



(12) 发明专利申请

(10) 授权公告号 CN 103059137 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 24

(21) 申请号 201110322423. 1

(22) 申请日 2011. 10. 21

(71) 申请人 神州细胞工程有限公司

地址 100176 北京市经济技术开发区中和街
14 号 B-211

(72) 发明人 谢良志 张杰 赵静 孙春昀
贺正颖 胡萍 王加兰 李莉

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

A61P 29/00 (2006. 01)

A61P 19/04 (2006. 01)

A61P 17/06 (2006. 01)

A61P 37/02 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页
序列表6页 附图2页

(54) 发明名称

抗 hIL6R 高亲和力抗体的制备及应用

(57) 摘要

本发明提供一种高亲和力的人白细胞介素-6受体 (hIL6R) 鼠单克隆抗体, 抗体能特异性识别重组 hIL6R 蛋白, 有效阻断重组 hIL6R 和重组 IL6 的结合。基于该抗体建立了高灵敏度的双抗夹心酶联免疫检测方法, 可用于 IL6R 的特异性检测。抗体可特异性识别细胞膜上的 hIL6R, 能有效阻断细胞上 hIL6R 与 IL6 的结合介导的细胞增殖抑制效应。所述抗体为进一步开发临床治疗性药物提供了候选抗体。

1. 一种高亲和力的人白细胞介素-6受体 (human interleukin-6 receptor, hIL6R) 抗体, 其特征在于: 轻链上互补决定区 CDR1, CDR2, CDR3 的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO :5, SEQ ID NO :6, SEQ ID NO :7 ; 重链上互补决定区 CDR1, CDR2, CDR3 的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO :8, SEQ ID NO :9, SEQ ID NO :10。
2. 权利要求 1 所述的抗体, 其轻链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO :3, 重链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO :4。
3. 权利要求 1 所述的抗体, 其轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO :1 ; 重链氨基酸序列为 SEQ ID NO :2。
4. 权利要求 1 所述的抗体为单克隆抗体。
5. 权利要求 4 所述的抗体, 其特征为轻链恒定区为 κ 链, 重链恒定区为 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD 或 IgE 型。
6. 权利要求 4 所述的抗体, 其特征为轻链恒定区为 κ 链, 重链恒定区为 IgG1。
7. 权利要求 4 所述的抗体为鼠单克隆抗体。
8. 权利要求 7 所述的鼠单克隆抗体, 其制备方法为杂交瘤方法。
9. 权利要求 1 所述的抗体, 其特征在于能有效阻断由 hIL6R 和 hIL6 结合而介导的信号途径, 具有细胞水平上的中和活性。
10. 权利要求 1 所述的抗体, 其特征在于能有效阻断重组 hIL6R 蛋白和重组 hIL6 蛋白在体外的结合, 具有蛋白水平上的中和活性。
11. 权利要求 1 所述的抗体在建立高灵敏度的 hIL6R 的双抗夹心酶联免疫检测方法中的应用。
12. 权利要求 1 所述的抗体在制备诊断和 / 或 IL6/IL6R 介导的相关疾病的制剂中的应用。

抗 hIL6R 高亲和力抗体的制备及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学技术领域,涉及一种人白介素 6 受体 (hIL6R) 的高亲和力中和活性抗体的制备及其应用。

背景技术

[0002] 人白细胞介素 -6 (human interleukin-6, hIL6) 是一种具有多重免疫调节功能的细胞因子,具有广泛的生物学功能,可由 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、成纤维细胞、内皮细胞、巨噬细胞和心肌细胞等产生。hIL6 通过细胞上的两种蛋白传导其生物活性,一种是人白细胞介素 -6 受体 (human interleukin-6 receptor, hIL6R),一种是分子为 130KD 的 gp130 蛋白。hIL6 和 hIL6R 结合形成二元复合物,此复合物再与细胞膜结合的 gp130 相互作用,然后诱导信号传导。

[0003] hIL6R 可分为细胞膜结合型和可溶性 hIL6R (human soluble interleukin-6 receptor, hsIL6R) 两种类型。细胞膜结合型 hIL6R 由 468 个氨基酸组成,切除 N 端 19 个氨基酸的信号肽后获得含有 449 个氨基酸的成熟分子,有 6 个 N-糖基化位点,分子量为 80KD,分为胞外区、穿膜区和包浆区,三个区分别包含 339、28 和 82 个氨基酸。hIL6R 即与 hIL6 的结合,又与 gp130 蛋白的偶联,单独的 hIL6R 和 hIL6 结合是低亲和力。hIL6R 分布较广,分布于淋巴细胞和非淋巴细胞,如活化 B 细胞,骨髓瘤细胞,静止 T 细胞、肝细胞和单核细胞等。hIL6R 在很多肿瘤细胞上也都有表达,如多发性骨髓瘤、前列腺癌、白血病等。对 hIL6R 在疾病组织中的表达情况的检测可以对相关疾病的情况进行评价或跟踪。

[0004] hsIL6R 是 hIL6R 的一种特殊形式,分子量为 50KD,与细胞膜结合型的 hIL6R 的胞外区的只有 C 端的 10 个氨基酸不同。hsIL6R 可以和 hIL6 结合,形成的 hsIL6R/hIL6 复合体和细胞膜上的 gp130 结合从而也可以诱导胞内信号传导。通过这种机制,hIL6 可以激活不表达 hIL6R 的细胞,所以 hsIL6R 在 hIL6 的信号传导中扮演着重要的角色。研究发现报道称在一些慢性炎症性疾病和自身免疫性疾病中出现 hsIL6R 的高水平表达;另外恶性肿瘤患者血清中 hsIL6R 水平明显高于健康对照组,随着病情的加重 hsIL6R 水平进一步升高,表明对血清中的 hsIL6R 的检测对恶性肿瘤病情的监察及治疗效果的判断可能有一定的参考价值。

[0005] 目前研究表明 hIL6 与多种疾病如炎症性疾病、自身免疫性疾病及肿瘤的发生、发展和预后有关,某些急性炎症、自身免疫性疾病及淋巴细胞恶性肿瘤等疾病均与体内 hIL6 水平异常增高相关。hIL6 只能通过其受体来进行作用,对 hIL6 表达的调节可以在其受体水平上进行,所以 hIL6R 成为多种疾病的治疗靶点,为药物筛选和药物设计提供了新的思路和方法。可通过 hIL6R 抗体阻断 hIL6R 和 hIL6 的结合,从而可能达到治疗 hIL6 相关疾病的目的,比如类风湿性关节炎、Castleman 氏症、系统性红斑狼疮 (SLE)、银屑病及 2 岁及肿瘤等。类风湿性关节炎的发病率为总人口的 0.8%,且 80% 的患者在 35-50 岁发病,对患者和社会都带来很大的痛苦和负担。Castleman 氏症的发病率尚无明确统计,但它可发生在存在淋巴结的任何部位,常见于年轻人,可在任何年龄发病。银屑病发病率占世界人口的

0.1%~3%，给患者的身心都带来了很大的创伤。hIL6R 的抗体是有巨大的前景的治疗这些疾病的药物靶标。

[0006] 目前应用于临床的 hIL6R 的抗体只有 tocilizumab。Tocilizumab 被美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准用于治疗类风湿性关节炎，适用于使用其他已获批的治疗药物无效的成年中重度类风湿性关节炎患者。Tocilizumab 被日本批准用于 Castleman 氏症的治疗。Tocilizumab 在其他疾病，如银屑病和系统性红斑狼疮 (SLE) 等也表现出了一定的治疗效果，表现出更大的市场潜力和市场需求。但是目前市场上只有一家公司有 hIL6R 抗体药物，全球市场的空缺很大。而我国目前还没有上市的相关产品，所以迫切需要研发 hIL6R 的抗体药物，弥补国内的空白。该发明提供的 hIL6R 高亲和力鼠单克隆抗体的成功研制恰为相关药物的研发提供了优质的候选抗体，也将为进一步研制其他类型抗体（如人源化抗体）提供了条件和基础。

发明内容

[0007] 本发明提供一种 hIL6R 高亲和力鼠单克隆抗体，该抗体能与重组表达的 hIL6R 结合，也能与细胞水平的 hIL6R 结合。该抗体与重组 hIL6R 结合的亲和常数为 $1.72 \times 10^{-11} \text{M}$ 。该抗体的轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO :1；重链氨基酸序列为 SEQ ID NO :2；轻链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO :3，重链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO :4；轻链上互补决定区 CDR1，CDR2，CDR3 的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO :5，SEQ ID NO :6，SEQ ID NO :7；重链上互补决定区 CDR1，CDR2，CDR3 的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO :8，SEQ ID NO :9，SEQ ID NO :10。

[0008] 本发明用来制备 hIL6R 鼠单克隆抗体的免疫原是利用哺乳动物细胞在体外重组表达的 hIL6R 胞外区片段，采用的技术是小鼠杂交瘤技术。

[0009] 本发明利用酶联免疫检测方法，证明所述 hIL6R 单克隆抗体可以在蛋白水平有效的阻断重组 hIL6R 和重组 hIL6 的结合，说明该抗体在蛋白水平上具有中和活性。另外，本发明利用细胞活性检测试验，证明所述 hIL6R 鼠单克隆抗体可以有效阻断 hIL6 与 hIL6R 结合介导的抑制细胞增殖的效应，说明该抗体在细胞水平上具有中和活性。具有中和活性的抗 hIL6R 单克隆抗体将成为进一步开发临床治疗性药物的候选抗体。中和活性检测实验以半数有效浓度 (concentration for 50% of maximum effect, EC50) 作为抗体中和能力的判断依据。

[0010] 本发明还提供一种基于所述 hIL6R 鼠单克隆抗体建立的 hIL6R 酶联免疫检测方法 (ELISA)。该 ELISA 使用的是双抗夹心酶联免疫检测方法，捕获抗体为本发明的 hIL6R 鼠单克隆抗体，检测抗体为 hIL6R 多克隆抗体，标准样品为体外重组表达的 hIL6R。检测的灵敏度为 0.031ng/ml，所建立的 ELISA 方法可用于 hIL6R 的特异性检测。

附图说明

[0011] 图 1 hIL6R 鼠单克隆抗体亲和力测定

[0012] 图 2 hIL6R 鼠单克隆抗体在蛋白水平上的中和活性的检测

[0013] 图 3 hIL6R 鼠单克隆抗体在细胞水平上的中和活性的检测

[0014] 图 4 基于抗 hIL6R 鼠单克隆抗体建立的酶联免疫检测方法的标准曲线

具体实施方式

[0015] 实施例 1、hIL6R 鼠单克隆抗体的制备

[0016] 1、hIL6R 鼠单克隆抗体的制备

[0017] 1) 动物免疫 :为了获得可以识别 hIL6R 蛋白的鼠单克隆抗体,该发明以北京义翘神州生物技术有限公司生产的重组 hIL6R 胞外区片段为免疫原,免疫 Ba1b/c 小鼠,每只小鼠免疫 50 μ g,首次免疫将免疫原与等量的完全弗氏佐剂制成乳化剂,腹部皮下多点注射,间隔 3 周取相同剂量免疫原与等量不完全弗氏佐剂制成乳化剂,加强免疫两次,三次免疫后测定血清效价,取血清效价高的小鼠用免疫原腹腔加强免疫一次,3 天后取脾进行融合。

[0018] 2) 细胞融合和克隆化 :取小鼠脾细胞,按 5-10 : 1 比例与 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞进行混合,聚乙二醇法进行细胞融合,制备杂交瘤细胞。以重组 hIL6R 蛋白作为包被抗原,用 ELISA 法测定细胞上清液,筛选阳性孔,通过有限稀释进行克隆化,直至得到稳定分泌 hIL6R 特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0019] 3) 单克隆抗体的生产与纯化 :选取杂交瘤细胞株,利用培养瓶或生物反应器进行细胞培养,收集细胞培养上清,利用蛋白 A 进行亲和纯化,对抗体进行鉴定后分装,于 -20 $^{\circ}$ C 低温保存备用。

[0020] 实施例 2、抗体的筛选和鉴定

[0021] 获得多株 hIL6R 鼠单克隆抗体后,首先对抗体进行初步鉴定和筛选,包括抗体亲和力的鉴定及中和活性的检测 :

[0022] 抗体亲和力的鉴定 :对获得的鼠单克隆抗体进行抗体亲和力的初步鉴定,使用 Octet 生物分子相互作用分析仪对所筛抗体的亲和力进行验证,使用 Fortebio 公司的 Octet 生物分子相互作用分析仪进行 hIL6R 单克隆抗体的亲和力测定。其中使用到的材料为生物素标记的重组 hIL6R 蛋白,使用浓度为 30 μ g/ml。通过条件摸索后将抗体稀释 4 个不同浓度,3.33nM,1.67nM,0.8333nM 和 0.4167nM。通过比较各个抗体亲和力,从中选择亲和力较好的抗体。

[0023] 抗体中和活性检测 :抗体的中和活性检测是抗体对蛋白或细胞的生物活性的干涉能力的评价。通过体外试验,检测 hIL6R 单克隆抗体对重组表达的 hIL6R 蛋白和细胞表面的 hIL6R 的中和能力,从而来检测各株抗体的中和活性。

[0024] 通过 ELISA 方法来检测 hIL6R 单克隆抗体对重组表达 hIL6R 蛋白的中和能力 :
(1) 把重组表达的 hIL6 蛋白包被在酶标板上,2 μ g/ml,100 μ l/ 孔,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,然后加入 300 μ l 封闭液进行封闭,常温孵育 1h 后洗板三遍 ;(2) 加入生物素标记的重组 hIL6R 蛋白,浓度为 0.2 μ g/ml,50 μ l/ 孔,以样品稀释液为空白对照 ;然后在孔中再加入用样品稀释液稀释的 hIL6R 鼠单克隆抗体,浓度分别为 400 μ g/ml,100 μ g/ml,50 μ g/ml,25 μ g/ml,12.5 μ g/ml,6.25 μ g/ml,3.125 μ g/ml,1.563 μ g/ml,0.781 μ g/ml,0.391 μ g/ml,0.195 μ g/ml,0.098 μ g/ml,0.049 μ g/ml,0.024 μ g/ml,0.012 μ g/ml,0.003 μ g/ml,0 μ g/ml,同时以相同浓度的同亚型人 IgG(hIgG1) 为对照,50 μ l/ 孔,常温孵育 1h 后洗板三遍 ;
(3) 加入链霉素标记的辣根过氧化物酶 (HRP),100 μ l/ 孔,常温孵育 1h 后洗板三遍 ;(4) 加入显色液,100 μ l/ 孔,常温显色 15 分钟后终止,450nm 下测定吸光值。

[0025] ELISA 使用的缓冲液 :包被缓冲液为 pH9.6,0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液,封闭液为含 2% FBS 的 Tris 缓冲液 ;样品稀释液为含有 0.1% 牛血清白蛋白 (FBS) 的磷酸盐缓冲液 ;

浓缩洗涤液为含有 2%吐温的 Tris 缓冲液或含有 2%吐温的磷酸盐缓冲液;显色液由 A 液和 B 液组成, A 液为过氧化氢或过氧化脲, B 液为四甲基联苯;终止液为 2mol/L 的硫酸。

[0026] 通过细胞增殖抑制实验来检测 hIL6R 单克隆抗体对细胞水平上 hIL6R 的中和能力:(1)100g 离心 5min 收集 M1 小鼠白血病细胞,用含 10% FBS 的 1640 培养基清洗细胞一遍后,以每孔 2×10^4 个细胞接种于 96 孔细胞培养板上, $50 \mu\text{l}$ /孔,置于 CO2 培养箱中孵育待用;(2)以含 10% FBS 的 1640 作为稀释液稀释样品,将重组 hIL6 和重组 hIL6R 混合,然后取 10 μl 混合物加入到孔中,使重组 hIL6 和重组 hIL6R 的终浓度分别为 100ng/ml 和 50ng/ml。37 度培养箱中孵育 1h;(3)加入以含 10% FBS 的 1640 稀释得到的 hIL6R 单克隆抗体,浓度依次是 100 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$, 0.8 $\mu\text{g/ml}$, 0.16 $\mu\text{g/ml}$, 0.032 $\mu\text{g/ml}$, 0.0064 $\mu\text{g/ml}$, 0.0013 $\mu\text{g/ml}$, 0 $\mu\text{g/ml}$, $50 \mu\text{l}$ /孔,然后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 72h;(4)加入 MTT, $15 \mu\text{l}$ /孔,孵育 4h;(5)加入三联液(10%的十二烷基硫酸钠、5%异丁醇和 0.1% HCl,充分溶解均匀后得到三联液), $100 \mu\text{l}$ /孔,孵育过夜,570nm 和 630nm 分别读取吸光值,两者的差值为测定的结果,反应细胞的状况。

[0027] 根据多株抗体的亲和力及中和活性的初步鉴定结果,筛选获得一株本发明所述的具有高亲和力的中和活性抗体,其杂交瘤细胞株的克隆号为 8C1D8B5:

[0028] 本发明所述抗体的亲和力测定结果见图 1,结果显示:所述 hIL6R 鼠单克隆抗体与重组 hIL6R 蛋白结合的亲和常数为 $1.72 \times 10^{-11}\text{M}$,说明该抗体与重组 hIL6R 蛋白具有很好的亲和力。

[0029] 本发明所述抗体在蛋白水平上的中和活性测定结果见图 2,随着 hIL6R 鼠单克隆抗体浓度的增加,对 hIL6R 和 IL6 的结合的抑制强度也逐渐增加,而同亚型的对照抗体对 hIL6R 和 IL6 的结合没有表现出这种抑制效应,说明 hIL6R 鼠单克隆抗体可以有效的阻断 hIL6 和 hIL6R 的结合,证明所述抗体在蛋白水平上具有中和作用,EC50 为 0.5-0.6 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0030] 本发明所述抗体在细胞水平上的中和活性测定结果见图 3, hIL6 和 hIL6R 的结合对 M1 细胞的增殖是起到抑制作用,而随着体系中 hIL6R 单克隆抗体的浓度的增加,这种抑制效应逐渐被阻断,细胞得以增殖,而同亚型的对照抗体没有表现出这种阻断抑制的效应。说明 hIL6R 单克隆抗体有效的阻断了 hIL6 和 hIL6R 结合介导的细胞信号转导,证明所述抗体在细胞水平上具有中和活性,EC50 为 0.15 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0031] 实施例 3、单克隆抗体基因的获得

[0032] 收集状态良好的杂交瘤细胞,加入 TRIzol 提取总 RNA,通过电泳检测质量,通过 UV 测定浓度。然后使用商业试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。根据参考文献(Ying W et al., BMC Bioinformatics. 2006;7(Suppl 4):S9),采用专业领域人员已知的技术方案设计引物,以 cDNA 为模板分别 PCR 获得抗体的轻链和重链片段。将轻链和重链片段插入到 pcDNA3T 载体上,构建 pcDNA3-anti-hIL6R-L 和 pcDNA3-anti-hIL6R-H 载体。转化大肠杆菌,挑取阳性克隆,进行测序鉴定,分析测序结果,获得正确的轻链和重链氨基酸序列。

[0033] 测定结果及序列分析显示该抗体的轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO:1;重链氨基酸序列为 SEQ ID NO:2;轻链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO:3,重链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO:4;轻链上互补决定区 CDR1, CDR2, CDR3 的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7;重链上互补决定区 CDR1, CDR2, CDR3 的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10。详见序列表。

[0034] 实施例 4、基于抗体建立酶联免疫检测方法

[0035] 酶联免疫检测方法的具体操作步骤:(1) 使用碳酸盐缓冲液 (pH9.6,0.05M) 将捕获抗体,抗 hIL6R 鼠单克隆抗体进行包被,4 度孵育过夜;洗涤液洗板;用含有 2%牛血清白蛋白的 Tris 缓冲液进行封闭;(2) 将标准样品(重组 hIL6R 蛋白)、待测样用磷酸盐缓冲液(含 0.1%牛血清白蛋白)稀释后加入到酶标板中,常温条件孵育 2h;用洗涤液洗板;(3) 将磷酸盐缓冲液稀释后的生物素标记的检测抗体,抗 hIL6R 多克隆抗体加入到板中,常温条件下孵育 1h;用洗涤液洗板;(4) 加入亲和素标记的 HRP,常温条件下孵育 1h;用洗涤液洗板;(5) 加入显色液,常温显色 20min,终止显色,450nm 下测定吸光值。

[0036] 酶联免疫检测方法的条件摸索:通过正交试验方法,综合考虑背景及重组蛋白的光吸收值,选择抗体的包被浓度为 $2\mu\text{g/ml}$,生物素标记的检测抗体 $2\mu\text{g/ml}$ 。

[0037] 酶联免疫检测方法的灵敏度:加入的样品为重组 hIL6R 蛋白,样品用含 0.1% BSA 的磷酸盐缓冲液稀释成 1ng/ml , 0.5ng/ml , 0.25ng/ml , 0.125ng/ml , 0.063ng/ml , 0.031ng/ml , 0.016ng/ml , 0ng/ml ,加样量为 $100\mu\text{l/孔}$ 。以 hIL6R 浓度为横坐标,吸光值为纵坐标建立标准曲线, $y = 1.703x + 0.016$, $R^2 = 0.989$,见图 4,。以吸光值的平均值减去 3 倍标准误差大于空白对照吸光值平均值加上 3 倍标准误差的最低 hIL6R 浓度为酶联免疫检测方法的灵敏度。实验结果显示所建立的 hIL6R 酶联免疫方法的检测灵敏度达到 0.031ng/ml ,所建立的 hIL6R 酶联免疫检测方法有很高的灵敏度。

[0001]

序列表

<110> 神州细胞工程有限公司
 <120> 抗 hIL6R 高亲和力抗体的制备及应用
 <160> 10
 <170> PatentIn version 3.3

 <210> 1
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> mouse

 <400> 1
 Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Ser Gly Thr Cys Gly Asp
 1 5 10 15
 Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ile Gly Glu
 20 25 30
 Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser
 35 40 45
 Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 50 55 60
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 100 105 110
 Tyr Ser Tyr Leu Met Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125
 Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
 130 135 140
 Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn
 145 150 155 160
 Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu
 165 170 175
 Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190
 Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr
 195 200 205

[0002]

Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr
 210 215 220
 Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230 235

 <210> 2
 <211> 476
 <212> PRT
 <213> mouse

 <400> 2
 Met Gly Trp Scr Gly Val Phe Ile Phe Phe Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Glu Val Leu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asp Tyr Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Asp Ile Asp Pro Asn Thr Gly Gly Thr Phe Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Phe Asp
 115 120 125
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr
 130 135 140
 Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly
 145 150 155 160
 Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Ser
 165 170 175
 Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val His Thr
 180 185 190
 Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Met Ser Ser Ser Val
 195 200 205
 Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser Val
 210 215 220

[0003]

Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Thr Val Asp Lys Lys Leu Glu Pro Ser
 225 230 235 240
 Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Pro Cys Pro Pro Cys Lys Glu Cys His
 245 250 255
 Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe
 260 265 270
 Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val
 275 280 285
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile
 290 295 300
 Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr
 305 310 315 320
 His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro
 325 330 335
 Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val
 340 345 350
 Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ile
 355 360 365
 Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Ile Leu Pro Pro Pro Ala
 370 375 380
 Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Val Gly
 385 390 395 400
 Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Thr
 405 410 415
 Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 420 425 430
 Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys
 435 440 445
 Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr
 450 455 460
 Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser His Ser Pro Gly Lys
 465 470 475

<210> 3

<211> 105

<212> PRT

<213> mouse

<400> 3

[0004]

<400> 9

Asp Ile Asp Pro Asn Thr Gly Gly Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> mouse

<400> 10

Ala Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr

1

5

10

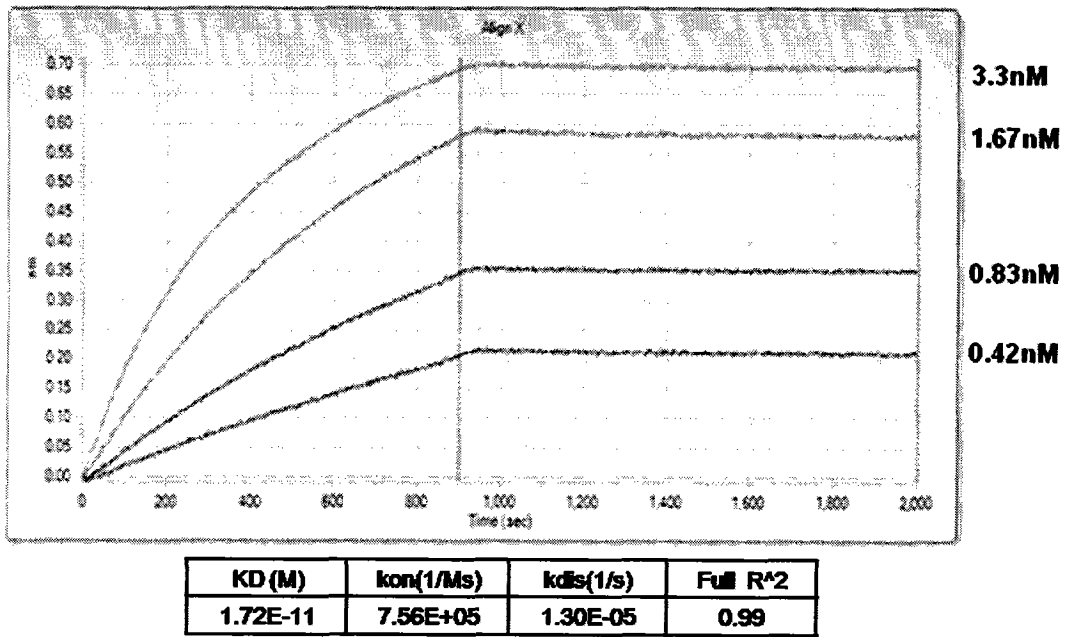


图 1

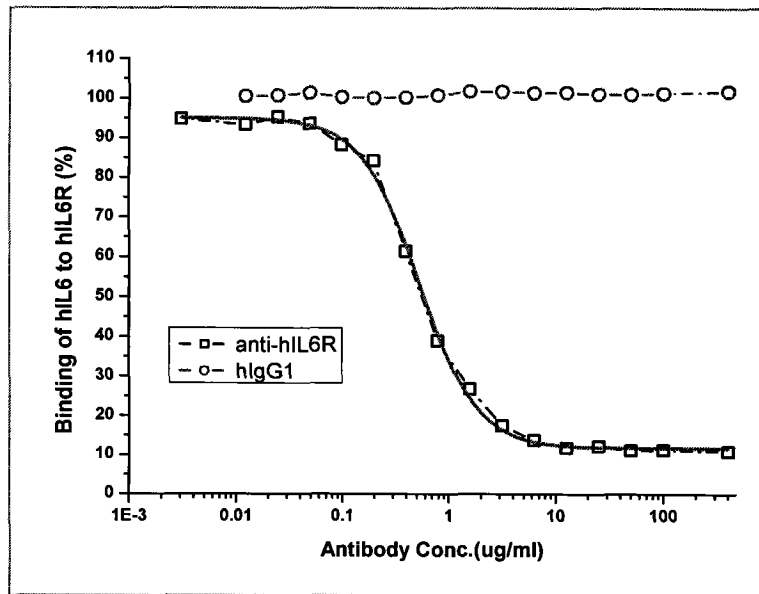


图 2

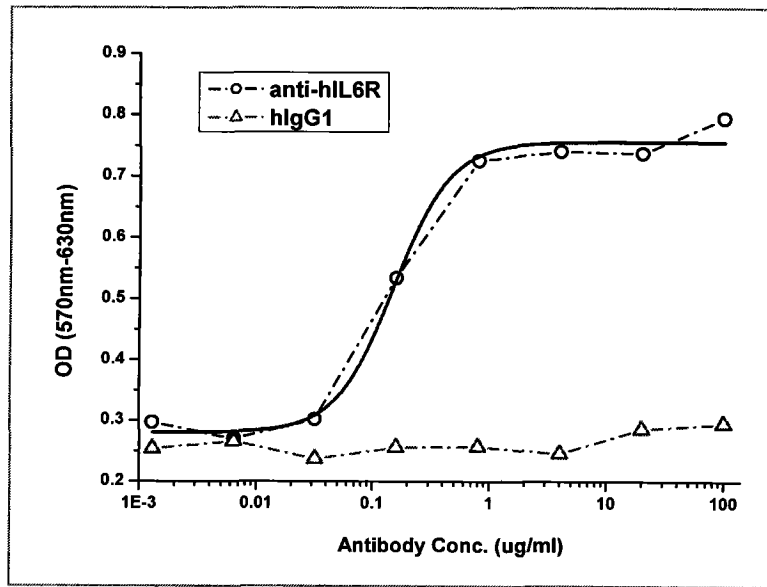


图 3

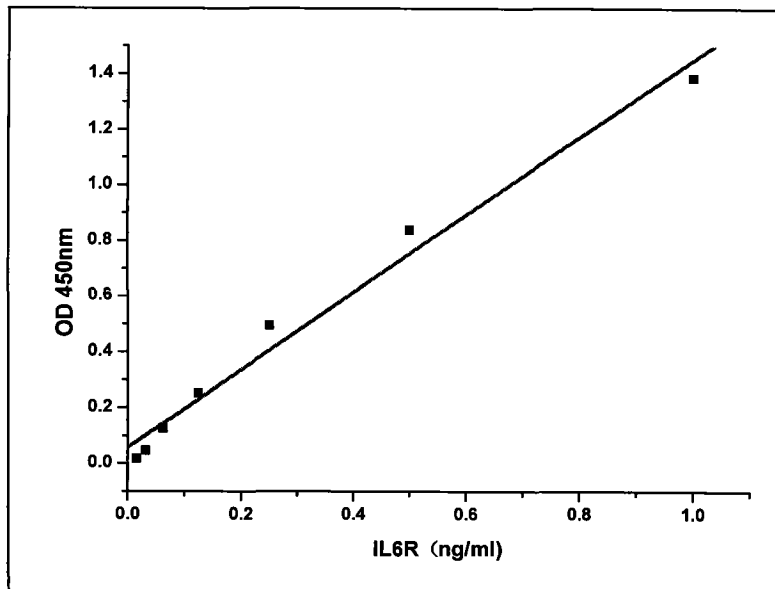
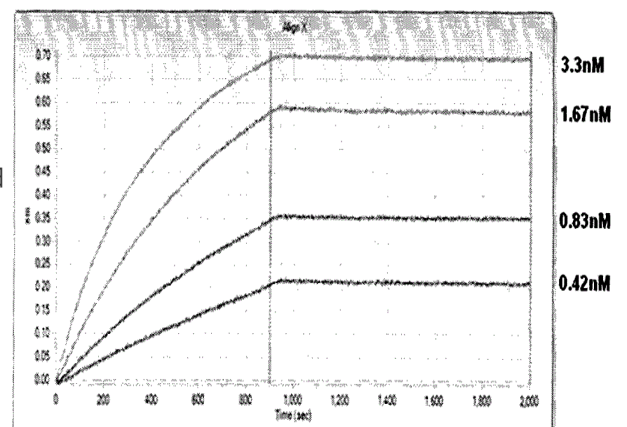


图 4

专利名称(译)	抗hIL6R高亲和力抗体的制备及应用		
公开(公告)号	CN103059137A	公开(公告)日	2013-04-24
申请号	CN201110322423.1	申请日	2011-10-21
[标]申请(专利权)人(译)	神州细胞工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	神州细胞工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	神州细胞工程有限公司		
[标]发明人	谢良志 张杰 赵静 孙春昀 贺正颖 胡萍 王加兰 李莉		
发明人	谢良志 张杰 赵静 孙春昀 贺正颖 胡萍 王加兰 李莉		
IPC分类号	C07K16/28 A61K39/395 A61P29/00 A61P19/04 A61P17/06 A61P37/02 A61P35/00 G01N33/53 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种高亲和力的人白细胞介素-6受体(hIL6R)鼠单克隆抗体，抗体能特异性识别重组hIL6R蛋白，有效阻断重组hIL6R和重组IL6的结合。基于该抗体建立了高灵敏度的双抗夹心酶联免疫检测方法，可用于IL6R的特异性检测。抗体可特异性识别细胞膜上的hIL6R，能有效阻断细胞上hIL6R与IL6的结合介导的细胞增殖抑制效应。所述抗体为进一步开发临床治疗性药物提供了候选抗体。



KD (M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)	Full R ²
1.72E-11	7.56E+05	1.30E-05	0.99