



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109867723 B

(45) 授权公告日 2022.06.17

(21) 申请号 201711269749.6

CA 2467719 A1,2003.05.13

(22) 申请日 2017.12.05

US 2014112935 A1,2014.04.24

RU 2550262 C1,2015.05.10

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109867723 A

Haihong Zhong等.A Novel IL6 Antibody Sensitizes Multiple Tumor Types to Chemotherapy Including Trastuzumab Resistant Tumors.《Cancer Res》.2016,第76卷(第2期),

(43) 申请公布日 2019.06.11

Frits van Rhee等.Siltuximab, a Novel Anti-Interleukin-6 Monoclonal Antibody, for Castleman's Disease.《JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY》.2010,第28卷(第23期),

(73) 专利权人 南京金斯瑞生物科技有限公司
地址 211100 江苏省南京市江宁区科学园雍熙路28号

Corey Casper等.Analysis of Inflammatory and Anemia-Related Biomarkers in a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Siltuximab (Anti-IL6 Monoclonal Antibody) in Patients With Multicentric Castleman Disease.《Clin Cancer Res》.2015,第21卷(第19期),

(72) 发明人 殷刘松 林峰 王磊 许云云
丁力

审查员 田晓蓉

(74) 专利代理机构 北京华睿卓成知识产权代理
事务所(普通合伙) 11436
专利代理师 程淼

权利要求书1页 说明书12页
序列表12页 附图4页

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

G12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2006046661 A1,2006.05.04

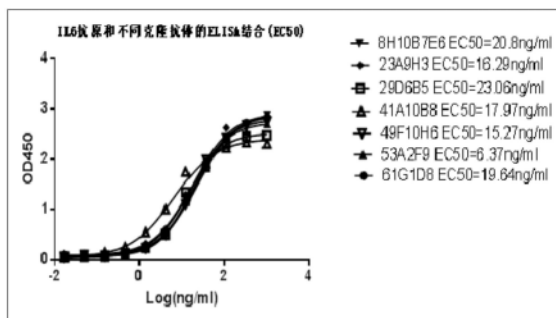
EP 2722341 A1,2014.04.23

(54) 发明名称

抗人IL6单克隆抗体及其制备方法和用途

(57) 摘要

本发明提供了抗人IL6单克隆抗体、其重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列,以及它们的编码核苷酸序列。本发明还提供了该抗人IL6单克隆抗体的制备方法和在制备抗肿瘤药物方面的用途。本发明提供的抗人IL6单克隆抗体可通过阻断IL6信号通路来抑制细胞增殖,进而实现肿瘤免疫治疗的目的。



1. 抗人IL6单克隆抗体,其包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区包括LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中
HCDR1的氨基酸序列为DAWMD;
HCDR2的氨基酸序列为EIRSKTYHPATYYTKSVRG;
HCDR3的氨基酸序列为PRYYGGYFDY;
LCDR1的氨基酸序列为RASESVDNYGMSFMN;
LCDR2的氨基酸序列为TASNQGS;
LCDR3的氨基酸序列为QQSKEVPYT。
2. 如权利要求1所述的抗人IL6单克隆抗体,其中所述重链可变区包括如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列,所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列。
3. 如权利要求1或2所述的抗人IL6单克隆抗体,其与IL6之间的解离常数KD小于10 nM。
4. 如权利要求1或2所述的抗人IL6单克隆抗体,其与IL6之间的解离常数KD小于1 nM。
5. 如权利要求1或2所述的抗人IL6单克隆抗体,其抑制IL6对TF-1细胞的增殖促进作用。
6. 分离的多核苷酸,其编码权利要求1或2所述的抗人IL6单克隆抗体。
7. 如权利要求6所述的多核苷酸,其包括编码所述抗人IL6单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列和编码所述抗人IL6单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列,编码所述重链可变区的核苷酸序列包括如SEQ ID NO:14所示的核苷酸序列,编码所述轻链可变区的核苷酸序列包括如SEQ ID NO:16所示的核苷酸序列。
8. 包括权利要求6或7所述的多核苷酸的表达载体。
9. 包括权利要求8所述的表达载体的宿主细胞。
10. 如权利要求9所述的宿主细胞,其为HEK293-6E细胞。
11. 一种制备抗人IL6单克隆抗体的方法,包括以权利要求8所述的表达载体转染感受态细胞,并对所述细胞进行培养。
12. 药物组合物,其包含有效量的权利要求1至5中任一项所述的抗人IL6单克隆抗体和药学上可接受的载体。

抗人IL6单克隆抗体及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明属于肿瘤免疫疗法和分子免疫学领域,尤其是涉及抗人IL6的单克隆抗体。本发明还涉及该抗人IL6单克隆抗体的制备方法以及它们的用途。

背景技术

[0002] 免疫系统是一种宿主防御系统,为了正常地发挥作用,免疫系统必须能够灵敏的检测到外来病原体的入侵,并将它们与生物体自身的健康组织区分开来。脊椎动物的免疫系统是一个由多种器官、组织、细胞和分子组成的功能性系统,是机体防卫外源物入侵的最有效的机制,这些免疫器官、组织、细胞和分子相互协作,相互制衡,从而达到保护机体免受外来侵染和维持体内平衡的作用(Janeway et al., Immunology: The Immune System in Health and Disease. New York: Garland Science, 2005)。这种相互协作、相互制衡需要众多免疫检查点蛋白和细胞因子的协调,刺激性免疫检查点蛋白增强免疫系统的防御反应,抑制性免疫检查点蛋白控制过强的免疫系统,防止产生自身免疫反应。癌变是正常体细胞失去正常细胞调节功能,基因突变累计到一定程度的结果。在肿瘤治疗中,肿瘤免疫治疗被广泛运用,它已成为肿瘤治疗的一个最重要的手段。肿瘤免疫治疗通过增强人体的免疫功能,使人体T细胞能更好的识别癌变细胞,从而起到杀伤癌细胞的作用。例如,针对抑制性免疫检查点蛋白PD1的抗体Pembrolizumab和针对CTLA4的Ipilimumab抗体已经被批准治疗多种癌症适应症。然而,由于肿瘤异质性和肿瘤免疫间的肿瘤间差异,这些基于免疫检查点蛋白的抗体药物临床益处还非常有限。

[0003] 细胞因子里的最主要类别白细胞介素(Interleukins)具有引导免疫系统细胞成熟、分化、迁移和粘附的多种免疫调节功能。在肿瘤发生中,这些细胞因子直接刺激肿瘤部位的免疫效应物和基质细胞,并增强细胞毒性效应细胞的肿瘤细胞识别(Yoshimoto et al., Immunotherapy 5:825-844, 2009)。最近的一些研究表明白细胞介素参与许多肿瘤相关的分子机制,并且已被利用来开发许多基于细胞因子的癌症治疗方法。然而,肿瘤细胞有多种方法进行免疫逃逸,包括创建安全的肿瘤微环境、分泌抑制免疫系统的细胞因子和抗炎性细胞因子、以及招募或转化抑制免疫反应的炎性细胞,包括调节性T(Treg)细胞、骨髓源性抑制细胞(MDSC)和树突状细胞(DC)(Stewart et al., Cancer Metastasis Rev. 30:125-140, 2011)。白细胞介素家族成员存在于肿瘤微环境中与各种生物分子如癌症干细胞、微小RNA、上皮间充质细胞相互作用。因此,能够基于白细胞介素影响肿瘤形成机制的原理,开发出高效的癌症免疫疗法。在过去十几年中,有一些包括白细胞介素2(IL2)、白细胞介素6(IL6)、白细胞介素7(IL7)、白细胞介素12(IL12)、白细胞介素18(IL18)和白细胞介素21(IL21)的相关疗法已进入患者临床试验阶段。

[0004] 白细胞介素6(IL6)在体内有多种功能,其中该因子可以导致调节性T细胞(Treg)失衡并分泌多种炎症物质。研究表明患者血清IL6浓度升高与各种癌症(例如多发性骨髓瘤,非小细胞肺癌,结肠直肠癌,肾细胞癌,前列腺癌,乳腺癌和卵巢癌)的肿瘤分期和患者生存紧密相关。并且,IL6能够通过诱导在乳腺癌细胞中诱导上皮间质细胞转换产生具有干细胞

特质的CD44阳性细胞。有证据表明肿瘤相关内皮细胞中IL6的水平与肿瘤干细胞的致瘤性直接相关(Int. J. Mol. Sci. 16:1691-1710, 2015)。因此,阻断IL6信号传导是癌症的潜在治疗策略。强生制药的抗人IL6的Siltuximab抗体在2014年被美国药监局批准治疗Castleman病,并正在进行针对多发性骨髓瘤的临床二期实验。但迄今为止,还没有抗人IL6的抗体上市用于肿瘤免疫疗法。而且不同抗人IL6单克隆抗体也存在不同程度的副反应,包括可在某些患者中诱导免疫原性,以及不同IL6单克隆抗体具有不同程度的可开发性。因此,尚需开发新的能够阻断IL6信号的功能性抗体,其应具有更高的亲和力、特异性、功能性以及多样性。

发明内容

[0005] 在一方面,本发明提供一种抗人IL-6单克隆抗体,其包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区包括LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中所述HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3选自如下组合之一:

- [0006] (a) HCDR1的氨基酸序列为RYWMH;
[0007] HCDR2的氨基酸序列为YINPITGYTENNQKFKD;
[0008] HCDR3的氨基酸序列为GIRGFTY;
[0009] LCDR1的氨基酸序列为RASENVDNSDNSFMH;
[0010] LCDR2的氨基酸序列为RASNLDS;
[0011] LCDR3的氨基酸序列为QQTNEAPLT;
[0012] (b) HCDR1的氨基酸序列为NYWMH;
[0013] HCDR2的氨基酸序列为YVIPSTGYTDYNQSFKD;
[0014] HCDR3的氨基酸序列为LLPGFAY;
[0015] LCDR1的氨基酸序列为RSSQSLVDSNGNTYLH;
[0016] LCDR2的氨基酸序列为KVS NRFS;
[0017] LCDR3的氨基酸序列为SQSTHVPPT;
[0018] (c) HCDR1的氨基酸序列为NYWMH;
[0019] HCDR2的氨基酸序列为YIDPRTASIYYNQKFKD;
[0020] HCDR3的氨基酸序列为ILYGKYDV;
[0021] LCDR1的氨基酸序列为RSSQSLVDSNGNTYLH;
[0022] LCDR2的氨基酸序列为KVS NRFS;
[0023] LCDR3的氨基酸序列为SQSTHVPPT;
[0024] (d) HCDR1的氨基酸序列为DAWMD;
[0025] HCDR2的氨基酸序列为EIRSKTYHPATYYTKSVRG;
[0026] HCDR3的氨基酸序列为PRYYGGYFDY;
[0027] LCDR1的氨基酸序列为RASESVDNYGMSFMN;
[0028] LCDR2的氨基酸序列为TASNQGS;
[0029] LCDR3的氨基酸序列为QQSKEVPYT;
[0030] (e) HCDR1的氨基酸序列为NYIIH;
[0031] HCDR2的氨基酸序列为AIYPGNGDTSYSQKFKD;

- [0032] HCDR3的氨基酸序列为GDAGYSAWFAY;
- [0033] LCDR1的氨基酸序列为SASESVDSYGNFMH;
- [0034] LCDR2的氨基酸序列为LASKLES;
- [0035] LCDR3的氨基酸序列为QQNNEDPLT;
- [0036] (f) HCDR1的氨基酸序列为SHTVS;
- [0037] HCDR2的氨基酸序列为KMWSNGD TDYDSAIRS;
- [0038] HCDR3的氨基酸序列为YYFSSYGGGYFDY;
- [0039] LCDR1的氨基酸序列为RASKSVSTYMH;
- [0040] LCDR2的氨基酸序列为SASNLES;
- [0041] LCDR3的氨基酸序列为QQSDEL PDT;以及
- [0042] (g) HCDR1的氨基酸序列为SFPMA;
- [0043] HCDR2的氨基酸序列为TISPSGGT SYSRDSVKG;
- [0044] HCDR3的氨基酸序列为ERIYNTYFDY;
- [0045] LCDR1的氨基酸序列为LPSEDISSDLA;
- [0046] LCDR2的氨基酸序列为NANTLPN;
- [0047] LCDR3的氨基酸序列为QQYDSYPYT。
- [0048] 在更具体的实施方案中,所述抗人IL-6单克隆抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列选自如下组合之一:
- [0049] 所述重链可变区包括如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;
- [0050] 所述重链可变区包括如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列,所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列;
- [0051] 所述重链可变区包括如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列,所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列;
- [0052] 所述重链可变区包括如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列,所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列;
- [0053] 所述重链可变区包括如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列,所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列;
- [0054] 所述重链可变区包括如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列,所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列;以及
- [0055] 所述重链可变区包括如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列,所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列。
- [0056] 在优选的实施方案中,所述抗人IL6单克隆抗体与IL6之间的解离常数KD小于10nM。在更优选的实施方案中,所述抗人IL6单克隆抗体与IL6之间的解离常数KD小于1nM。
- [0057] 在一个实施方案中,所述抗人IL6单克隆抗体抑制IL6对TF-1细胞的增殖促进作用。
- [0058] 在另一方面,本发明提供了分离的多核苷酸,其编码所述抗人IL6单克隆抗体。
- [0059] 在一个具体实施方案中,所述多核苷酸包括编码所述抗人IL6单克隆抗体的重链可变区的重链可变区编码序列和编码所述抗人IL6单克隆抗体的轻链可变区的轻链可变区

编码序列,所述重链可变区编码序列和轻链可变区编码序列选自如下组合之一:

[0060] 所述重链可变区编码序列包括如SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列,所述轻链可变区编码序列包括如SEQ IDNO:4所示的核苷酸序列;

[0061] 所述重链可变区编码序列包括如SEQ ID NO:6所示的核苷酸序列,所述轻链可变区编码序列包括如SEQ IDNO:8所示的核苷酸序列;

[0062] 所述重链可变区编码序列包括如SEQ ID NO:10所示的核苷酸序列,所述轻链可变区编码序列包括如SEQ IDNO:12所示的核苷酸序列;

[0063] 所述重链可变区编码序列包括如SEQ ID NO:14所示的核苷酸序列,所述轻链可变区编码序列包括如SEQ IDNO:16所示的核苷酸序列;

[0064] 所述重链可变区编码序列包括如SEQ ID NO:18所示的核苷酸序列,所述轻链可变区编码序列包括如SEQ IDNO:20所示的核苷酸序列;

[0065] 所述重链可变区编码序列包括如SEQ ID NO:22所示的核苷酸序列,所述轻链可变区编码序列包括如SEQ IDNO:24所示的核苷酸序列;以及

[0066] 所述重链可变区编码序列包括如SEQ ID NO:26所示的核苷酸序列,所述轻链可变区编码序列包括如SEQ IDNO:28所示的核苷酸序列。

[0067] 在另一方面,本发明提供了包括上述多核苷酸的表达载体。

[0068] 在另一方面,本发明提供了包括上述表达载体的宿主细胞。

[0069] 在优选的实施方案中,所述宿主细胞为HEK293-6E细胞。

[0070] 在另一方面,本发明提供了一种制备抗人IL6单克隆抗体的方法,包括以上述表达载体转染感受态细胞,并对所述细胞进行培养。

[0071] 在另一方面,本发明提供了所述抗人IL6单克隆抗体、所述多核苷酸、所述表达载体、所述宿主细胞在制备用于抗肿瘤的藥物中的用途。

[0072] 在优选的实施方案中,所述肿瘤选自多发性骨髓瘤、非小细胞肺癌、结肠直肠癌、肾细胞癌、前列腺癌、乳腺癌和卵巢癌。

[0073] 在另一方面,本发明提供了抗肿瘤药物组合物,其包含有效量的所述抗人IL6单克隆抗体和药学上可接受的载体。

[0074] 在又一方面,本发明提供了一种制备抗人IL6单克隆抗体的方法,包括:

[0075] 1) 以人IL6免疫小鼠,在所述小鼠中产生针对人IL6的免疫反应;

[0076] 2) 取所述小鼠的脾脏细胞与骨髓瘤细胞融合,并对获得的杂交瘤细胞进行筛选,得到特异识别人IL6的阳性母克隆;

[0077] 3) 对所述阳性母克隆进行亚克隆,以获得稳定的杂交瘤细胞株;

[0078] 4) 对所述杂交瘤细胞株进行基因测序,获得抗人IL6抗体的轻链和重链的可变区编码序列;以及

[0079] 5) 用所述可变区编码序列进行重组抗体生产,获得功能性抗人IL6单克隆抗体。

[0080] 本发明提供的抗IL6单克隆抗体对IL6具有高亲和性、高特异性、并且能够分别识别IL6的不同表位,能够刺激或抑制IL6下游通路,激活或抑制T细胞分泌细胞因子,例如通过抑制IL6下游通路来抑制TF-1细胞增值。因而,本发明提供的针对IL6的功能性单克隆抗体,可通过阻断IL6信号通路来抑制细胞增值,进而实现肿瘤免疫治疗的目的。

附图说明

- [0081] 图1显示了经人IL6免疫后的小鼠的血清ELISA效价检测结果。
- [0082] 图2显示了经人IL6免疫后的大鼠的血清ELISA效价检测结果。
- [0083] 图3显示了本发明的抗IL6单克隆抗体与IL6重组蛋白特异性结合的曲线图。
- [0084] 图4显示了本发明的抗IL6单克隆抗体特异性抑制TF-1细胞增殖的曲线图。
- [0085] 图5显示了本发明的抗IL6单克隆抗体对IL6蛋白的亲合力的测定结果。

具体实施方式

[0086] 除非另有说明,本发明所用的技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。

[0087] 本文所用的术语“抗体”指免疫球蛋白分子,其通常为由2个相同重链和2个相同轻链通过二硫键相互连接组成的四聚体。根据氨基酸序列的保守性差异,将重链和轻链分为位于氨基端的可变区(V)和位于羧基端的恒定区(C)。在重链和轻链的可变区内,分别有三个局部区域的氨基酸组成和排列顺序具有更高的变异程度,为抗体与抗原结合的关键位置,因而也称为互补决定区(CDR)。在本文中,三个重链互补决定区分别称为HCDR1、HCDR2和HCDR3,三个轻链互补决定区分别称为LCDR1、LCDR2和LCDR3。一条重链和一条轻链的可变区相互作用形成了抗原结合部位(Fv)。根据它们重链恒定区的氨基酸序列,可将抗体分为不同类别。有五种主要类型的完整抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些中的一些可进一步分为亚类,例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgA2。不同类别的免疫球蛋白的亚单位结构和三维构象在本领域内是已知的。本发明旨在包括任何前述类或亚类的抗体。

[0088] 本文使用的术语“抗体”还旨在涵盖其消化片段或功能性变体,例如,能够结合IL6或其部分的抗体片段,包括但不限于Fab(例如,抗体经木瓜蛋白酶消化而得到)、F(ab')₂(例如,通过胃蛋白酶消化得到)、Fv或scFv(例如通过分子生物学技术得到)。

[0089] 本文使用的术语“单克隆抗体”指均一的、仅针对某一特定抗原表位的抗体。与典型地包括针对不同抗原决定簇(表位)的不同抗体的普通多克隆抗体制剂相比,每种单克隆抗体针对抗原上的单个抗原决定簇。修饰语“单克隆”表示抗体的均一特征,不解释为需要通过任何特定方法产生的抗体。本发明的单克隆抗体优选通过重组DNA方法产生,或通过本文其它地方描述的筛选方法获得。

[0090] 本文使用的术语“分离的多核苷酸”指非自然界中天然存在状态的多核苷酸,包括通过生物学技术从自然界(包括生物体内)分离出的多核苷酸,也包括人工合成的多核苷酸。分离的多核苷酸可以是基因组DNA、cDNA、mRNA或合成的其它RNA,或者它们的组合。本文提供了多个用于编码抗人IL6单克隆抗体的重链可变区和轻链可变区的核苷酸序列,需要指出的是,本领域技术人员可以根据本文所提供的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列,基于密码子简并性,设计出与以上提供的核苷酸序列不完全相同的核苷酸序列,但都编码相同的氨基酸序列。这些经改动的核苷酸序列也包括在本发明的范围内。

[0091] 当涉及多核苷酸时,本文所用的术语“载体”指用于将核苷酸编码信息转移到宿主细胞内的任一种分子(例如,核酸、质粒、或病毒等)。术语“表达载体”或“表达盒”指适于在宿主细胞内表达目的基因(待表达核苷酸序列)的载体,通常包括目的基因、启动子、终止子、标记基因等部分。

[0092] 本文所用的术语“宿主细胞”指已经或者能够用核酸序列转化并从而表达所选的目的基因的细胞。该术语包括亲本细胞的后代,无论该后代与原来的亲本细胞在形态或基因组成上是否相同,只要后代存在所选目的基因即可。常用的宿主细胞包括细菌、酵母、哺乳动物细胞等。

[0093] 本文所用的术语“转染”指外来或外源DNA被细胞摄入,该技术可用于将一种或多种外源DNA部分导入适宜的宿主细胞。可通过理化方法(例如通过氯化钙处理)诱导细胞,使其处于最适摄取和容纳外来DNA的生理状态,即“感受态”。

[0094] 提及药物组合物时,本文所使用的术语“有效量的”指可对人和/或动物产生功能或活性且可被人/或动物所接受的量。“药学上可接受的载体”指用于给药的载体,包括各种赋形剂、稀释剂和缓冲剂等,这些物质适合于人和/或动物给药而无过度的不良副反应,同时适合于维持位于其中的药物或活性剂的活力。

[0095] 下面将结合具体实施例对本发明的一些方面进行详细描述。除非另有说明,下文描述的实施例的方法和材料均为可以通过市场购买获得的常规产品。

[0096] 实施例1:人IL6杂交瘤细胞株的获得

[0097] 1) 动物免疫

[0098] 抗原采用tag-free的人IL6重组蛋白(GenScript,Cat.No.Z03034)。用含50 μ g IL6蛋白的200 μ l弗氏完全佐剂(Sigma-Aldrich)的1:1乳液皮下免疫雌性Balb/c和C57b1/6小鼠以及Wistar大鼠。随后,每二周腹腔/皮下交替注射含25 μ g IL6的弗氏不完全佐剂(Sigma-Aldrich)的1:1乳液最多达3次,从而对小鼠进行加强免疫。骨髓瘤融合前4天,对表现出最高抗体滴度(参见图1和图2,采用血清ELISA法测定抗体效价)的一只小鼠(#3509)和一只大鼠(#3693)进行了25 μ g IL6(不含佐剂)腹腔加强免疫。

[0099] 2) 杂交瘤融合和筛选

[0100] 提取脾脏并进行均质化以产生单细胞悬液,同时准备骨髓瘤细胞(SP2/0)单细胞悬液。使用电融合将 8.9×10^7 个脾细胞与 4.1×10^7 个SP2/0小鼠骨髓瘤细胞进行融合。将融合的细胞重悬于100ml含杂交瘤细胞选择剂胸腺核苷嘧啶、次黄嘌呤和氨基嘌呤的DMEM/10%FBS培养基中,并用移液管以100 μ l的体积移至96孔板中。将板在37 $^{\circ}$ C下在6%CO₂中孵育。孵育7天之后,开始使用下文所述的ELISA结合来测试针对IL6的抗体的存在情况。

[0101] ELISA结合检测方法:将间接ELISA用于评估上清液中抗体对于IL6的结合能力。将ELISA板(Nunc)用100 μ l/孔的PBS中0.5 μ g/ml的重组IL6蛋白在4 $^{\circ}$ C下包被过夜。用PBS-T(0.05%吐温)洗涤板,并将其用200 μ l/孔的含1%BSA的PBST在37 $^{\circ}$ C封闭0.5小时。随后弃去封闭液,向每个板加入100 μ l杂交瘤细胞培养上清液,然后在室温下孵育1小时。将板用PBST洗涤三次,并用100 μ l/孔的缀合辣根过氧化物酶的山羊抗小鼠IgG(Fab-特异性)(GenScript)37 $^{\circ}$ C孵育0.5小时。将板用PBST洗涤五次,然后加入TMB显色液(GenScript)并在室温下在黑暗中孵育15分钟。通过加入50 μ l的1MHC1终止液(Sigma)终止反应。使用酶标仪在450nm下读板。

[0102] 3) 杂交瘤亚克隆

[0103] 使用有限稀释法进行亚克隆。使用血球细胞计数器并在含杂交瘤细胞选择剂胸腺核苷嘧啶、次黄嘌呤和氨基嘌呤的DMEM/10%FBS培养基中对细胞进行系列稀释来确定细胞数量,直至细胞密度达到5-15个细胞/ml。对于每个杂交瘤,将200 μ l的细胞溶液用移液管移

至96孔中,密度为1-3个细胞/孔。将培养物在37℃下在5%CO₂中培养1周后,对上清液进行上述ELISA结合测试,来评估针对IL6的抗体的存在情况。

[0104] 实施例2:单克隆抗体的可变区测序及抗体重组生产

[0105] 使用快速ELISA小鼠抗体亚型鉴定试剂盒(ClonoTyping System-HRP, SouthernBiotech)对杂交瘤细胞培养上清中的抗体进行亚型鉴定后,使用TRIzol(Ambion)从 3×10^6 - 5×10^6 个杂交瘤细胞提取总RNA,并利用抗体亚型特异性引物和通用引物(PrimeScript™ 1stStrand cDNA Synthesis Kit,Takara)将其逆转录为cDNA。随后通过RACE PCR(GenScript)扩增鼠免疫球蛋白重链和轻链V-区域片段,将所得的PCR片段亚克隆至pMD18-T载体系统(Takara)中,并使用载体特异性引物对插入片段进行测序。最终获得了克隆8H10B7E6、23A9H3、29D6B5、41A10B8、49F10H6、53A2F9(大鼠)、61G1D8(大鼠)的独特V-区域核苷酸/氨基酸序列。在重链和轻链的氨基酸序列中,CDR1区加有实心下划线,CDR2区加有虚线下划线,CDR3区加有波浪下划线。

[0106] 8H10B7E6重链可变区氨基酸序列:SEQ ID NO:1

QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTLTRYWMHWVKQRPGQGLEWIGYIN

[0107] PITGYTENNQKFKDKATLTADKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYFCARGIRGFTYWGHGTL
VTVSA

[0108] 8H10B7E6重链可变区核苷酸序列:SEQ ID NO:2

[0109] CAGGTCCAGCTTCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAAACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAG
GCTTCTGGCTACACCTTAAGTACTGGTACTGGTGCCTGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGG
ATACATTAATCCTATCACTGGTTATACTGAGAACAAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGCAGACAAGT
CCTCCAGCACAGCCTATATACAAGTACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTTCTGTGCAAGAGGGATA
CGGGGGTTTACTTACTGGGGCCATGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

[0110] 8H10B7E6轻链可变区氨基酸序列:SEQ ID NO:3

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASENVDNSDFMHWYQQKPGQPPLLIYRA

[0111] SNLDSGIPARFSGSGSRDFTLTINPVEADDVATYYCQQTNEAPLTFGAGTKLELK

[0112] 8H10B7E6轻链可变区核苷酸序列:SEQ ID NO:4

[0113] GACATTGTGCTGACCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATATCCTGC
AGAGCCAGTGAGAATGTTGATAACTCTGACAATAGTTTATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAA
ACTCCTCATCTATCGTGATCCAACCTAGATTCTGGGATCCCTGCCAGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTAGGACAGACT
TCACCCTCACCATTAATCCTGTGGAGGCTGATGATGTTGCAACCTATTACTGTCAGCAAATAATGAGGCTCCGCTC
ACGTTCCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

[0114] 23A9H3重链可变区氨基酸序列:SEQ ID NO:5

QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKTSGYTFNTYWMHWVKQRPGQGLEWIGYVI

[0115] PSTGYTDYNQSFKDKATLTADKSSNTAYMQVNSLTSEDSAVYYCASLLPGFAYWGQG
TLVTVSA

[0116] 23A9H3重链可变区核苷酸序列:SEQ ID NO:6

[0117] CAGGTCCAGCTTCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAAACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAG
ACTTCTGGCTACACCTTTACTAACTACTGGATGCACTGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAGTGGATTGG

ATACGTTATTCCTAGCACTGGTTATACTGACTACAATCAGAGTTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGCAGACAAAT
CCTCCAACACAGCCTACATGCAAGTGAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGCCTACTG
CCAGGTTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

[0118] 23A9H3轻链可变区氨基酸序列:SEQ ID NO:7

[0119] DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVDSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYK

[0120] VSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPTFGGGTKLEIK

[0121] 23A9H3轻链可变区核苷酸序列:SEQ ID NO:8

[0122] GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGC
AGATCTAGTCAGAGCCTTGTGGACAGTAATGAAAACACTTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCC
AAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAG
ATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCTCT
CCGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

[0123] 29D6B5重链可变区氨基酸序列:SEQ ID NO:9

QVQLQQSGAELAEPGASVKMSCKASGYNFNNYWMHWVKQPGQGLEWIGYI

[0124] DPRTASIYYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLSEDSAVVYCARILYGKYDVWGA
GTTVIVSS

[0125] 29D6B5重链可变区核苷酸序列:SEQ ID NO:10

[0126] CAGGTCCAGCTTCAAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGCAGAACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAG
GCTTCTGGCTACAACCTTAAATAACTATTGGATGCACTGGGTAAAACAGGGCCTGGCCAGGGTCTGGAATGGATTGG
ATACATTGATCCTAGGACTGCTTCTATTTATTACAATCAGAAGTTCAAAGACAAGGCCACATTGACTGCAGACAAAT
CCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGAAGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAATCCTC
TATGGTAAATATGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCATCGTCTCCTCA

[0127] 29D6B5轻链可变区氨基酸序列:SEQ ID NO:11

DVVLTQTPLSLPVSLGNQASISCRSSQSLVDSNGNTYLHWYLQKPGQSPKVLIIHK

[0128] VSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPTFGGGTKLEIK

[0129] 29D6B5轻链可变区核苷酸序列:SEQ ID NO:12

[0130] GATGTTGTGCTGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGAAATCAAGCCTCCATCTCTTGC
AGATCTAGTCAGAGCCTTGTAGACAGTAATGAAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCC
AAAGGTCCTGATCCACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAG
ATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCTCT
CCGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

[0131] 41A10B8重链可变区氨基酸序列:SEQ ID NO:13

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSAASGFTFSDAWMDWVRQSPDKGLEWVAEIRS

[0132] KTYHPATYYTKSVRGRRFTISRDDSKSSVYLQMNNLGAEDTGIYYCTRPRYYGGYFDY
WGQGTTLTVSS

[0133] 41A10B8重链可变区核苷酸序列:SEQ ID NO:14

[0134] GAAGTGAACCTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCTGGTGC AACCTGGAGGATCCATGAACTCTCTTGTGCT
GCCTCTGGATTCACCTTTAGTGACGCCTGGATGGACTGGTCCGCCAGTCTCCAGACAAGGGGCTTGAGTGGGTTGC

TGAAATTAGAAGCAAACTTATCATCCTGCAACATACTATACTAAGTCTGTGAGAGGGAGGTTCCACCATCTCAAGAG
ATGATTCCAAAAGTAGTGTCTACCTGCAGATGAACAACTTAGGAGCTGAAGACACTGGCATTATTACTGTACCAGG
CCGAGATACTACGGGGGTTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

[0135] 41A10B8轻链可变区氨基酸序列:SEQ ID NO:15

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGMSFMNWFQQKPGQPPELLIYTA
[0136] SNQGSVGPARGSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQOSKEVPYTFGGGKLEIK

[0137] 41A10B8轻链可变区核苷酸序列:SEQ ID NO:16

[0138] GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGC
AGAGCCAGCGAAAGTGTGACAATTATGGCATGAGTTTTATGAACTGGTCCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAA
ACTCCTCATCTATACTGCTTCCAACCAAGGATCCGGGGTCCCTGCCAGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACT
TCAGCCTCAACATCCATCCTATGGAGGAGGATGATACTGCAATGTATTTCTGTCAACAAAGTAAGGAGGTCCCGTAT
ACGTTCCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

[0139] 49F10H6重链可变区氨基酸序列:SEQ ID NO:17

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYFTFTNYIIHWIKQTPGQGLEWIGAIYPG
[0140] NGDTSYSQKFKDKATLTADRSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGDAGYSAWFAYWG
QGTLVTVSA

[0141] 49F10H6重链可变区核苷酸序列:SEQ ID NO:18

[0142] CAGGTGCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAG
GCTTCTGGCTACACATTTACCAATTACATTATCCACTGGATAAAACAGACACCTGGACAGGGCCTGGAATGGATTGG
AGCTATTTATCCAGGAAATGGTGATACTTCTACAGTCAGAAGTTCAAAGACAAGGCCACATTGACTGCAGACAGAT
CCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAGGGGAT
GCGGGTTACTCCGCTGGTTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

[0143] 49F10H6轻链可变区氨基酸序列:SEQ ID NO:19

NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCSASESVDSDSYGNNFMHWYQQRPGQPPELLIYLAS
[0144] KLESVGPARGSGSGSRTEFTLTIDPVEAEDAATYYCQONNEDPLTFGAGTKLELK

[0145] 49F10H6轻链可变区核苷酸序列:SEQ ID NO:20

[0146] AACATTGTACTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGACAGAGGGCCACCATATCCTGC
AGTGCCAGTAAAAGTGTGATAGTTATGGCAATAATTTTATGCACTGGTATCAGCAGAGACCAGGACAGCCACCCAA
ACTCCTCATTTATCTTGATCCAAGCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGTTTCAAGTGGCAGTGGGTCTAGGACAGAGT
TCACCCTCACCATTGACCCTGTGGAGGCTGAAGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAATAATGAGGATCCGCTC
ACGTTCCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

[0147] 53A2F9重链可变区氨基酸序列:SEQ ID NO:21

QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTSHTVSWIRQPPGRGLEWMGKMWSN
[0148] GDTDYDSAIRSRLSITRDTSKSKVFLKINSLQTEDTAMYFCARYYFSSYGGGYFDYWG
QGVMTVTVSS

[0149] 53A2F9重链可变区核苷酸序列:SEQ ID NO:22

[0150] CAAGTCCAATAAAGGAGTCAGGACCTGGTCTGGTACAGCCATCACAGACCCTGTCTCTCACCTGCACT
GTCTCTGGGTTTTTATTAACCAGCCATACTGTAAGCTGGATTCGGCAGCCTCCAGGAAGGGGTCTGGAGTGGATGGG

AAAAATGTGGAGTAATGGAGACACAGATTATGATTCAGCTATCAGATCCCAGACTGAGCATCACCAGGGACACCTCGA
AGAGCCAAGTTTTCTTAAAGATAAACAGTCTGCAAAGTGAAGACACAGCCATGTACTTCTGTGCCAGATATTACTTT
AGCAGCTATGGAGGTGGCTACTTTGATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACAGTCTCCTCA

[0151] 53A2F9轻链可变区氨基酸序列:SEQ ID NO:23

DTVLTQSPALAVSLGQRVTISCRASKSVSTYMHWYQQKSGQPPKLLIYSASNLES
[0152] GVPSRFSGSGSDFTLTIDPVEADDIANYYCQQSDELPDTFGAGTKLELK

[0153] 53A2F9轻链可变区核苷酸序列:SEQ ID NO:24

[0154] GACACTGTGCTGACCCAGTCTCCTGCTTTGGCTGTGTCTCTAGGACAGAGGGTCACCATCTCTTGTAGG
GCCAGCAAAAGTGTGAGTACATATATGCACTGGTACCAACAGAAATCGGGACAGCAACCCAACTCCTGATCTATAG
TGCATCCAACCTAGAATCTGGAGTCCCTTCCAGGTTGAGTGGGCTGGGACAGACTTTACCCTCACCATAG
ATCCTGTGGAGGCTGATGACATAGCAAATATTACTGTCAGCAGAGTGATGAACTCCGGACACCTTTGGAGCTGGG
ACCAAGCTGGAAGTAAA

[0155] 61G1D8重链可变区氨基酸序列:SEQ ID NO:25

EVQLLESGGGLVQPGRSMKLSCAASGFTFSSFPMAWVRQTPSKALEWVATISPS
[0156] GGTSYSRDSVKGRFTISRDNANSTLCLHMDSLKSEDTATYYCLRERIYNTYFDYWGQ
GVMVTVSS

[0157] 61G1D8重链可变区核苷酸序列:SEQ ID NO:26

[0158] GAGGTGCAGCTGCTAGAATCTGGGGCGGTTAGTGCAGCCTGGAAGTCCATGAACTCTCCTGTGCG
GCCTCAGGATTCACCTTCAGTAGCTTTCCAATGGCCTGGTCCGACACTCCATCGAAGGCTCTGGAGTGGGTCGC
AACCATTAGTCTAGTGGTGGTACCTCTTACTCTCGAGACTCCGTAAGGGCCGATTCATCTCCAGAGATAATG
CAAACAGCACCTATGTCTACACATGGACAGTCTGAAGTCTGAGGACACGGCCACTATTATTGTTTACGAGAAAGG
ATTTATAACACTTACTTTGATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACAGTCTCCTCA

[0159] 61G1D8轻链可变区氨基酸序列:SEQ ID NO:27

DIRMTHSPASLSASLGETVSIELPSEDISSDLAWYQQKPGKSPQLLIYNANTLPN
[0160] GVPSRFSGSRSGAQYFLKINSLSQSEDVATYFCQQYDSYPYTFGTGKLELK

[0161] 61G1D8轻链可变区核苷酸序列:SEQ ID NO:28

[0162] GATATCCGGATGACACACTCTCCAGCTCCCTGTCTGCATCTCTGGGAGAGACTGTCAGCATCGAATGT
CTACCAAGTGAGGACATTTCCAGTGATTTAGCATGGTATCAGCAGAAGCCAGGAAATCTCCTCAGCTCCTCATCTA
TAATGCAAATACTTTGCCAAATGGGGTCCCTTACGGTTTAGTGGCAGTAGATCTGGCGCACAGTATTTTCTAAAAA
TAAACAGCCTGCAATCTGAGGATGTCGCGACTTATTTCTGTCAGCAATATGACAGTTATCCGTACACGTTTGAAGT
GGGACCAAGCTGGAAGTAAA

[0163] 分别合成包含轻链可变区+恒定区与重链可变区+恒定区的DNA片段,将其分别插入pTT5表达载体中,形成表达质粒。

[0164] 将上述表达质粒共转染HEK293-6E细胞,并于37℃摇瓶中培养10天后,收取上清用于抗体纯化。纯化之前,将管道和蛋白A柱用0.2M NaOH去热原。将柱用含有0.05M Tris和1.5M NaCl (pH8.0)的缓冲液重新平衡。随后将收获的细胞培养物上清液,使用2×上述缓冲液1:1稀释并过滤除菌。将过滤的上清液和蛋白A柱室温孵育2小时,用并1×上述缓冲液洗涤柱后,使用无菌0.1M柠檬酸钠 (pH3.5)洗脱IgG,收集了洗脱液并用九分之一体积的无菌

1M Tris-HCl (pH9) 中和。在无菌条件下,将所述产品缓冲液交换为PBS (pH7.4) 以除去任何的洗脱缓冲液并浓缩所述样品。浓缩之后,使用1.43的消光系数 E_c (0.1%) 通过OD280nm对抗体进行定量。

[0165] 纯化的抗体通过BioRad电泳系统用10%预制胶 (GenScript) 通过SDS-PAGE来分析。将所述凝胶用Estain2.0 (GenScript) 染色并通过比较染色带与Protein Ladder (GenScript) 来估计分子大小和纯度。

[0166] 实施例3:单克隆抗体对人IL6重组蛋白的结合

[0167] 将间接ELISA用于评估纯化抗体对于IL6的结合能力。将ELISA板 (Nunc) 用100 μ l/孔的PBS中0.5 μ g/ml的重组IL6蛋白在4 $^{\circ}$ C下包被过夜。用PBS-T (0.05%吐温) 洗涤板,并将其用200 μ l/孔的含1%BSA的PBST在37 $^{\circ}$ C封闭0.5小时。随后弃去封闭液,向首孔加入10 μ g/ml的纯化抗体100 μ l,并按照3倍梯度稀释,共计11个测试浓度梯度。然后在室温下孵育1小时。将板用PBST洗涤三次,并用100 μ l/孔的缀合辣根过氧化物酶的山羊抗小鼠/大鼠IgG (Fab-特异性) (GenScript) 37 $^{\circ}$ C孵育0.5小时。将板用PBST洗涤五次,然后加入TMB显色液 (GenScript) 并在室温下在黑暗中孵育15分钟。通过加入50 μ l的1M HCl终止液 (Sigma) 终止反应。使用酶标仪在450nm下读板。克隆8H10B7E6、23A9H3、29D6B5、41A10B8、49F10H6、53A2F9 (大鼠)、61G1D8 (大鼠) 对于重组蛋白IL6的结合能力如图3。根据ELISA浓度梯度实验计算得到的EC50表明这些抗体对于抗原都表现出相当高的亲和力 (ELISA EC50都小于25ng/ml;特别是53A2F9达到6.32ng/ml,相当于0.04nM)。

[0168] 实施例4:单克隆抗体表位鉴定

[0169] 将竞争ELISA用于评估纯化抗体的抗原表位。将ELISA板 (Nunc) 用100 μ l/孔的PBS中0.5 μ g/ml的重组IL6在4 $^{\circ}$ C下包被过夜。用PBS-T (0.05%吐温) 洗涤板,并将其用200 μ l/孔的含1%BSA的PBST在37 $^{\circ}$ C封闭0.5小时。随后弃去封闭液,每孔分别加入一对 (其中一个已标记生物素) 用于竞争实验的待测抗体,每个纯化抗体100 μ l (10 μ g/ml)。然后在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时。将板用PBST洗涤3次,并用100 μ l/孔的抗生物素蛋白链菌素HRP (SA-HRP, GenScript) 37 $^{\circ}$ C孵育10分钟。将板用PBST洗涤五次,然后加入TMB显色液 (GenScript) 并在室温下在黑暗中孵育15分钟。通过加入50 μ l的1M HCl终止液 (Sigma) 终止反应。使用酶标仪在450nm下读板。测定结果显示,克隆8H10B7E6、23A9H3、29D6B5是针对同一个表位,而41A10B8、49F10H6、53A2F9 (大鼠)、和61G1D8 (大鼠) 分别针对另外的四个不同表位。这些结果表明所得到的特异性针对IL6抗体具有多个不同的抗原识别表位。因此,本发明筛选到的抗体具有更大的多样性。

[0170] 实施例5:单克隆抗体的功能性检测

[0171] TF-1细胞的生长是粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 依赖的,如果该因子缺乏或功能被阻碍,细胞的增殖、分化、成熟会受到明显的抑制。本单克隆抗体功能实验是将培养基中的GM-CSF替换成有同样功能的IL6蛋白,再通过加入抗IL6单克隆抗体,通过判断培养一定时间后的TF-1活细胞的数量来确定该单克隆抗体是否能阻断IL-6蛋白生物学功能。在含有GM-CSF的培养基中正常培养TF-1细胞,实验前将细胞收集,用不含有GM-CSF的基础培养基洗涤2次并计数,按5000个/孔 (100 μ l) 铺96孔板若干。IL6蛋白用基础培养基稀释至0.4 μ g/ml,每孔添加50 μ l,每孔蛋白含量为20ng。抗体在另外一块板上,起始100 μ g/ml稀释,2倍稀释10个梯度。最终向板孔内加50 μ l。37 $^{\circ}$ C及5%CO₂条件下孵育7-10天。每孔加20 μ l

Promega Substrate Cell Titer 96Aqueous One Solution Reagent。37度孵育,每半小时用490nm读数一次,挑选线性最好的编辑数据。IL6抗体对TF-1细胞生长抑制作用见图4。这些结果表明,本发明筛选到的抗体能够有效的抑制细胞增殖,特别是克隆53A2F9和61G1D8抗体的抑制IC50分别达到3.95 μ g/ml,和4.54 μ g/ml。

[0172] 实施例6:单克隆抗体的亲和力测定

[0173] 以10 μ l/min流速的HBS-EP缓冲液平衡芯片表面5min,随后以10 μ l/min的流速注射“NHS+EDC”的1:1混合液7min来活化芯片,将稀释在10mM醋酸钠缓冲液中的捕获抗体 (Goat anti-mouse IgG) 以10 μ l/min流速注射约7min进行耦联,最后以10 μ l/min的流速注射乙醇胺7min进行表面封闭。

[0174] 以HBS-EP缓冲液作为样品进行三个预循环来平衡芯片使基线稳定,10 μ l/min流速注射稀释在HBS-EP缓冲液中的抗体0~5min(通过调整捕获时间来控制抗体和抗原结合信号在~100RU),缓冲液平衡1min。以30 μ l/min流速注射低浓度抗原0.33nM IL6 5min,抗原与抗体发生结合,之后30 μ l/min流速注射缓冲液15min进行解离,100 μ l/min流速注射50mMHC1共四次,每次10s进行再生,一次循环结束。改变抗原浓度(如1n IL6)进行下一个梯度浓度的循环测定直到所有梯度浓度(0.33nM、1nM、3nM、9nM、27nM IL6)及重复浓度(如9nM IL6)测定结束。

[0175] 实验数据经过双扣减(对照通道及零浓度)后,在Biacore 8K evaluation software中进行“1:1Binding”模型的拟合。使用Biacore 8K测定抗体针对IL重组蛋白的亲和力。如图5所示,特异性针对IL6的单克隆抗体对IL6的亲和力由Biacore测得均达到sub-nM级至pM级。这些结果表明,本发明筛选到的抗体具有非常高的亲和力。

[0176] 本发明所属领域技术人员应理解,以上描述的方法和材料,仅是示例性的,而不应视为限定本发明的范围。

[0039] atacaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct atttctgtgc aagagggata 300
 [0040] cgggggttta cttactgggg ccatgggact ctggtcactg tctctgca 348
 [0041] <210> 3
 [0042] <211> 111
 [0043] <212> PRT
 [0044] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0045] <400> 3
 [0046] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 [0047] 1 5 10 15
 [0048] Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asn Val Asp Asn Ser
 [0049] 20 25 30
 [0050] Asp Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 [0051] 35 40 45
 [0052] Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Asp Ser Gly Ile Pro Ala
 [0053] 50 55 60
 [0054] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 [0055] 65 70 75 80
 [0056] Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn
 [0057] 85 90 95
 [0058] Glu Ala Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 [0059] 100 105 110
 [0060] <210> 4
 [0061] <211> 333
 [0062] <212> DNA
 [0063] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0064] <400> 4
 [0065] gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
 [0066] atatcctgca gagccagtga gaatgttgat aactctgaca atagttttat gcaactggtag 120
 [0067] caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcactatc gtgcatccaa cctagattct 180
 [0068] gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 240
 [0069] cctgtggagg ctgatgatgt tgcaacctat tactgtcagc aaactaatga ggctccgctc 300
 [0070] acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa 333
 [0071] <210> 5
 [0072] <211> 116
 [0073] <212> PRT
 [0074] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0075] <400> 5
 [0076] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala
 [0077] 1 5 10 15

[0078] Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 [0079] 20 25 30
 [0080] Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 [0081] 35 40 45
 [0082] Gly Tyr Val Ile Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Gln Ser Phe
 [0083] 50 55 60
 [0084] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 [0085] 65 70 75 80
 [0086] Met Gln Val Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0087] 85 90 95
 [0088] Ala Ser Leu Leu Pro Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 [0089] 100 105 110
 [0090] Thr Val Ser Ala
 [0091] 115
 [0092] <210> 6
 [0093] <211> 348
 [0094] <212> DNA
 [0095] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0096] <400> 6
 [0097] caggtccagc ttcagcagtc tggggctgaa ctggcaaac ctggggcctc agtgaagatg 60
 [0098] tcttgcaaga cttctggcta cacctttact aactactgga tgcactgggt aaaacagagg 120
 [0099] cctggacagg gtctggagtg gattggatac gttattccta gcaactggta tactgactac 180
 [0100] aatcagagtt tcaaggacaa ggccacattg actgcagaca aatcctccaa cacagcctac 240
 [0101] atgcaagtga acagcctgac atctgaggac tctgcagtet attactgtgc aagcctactg 300
 [0102] ccaggttttg cttactgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgca 348
 [0103] <210> 7
 [0104] <211> 112
 [0105] <212> PRT
 [0106] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0107] <400> 7
 [0108] Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 [0109] 1 5 10 15
 [0110] Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Asp Ser
 [0111] 20 25 30
 [0112] Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 [0113] 35 40 45
 [0114] Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 [0115] 50 55 60
 [0116] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

| | | | | |
|--------|---|-----|-----|-----|
| [0117] | 65 | 70 | 75 | 80 |
| [0118] | Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser | | | |
| [0119] | | 85 | 90 | 95 |
| [0120] | Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys | | | |
| [0121] | | 100 | 105 | 110 |
| [0122] | <210> 8 | | | |
| [0123] | <211> 336 | | | |
| [0124] | <212> DNA | | | |
| [0125] | <213> 人工序列(Artificial Sequence) | | | |
| [0126] | <400> 8 | | | |
| [0127] | gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60 | | | |
| [0128] | atctcttgca gatctagtca gagccttgtg gacagtaatg gaaacactta tttacattgg 120 | | | |
| [0129] | tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180 | | | |
| [0130] | tctgggggcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240 | | | |
| [0131] | agcagagtgg aggctgagga tctgggggtt tattttctgt ctcaaagtac acatgttctc 300 | | | |
| [0132] | ccgacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336 | | | |
| [0133] | <210> 9 | | | |
| [0134] | <211> 117 | | | |
| [0135] | <212> PRT | | | |
| [0136] | <213> 人工序列(Artificial Sequence) | | | |
| [0137] | <400> 9 | | | |
| [0138] | Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Glu Pro Gly Ala | | | |
| [0139] | 1 | 5 | 10 | 15 |
| [0140] | Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Asn Asn Tyr | | | |
| [0141] | | 20 | 25 | 30 |
| [0142] | Trp Met His Trp Val Lys Gln Gly Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile | | | |
| [0143] | | 35 | 40 | 45 |
| [0144] | Gly Tyr Ile Asp Pro Arg Thr Ala Ser Ile Tyr Tyr Asn Gln Lys Phe | | | |
| [0145] | | 50 | 55 | 60 |
| [0146] | Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr | | | |
| [0147] | 65 | 70 | 75 | 80 |
| [0148] | Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys | | | |
| [0149] | | 85 | 90 | 95 |
| [0150] | Ala Arg Ile Leu Tyr Gly Lys Tyr Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr | | | |
| [0151] | | 100 | 105 | 110 |
| [0152] | Val Ile Val Ser Ser | | | |
| [0153] | | 115 | | |
| [0154] | <210> 10 | | | |
| [0155] | <211> 351 | | | |

[0156] <212> DNA
 [0157] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0158] <400> 10
 [0159] caggtccagc ttcagcagtc tggggctgaa ctggcagaac ctggggcctc agtgaagatg 60
 [0160] tcctgcaagg cttctggcta caactttaat aactattgga tgcactgggt aaaacagggg 120
 [0161] cctggccagg gtctggaatg gattggatac attgataccta ggactgcttc tatttattac 180
 [0162] aatcagaagt tcaaagacaa ggccacattg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240
 [0163] atgcaactga gcagcctgac atctgaagac tctgcagtct attactgtgc aagaatcctc 300
 [0164] tatggtaaat atgatgtctg gggcgcaggg accacgggtca tcgtctcctc a 351
 [0165] <210> 11
 [0166] <211> 112
 [0167] <212> PRT
 [0168] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0169] <400> 11
 [0170] Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 [0171] 1 5 10 15
 [0172] Asn Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Asp Ser
 [0173] 20 25 30
 [0174] Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 [0175] 35 40 45
 [0176] Pro Lys Val Leu Ile His Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 [0177] 50 55 60
 [0178] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 [0179] 65 70 75 80
 [0180] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 [0181] 85 90 95
 [0182] Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [0183] 100 105 110
 [0184] <210> 12
 [0185] <211> 336
 [0186] <212> DNA
 [0187] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0188] <400> 12
 [0189] gatgttgtgc tgacceaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaaa tcaagcctcc 60
 [0190] atctcttgca gatctagtca gagccttgta gacagtaatg gaaacaccta tttacattgg 120
 [0191] tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag gtctgatcc acaaagtttc caaccgattt 180
 [0192] tctgggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcagggg cagatttcac actcaagatc 240
 [0193] agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattttctgct ctcaaagtac acatgttctc 300
 [0194] ccgacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

[0195] <210> 13
 [0196] <211> 121
 [0197] <212> PRT
 [0198] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0199] <400> 13
 [0200] Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0201] 1 5 10 15
 [0202] Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
 [0203] 20 25 30
 [0204] Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Asp Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0205] 35 40 45
 [0206] Ala Glu Ile Arg Ser Lys Thr Tyr His Pro Ala Thr Tyr Tyr Thr Lys
 [0207] 50 55 60
 [0208] Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
 [0209] 65 70 75 80
 [0210] Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Gly Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 [0211] 85 90 95
 [0212] Tyr Cys Thr Arg Pro Arg Tyr Tyr Gly Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 [0213] 100 105 110
 [0214] Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 [0215] 115 120
 [0216] <210> 14
 [0217] <211> 363
 [0218] <212> DNA
 [0219] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0220] <400> 14
 [0221] gaagtgaac ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc 60
 [0222] tcttgtgctg cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgccagtct 120
 [0223] ccagacaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaagca aaacttatca tcctgcaaca 180
 [0224] tactatacta agtctgtgag aggagagttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt 240
 [0225] gtctacctgc agatgaacaa cttaggagct gaagacactg gcatttatta ctgtaccagg 300
 [0226] ccgagatact acgggggtta ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 360
 [0227] tca 363
 [0228] <210> 15
 [0229] <211> 111
 [0230] <212> PRT
 [0231] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0232] <400> 15
 [0233] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

| | | | | |
|--------|---|-----|-----|----|
| [0234] | 1 | 5 | 10 | 15 |
| [0235] | Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr | | | |
| [0236] | 20 | 25 | 30 | |
| [0237] | Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro | | | |
| [0238] | 35 | 40 | 45 | |
| [0239] | Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala | | | |
| [0240] | 50 | 55 | 60 | |
| [0241] | Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His | | | |
| [0242] | 65 | 70 | 75 | 80 |
| [0243] | Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys | | | |
| [0244] | 85 | 90 | 95 | |
| [0245] | Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys | | | |
| [0246] | 100 | 105 | 110 | |
| [0247] | <210> 16 | | | |
| [0248] | <211> 333 | | | |
| [0249] | <212> DNA | | | |
| [0250] | <213> 人工序列(Artificial Sequence) | | | |
| [0251] | <400> 16 | | | |
| [0252] | gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60 | | | |
| [0253] | atctcctgca gagccagcga aagtgttgac aattatggca tgagttttat gaactggttc 120 | | | |
| [0254] | caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatttata ctgcttccaa ccaaggatcc 180 | | | |
| [0255] | ggggtcctg ccaggttttag tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat 240 | | | |
| [0256] | cctatggagg aggatgatac tgcaatgtat ttctgtcaac aaagtaagga ggtcccgtat 300 | | | |
| [0257] | acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa 333 | | | |
| [0258] | <210> 17 | | | |
| [0259] | <211> 120 | | | |
| [0260] | <212> PRT | | | |
| [0261] | <213> 人工序列(Artificial Sequence) | | | |
| [0262] | <400> 17 | | | |
| [0263] | Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala | | | |
| [0264] | 1 | 5 | 10 | 15 |
| [0265] | Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr | | | |
| [0266] | 20 | 25 | 30 | |
| [0267] | Ile Ile His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile | | | |
| [0268] | 35 | 40 | 45 | |
| [0269] | Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Ser Gln Lys Phe | | | |
| [0270] | 50 | 55 | 60 | |
| [0271] | Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr | | | |
| [0272] | 65 | 70 | 75 | 80 |

| | |
|--------|---|
| [0273] | Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys |
| [0274] | 85 90 95 |
| [0275] | Ala Arg Gly Asp Ala Gly Tyr Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln |
| [0276] | 100 105 110 |
| [0277] | Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala |
| [0278] | 115 120 |
| [0279] | <210> 18 |
| [0280] | <211> 360 |
| [0281] | <212> DNA |
| [0282] | <213> 人工序列(Artificial Sequence) |
| [0283] | <400> 18 |
| [0284] | caggtgcaac tgcagcagcc tggggctgaa ctggtgaagc ctggggcctc agtgaagatg 60 |
| [0285] | tcttgcaagg cttctggcta cacatttacc aattacatta tccactggat aaaacagaca 120 |
| [0286] | cctggacagg gcctggaatg gattggagct atttatccag gaaatggtga tacttcctac 180 |
| [0287] | agtcagaagt tcaaagacaa ggccacattg actgcagaca gatcctccag cacagcctac 240 |
| [0288] | atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaggggat 300 |
| [0289] | gcgggttact cgcctgggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctctgca 360 |
| [0290] | <210> 19 |
| [0291] | <211> 111 |
| [0292] | <212> PRT |
| [0293] | <213> 人工序列(Artificial Sequence) |
| [0294] | <400> 19 |
| [0295] | Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly |
| [0296] | 1 5 10 15 |
| [0297] | Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr |
| [0298] | 20 25 30 |
| [0299] | Gly Asn Asn Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro |
| [0300] | 35 40 45 |
| [0301] | Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Lys Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala |
| [0302] | 50 55 60 |
| [0303] | Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asp |
| [0304] | 65 70 75 80 |
| [0305] | Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn |
| [0306] | 85 90 95 |
| [0307] | Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys |
| [0308] | 100 105 110 |
| [0309] | <210> 20 |
| [0310] | <211> 333 |
| [0311] | <212> DNA |

[0312] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0313] <400> 20
 [0314] aacattgtac tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctaggaca gagggccacc 60
 [0315] atatcctgca gtgccagtga aagtgttgat agttatggca ataattttat gcaactggat 120
 [0316] cagcagagac caggacagcc acccaactc ctcatttate ttgcatccaa gctagaatct 180
 [0317] ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag agttcaccct caccattgac 240
 [0318] cctgtggagg ctgaagatgc tgcaacctat tactgtcagc aaaataatga ggatccgctc 300
 [0319] acgttcgggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa 333
 [0320] <210> 21
 [0321] <211> 121
 [0322] <212> PRT
 [0323] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0324] <400> 21
 [0325] Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
 [0326] 1 5 10 15
 [0327] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser His
 [0328] 20 25 30
 [0329] Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Met
 [0330] 35 40 45
 [0331] Gly Lys Met Trp Ser Asn Gly Asp Thr Asp Tyr Asp Ser Ala Ile Arg
 [0332] 50 55 60
 [0333] Ser Arg Leu Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 [0334] 65 70 75 80
 [0335] Lys Ile Asn Ser Leu Gln Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Ala
 [0336] 85 90 95
 [0337] Arg Tyr Tyr Phe Ser Ser Tyr Gly Gly Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 [0338] 100 105 110
 [0339] Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
 [0340] 115 120
 [0341] <210> 22
 [0342] <211> 363
 [0343] <212> DNA
 [0344] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0345] <400> 22
 [0346] caagtccaac taaaggagtc aggacctggt ctggtacagc catcacagac cctgtctctc 60
 [0347] acctgcaactg tctctggggtt ttcattaacc agccatactg taagctggat tcggcagcct 120
 [0348] ccaggaaggg gtctggagtg gatgggaaaa atgtggagta atggagacac agattatgat 180
 [0349] tcagctatca gateccgact gagcatcacc agggacacct cgaagagcca agttttctta 240
 [0350] aagataaaca gtctgcaaac tgaagacaca gccatgtact tctgtgccag atattacttt 300

[0351] agcagctatg gaggtggcta ctttgattac tggggccaag gagtcatggt cacagtctcc 360
 [0352] tca 363
 [0353] <210> 23
 [0354] <211> 106
 [0355] <212> PRT
 [0356] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0357] <400> 23
 [0358] Asp Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln
 [0359] 1 5 10 15
 [0360] Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Tyr Met
 [0361] 20 25 30
 [0362] His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Gln Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 [0363] 35 40 45
 [0364] Ser Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 [0365] 50 55 60
 [0366] Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp
 [0367] 65 70 75 80
 [0368] Asp Ile Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Glu Leu Pro Asp Thr
 [0369] 85 90 95
 [0370] Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 [0371] 100 105
 [0372] <210> 24
 [0373] <211> 318
 [0374] <212> DNA
 [0375] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0376] <400> 24
 [0377] gacactgtgc tgaccagtc tcttgctttg gctgtgtctc taggacagag ggtcaccatc 60
 [0378] tcttgtaggg ccagcaaaag tgctagtaca tatatgcact ggtaccaaca gaaatcgga 120
 [0379] cagcaacca aactcctgatctatagtga tccaacctag aatctggagt cccttccagg 180
 [0380] ttcagtggga gtgggtctgg gacagacttt accctacca tagatcctgt ggaggctgat 240
 [0381] gacatagcaa actattactg tcagcagagt gatgaacttc cggacacctt tggagctggg 300
 [0382] accaagctgg aactgaaa 318
 [0383] <210> 25
 [0384] <211> 119
 [0385] <212> PRT
 [0386] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0387] <400> 25
 [0388] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 [0389] 1 5 10 15

[0390] Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 [0391] 20 25 30
 [0392] Pro Met Ala Trp Val Arg Gln Thr Pro Ser Lys Ala Leu Glu Trp Val
 [0393] 35 40 45
 [0394] Ala Thr Ile Ser Pro Ser Gly Gly Thr Ser Tyr Ser Arg Asp Ser Val
 [0395] 50 55 60
 [0396] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Asn Ser Thr Leu Cys
 [0397] 65 70 75 80
 [0398] Leu His Met Asp Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 [0399] 85 90 95
 [0400] Leu Arg Glu Arg Ile Tyr Asn Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 [0401] 100 105 110
 [0402] Val Met Val Thr Val Ser Ser
 [0403] 115
 [0404] <210> 26
 [0405] <211> 357
 [0406] <212> DNA
 [0407] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0408] <400> 26
 [0409] gaggtgcagc tgctagaatc tgggggcggt ttagtgcagc ctggaaggtc catgaaactc 60
 [0410] tcctgtgcgg cctcaggatt cactttcagt agctttccaa tggcctgggt ccgccagact 120
 [0411] ccatcgaagg ctctggagtg ggtcgcaacc attagtccta gtgggtgtac ctcttactct 180
 [0412] cgagactccg tgaagggccg attcactatc tccagagata atgcaaacag caccctatgt 240
 [0413] ctacacatgg acagtctgaa gtctgaggac acggccactt attattgttt acgagaaagg 300
 [0414] atttataaca cttactttga ttactggggc caaggagtca tggtcacagt ctctca 357
 [0415] <210> 27
 [0416] <211> 107
 [0417] <212> PRT
 [0418] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0419] <400> 27
 [0420] Asp Ile Arg Met Thr His Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 [0421] 1 5 10 15
 [0422] Glu Thr Val Ser Ile Glu Cys Leu Pro Ser Glu Asp Ile Ser Ser Asp
 [0423] 20 25 30
 [0424] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
 [0425] 35 40 45
 [0426] Tyr Asn Ala Asn Thr Leu Pro Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 [0427] 50 55 60
 [0428] Ser Arg Ser Gly Ala Gln Tyr Phe Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser

| | | | | |
|--------|---|-----|-----|----|
| [0429] | 65 | 70 | 75 | 80 |
| [0430] | Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Tyr | | | |
| [0431] | | 85 | 90 | 95 |
| [0432] | Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys | | | |
| [0433] | | 100 | 105 | |
| [0434] | <210> 28 | | | |
| [0435] | <211> 321 | | | |
| [0436] | <212> DNA | | | |
| [0437] | <213> 人工序列(Artificial Sequence) | | | |
| [0438] | <400> 28 | | | |
| [0439] | gatatccgga tgacacactc tccagcttcc ctgtctgcat ctctgggaga gactgtcagc 60 | | | |
| [0440] | atcgaatgtc taccaagtga ggacatttcc agtgatttag catggtatca gcagaagcca 120 | | | |
| [0441] | gggaaatctc ctcagctcct catctataat gcaaatactt tgccaaatgg ggtcccttca 180 | | | |
| [0442] | cggtttagtg gcagtagatc tggcgcacag tattttctaa aaataaacag cctgcaatct 240 | | | |
| [0443] | gaggatgtcg cgacttattt ctgtcagcaa tatgacagtt atccgtacac gtttggaact 300 | | | |
| [0444] | gggaccaagc tggaactgaa a 321 | | | |

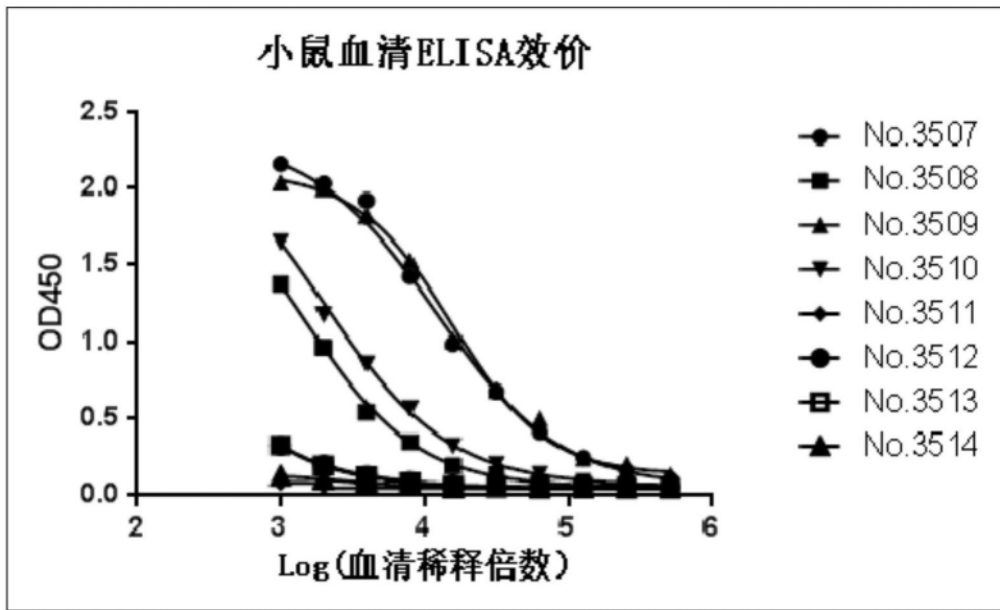


图1

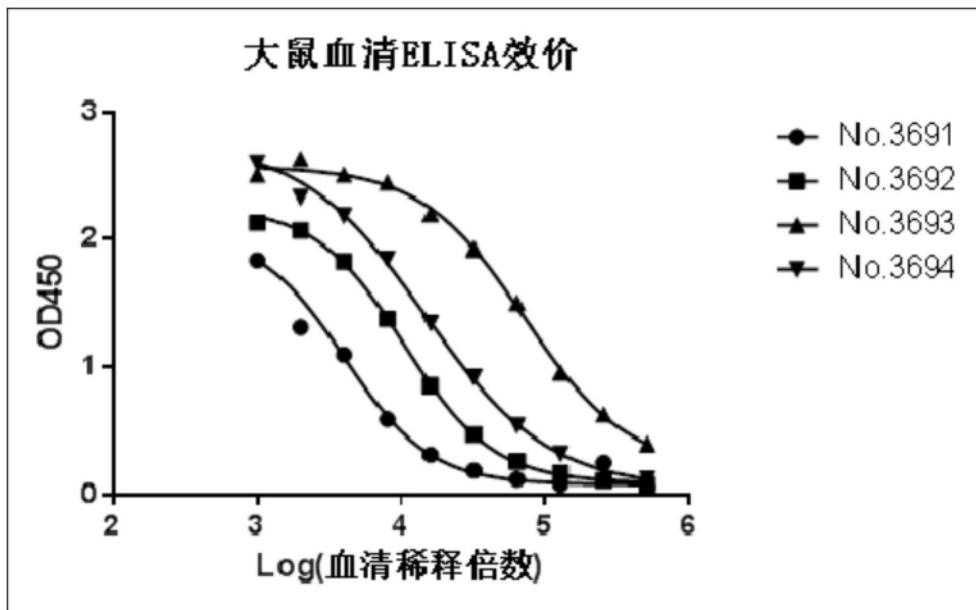


图2

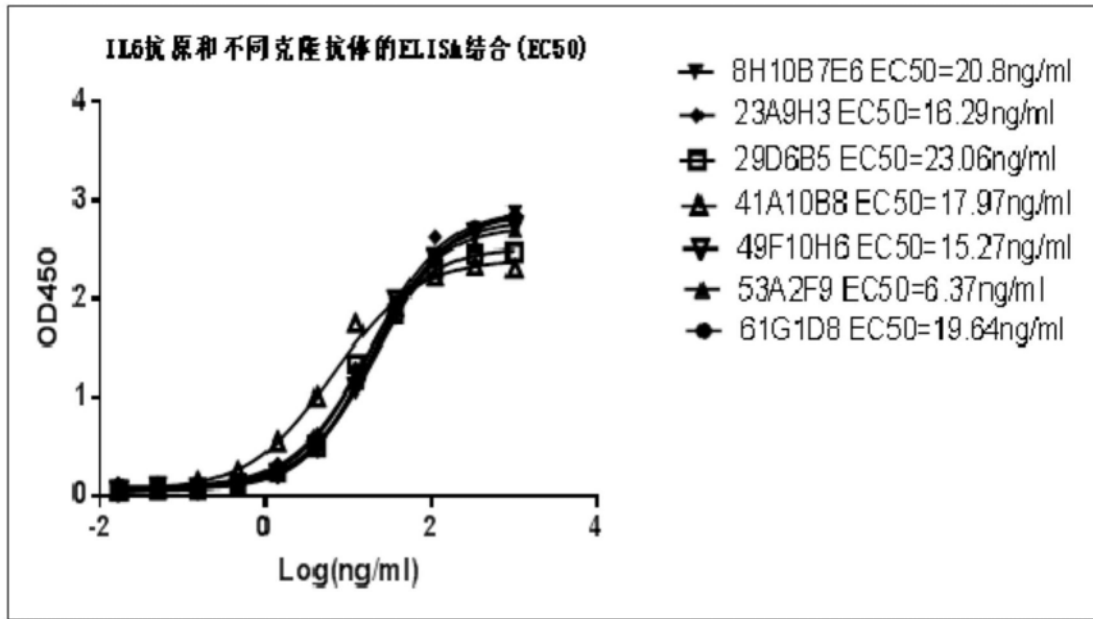


图3

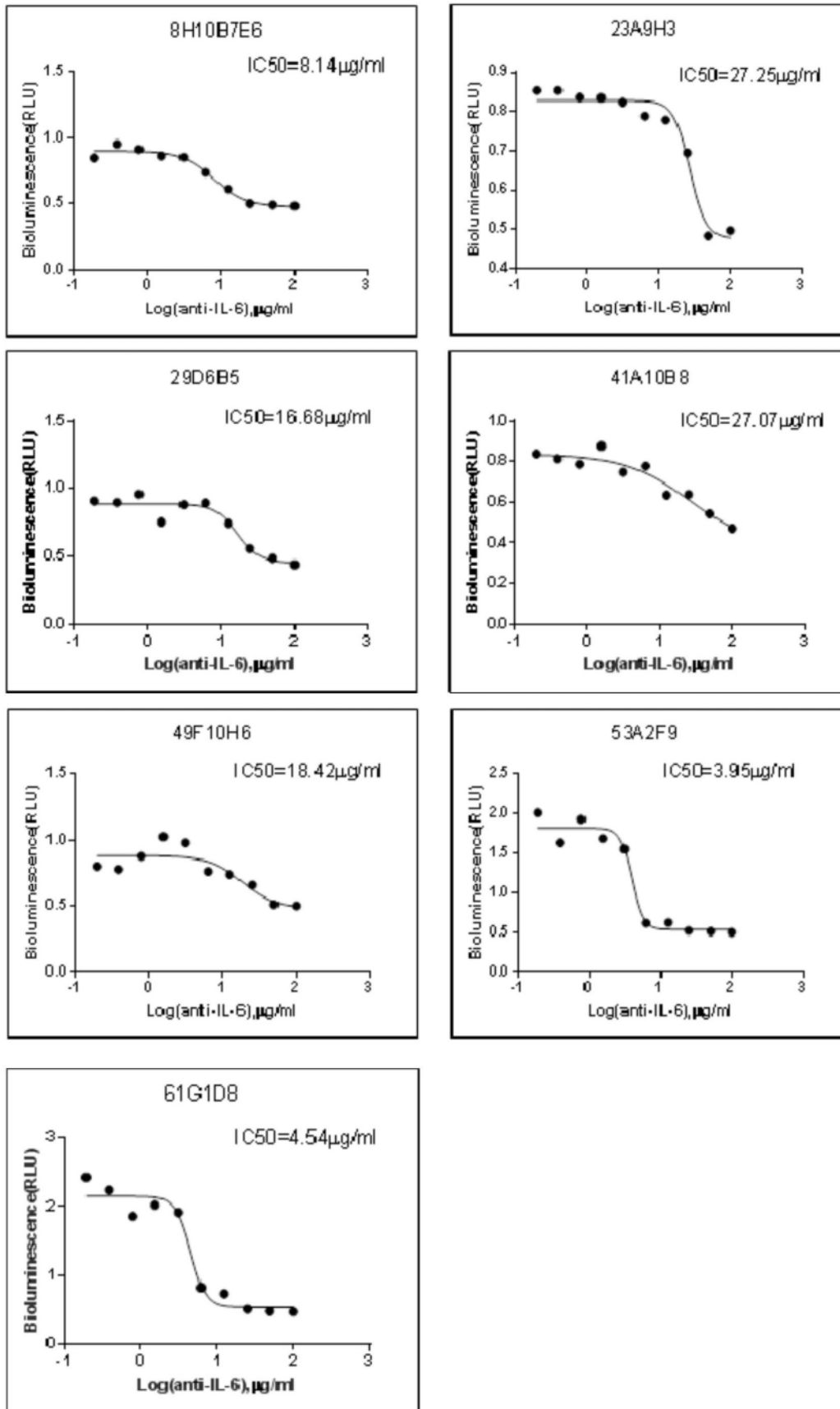


图4

| 配体 | 分析物 | ka(1/Ms) | kd(1/s) | KD (M) |
|----------|------|----------|----------|----------|
| 41A10B8 | | 6.81E+05 | 5.77E-05 | 8.47E-11 |
| 61G1D8 | | 7.34E+05 | 1.69E-04 | 2.30E-10 |
| 49F10H6 | | 5.14E+05 | 1.36E-04 | 2.65E-10 |
| 29D6B5 | IL-6 | 1.09E+04 | 2.13E-05 | 1.95E-09 |
| 8H10B7E6 | | 1.44E+04 | 3.45E-05 | 2.40E-09 |
| 23A9H3 | | 1.54E+04 | 1.35E-04 | 8.77E-09 |
| 53A2F9 | | 7.64E+05 | 1.72E-08 | 2.25E-14 |

图5