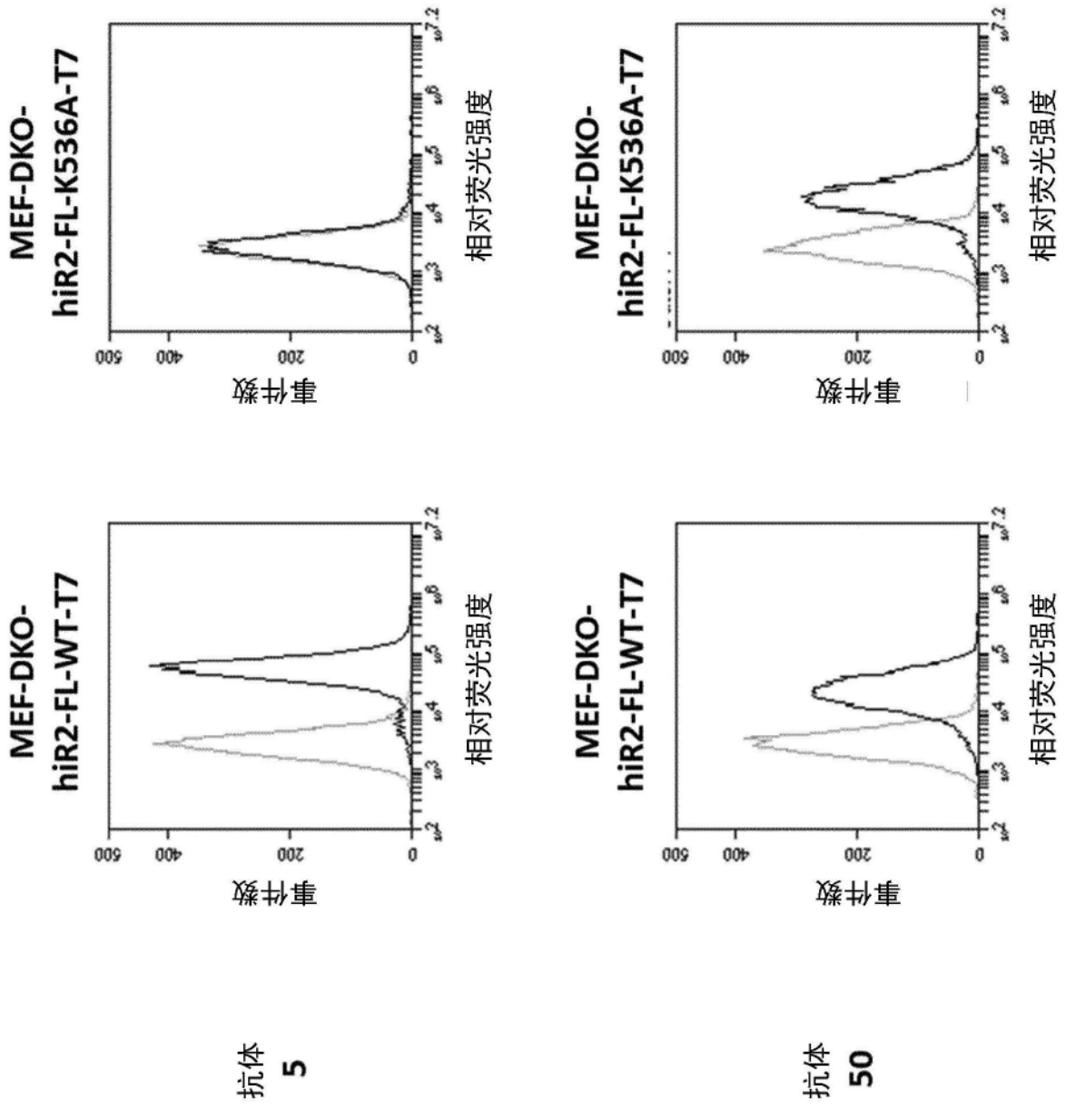
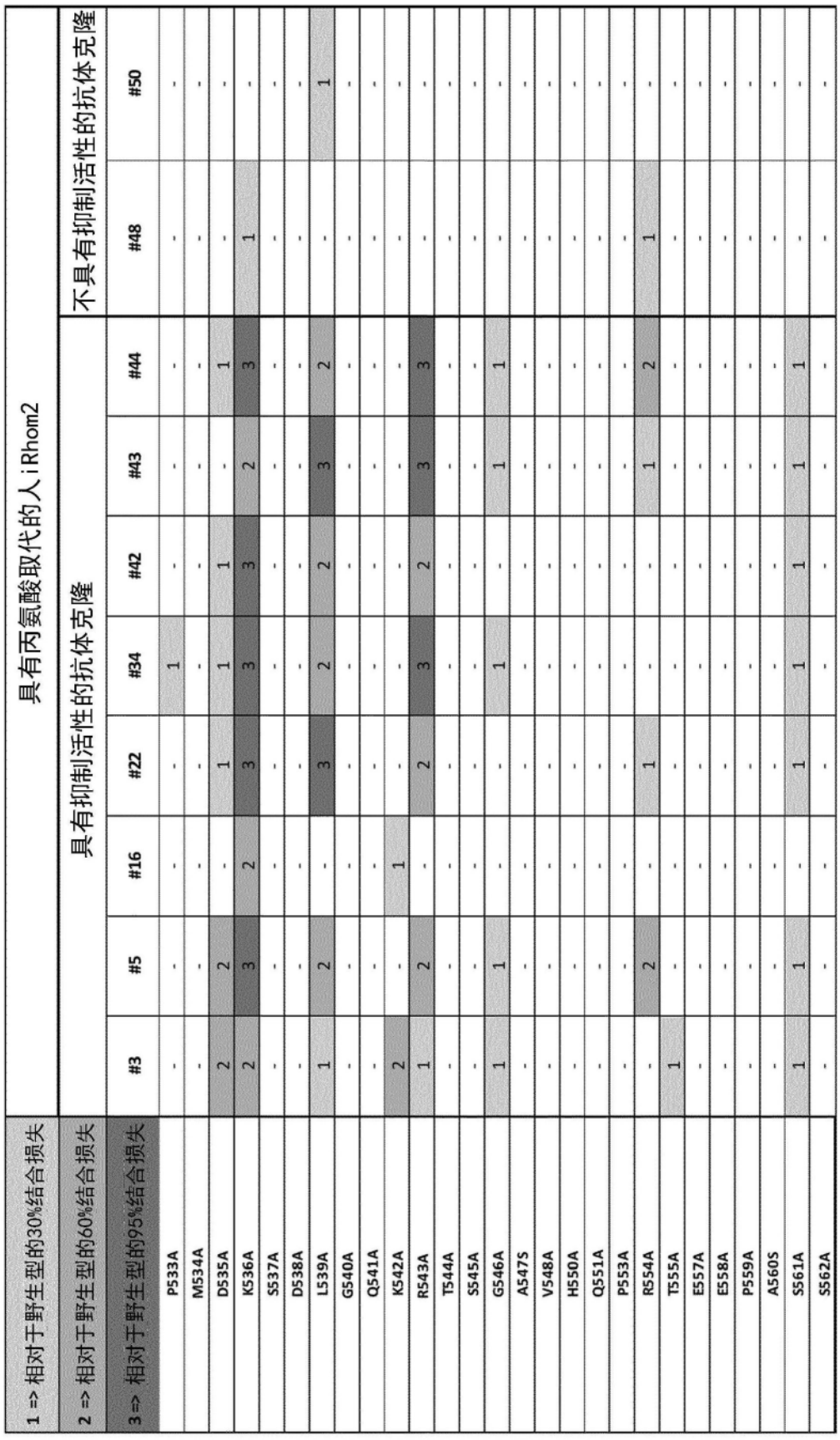

抗体
5
抗体
50
MEF-DKO-
hiR2-FL-WT-T7
MEF-DKO-
hiR2-FL-K536A-T7
事件数
相对荧光强度
0
200
400
600

图26a

| 1 =>相对于野生型的30%结合损失 | 具有丙氨酸取代的人iRhom2 | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 =>相对于野生型的60%结合损失 | 具有抑制活性的抗体克隆 | | | | | | | | 不具有抑制活性的抗体克隆 | | | |
| 3 => 相对于野生型的95%结合损失 | #3 | #5 | #16 | #22 | #34 | #42 | #43 | #44 | #48 | #50 | | |
| N503A | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 1 | | |
| D504A | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 | 2 | | |
| H505A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | | |
| S506A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| G507A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| C508A | - | 1 | - | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | | |
| I509A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| Q510A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | | |
| T511A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| Q512A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| R513A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| K514A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| D515A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| S517A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| E518A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| T519A | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 | 2 | | |
| L520A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| A521S | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| T522A | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 1 | | |
| V524A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | | |
| K525A | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | | |
| W526A | 1 | 2 | - | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| Q527A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| D528A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| D529A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| T530A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| G531A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| P532A | - | 1 | - | - | - | - | - | 1 | - | - | | |

图26b



| 1 => 相对于野生型的30%结合损失 | 具有丙氨酸取代的人iRhom2 | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 => 相对于野生型的60%结合损失 | 具有抑制活性的抗体克隆 | | | | | | | | | 不具有抑制活性的抗体克隆 | | | |
| 3 => 相对于野生型的95%结合损失 | #3 | #5 | #16 | #22 | #34 | #42 | #43 | #44 | #48 | #50 | | | |
| P533A | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | | | |
| M534A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| D535A | 2 | 2 | - | 1 | 1 | 1 | - | 1 | - | - | | | |
| K536A | 2 | 3 | 2 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 1 | - | | | |
| S537A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| D538A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| L539A | 1 | 2 | - | 3 | 2 | 2 | 3 | 2 | - | 1 | | | |
| G540A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| Q541A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| K542A | 2 | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| R543A | 1 | 2 | - | 2 | 3 | 2 | 3 | 3 | - | - | | | |
| T544A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| S545A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| G546A | 1 | 1 | - | - | 1 | - | 1 | 1 | - | - | | | |
| A547S | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| V548A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| H550A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| Q551A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| P553A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| R554A | - | 2 | - | 1 | - | - | 1 | 2 | 1 | - | | | |
| T555A | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| E557A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| E558A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| P559A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| A560S | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| S561A | 1 | 1 | - | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | | | |
| S562A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |

图26b续1

| 1 =>相对于野生型的30%结合损失 | 具有丙氨酸取代的人 iRhom2 | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 =>相对于野生型的60%结合损失 | 具有抑制活性的抗体克隆 | | | | | | | | | 不具有抑制活性的抗体克隆 | |
| 3 => 相对于野生型的95%结合损失 | #3 | #5 | #16 | #22 | #34 | #42 | #43 | #44 | #48 | #50 | |
| G563A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| A564S | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| H565A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| I566A | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | |
| P568A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| D569A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| D570A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| I571A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| T572A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| K573A | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| P575A | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| I576A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| T578A | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| E579A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Q580A | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| A581S | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| R582A | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| S583A | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| N584A | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| H585A | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| T586A | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| G587A | - | - | - | - | - | - | 1 | 1 | 1 | 2 | |
| F588A | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | |
| L589A | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 | 2 | |
| H590A | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | |
| M591A | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 1 | |
| D592A | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 | 2 | |
| C593A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | |

图26b续2

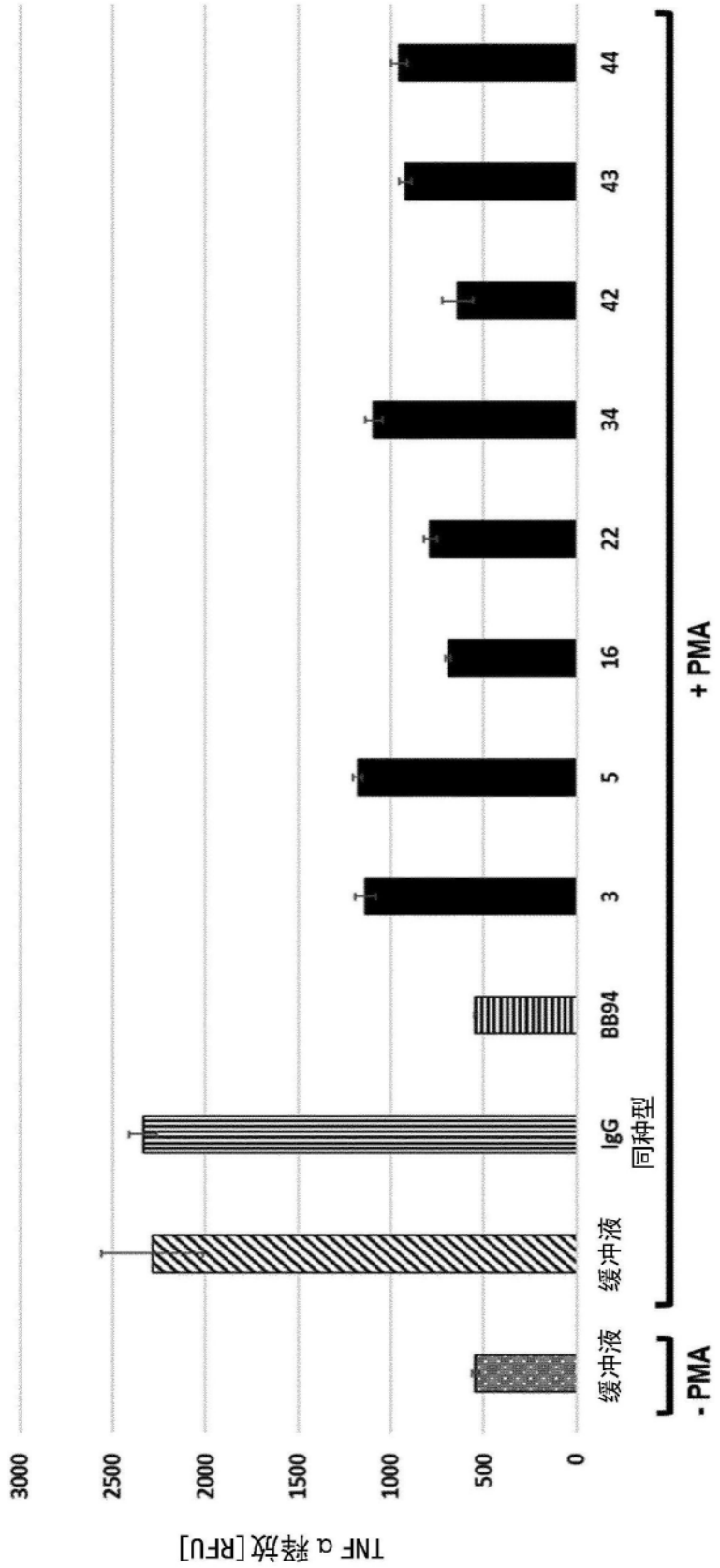

TNF α 释放[RFU]
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
缓冲液
缓冲液
IgG
同种型
BB94
3
5
16
22
34
42
43
44
- PMA
+ PMA

图27a

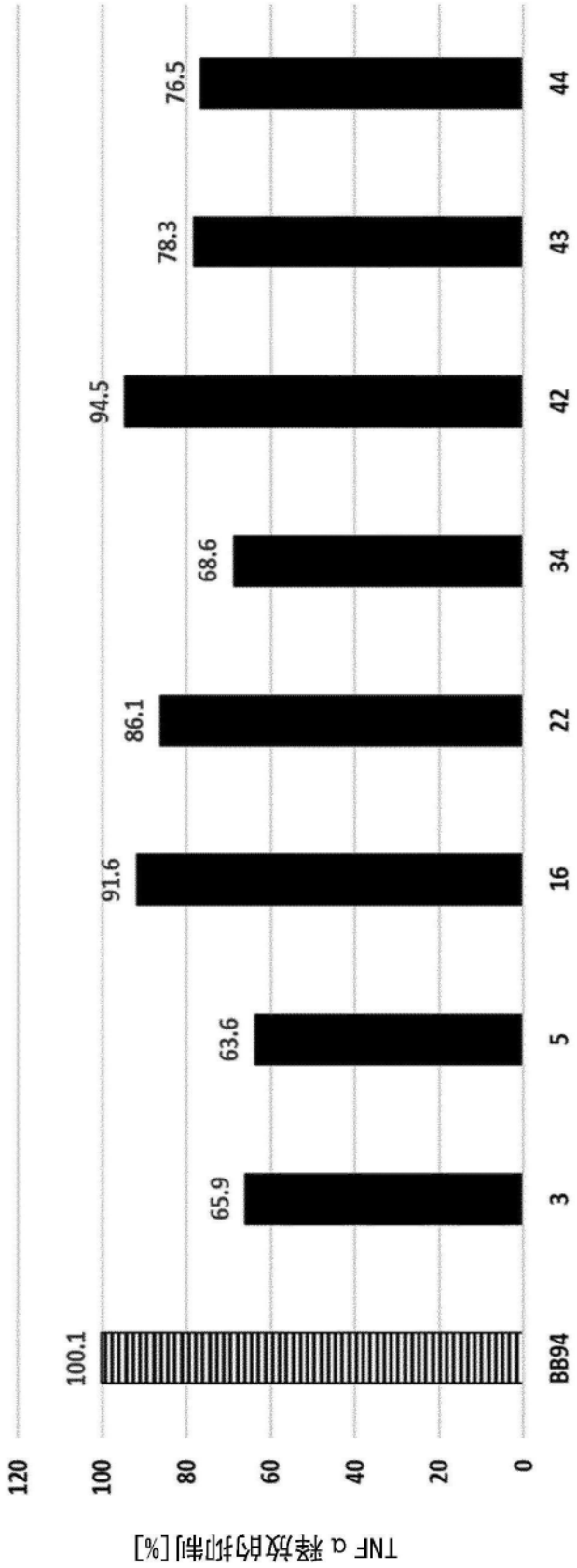

TNF α 释放的抑制[%]
120
100
80
60
40
20
0
100.1
65.9
63.6
91.6
86.1
68.6
94.5
78.3
76.5
BB94
3
5
16
22
34
42
43
44

图27b

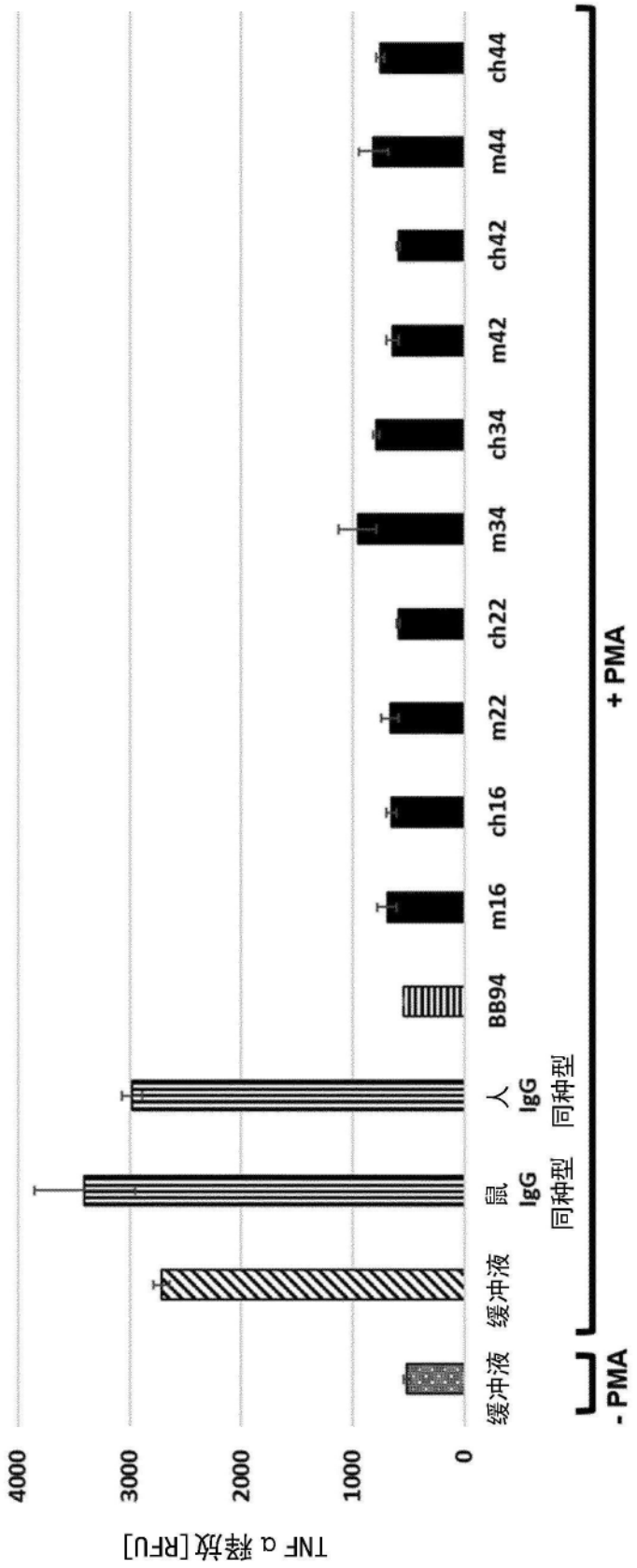

TNF α 释放[RFU]
4000
3000
2000
1000
0
缓冲液
缓冲液
鼠 IgG 同种型
人 IgG 同种型
BB94
m16
ch16
m22
ch22
m34
ch34
m42
ch42
m44
ch44
- PMA
+ PMA

图28a

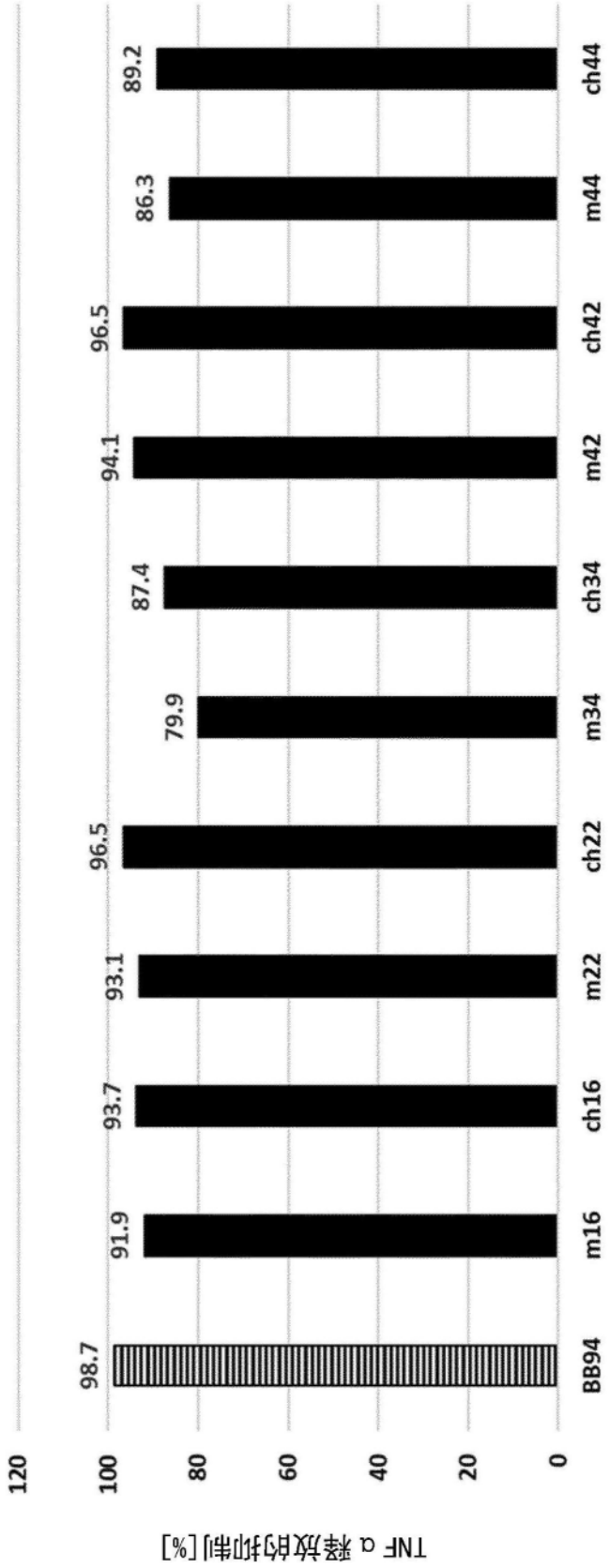

TNF α 释放的抑制[%]
120
100
80
60
40
20
0
98.7
91.9
93.7
93.1
96.5
79.9
87.4
94.1
96.5
86.3
89.2
BB94
m16
ch16
m22
ch22
m34
ch34
m42
ch42
m44
ch44

图28b

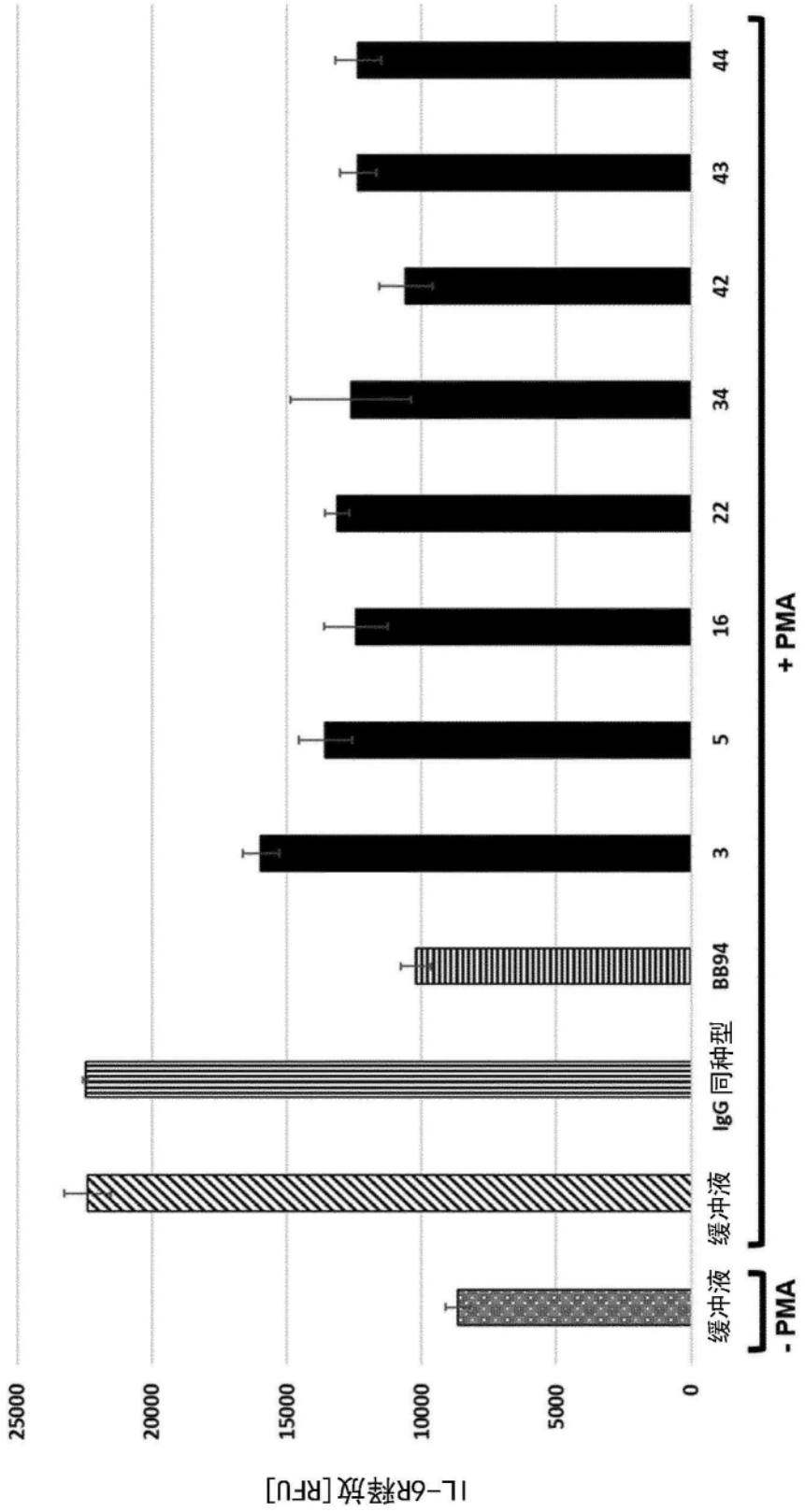

IL-6R释放[RFU]
25000
20000
15000
10000
5000
0
缓冲液
缓冲液
IgG 同种型
BB94
3
5
16
22
34
42
43
44
- PMA
+ PMA

图29a


IL-6R释放的抑制[%]
100
80
60
40
20
0
88.6
BB94
46.7
3
64.1
5
72.5
16
67.4
22
71.1
34
85.9
42
72.9
43
73.0
44

图29b

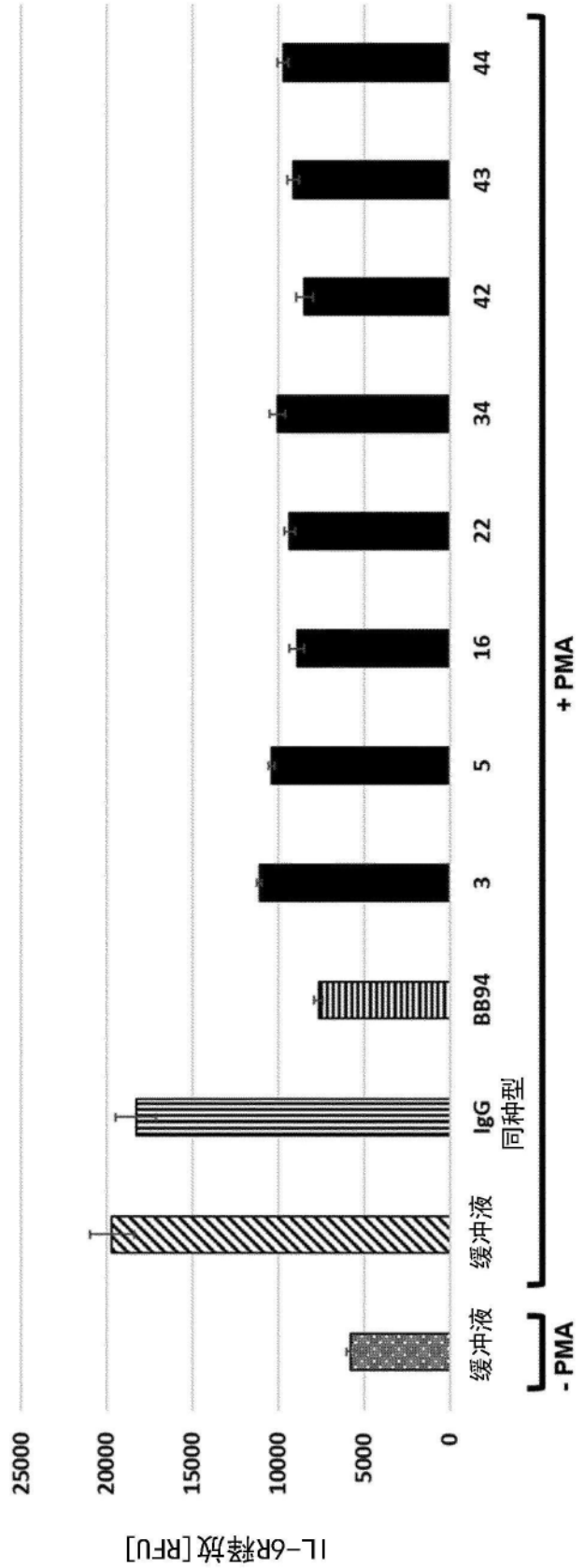

IL-6R释放[RFU]
25000
20000
15000
10000
5000
0
缓冲液
缓冲液
IgG
同种型
BB94
3
5
16
22
34
42
43
44
- PMA
+ PMA

图30a

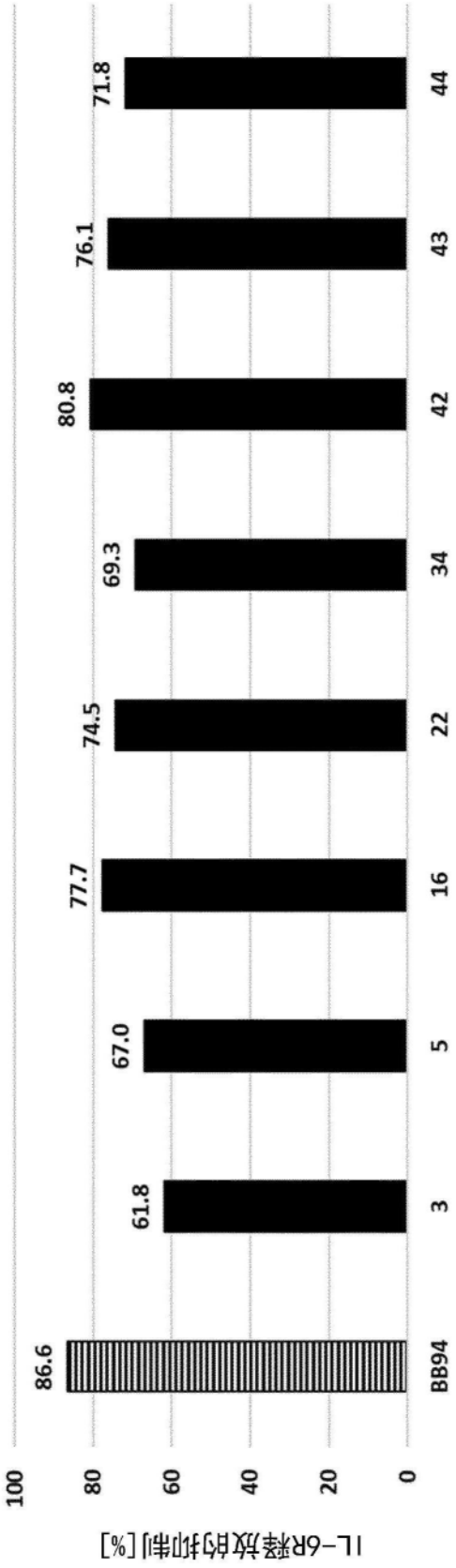

IL-6R释放的抑制[%]
100
80
60
40
20
0
86.6
61.8
67.0
77.7
74.5
69.3
80.8
76.1
71.8
BB94
3
5
16
22
34
42
43
44

图30b

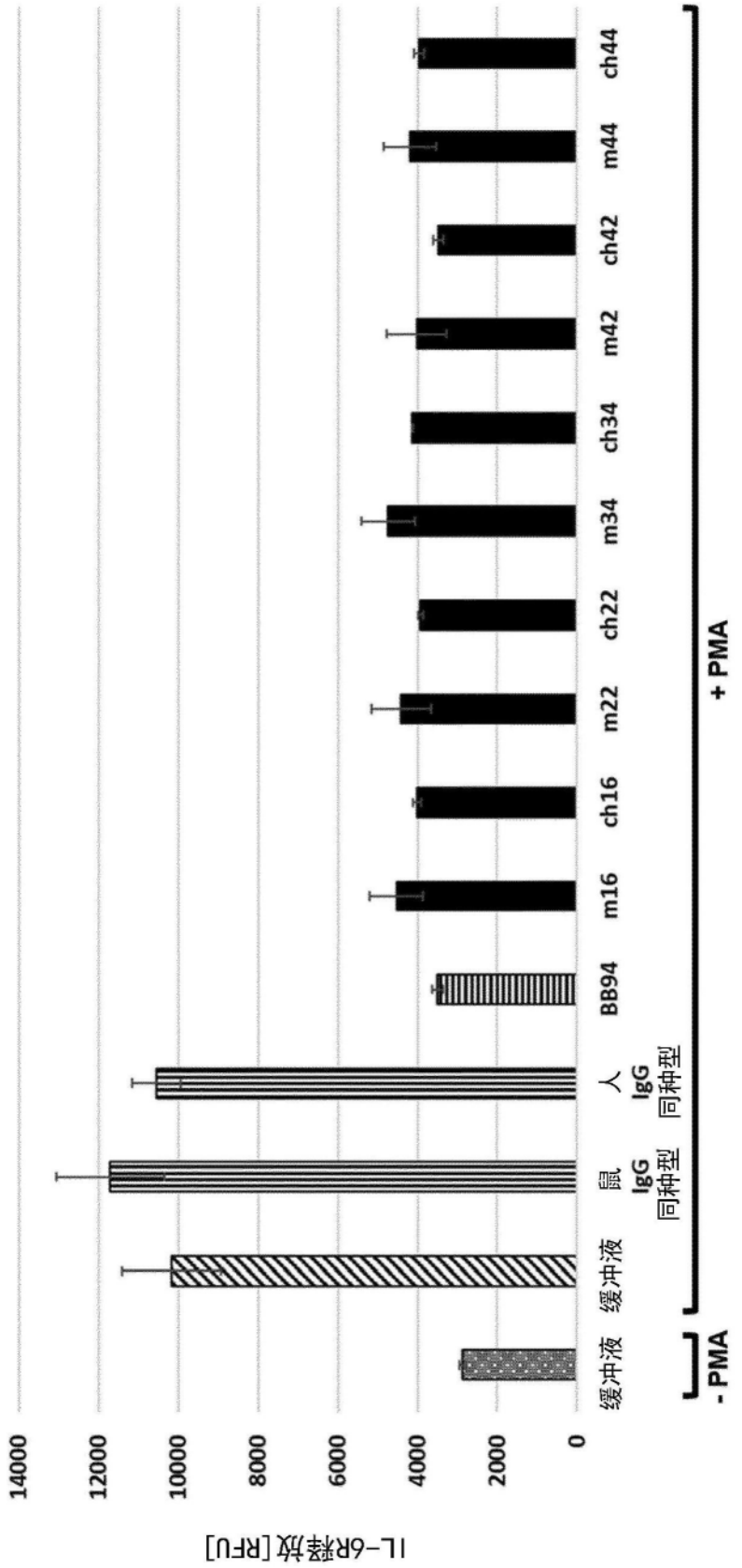

IL-6R释放[RFU]
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
缓冲液
缓冲液
鼠 IgG 同种型
人 IgG 同种型
BB94
m16
ch16
m22
ch22
m34
ch34
m42
ch42
m44
ch44
- PMA
+ PMA

图31a

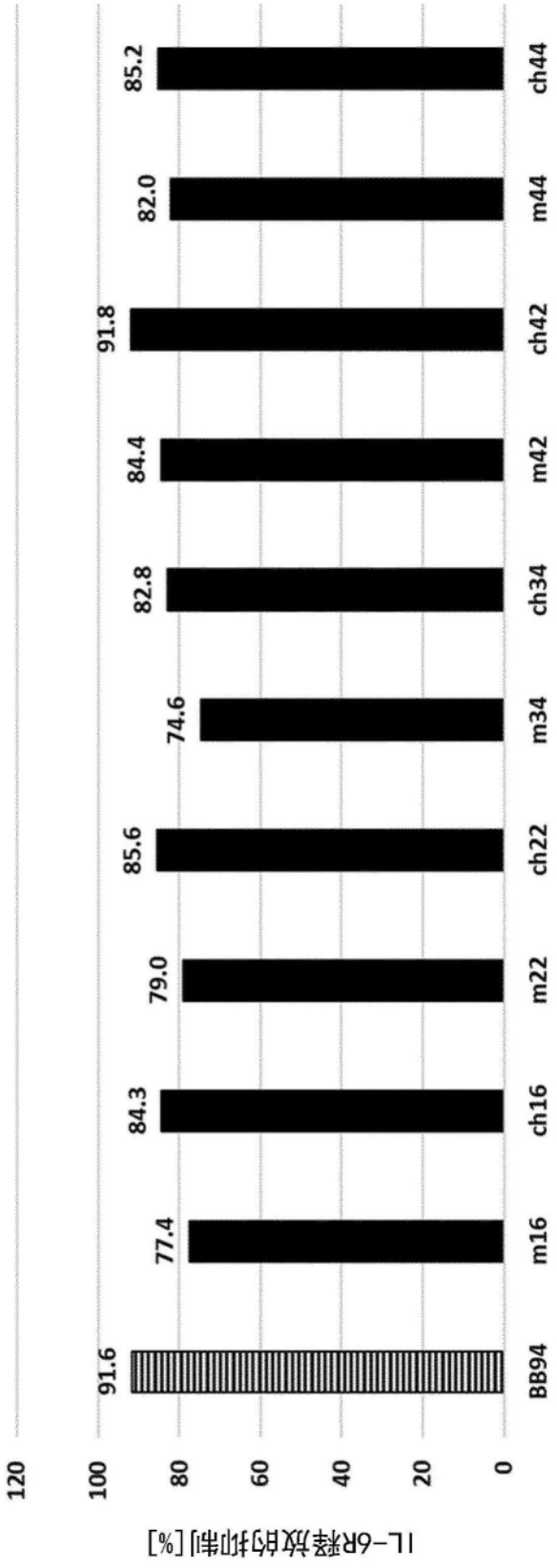

IL-6R释放的抑制[%]
120
100
80
60
40
20
0
91.6
77.4
84.3
79.0
85.6
74.6
82.8
84.4
91.8
82.0
85.2
BB94
m16
ch16
m22
ch22
m34
ch34
m42
ch42
m44
ch44

图31b

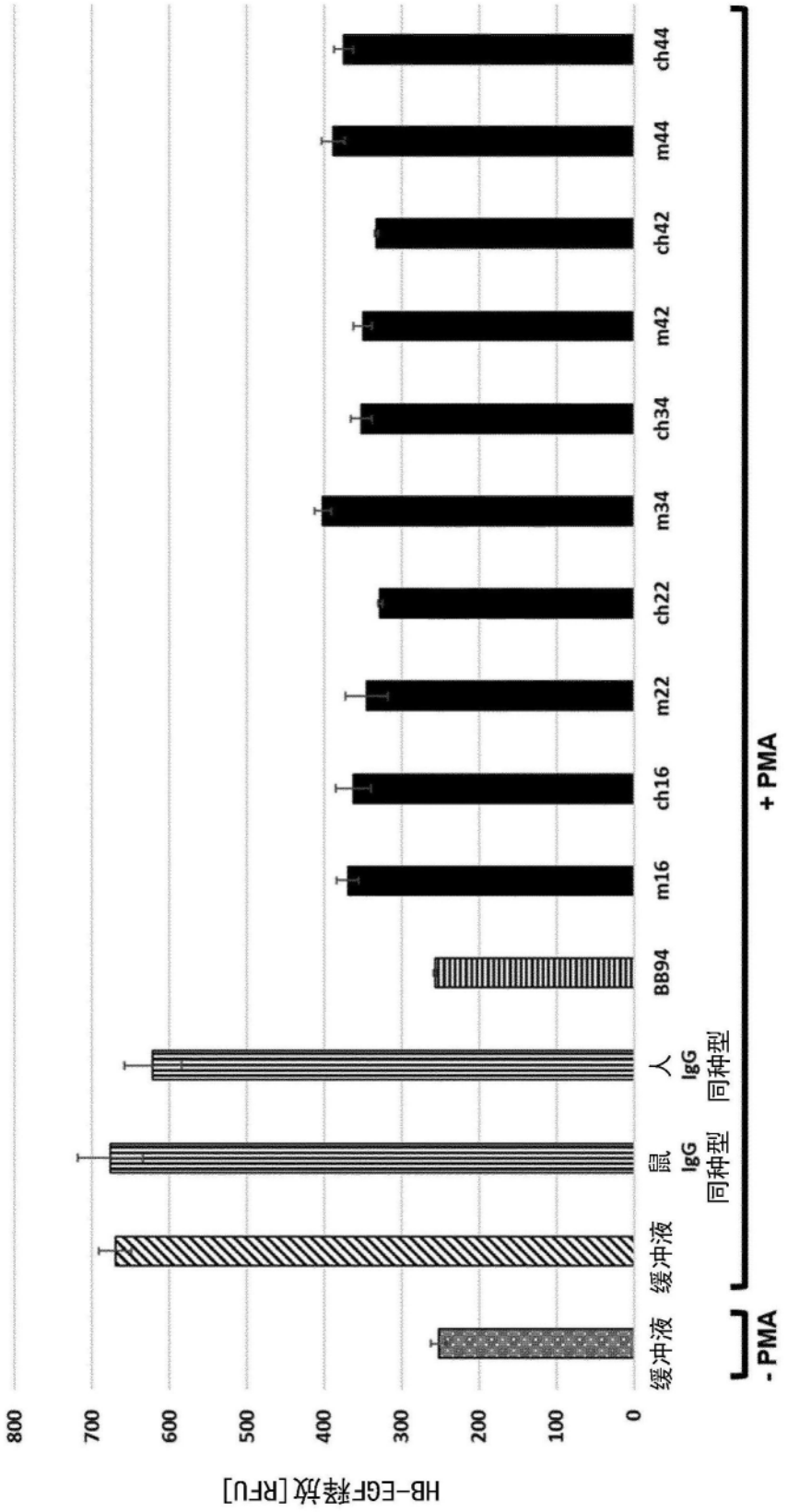

HB-EGF释放[RFU]
800
700
600
500
400
300
200
100
0
缓冲液
缓冲液
鼠 IgG 同种型
人 IgG 同种型
BB94
m16
ch16
m22
ch22
m34
ch34
m42
ch42
m44
ch44
- PMA
+ PMA

图32a

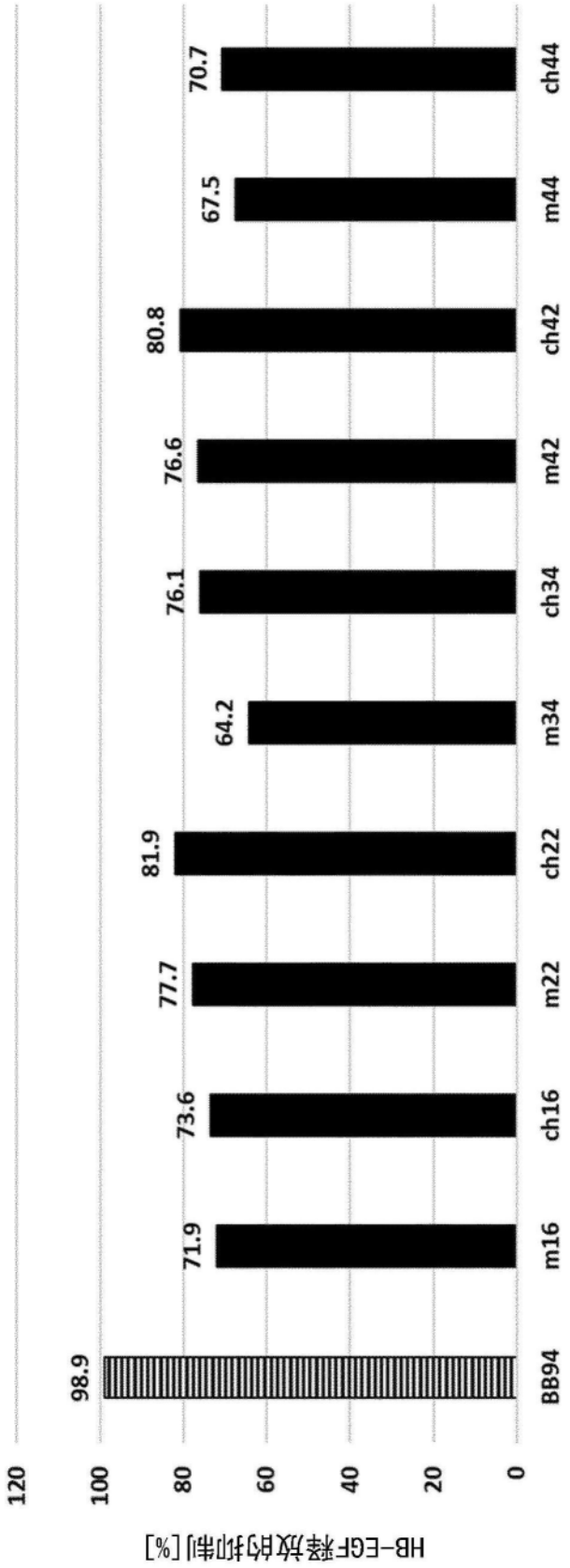

HB-EGF释放的抑制[%]
120
100
80
60
40
20
0
98.9
BB94
71.9
m16
73.6
ch16
77.7
m22
81.9
ch22
64.2
m34
76.1
ch34
76.6
m42
80.8
ch42
67.5
m44
70.7
ch44

图32b

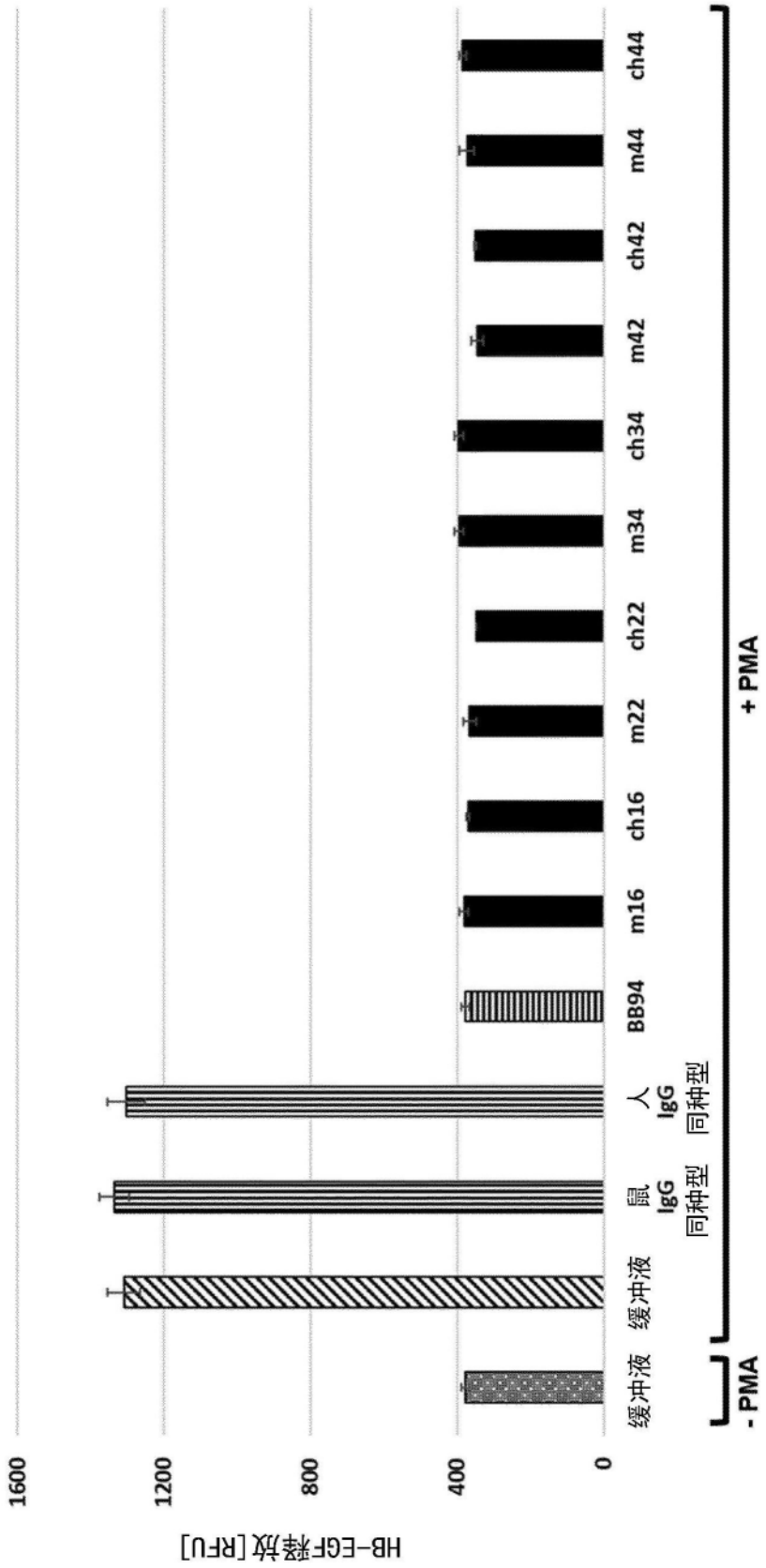

HB-EGF释放[RFU]
1600
1200
800
400
0
缓冲液
缓冲液
鼠IgG同种型
人IgG同种型
BB94
m16
ch16
m22
ch22
m34
ch34
m42
ch42
m44
ch44
- PMA
+ PMA

图33a

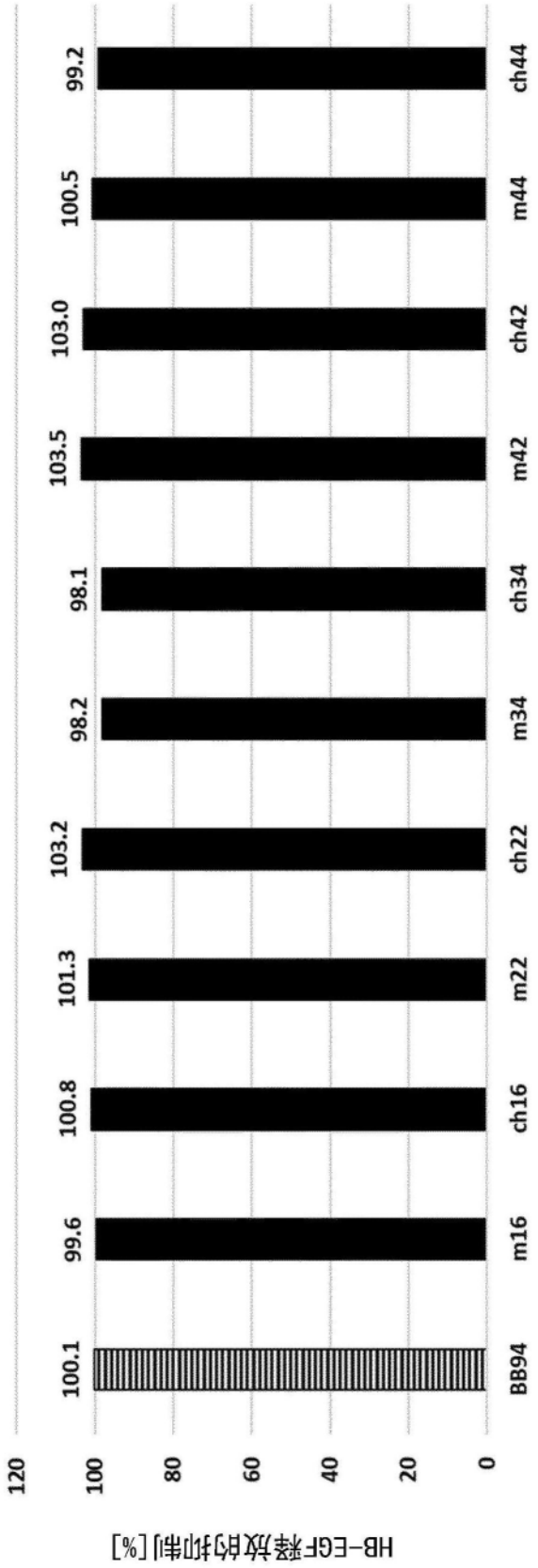

HB-EGF释放的抑制[%]
120
100
80
60
40
20
0
100.1
99.6
100.8
101.3
103.2
98.2
98.1
103.5
103.0
100.5
99.2
BB94
m16
ch16
m22
ch22
m34
ch34
m42
ch42
m44
ch44

图33b

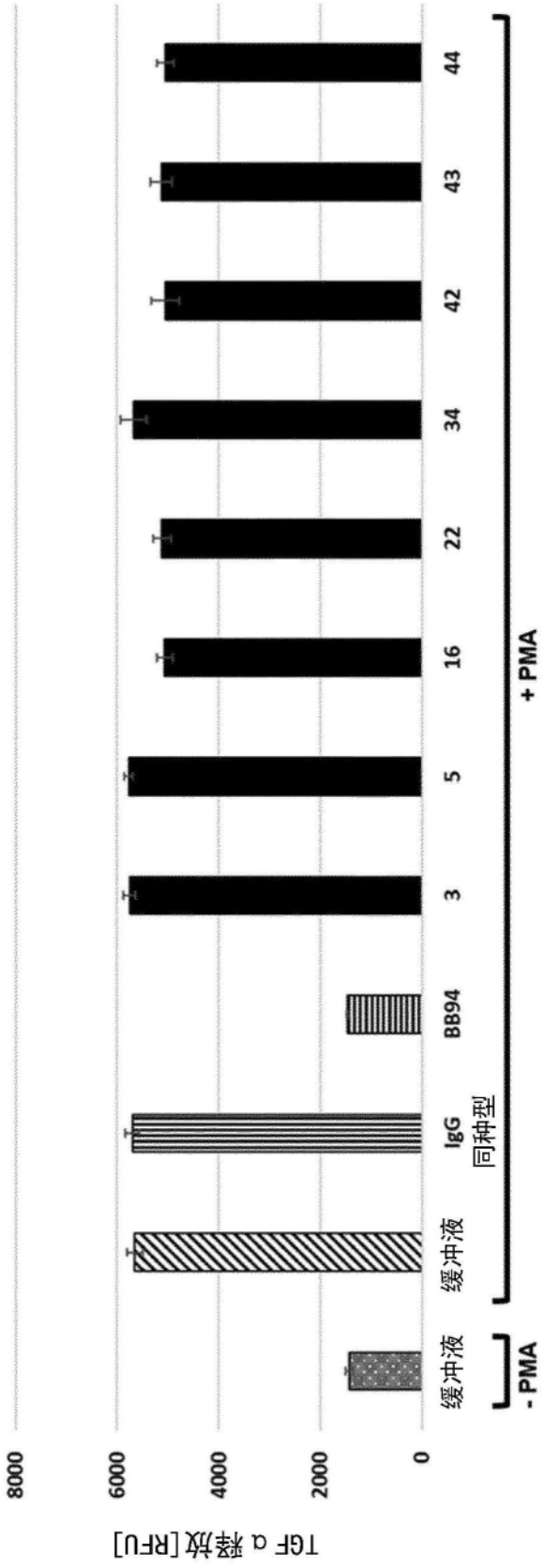

TGF α 释放[RFU]
8000
6000
4000
2000
0
缓冲液
缓冲液
IgG
同种型
BB94
3
5
16
22
34
42
43
44
- PMA
+ PMA

图34a

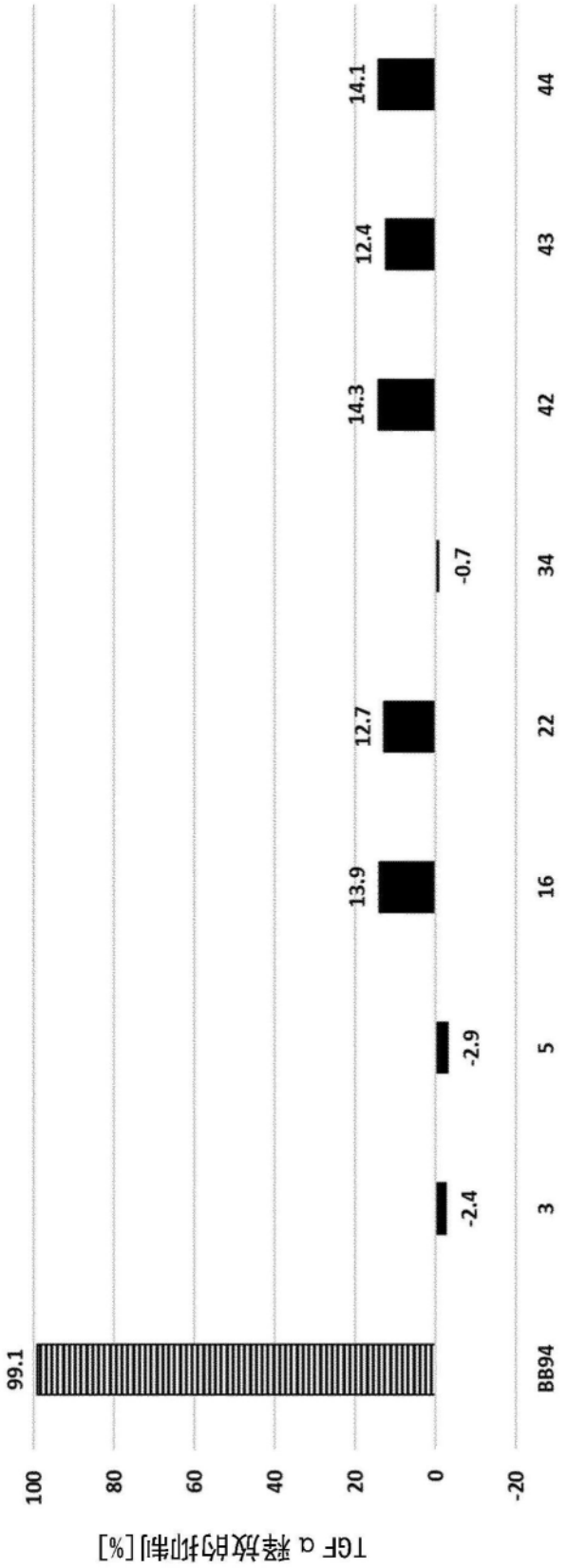

TGF α 释放的抑制[%]
100
80
60
40
20
0
-20
BB94
3
5
16
22
34
42
43
44
99.1
-2.4
-2.9
13.9
12.7
-0.7
14.3
12.4
14.1

图34b

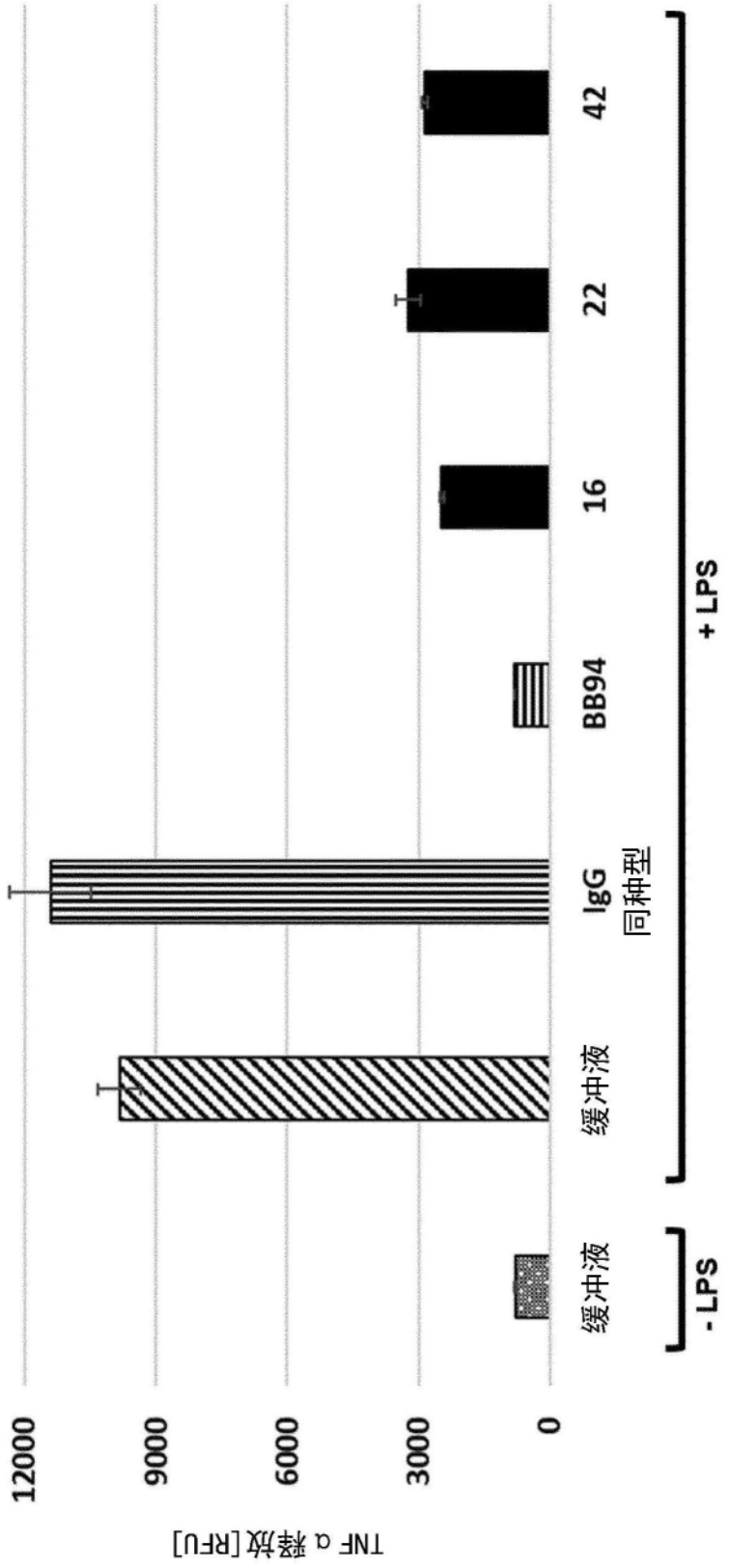

TNF α 释放[RFU]
12000
9000
6000
3000
0
缓冲液
缓冲液
IgG
同种型
BB94
16
22
42
- LPS
+ LPS

图35a




图35b

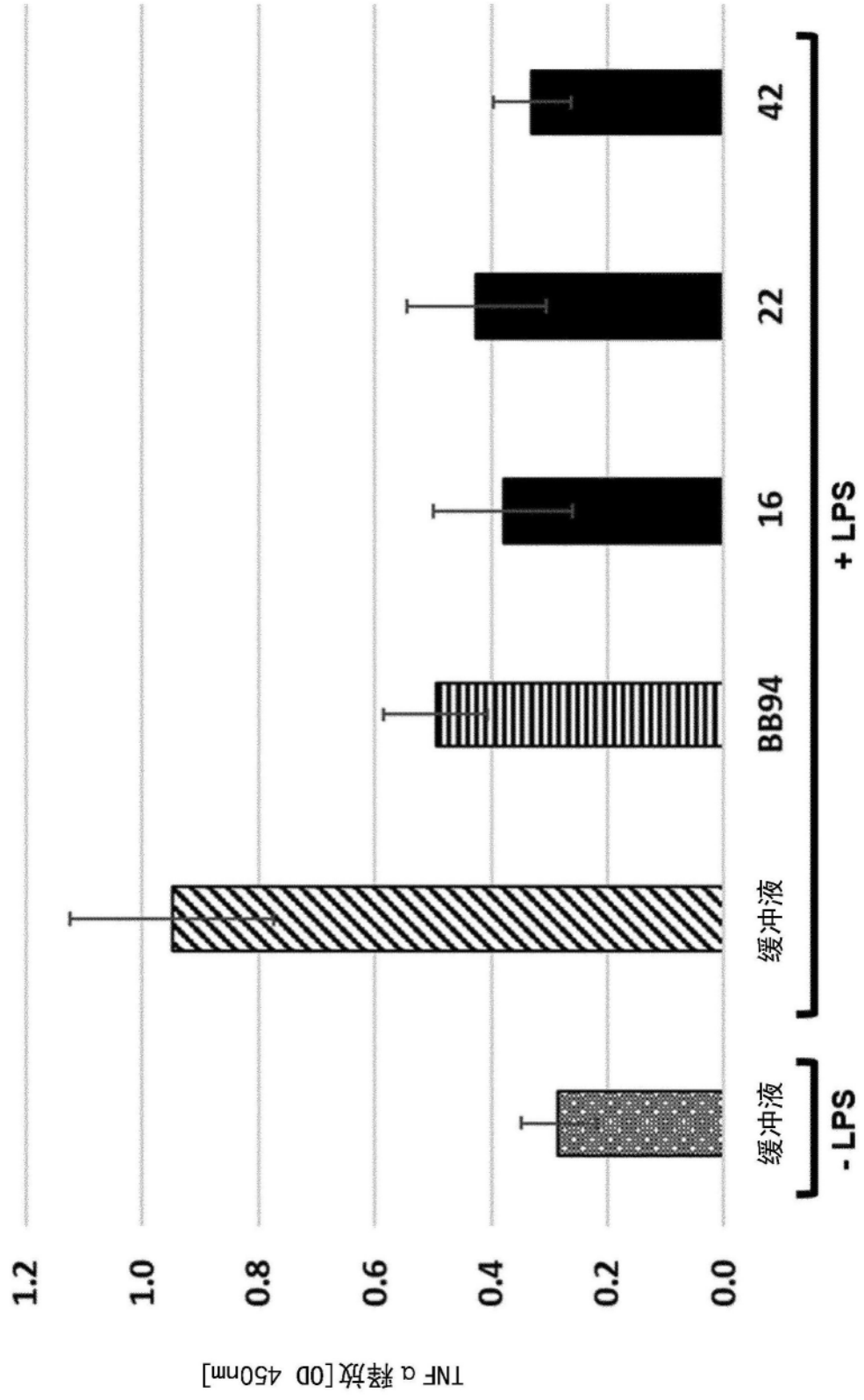



图36a

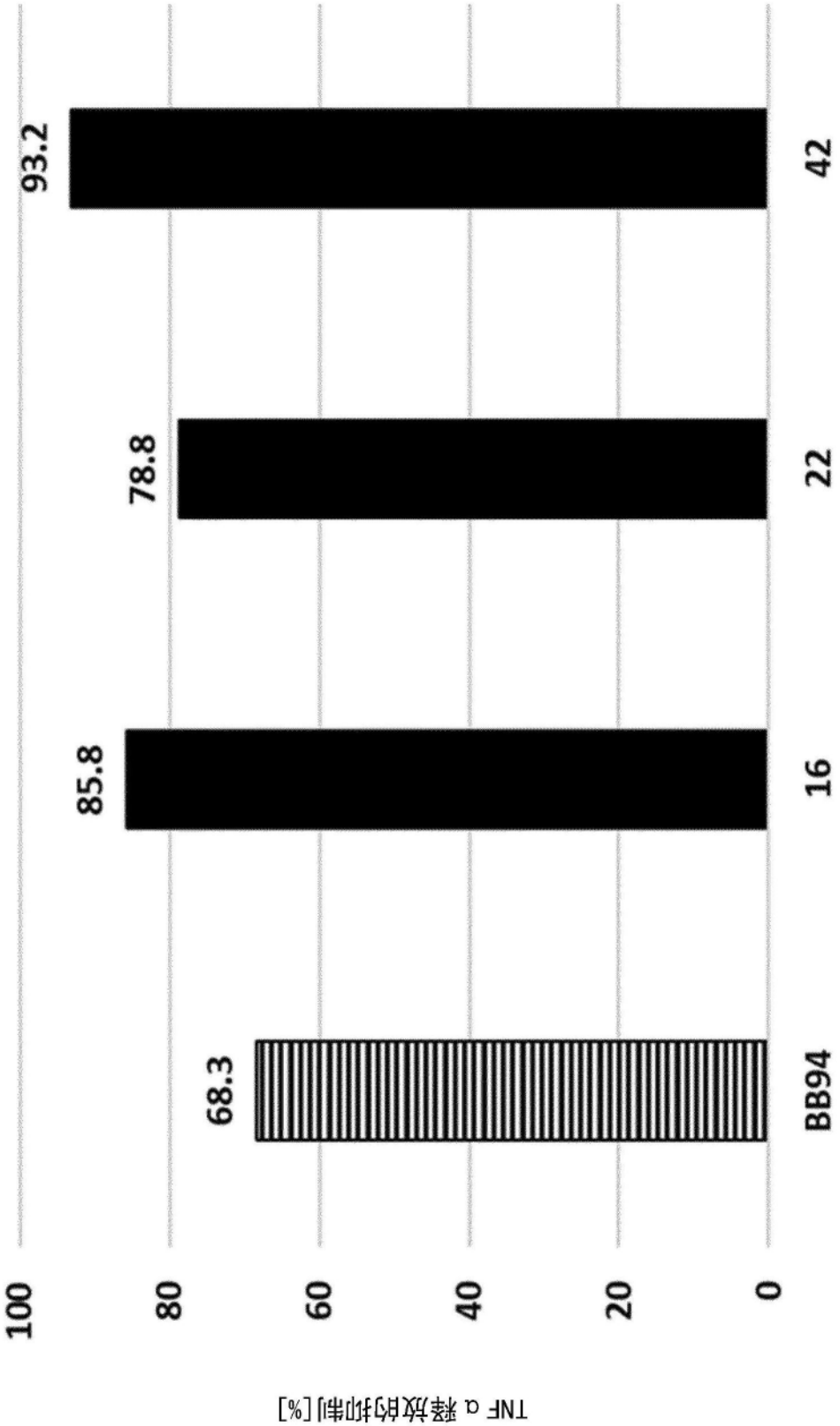



图36b

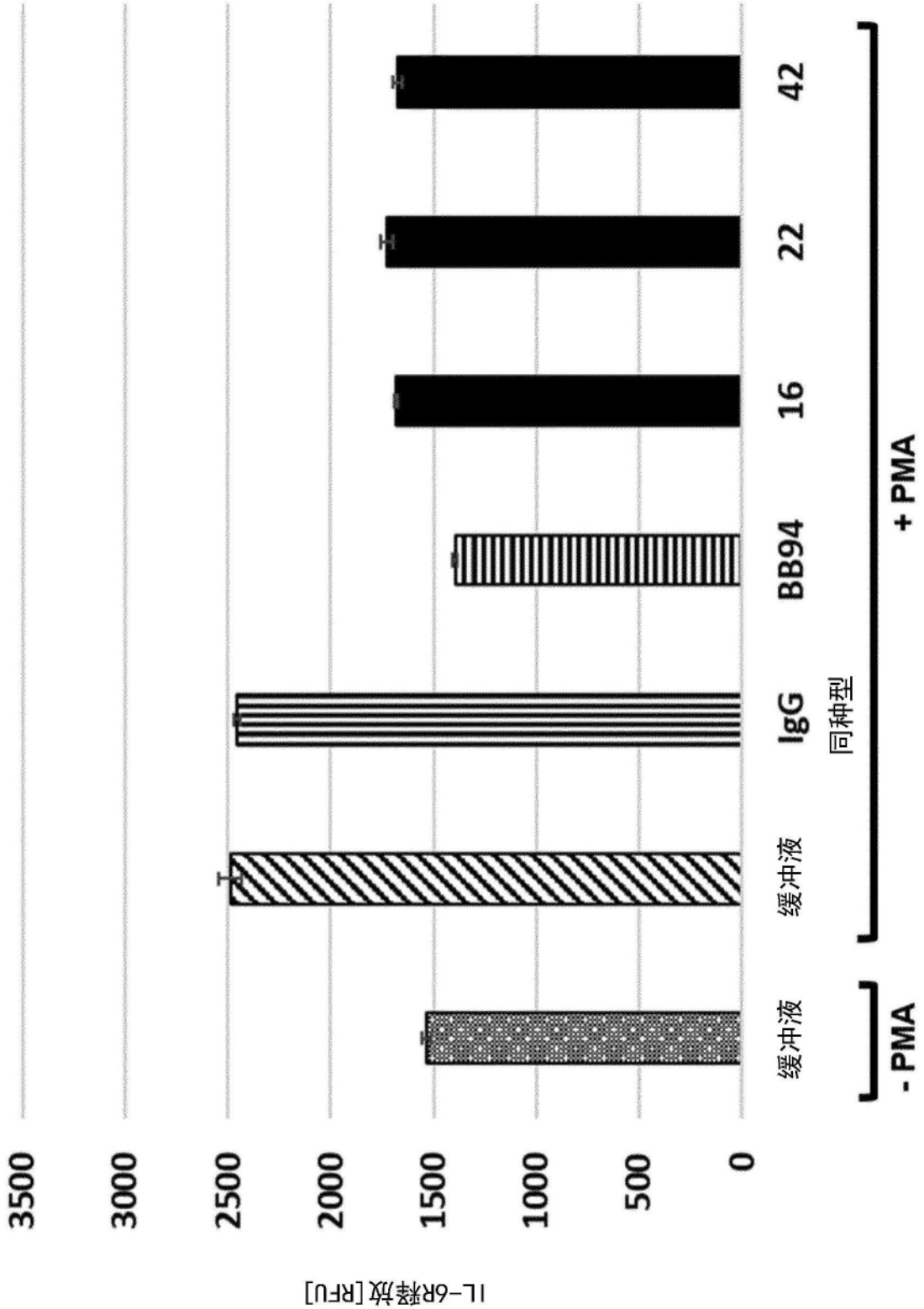

IL-6R释放[RFU]
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
缓冲液
缓冲液
IgG
BB94
16
22
42
同种型
- PMA
+ PMA

图37a

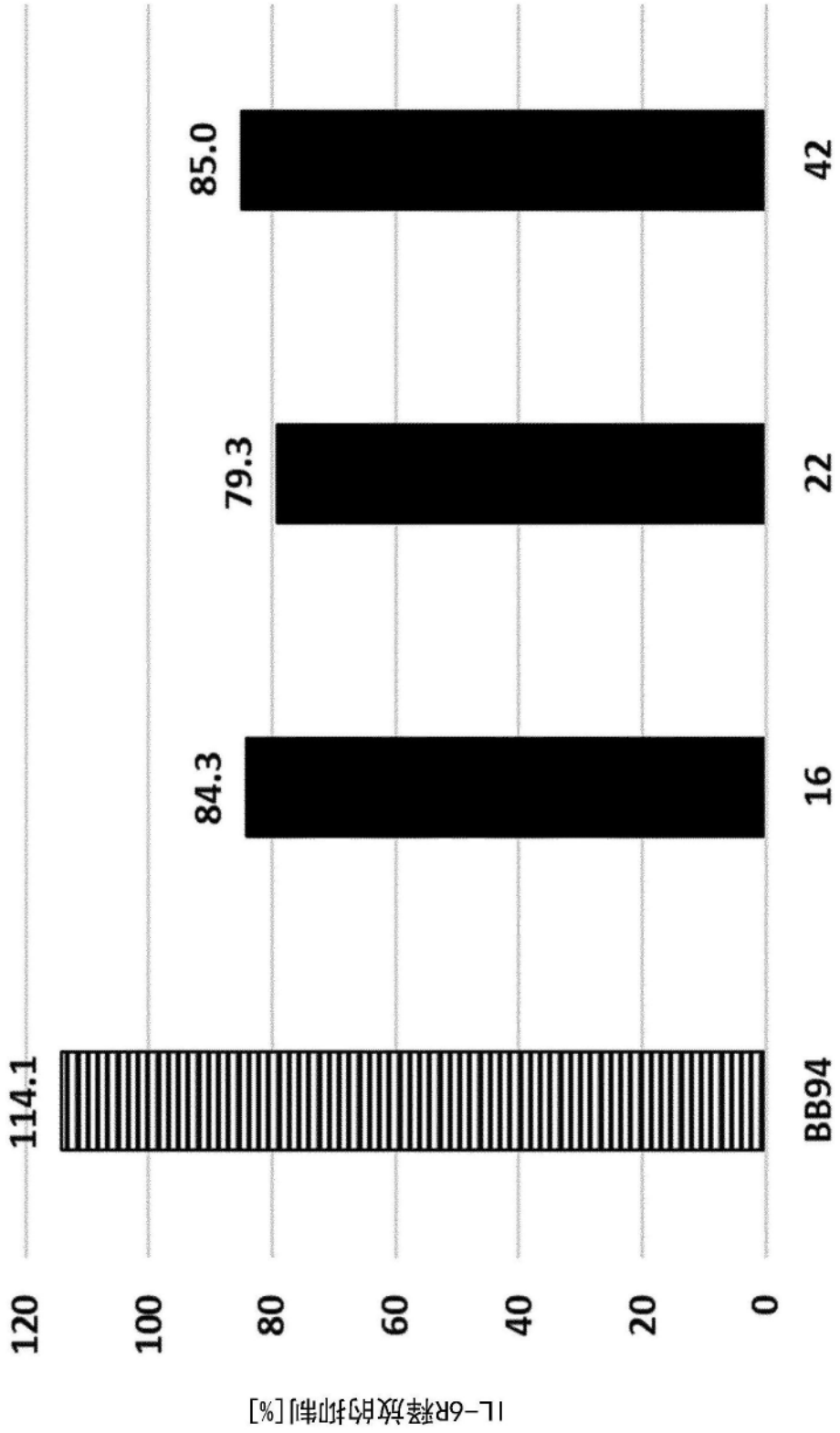



图37b

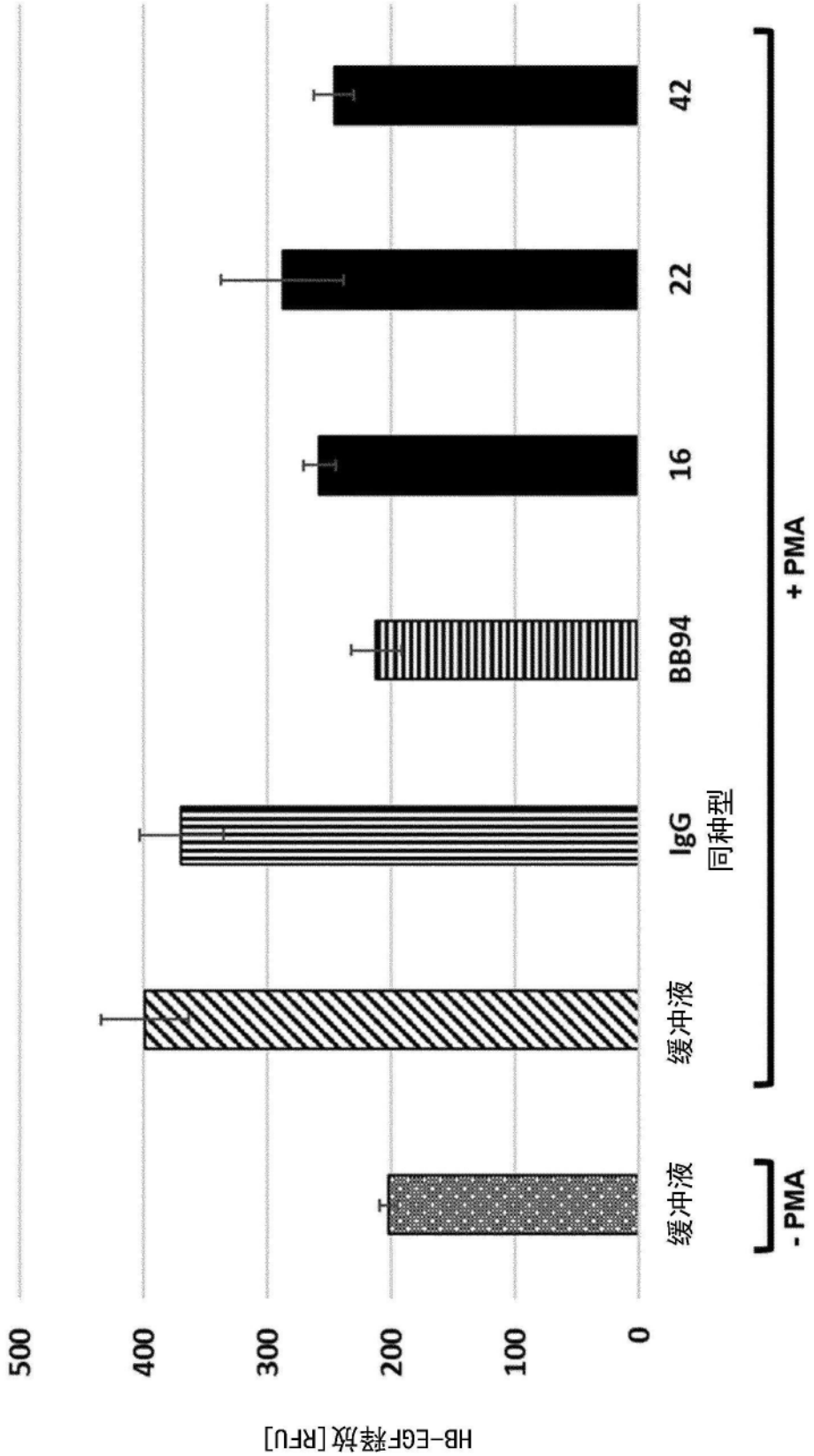

HB-EGF释放[RFU]
500
400
300
200
100
0
缓冲液
缓冲液
IgG
同种型
BB94
16
22
42
- PMA
+ PMA

图38a

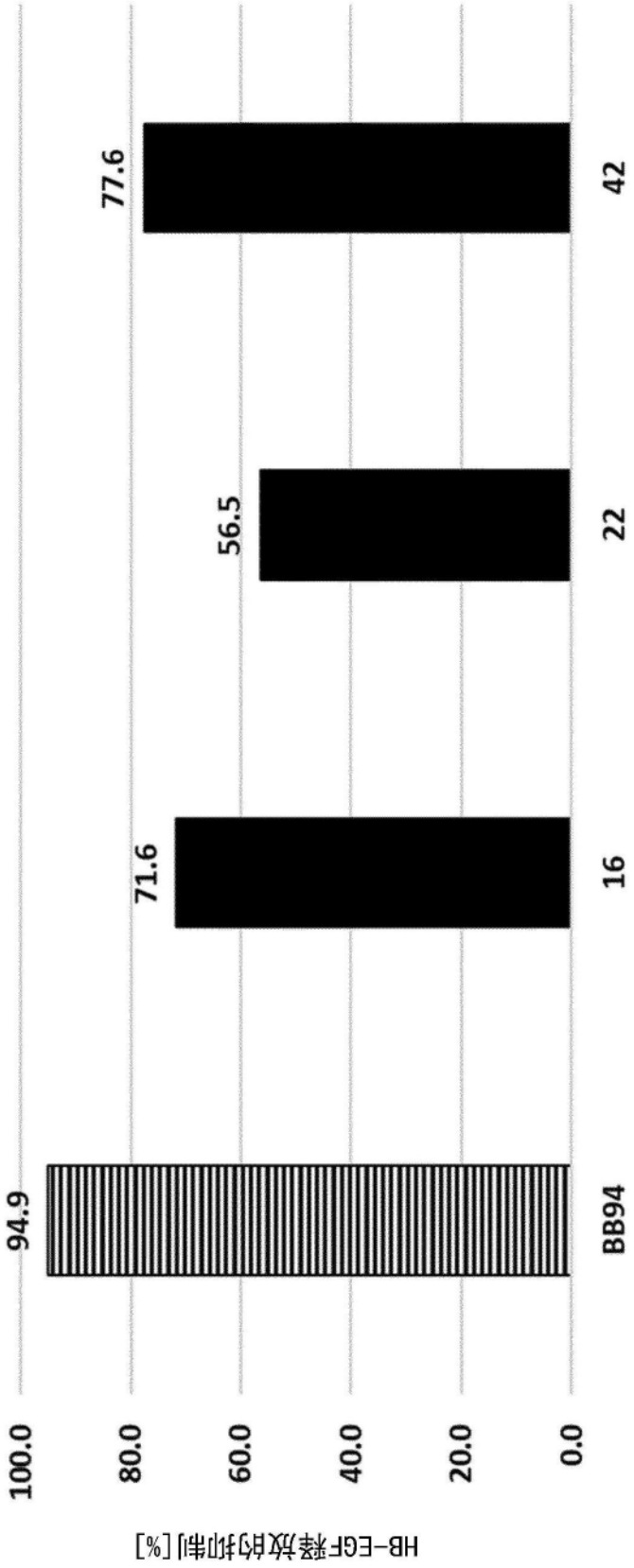

HB-EGF释放的抑制[%]
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
94.9
71.6
56.5
77.6
BB94
16
22
42

图38b

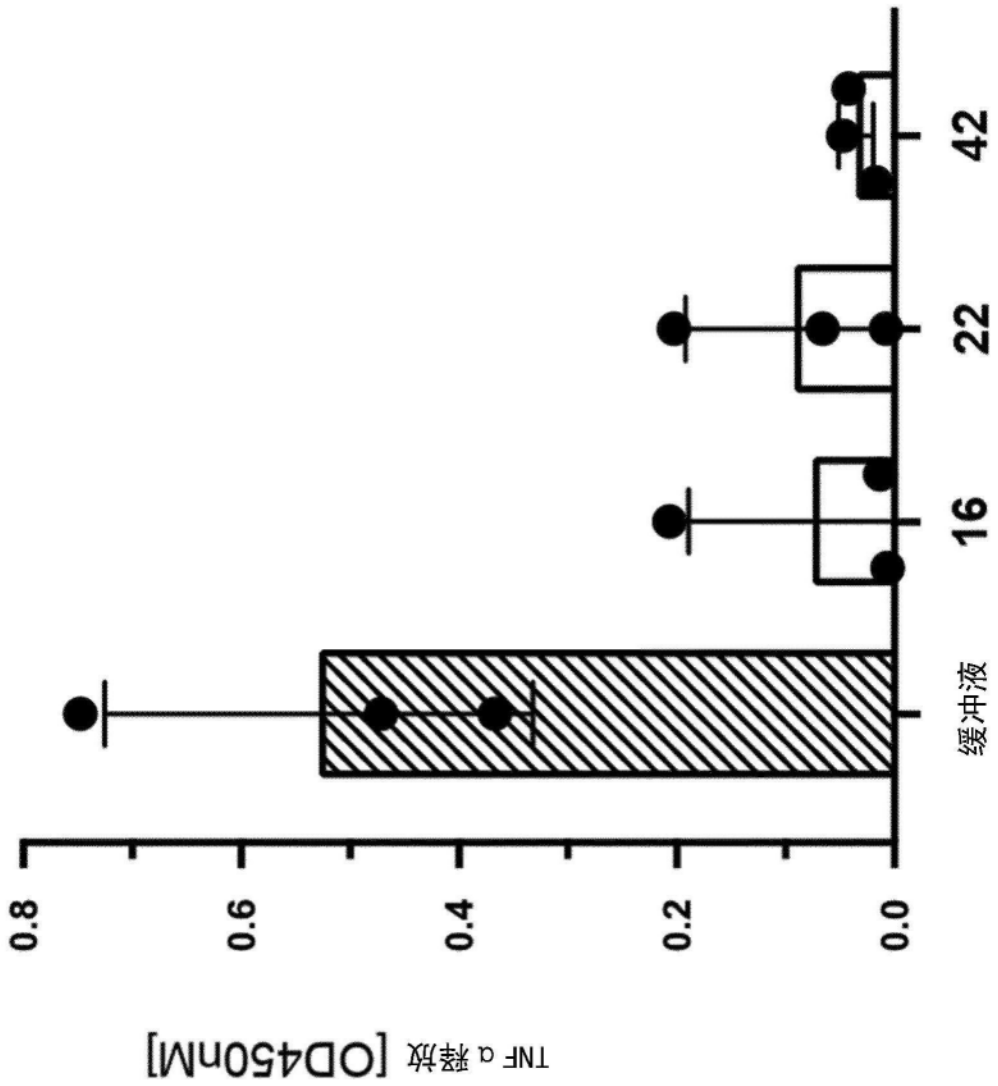



图39a

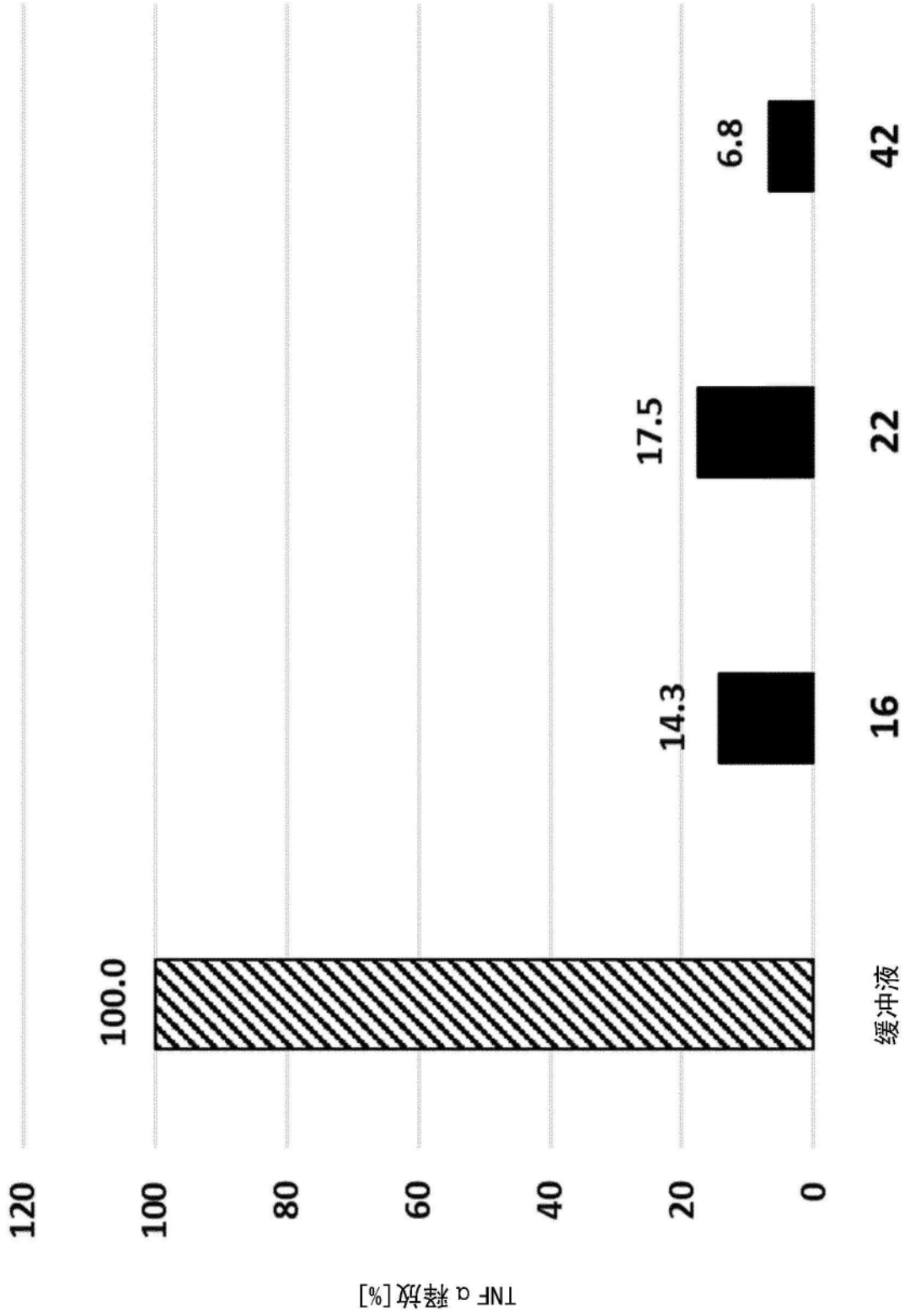



图39b

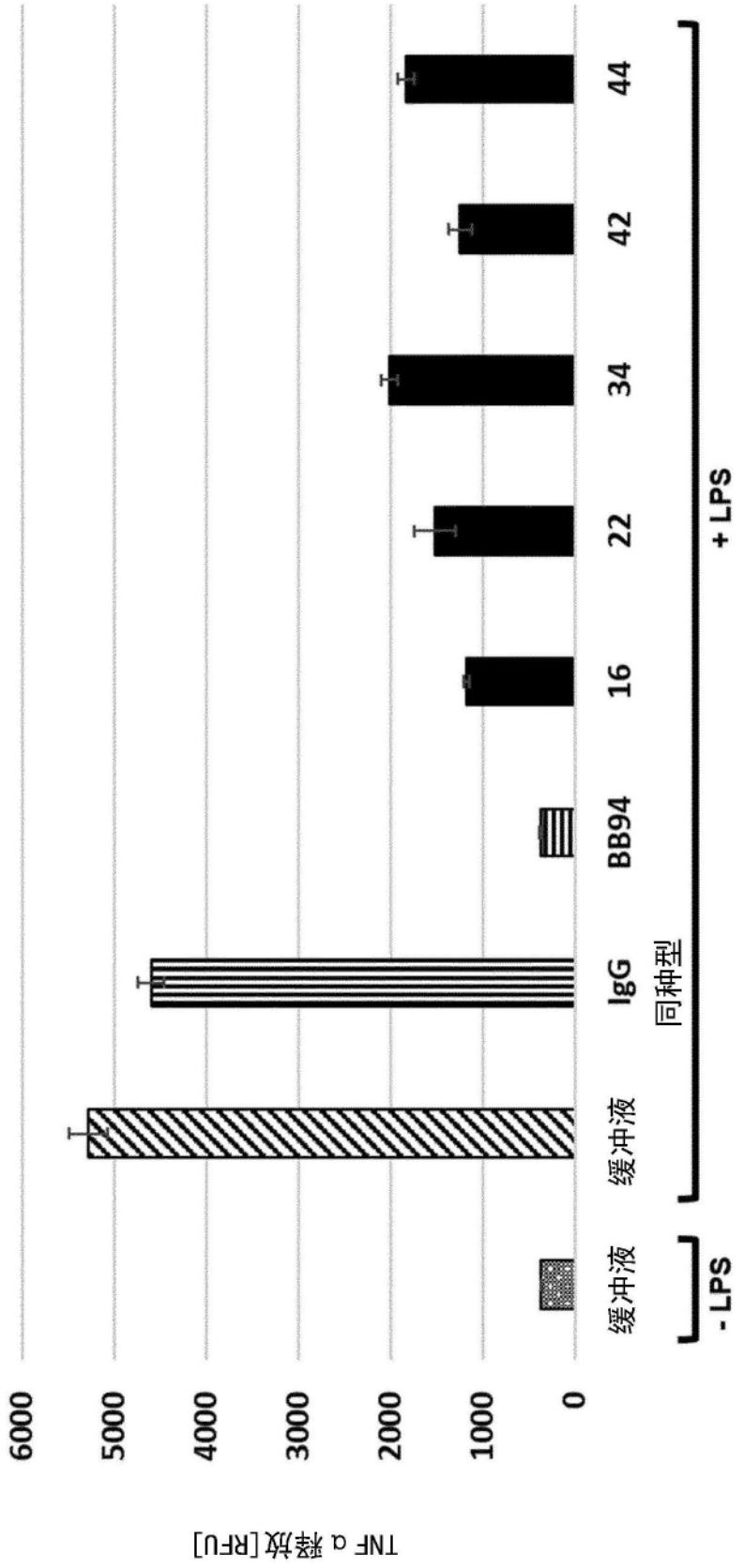

TNFα释放[RFU]
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
缓冲液
缓冲液
IgG
BB94
16
22
34
42
44
同种型
- LPS
+ LPS

图40a


99.9
83.6
76.5
66.6
82.1
70.2
BB94
16
22
34
42
44
0
20
40
60
80
100
TNF α 释放的抑制[%]

图40b

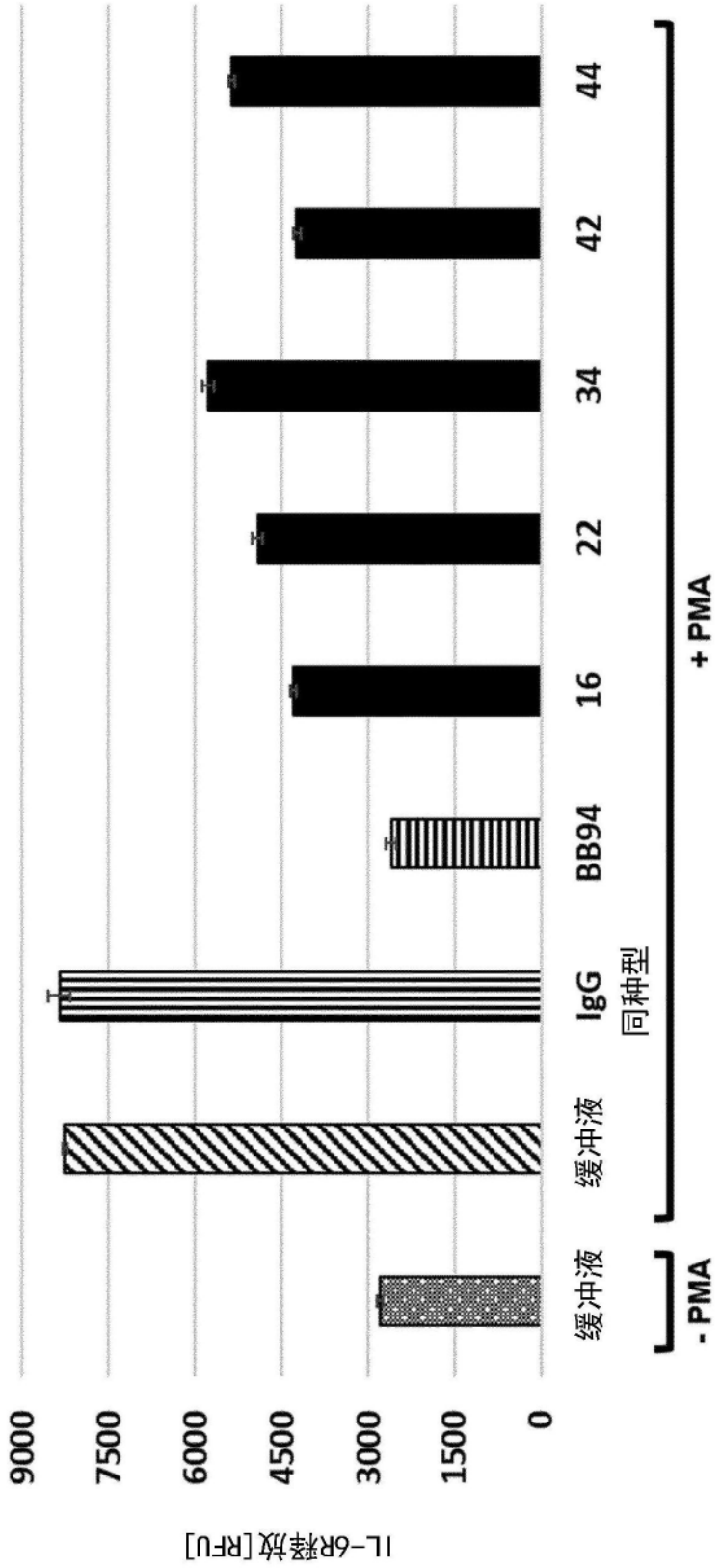

IL-6R释放[RFU]
9000
7500
6000
4500
3000
1500
0
缓冲液
缓冲液
IgG
BB94
16
22
34
42
44
同种型
- PMA
+ PMA

图41a

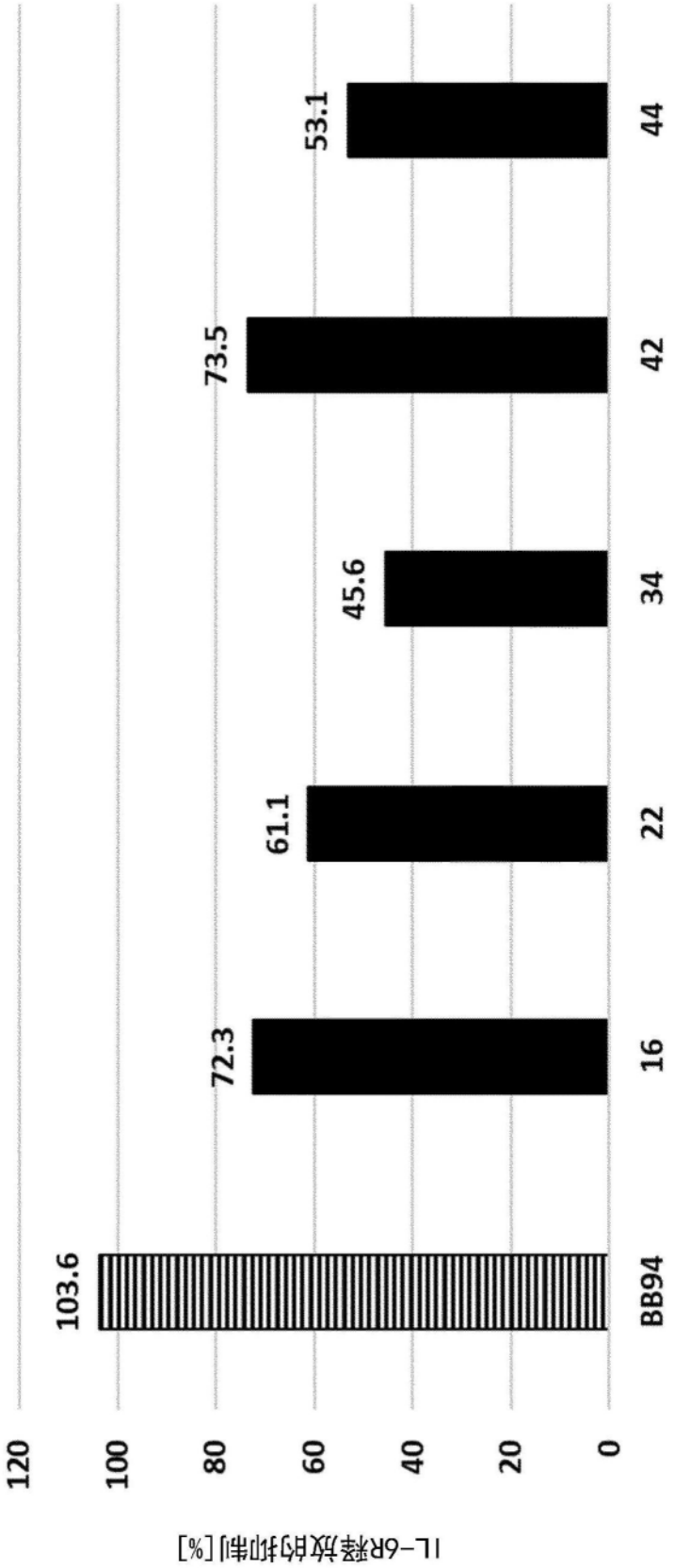

120
100
80
60
40
20
0
IL-6R释放的抑制[%]
103.6
72.3
61.1
45.6
73.5
53.1
BB94
16
22
34
42
44

图41b

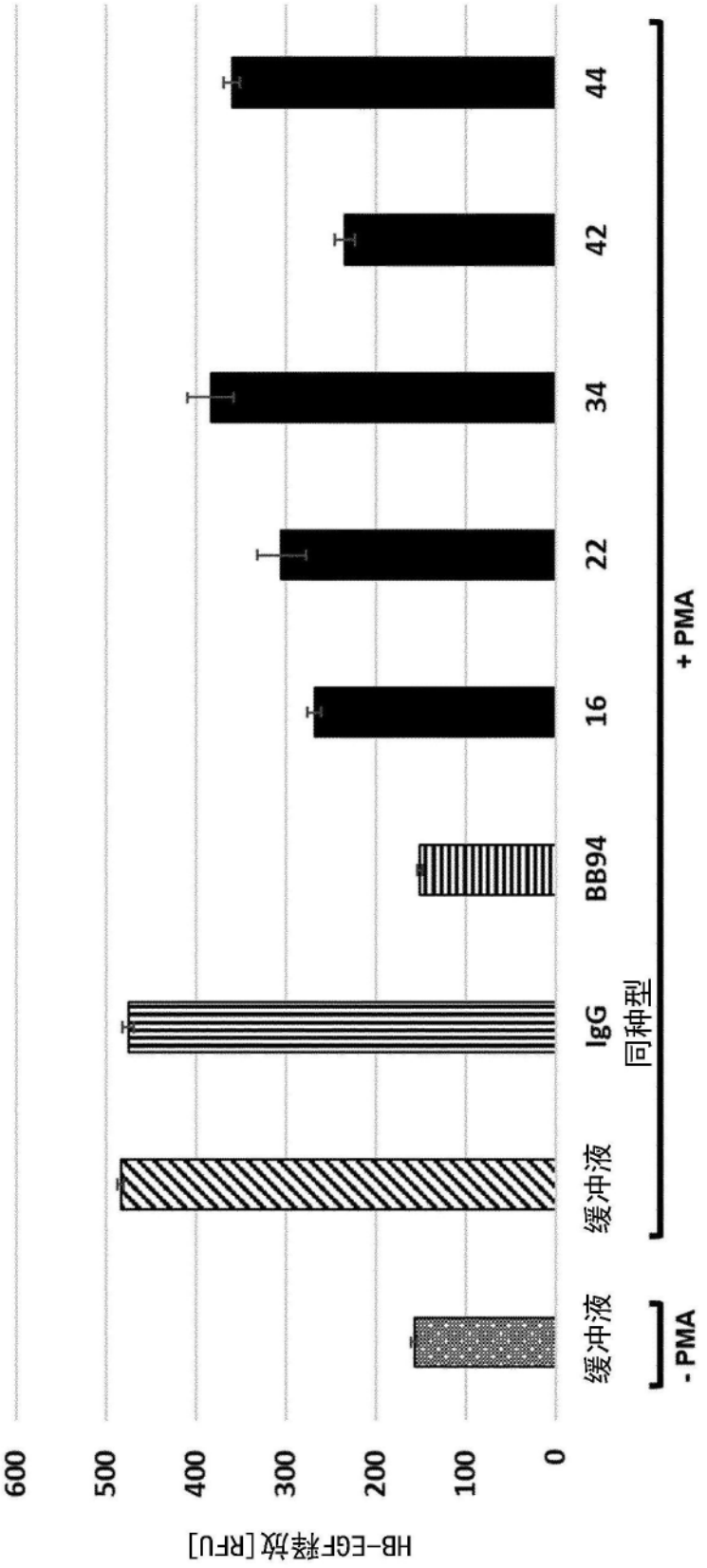

HB-EGF释放[RFU]
600
500
400
300
200
100
0
缓冲液
缓冲液
IgG
BB94
16
22
34
42
44
同种型
- PMA
+ PMA

图42a

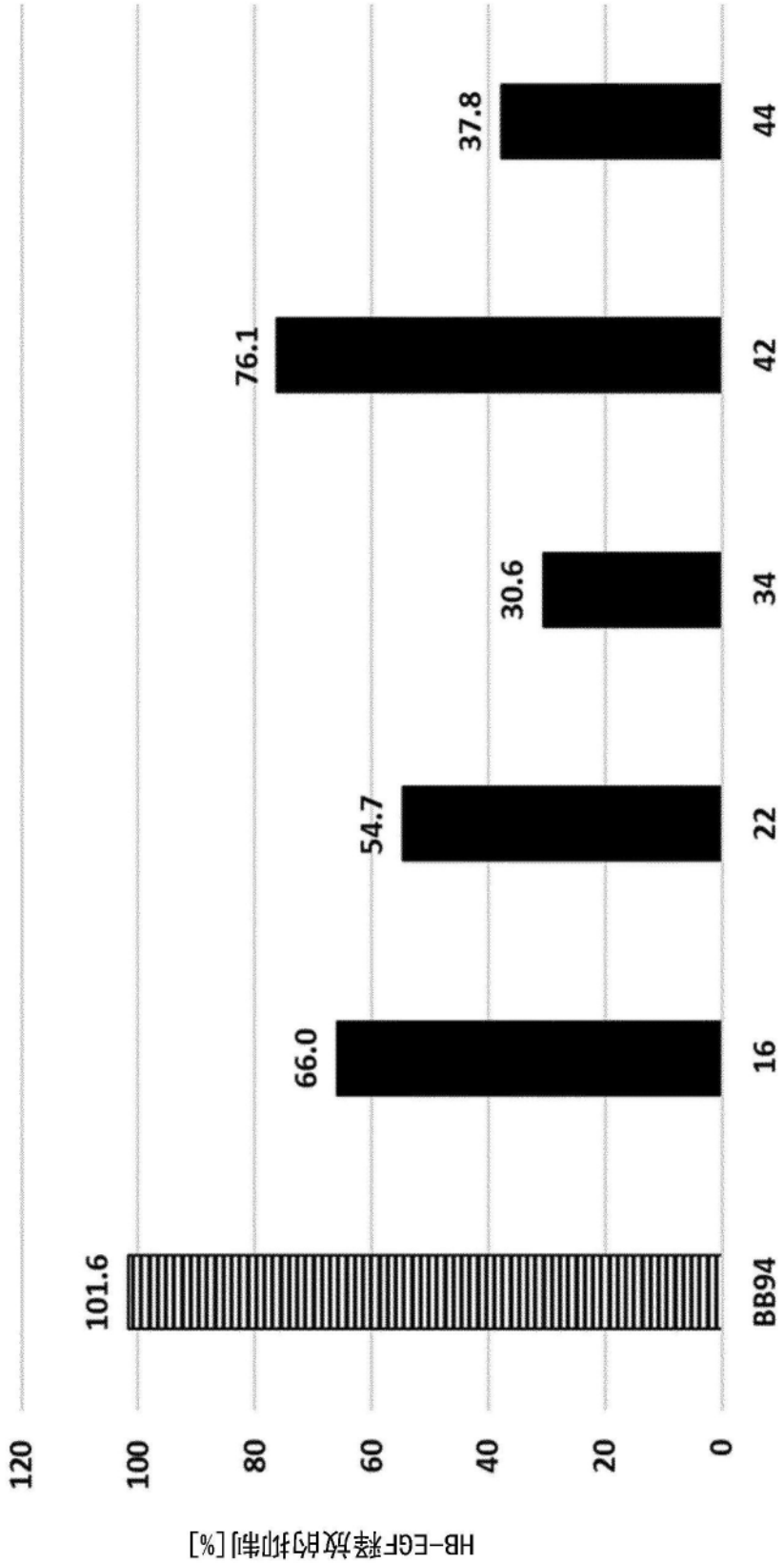

HB-EGF释放的抑制[%]
120
100
80
60
40
20
0
101.6
66.0
54.7
76.1
30.6
37.8
BB94
16
22
42
34
44

图42b