



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107810200 B

(45) 授权公告日 2021. 04. 06

(21) 申请号 201680033481.3	(51) Int.Cl.
(22) 申请日 2016.06.01	C07K 16/30 (2006.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 107810200 A	C07K 16/40 (2006.01)
(43) 申请公布日 2018.03.16	G01N 33/574 (2006.01)
(30) 优先权数据 1509907.0 2015.06.08 GB	(56) 对比文件
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2017.12.08	WO 99/21014 A1,1999.04.29
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/GB2016/051609 2016.06.01	Kai et al.Diagnosis of Genito-Urinary Tract Cancer by Detection of Minichromosome Maintenance 5 Protein in Urine Sediments.《Journal of the National Cancer Institute》.2002,摘要,第1072页左栏 第3段-第1078页右栏第3段.
(87) PCT国际申请的公布数据 W02016/198834 EN 2016.12.15	T J DUDDERIDGE et al.Diagnosis of prostate cancer by detection of minichromosome maintenance 5 protein in urine sediments.《BRITISH JOURNAL OF CANCER》.2010,701-707.
(73) 专利权人 阿奎尔诊断有限公司 地址 英国泰恩-威尔郡	审查员 马骞
(72) 发明人 R·A·拉斯基 K·斯托伯	
(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所 有限公司 11038	
代理人 李程达	权利要求书2页 说明书26页 序列表13页

(54) 发明名称
结合MCM5的单克隆抗体

(57) 摘要
本发明涉及结合Mcm5的抗体。本发明进一步涉及包含该抗体的试剂盒、能够表达该抗体的杂交瘤、编码该抗体的多核苷酸、多肽及载体以及制备该抗体的方法。

1. 特异性结合Mcm5的单克隆抗体,该单克隆抗体包含由SEQ ID NO:21的序列组成的4B4 CDRH1,由SEQ ID NO:23的序列组成的4B4 CDRH2,由SEQ ID NO:25的序列组成的4B4 CDRH3,由SEQ ID NO:15的序列组成的4B4 CDRL1,由SEQ ID NO:17的序列组成的4B4 CDRL2,和由SEQ ID NO:19的序列组成的4B4 CDRL3。

2. 特异性结合Mcm5的单克隆抗体,该单克隆抗体包含由SEQ ID NO:9的序列组成的12A7 CDRH1,由SEQ ID NO:11的序列组成的12A7 CDRH2,由SEQ ID NO:13的序列组成的12A7 CDRH3,由SEQ ID NO:3的序列组成的12A7 CDRL1,由SEQ ID NO:5的序列组成的12A7 CDRL2,和由SEQ ID NO:7的序列组成的12A7CDRL3。

3. 根据权利要求1或2所述的抗体,其具有范围为1-10nM的针对Mcm5的亲和力。

4. 根据权利要求2所述的抗体,其中该抗体包含重链可变区,所述重链可变区具有与SEQ ID NO:29至少98%相同的序列,并且该抗体包含轻链可变区,所述轻链可变区具有与SEQ ID NO:27至少98%相同的序列。

5. 根据权利要求1所述的抗体,其中该抗体包含重链可变区,所述重链可变区具有与SEQ ID NO:33至少98%相同的序列,并且该抗体包含轻链可变区,所述轻链可变区具有与SEQ ID NO:31至少98%相同的序列。

6. 组合物,其包含根据权利要求1-5任一项所述的抗体。

7. 组合物,其包含

(i) 与SEQ ID NO:28至少98%、99%或100%相同的核酸序列,其包含SEQ ID NO:4的核酸序列、SEQ ID NO:6的核酸序列和SEQ ID NO:8的核酸序列,和与SEQ ID NO:30至少98%、99%或100%相同的核酸序列,其包含SEQ ID NO:10的核酸序列、SEQ ID NO:12的核酸序列和SEQ ID NO:14的核酸序列;或

(ii) 与SEQ ID NO:32至少98%、99%或100%相同的核酸序列,其包含SEQ ID NO:16的核酸序列、SEQ ID NO:18的核酸序列和SEQ ID NO:20的核酸序列,和与SEQ ID NO:34至少98%、99%或100%相同的核酸序列,其包含SEQ ID NO:22的核酸序列、SEQ ID NO:24的核酸序列和SEQ ID NO:26的核酸序列;或

(iii) SEQ ID NO:28的核酸序列,和SEQ ID NO:30的核酸序列;或

(iv) SEQ ID NO:32的核酸序列,和SEQ ID NO:34的核酸序列。

8. 宿主细胞,其包含根据权利要求7所述的核酸,任选地其中宿主细胞为CHO细胞或大肠杆菌(E.coli)细胞。

9. 制备抗体的方法,包括:

(i) 生长根据权利要求8所述的宿主细胞;和

(ii) 从宿主细胞分离抗体。

10. 根据权利要求9所述的方法:

(i) 进一步包括通过将该抗体缀合至放射性标记物来标记抗体的步骤;或

(ii) 进一步包括将该抗体固定至固体支持物的步骤。

11. 试剂盒,包含:

(i) 包含根据权利要求1或5的第一抗体的组合物;和

(ii) 包含根据权利要求2或4的第二抗体的组合物。

12. 根据权利要求1-5中任一项所述的抗体在制备用于测定样品中Mcm5的浓度或量的

方法的试剂盒中的用途,所述方法包括以下步骤:

- (i) 提供固定的第一抗体,其为固定至固体支持物的权利要求1-5任一项的抗体;
 - (ii) 将样品暴露于固定的第一抗体,使得样品中的Mcm5能够结合固定的抗体以提供固定的Mcm5;
 - (iii) 提供标记的第二抗体,其为缀合至标记物的权利要求1-5任一项的抗体;
 - (iv) 将固定的Mcm5暴露于标记的第二抗体,使得标记的第二抗体能够结合Mcm5;和
 - (v) 检测标记的第二抗体的浓度;
- 其中第一抗体和第二抗体二者均结合Mcm5,但是第一抗体和第二抗体结合Mcm5的不同表位。

13. 根据权利要求11所述的试剂盒或根据权利要求12所述的用途,其中第一抗体和第二抗体二者均结合Mcm5,但是第一抗体和第二抗体结合Mcm5的不同表位;和

- (a) (i) 第一抗体结合SEQ ID NO:1,第二抗体结合SEQ ID NO:2;或
- (ii) 第一抗体结合SEQ ID NO:2,第二抗体结合SEQ ID NO:1;和/或
- (b) 第一抗体固定至ELISA板;和/或
- (c) 第二抗体固定至ELISA板;和/或
- (d) 第二抗体与放射性标记物缀合,任选地其中放射性标记物是镧³⁺;和/或
- (e) 第一抗体与放射性标记物缀合,任选地其中放射性标记物是镧³⁺。

14. 根据权利要求12或13所述的用途,其中检测标记的第二抗体的浓度的步骤包括Eu³⁺的免疫荧光检测。

结合MCM5的单克隆抗体

发明领域

[0001] 本发明涉及结合Mcm蛋白的单克隆抗体,涉及包含单克隆抗体的组合物或试剂盒或使用所述抗体的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 泌尿系癌症(偶尔被称为“泌尿系统癌症”)是一个重大且日益增长的流行病学问题。两种最具经济重要性的泌尿系癌症是膀胱癌和前列腺癌。

[0004] 前列腺癌是男性中在非黑色素瘤皮肤癌之后第二大常见癌症,英国每年诊断的新病例超过35,000例;每年约有10,200人死于前列腺癌。每年,欧洲新增病例约30万例,美国约19万例,全球约67万例。英国癌症研究机构(Cancer Research UK)报告称,在英国男性中诊断出的所有癌症新病例中有四分之一是前列腺癌,60%的新诊断是70岁以上的男性。这种疾病最常见的形式是腺癌。英国的5年生存率接近80%。没有已知的环境原因,但与前列腺癌或乳腺癌近亲的人处于发展成该疾病的风险更大。西非和非裔加勒比男性具有增加的前列腺癌风险。

[0005] 前列腺癌的症状与前列腺良性肿大引起的症状类似,包括尿急、排尿困难或疼痛,罕见尿或精液中有血液。然而,在许多男性中,直到疼痛转移形成、主要是在骨骼中为止,这种疾病仍然没有症状。

[0006] 治疗取决于肿瘤的阶段和级别以及患者的一般健康和年龄。选项包括主动监测,局部或根治性前列腺切除术,睾丸切除术,激素治疗和放疗,如近距离放疗。睾丸切除术和激素治疗减少或消除肿瘤生长所必需的睾酮的产生。

[0007] 前列腺癌的明确诊断需要多方面的方法。目前用于前列腺癌的金标准诊断试验是活检材料的组织学检查。活检的决定是基于与年龄有关的血清(前列腺特异性抗原)PSA水平和/或异常直肠指检(DRE)。DRE(其中腺体被经直肠触诊以检查形态异常)也是非特异性的。不能检测到太小而不能改变腺体形态的肿瘤,并且非恶性疾病也会导致形态异常或肿大。这是本领域中的问题。前列腺的样品通常采用TRUS(经直肠超声)引导的穿刺活检。采取许多针芯(通常至多12个)以使采样腺体的区域最大化。该手术由泌尿科医生在护士或医疗助理的协助下在局部麻醉下在门诊部门进行。该手术存在缺点,包括对患者有些痛苦,使患者暴露于败血症和/或出血的风险中。在实验室中对组织核心进行显微检查以确定是否存在恶性细胞,这具有劳动密集型的问题,需要训练有素的细胞学家,并且容易出现人为错误。

[0008] 可以理解的是,活检是侵入性和昂贵的。本领域需要一种用于诊断和/或监测泌尿系癌症如前列腺癌的更具成本效益、可靠和/或非侵入性的工具。用于前列腺癌的已知的备选和/或较少侵入性的诊断程序涉及特定生物学标志物(“生物标志物”)的分析。

[0009] 前列腺癌的核酸生物标志物的实例是PCA3(前列腺癌基因3)测试。该泌尿系测定鉴定来自在前列腺癌中过表达的PCA3基因的非编码mRNA(Hessels&Schalken, The use of PCA3 in the diagnosis of prostate cancer. Nat Rev Urol, 6, 255-61; 2009)。PCA3测试(Gen-Probe, Inc)依赖于对用于排出前列腺分泌物的确定形式的前列腺按摩之后产生的第

一次抓取尿标本的分析,所述前列腺分泌物含有进入尿道的上皮细胞。作为前列腺癌的诊断,PCA3具有0.68的ROC(接受者操作特征曲线)值(Chun et al,Prostate Cancer Gene 3 (PCA3):development and internal validation of a novel biopsy nomogram.Eur Urol;2009vol 56p659-668),这与下面讨论的PSA测试类似。然而,PCA3测试是昂贵的并且不适合即时使用,这是现有技术的问题。

[0010] 常用于指示前列腺癌的存在蛋白质生物标志物的实例是PSA(前列腺特异性抗原)。在初级保健中出现症状的患者通常给予血清PSA测试和DRE。然而,PSA并不特异性针对前列腺癌。PSA是组成性表达的组织特异性细胞内酶。具有健康前列腺的男性血清中存在低浓度的PSA。由于从前列腺的渗漏,血清中的PSA水平升高,并且是腺体相对大小的指示。提高的PSA可以发生在非恶性病况,如良性前列腺增生和前列腺炎,也可以发生在前列腺癌。随着男性年龄的增长,腺体积增大,导致PSA水平在没有恶性疾病的情况下升高。在最近的研究中发现,60-70%的“阳性”PSA测试(血清PSA水平大于4ng/mL)与癌症无关(Kilpeläinen et al.,False-positive screening results in the Finnish prostate cancer screening trial,British Journal of Cancer.102,469-474;2010)。假阳性结果的高比率导致许多不必要的活检操作,并使测试不适合人群筛查。此外,PSA测试未能检测到大量的前列腺癌病例,特别是在较年轻的男性中。在ROC(受试者工作特征)分析中测量的PSA测试的准确性是0.678(Thompson et al.,Operating characteristics of a prostate-specific antigen in men with an initial PSA level of 3.0ng/ml or lower.JAMA,294,66-70;2005)。在英国,尽管快速即时(point-of-care)测定可用,但是PSA测试通常在医院实验室进行。

[0011] 膀胱癌在男性中是第四大常见癌症,女性中是第九大常见癌症,并且导致显著的发病率和死亡率(Jemal et al.CA Cancer J Clin.2007.57:43-66.)。大多数膀胱癌患者在出现肉眼可见或微观血尿或其他刺激性排尿症状,如尿频和尿痛后,会得到诊断。在初诊时,约70%的患者具有局限于上皮或上皮结缔组织的膀胱癌。这些癌症可以通过内镜切除和膀胱内治疗进行管理。这些肿瘤的复发率在50%至70%的范围内,并且10%至15%的病例在5年期间进展为肌层浸润(Shariat et al.,2008.Rev Urol.10:120-135)。即使几年后,复发也可能在局部见到,甚至在上尿路更罕见,需要终身监测。其余30%的患者在初诊时有肌层浸润性癌症。在该人群中,50%在2年内有远距离转移,并且60%尽管治疗却仍然在5年内死亡。

[0012] 膀胱癌的明确诊断需要结合手术。目前还没有方法可以准确、方便地鉴别早期膀胱癌的存在。目前用尿常规检查、膀胱镜检查 and 腹部超声,静脉尿路造影,计算机断层扫描或磁共振成像等扫描程序对提交给泌尿科具有适当症状的患者进行膀胱癌的筛查。偶尔使用尿液细胞学,其中显微镜检查来自尿液样品的细胞。作为检测膀胱癌的主要手段,膀胱镜检查是一项相对较短、创伤最小的手术,采用局部尿道麻醉,几乎可以鉴定所有的乳头状和无蒂(sessile)病变。然而,这仍然是侵入性的,并且是患者不舒服和困扰的原因。此外,膀胱镜检查有时可能是不确定的,因为膀胱粘膜出现严重异常,特别是留置导管或活动性炎症的患者,并且无法检测输尿管内的癌症。虽然考虑用于膀胱癌的的金标准,因为它允许直接可视化和膀胱尿道上皮活检,膀胱镜具有来自操作者的错误或来自可能难以检测的“原位癌”的小区域的明显的假阴性率(van der Poel&Debruyne.Curr Opin Urol.2001;

11:503-509;Herr.BJU Int.1999;84:1102-1103.)。

[0013] 在膀胱癌的尿液细胞学检查中,可以研究脱落细胞中特定细胞表面抗原的存在、细胞核形态、基因表达或其他生物学标志物。尿液细胞学检查对于高级别膀胱癌具有高度的灵敏度和特异性,但缺乏检测低级别肿瘤的灵敏度(Wiener et al.Acta Cytol.1993;37:163-169)。尿液细胞学检查在预测膀胱癌复发方面的准确性可能差别很大,部分原因是因为在结果的解释中存在主观因素。因此,细胞学检查对膀胱癌的筛查和监测并不理想。

[0014] Mcm5是癌症的生物标志物(W099021014)。尿沉渣中Mcm蛋白如Mcm5水平升高与前列腺恶性改变相关。因此这些Mcm蛋白水平的升高可以用来检测前列腺癌。使用**DELFI**A®(解离增强的镧系元素荧光免疫测定)和在双抗体测定中抗Mcm5单克隆抗体4B4和12A7,Dudderidge等人(BJC,103,701-707;2010)研究了Mcm5作为前列腺癌检测的尿生物标记物的用途,并得出结论认为它“似乎是用于鉴定前列腺癌患者的简单、准确和非侵入性的方法”。与具有30%特异性的PSA测试相比,Mcm5的特异性估计在73%和93%之间。重要的是,良性前列腺增生没有产生其为PSA测试的缺点的假阳性结果。

[0015] 然而,没有公开以高度特异性方式结合Mcm5并因此适合于设计针对Mcm5的高亲和力测定的抗体序列。

[0016] 发明概述

[0017] 本发明提供了以高度特异性的方式结合生物标志物(例如Mcm蛋白,例如Mcm5)的抗体。这些抗体可用于检测生物标志物的水平。例如,这些抗体可以用于检测泌尿系癌症的诊断测试。

[0018] 目前,泌尿系癌症、特别是前列腺癌或膀胱癌的检测是困难的,并且可能需要侵入性技术。Mcm5是癌症的生物标志物。本发明人已经开发了结合Mcm5但是彼此结合不同表位的两种抗体(12A7结合SEQ ID NO:1,4B4结合SEQ ID NO:2)。这样的抗体是有利的,因为它们可以用于检测Mcm5(或含有这些表位的类似Mcm蛋白)的测定中。具体而言,这些抗体可用于需要固定Mcm5抗原的测定。例如,可以使用双位点免疫测定来检测Mcm5。结合Mcm5的第一抗体可以结合到板上。该板可以暴露于诸如尿液样品的样品。样品中的任何Mcm5将被第一抗体固定(“捕获”)。然后可以洗涤板,留下结合第一抗体的固定的Mcm5,但去除任何其他污染物。结合Mcm5的第二抗体可用于检测结合的Mcm5的浓度。该第二抗体应该与检测剂如Eu³⁺缀合。该板可以暴露于第二抗体,并且第二抗体将与固定的Mcm5结合。任何过量的抗体可以通过洗涤去除。剩下的第二抗体的量可以通过荧光定量来检测,其将测量存在的Eu³⁺的量。剩下的第二抗体的量将与样品中Mcm5的浓度成比例。

[0019] 然而,为了开发这样的测定,必须鉴定结合Mcm5的两种抗体。此外,这两种抗体必须互相结合不同的表位,但是两种抗体结合的两种不同表位必须在空间上定位,使得两种抗体可以同时结合Mcm5(没有显著的空间位阻)。本发明人已经开发了两种这样的抗体(命名为12A7和4B4)。这两种抗体分别结合SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2。SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2代表两个不同的Mcm5表位,其在Mcm5上空间排列,以使两种抗体同时结合Mcm5。这在实施例2和3中得到了证实。本发明人首次鉴定了两个Mcm5表位,其排列成使得针对每个表位的抗体可以同时结合。此外,本发明人首次提供了能够独立结合Mcm5的两种抗体的序列。

[0020] 因此,在本发明的第一个方面,提供了抗体,该抗体:

[0021] (i) 结合具有SEQ ID NO:1或2的氨基酸序列的多肽;

[0022] (ii) 包含至少一个选自以下的CDR:

[0023] a. 12A7CDRH1, 其具有SEQ ID NO:9的序列或与SEQ ID NO:9相差单个氨基酸置换的序列;

[0024] b. 12A7CDRH2, 其具有SEQ ID NO:11的序列或与SEQ ID NO:11相差单个氨基酸置换的序列;

[0025] c. 12A7CDRH3, 其具有SEQ ID NO:13的序列或与SEQ ID NO:13相差单个氨基酸置换的序列;

[0026] d. 12A7CDRL1, 其具有SEQ ID NO:3的序列或与SEQ ID NO:3相差单个氨基酸置换的序列;

[0027] e. 12A7CDRL2, 其具有SEQ ID NO:5的序列或与SEQ ID NO:5相差单个氨基酸置换的序列;

[0028] f. 12A7CDRL3, 其具有SEQ ID NO:7的序列或与SEQ ID NO:7相差单个氨基酸置换的序列;

[0029] g. 4B4CDRH1, 其具有SEQ ID NO:21的序列或与SEQ ID NO:21相差单个氨基酸置换的序列;

[0030] h. 4B4CDRH2, 其具有SEQ ID NO:23的序列或与SEQ ID NO:23相差单个氨基酸置换的序列;

[0031] i. 4B4CDRH3, 其具有SEQ ID NO:25的序列或与SEQ ID NO:25相差单个氨基酸置换的序列;

[0032] j. 4B4CDRL1, 其具有SEQ ID NO:15的序列或与SEQ ID NO:15相差单个氨基酸置换的序列;

[0033] k. 4B4CDRL2, 其具有SEQ ID NO:17的序列或与SEQ ID NO:17相差单个氨基酸置换的序列;

[0034] l. 4B4CDRL3, 其具有SEQ ID NO:19的序列或与SEQ ID NO:19相差单个氨基酸置换的序列;

[0035] (iii) 包含重链可变区, 所述重链可变区具有与SEQ ID NO:29或33至少85%、90%、95%、98%、99%或100%相同的序列;

[0036] (iv) 包含轻链可变区, 所述轻链可变区具有与SEQ ID NO:27或31至少85%、90%、95%、98%、99%或100%相同的序列; 或者

[0037] (v) 与(i)、(ii)、(iii)或(iv)的抗体竞争。

[0038] 在本发明的第二个方面, 提供了组合物, 其包含本发明的抗体。

[0039] 在本发明的第三个方面, 提供了杂交瘤细胞系, 其能够产生本发明的抗体。

[0040] 在本发明的第四个方面, 提供了多核苷酸, 其包含编码包含本发明的抗体的重链的多肽的核酸序列。

[0041] 在本发明的第五个方面, 提供了多核苷酸, 其包含编码包含本发明的抗体的轻链的多肽的核酸序列。

[0042] 在本发明的第六个方面, 提供了多核苷酸, 其包含与SEQ ID NO:4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32或34至少85%、90%、95%、98%、99%或100%相同的核酸序列。

[0043] 在本发明的第七个方面,提供了多核苷酸,其包含SEQ ID NO:4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32或34的核酸序列。

[0044] 在本发明的第八个方面,提供了载体,其包含本发明的核酸。

[0045] 在本发明的第九个方面,提供了宿主细胞,其包含本发明的核酸或载体。

[0046] 在本发明的第十个方面,提供了制备抗体的方法,包括:

[0047] (i) 生长本发明的杂交瘤细胞系或宿主细胞;和

[0048] (ii) 从杂交瘤细胞系或宿主细胞分离抗体。

[0049] 在本发明的第十一个方面,本发明提供了试剂盒,包含:

[0050] (i) 包含本发明的第一抗体的组合物;和

[0051] (ii) 包含结合Mcm5的第二抗体的组合物。

[0052] 在本发明的第十二个方面,本发明提供了试剂盒,包含:

[0053] (i) 包含本发明的第一抗体的组合物;和

[0054] (ii) 包含本发明的第二抗体的组合物。

[0055] 在本发明的第十三个方面,本发明提供了测定样品中Mcm5的浓度或量的方法,包括以下步骤:

[0056] (i) 提供固定的第一抗体,其为固定至固体支持物的本发明的抗体;

[0057] (ii) 将样品暴露于固定的第一抗体,使得样品中的Mcm5能够结合固定的抗体以提供固定的Mcm5;

[0058] (iii) 提供标记的第二抗体,其为缀合至标记物的本发明的抗体;

[0059] (iv) 将固定的Mcm5暴露于标记的第二抗体,使得标记的第二抗体可以结合Mcm5;和

[0060] (v) 检测标记的第二抗体的浓度。

[0061] 详述

[0062] 抗体

[0063] 本发明提供了抗体。术语“抗体”可以指天然存在形式或重组抗体,例如单链抗体,嵌合抗体或人源化抗体。术语“一种抗体”和“多种抗体”也可以被认为包括能够结合靶蛋白诸如像Mcm5的Mcm蛋白的抗体的片段。这样的片段可以包括Fab'₂、F' (ab)₂、Fv、单链抗体或双抗体。在优选的实施方案中,本发明的抗体是天然存在的全长抗体(而不是片段)。在优选的实施方案中,抗体是小鼠抗体(即最初来源于小鼠脾细胞)。

[0064] 通常,抗体由两条重链和两条轻链形成。每条重链由重链恒定区(CH)和重链可变区(VH)组成。类似地,每条轻链由轻链恒定区(CL)和轻链可变区(VL)组成。VH和VL区包含互补决定区(CDR)。CDR主要负责与靶蛋白的特异性结合。

[0065] 本发明的抗体可以是任何类别的抗体,特别是IgG,IgM或IgA。在优选的实施方案中,抗体是IgG抗体。

[0066] 术语“单克隆抗体”旨在表示从基本上相似的抗体群体获得的抗体,即从除了少数天然存在的变体之外相同的抗体群体获得的抗体。单克隆抗体群体会结合相同的表位。单克隆抗体可以通过本领域技术人员众所周知的各种技术来生产,并且包括在“Monoclonal Antibodies:A manual of techniques”,H Zola(CRC Press,1988)和“Monoclonal Hybridoma Antibodies:Techniques and Application”,SG Hurrell(CRC Press,1982)中

所公开的方法。在实施方案中,本发明的抗体是单克隆抗体。

[0067] 抗体靶

[0068] 优选特异性针对Mcm5的抗体。甚至更优选地,抗体结合SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中的至少一个。任选地,抗体特异性结合SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中的至少一个。

[0069] Mcm5是推定的DNA复制许可因子,是MCM(微染色体维持)蛋白质家族的成员。MCM蛋白结合染色质并被认为是具有解旋酶活性,因此是DNA复制的核心成分。Mcm5在细胞周期从G0向G1/S期的转变中上调,可能主动参与细胞周期调控;Mcm5可以与MCM家族的至少两个其他成员相互作用。

[0070] MCM蛋白2-7包含在染色质上形成的复制前复合物的一部分,并且是后续DNA复制的基本先决条件或许可因子。MCM蛋白复合物充当复制解旋酶,因此是DNA复制机器的核心组分。MCM在细胞周期从G0向G1/S期的转变中上调,并主动参与细胞周期调控。MCM蛋白在染色质周围形成环状结构。

[0071] 人Mcm5基因定位于22q13.1,成熟Mcm5蛋白由734个氨基酸组成(SEQ ID NO:35; UNIPROT P33992:人类DNA复制许可因子MCM5)。然而,Mcm5基因可能在个体之间的序列中稍有不同。出于这个原因,短语“结合Mcm5”是指与SEQ ID NO:35结合的抗体,而且还涉及结合具有与SEQ ID NO:35至少90%、95%、98%、99%或100%相同的序列的多肽的抗体。在优选的实施方案中,抗体结合与SEQ ID NO:35为100%相同的多肽。此外,本发明的抗体会结合Mcm5的表位(片段)(例如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2)。因此,术语“结合Mcm5的抗体”是指仅结合Mcm5的单个表位例如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的抗体。

[0072] 为了本发明的目的,术语“结合亲和力”是指抗体结合其靶的能力。为了本发明的目的,术语“特异性结合”是指以它结合另一个非靶分子的结合亲和力的至少2倍,10倍,50倍或100倍的结合亲和力结合靶如Mcm5的抗体。在实施方案中,非靶分子是Mcm5以外的Mcm蛋白,例如Mcm 2。优选地,本发明的抗体能够以它结合另一个非靶分子的结合亲和力的至少2倍,10倍,50倍或100倍的结合亲和力结合Mcm蛋白,任选Mcm5。甚至更优选地,本发明的抗体能以它结合另一个非靶分子的结合亲和力的至少2倍,10倍,50倍或100倍的结合亲和力结合SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2。

[0073] 评估对Mcm5的结合亲和力的优选方法是通过ELISA。优选地,本发明的抗体对Mcm5具有2500ng/ml或更低,1500ng/ml或更低,1000ng/ml或更低,600ng/ml或更低,50ng/ml或更低,30ng/ml或更低,20ng/ml或更低,或10ng/ml或更低的亲和力(如实施例2所述,以EC50或50%最大结合浓度测量的)。EC50通常将高于1ng/ml,因此EC50可以在1ng/ml与前述句子中指定的任何上限之间。用于评估配体如抗体与靶的结合能力的其他标准测定在本领域是已知的,包括例如蛋白质印迹,RIA和流式细胞术分析。抗体的结合动力学(例如结合亲和力)也可以通过本领域已知的标准测定来评估,例如通过表面等离子体共振(SPR)(例如Biacore™系统)分析。结合Mcm5的亲和常数(KD)优选为1-10000nM,1-1000nM,1-500nM,1-100nM,1-50nM或1-10nM。结合速率(k_a)优选在 $0.4-3.4 \times 10^6$ 1/M的范围内。解离速率(k_d)优选在 $1-10 \times 10^{-3}$ 1/s的范围内。这些值通常可以通过SPR(表面等离子体共振)确定。

[0074] 互补决定区(CDR)

[0075] 本发明的抗体优选包含抗体12A7或4B4的CDR中的至少一个CDR,即选自以下的CDR:

[0076] a.12A7CDRH1,其具有SEQ ID NO:9的序列或与SEQ ID NO:9相差1、2或3个氨基酸置换的序列;

[0077] b.12A7CDRH2,其具有SEQ ID NO:11的序列或与SEQ ID NO:11相差1、2或3个氨基酸置换的序列;

[0078] c.12A7CDRH3,其具有SEQ ID NO:13的序列或与SEQ ID NO:13相差1、2或3个氨基酸置换的序列;

[0079] d.12A7CDRL1,其具有SEQ ID NO:3的序列或与SEQ ID NO:3相差1、2或3个氨基酸置换的序列;

[0080] e.12A7CDRL2,其具有SEQ ID NO:5的序列或与SEQ ID NO:5相差1、2或3个氨基酸置换的序列;

[0081] f.12A7CDRL3,其具有SEQ ID NO:7的序列或与SEQ ID NO:7相差1、2或3个氨基酸置换的序列;

[0082] g.4B4CDRH1,其具有SEQ ID NO:21的序列或与SEQ ID NO:21相差1、2或3个氨基酸置换的序列;

[0083] h.4B4CDRH2,其具有SEQ ID NO:23的序列或与SEQ ID NO:23相差1、2或3个氨基酸置换的序列;

[0084] i.4B4CDRH3,其具有SEQ ID NO:25的序列或与SEQ ID NO:25相差1、2或3个氨基酸置换的序列;

[0085] j.4B4CDRL1,其具有SEQ ID NO:15的序列或与SEQ ID NO:15相差1、2或3个氨基酸置换的序列;

[0086] k.4B4CDRL2,其具有SEQ ID NO:17的序列或与SEQ ID NO:17相差1、2或3个氨基酸置换的序列;

[0087] l.4B4CDRL3,其具有SEQ ID NO:19的序列或与SEQ ID NO:19相差1、2或3个氨基酸置换的序列。

[0088] 与4B4和12A7抗体具有相同CDR的抗体可以与4B4和12A7的序列在其他区域中实质上不同。这样的抗体可以例如是抗体片段。

[0089] 短语“与SEQ ID NO:3相差单个氨基酸置换的序列”是指用不同的氨基酸置换SEQ ID NO:3中定义的一个氨基酸的可能性。优选地,这样的替换是保守氨基酸置换。以下八组各自含有通常是彼此保守置换的氨基酸:

[0090] 1) 丙氨酸,甘氨酸;

[0091] 2) 天冬氨酸,谷氨酸;

[0092] 3) 天冬酰胺,谷氨酰胺;

[0093] 4) 精氨酸,赖氨酸;

[0094] 5) 异亮氨酸,亮氨酸,甲硫氨酸,缬氨酸;

[0095] 6) 苯丙氨酸,酪氨酸,色氨酸;

[0096] 7) 丝氨酸,苏氨酸;和

[0097] 8) 半胱氨酸,甲硫氨酸。

[0098] 在实施方案中,本发明的抗体包含来自12A7的重链的至少一个CDR (12A7CDRH1, 12A7CDRH2或12A7CDRH3) 以及来自12A7的轻链的至少一个CDR (12A7CDRL1, 12A7CDRL2或

12A7CDRL3)。在进一步的实施方案中,本发明的抗体包含来自12A7的重链的至少两个CDR和来自12A7的轻链的至少两个CDR。在优选实施方案中,本发明的抗体包含来自12A7的重链的所有三个CDR和/或来自12A7的轻链的所有三个CDR。在实施方案中,本发明的抗体包含12A7CDRL1和12A7CDRL2,12A7CDRL1和12A7CDRL3,12A7CDRL1和12A7CDRH1,12A7CDRL1和12A7CDRH2,12A7CDRL1和12A7CDRH3,12A7CDRL2和12A7CDRL3,12A7CDRL2和12A7CDRH1,12A7CDRL2和12A7CDRH2,12A7CDRL2和12A7CDRH3,12A7CDRL3和12A7CDRH1,12A7CDRL3和12A7CDRH2,12A7CDRL3和12A7CDRH3,12A7CDRH1和12A7CDRH2,12A7CDRH1和12A7CDRH3,或者12A7CDRH2和12A7CDRH3。

[0099] 在实施方案中,本发明的抗体包含来自4B4的重链的至少一个CDR(4B4CDRH1,4B4CDRH2或4B4CDRH3)以及来自4B4的轻链的至少一个CDR(4B4CDRL1,4B4CDRL2或4B4CDRL3)。在其它实施方案中,本发明的抗体包含来自4B4的重链的至少两个CDR和来自4B4的轻链的至少两个CDR。在优选实施方案中,本发明的抗体包含来自4B4的重链的所有三个CDR和/或来自4B4的轻链的所有三个CDR。在实施方案中,本发明的抗体包含4B4CDRL1和4B4CDRL2,4B4CDRL1和4B4CDRL3,4B4CDRL1和4B4CDRH1,4B4CDRL1和4B4CDRH2,4B4CDRL1和4B4CDRH3,4B4CDRL2和4B4CDRL3,4B4CDRL2和4B4CDRH1,4B4CDRL2和4B4CDRH2,4B4CDRL2和4B4CDRH3,4B4CDRL3和4B4CDRH1,4B4CDRL3和4B4CDRH2,4B4CDRL3和4B4CDRH3,4B4CDRH1和4B4CDRH2,4B4CDRH1和4B4CDRH3,或者4B4CDRH2和4B4CDRH3。

[0100] 在优选实施方案中,本发明的抗体包含具有与以下所述任一序列相同的序列的至少一个CDR:SEQ ID NO:3(12A7CDRL1),SEQ ID NO:5(12A7CDRL2),SEQ ID NO:7(12A7CDRL3),SEQ ID NO:9(12A7CDRH1),SEQ ID NO:11(12A7CDRH2),SEQ ID NO:13(12A7CDRH3),SEQ ID NO:15(4B4CDRL1),SEQ ID NO:17(4B4CDRL2),SEQ ID NO:19(4B4CDRL3),SEQ ID NO:21(4B4CDRH1),SEQ ID NO:23(4B4CDRH2)或者SEQ ID NO:25(4B4CDRH3)。在其中本发明的抗体包含12A7CDRL2的实施方案中,12A7CDRL2具有SEQ ID NO:5中所述的序列。在其中本发明的抗体包含12A7CDRL1的进一步的实施方案中,12A7CDRL1具有SEQ ID NO:3中所述的序列。在其中本发明的抗体包含12A7CDRL3的进一步的实施方案中,12A7CDRL3具有SEQ ID NO:7中所述的序列。在其中本发明的抗体包含12A7CDRH1的进一步的实施方案中,12A7CDRH1具有SEQ ID NO:9中所述的序列。在其中本发明的抗体包含12A7CDRH2的进一步的实施方案中,12A7CDRH2具有SEQ ID NO:11中所述的序列。在其中本发明的抗体包含12A7CDRH3的进一步的实施方案中,12A7CDRH3具有SEQ ID NO:13中所述的序列。在其中本发明的抗体包含4B4CDRL1的进一步的实施方案中,4B4CDRL1具有SEQ ID NO:15中所述的序列。在其中本发明的抗体包含4B4CDRL2的进一步的实施方案中,4B4CDRL2具有SEQ ID NO:17中所述的序列。在其中本发明的抗体包含4B4CDRL3的进一步的实施方案中,4B4CDRL3具有SEQ ID NO:19中所述的序列。在其中本发明的抗体包含4B4CDRH1的进一步的实施方案中,4B4CDRH1具有SEQ ID NO:21中所述的序列。在其中本发明的抗体包含4B4CDRH2的进一步的实施方案中,4B4CDRH2具有SEQ ID NO:23中所述的序列。在其中本发明的抗体包含4B4CDRH3的进一步的实施方案中,4B4CDRH3具有SEQ ID NO:25中所述的序列。

[0101] 优选地,包含12A7或4B4的至少一个CDR的抗体结合(任选地特异性结合)Mcm5。甚至更优选地,包含12A7或4B4的至少一个CDR的抗体结合(任选地特异性结合)SEQ ID NO:1

或SEQ ID NO:2。

[0102] 重链和轻链可变区序列

[0103] 本发明的抗体优选包含具有与SEQ ID NO:29或33至少85%、90%、95%、98%、99%或100%相同的序列的重链可变区和/或具有与SEQ ID NO:27或31至少85%、90%、95%、98%、99%或100%相同的序列的轻链可变区。本文中这样的抗体称为“本发明的变体抗体”。

[0104] 在实施方案中,抗体包含具有与SEQ ID NO:29至少95%相同的序列的重链可变区。在进一步的实施方案中,抗体包含具有与SEQ ID NO:29至少98%相同的序列的重链可变区。在一个实施方案中,抗体包含具有与SEQ ID NO:27至少95%相同的序列的轻链可变区。在进一步的实施方案中,抗体包含具有与SEQ ID NO:27至少98%相同的序列的轻链可变区。在进一步的实施方案中,抗体包含具有与SEQ ID NO:27至少95%相同的序列的轻链可变区和具有与SEQ ID NO:29至少95%相同的序列的重链可变区。在优选实施方案中,抗体包含具有与SEQ ID NO:27至少98%相同的序列的轻链可变区和具有与SEQ ID NO:29至少98%相同的序列的重链可变区。

[0105] 在进一步的方案中,抗体包含具有与SEQ ID NO:33至少95%相同的序列的重链可变区。在进一步的实施方案中,抗体包含具有与SEQ ID NO:33至少98%相同的序列的重链可变区。在进一步的实施方案中,抗体包含具有与SEQ ID NO:31至少95%相同的序列的轻链可变区。在进一步的实施方案中,抗体包含具有与SEQ ID NO:31至少98%相同的序列的轻链可变区。在进一步的实施方案中,抗体包含具有与SEQ ID NO:33至少95%相同的序列的重链可变区和具有与SEQ ID NO:31至少95%相同的序列的轻链可变区。在优选实施方案中,抗体包含具有与SEQ ID NO:33至少98%相同的序列的重链可变区和具有与SEQ ID NO:31至少98%相同的序列的轻链可变区。

[0106] 如本领域技术人员已知的,抗体包含多个区域,包括框架区域。框架区中氨基酸的缺失或添加不太可能影响抗体结合其靶的能力。另一方面,CDR中的突变更可能相当大程度地影响抗体结合靶的能力。因此,在本发明的某些实施方案中,变体抗体具有与12A7或4B4抗体的CDR相同的CDR,或具有仅在单个氨基酸置换(优选保守氨基酸置换)方面变化的CDR。本发明的变体抗体可以具有与SEQ ID NO:27、29、31或33中所述序列非常显著不同的框架区。

[0107] 任选地,当本发明的抗体包含具有与SEQ ID NO:29至少85%、90%、95%、98%、99%或100%相同的序列的重链可变区时,抗体进一步包含12A7CDRH1、12A7CDRH2或12A7CDRH3的至少一个。本领域技术人员理解的是,由于靶结合特异性由CDR确定,即使抗体序列的其余部分是十分可变的,包含12A7的CDR的抗体仍可以结合Mcm5。为此,当抗体包含12A7CDRH1、12A7CDRH2或12A7CDRH3中的至少一个时,抗体优选包含具有与SEQ ID NO:29至少90%相同的序列的重链可变区。在更优选的实施方案中,本发明的抗体包含12A7CDRH1, 12A7CDRH2和12A7CDRH3,并且包含具有与SEQ ID NO:29至少95%相同的序列的重链可变区。

[0108] 任选地,当本发明的抗体包含具有与SEQ ID NO:33至少85%、90%、95%、98%、99%或100%相同的序列的重链可变区时,所述抗体进一步包含4B4CDRH1、4B4CDRH2或4B4CDRH3的至少一种。本领域技术人员应理解,由于靶结合特异性由CDR确定,即使抗体序

列的其余部分是十分可变的,包含4B4的CDR的抗体仍可以结合Mcm5。为此,当抗体包含4B4CDRH1、4B4CDRH2或4B4CDRH3中的至少一种时,抗体优选包含具有与SEQ ID NO:33至少90%相同的序列的重链可变区。在更优选的实施方案中,抗体包含4B4CDRH1,4B4CDRH2和4B4CDRH3并且包含具有与SEQ ID NO:33至少95%相同的序列的重链可变区。

[0109] 任选地,当本发明的抗体包含具有与SEQ ID NO:27至少85%、90%、95%、98%、99%或100%相同的序列的轻链可变区时,抗体进一步包含12A7CDRL1、12A7CDRL2或12A7CDRL3的至少一种。本领域技术人员理解的是,由于靶标结合特异性由CDR确定,即使抗体序列的其余部分是十分可变的,包含12A7的CDR的抗体仍可以结合Mcm5。为此,当抗体包含12A7CDRL1、12A7CDRL2或12A7CDRL3中的至少一种时,抗体优选地包含具有与SEQ ID NO:27至少90%相同的序列的轻链可变区。在更优选的实施方案中,抗体包含12A7CDRL1、12A7CDRL2和12A7CDRL3并且包含具有与SEQ ID NO:27至少95%相同的序列的轻链可变区。

[0110] 任选地,在本发明的抗体包含具有与SEQ ID NO:31至少85%、90%、95%、98%、99%或100%相同的序列的轻链可变区的情况下,抗体进一步包含4B4CDRL1、4B4CDRL2或4B4CDRL3的至少一个。本领域技术人员应理解,由于靶结合特异性由CDR确定,即使抗体序列的其余部分是十分可变的,包含4B4的CDR的抗体仍可以结合Mcm5。为此,当抗体包含4B4CDRL1、4B4CDRL2或4B4CDRL3中的至少一个时,抗体优选包含具有与SEQ ID NO:31至少90%相同的序列的重链可变区。在更优选的实施方案中,本发明的抗体包含4B4CDRL1、4B4CDRL2和4B4CDRL3,并且包含具有与SEQ ID NO:31至少95%相同的序列的重链可变区。

[0111] 在本发明的另一个实施方案中,本发明的抗体包含:

[0112] (i) 12A7CDRH1、12A7CDRH2和12A7CDRH3;

[0113] (ii) 具有与SEQ ID NO:29至少95%相同的序列的重链可变区;

[0114] (iii) 12A7CDRL1、12A7CDRL2和12A7CDRL3;和

[0115] (iv) 具有与SEQ ID NO:27至少95%相同的序列的轻链可变区。

[0116] 在另一个实施方案中,本发明的抗体包含:

[0117] (i) 4B4CDRH1、4B4CDRH2和4B4CDRH3;

[0118] (ii) 具有与SEQ ID NO:33至少95%相同的序列的重链可变区;

[0119] (iii) 4B4CDRL1、4B4CDRL2和4B4CDRL3;和

[0120] (iv) 具有与SEQ ID NO:31至少95%相同的序列的重链可变区。

[0121] 具有与SEQ ID NO:29相同的重链可变序列和与SEQ ID NO:27相同的轻链可变序列的抗体可以称为抗体12A7。具有与SEQ ID NO:33相同的重链可变序列和与SEQ ID NO:31相同的轻链可变序列的抗体可以称为抗体4B4。

[0122] 在一些实施方案中,本发明的变体抗体将与12A7抗体竞争结合Mcm5。类似地,在本发明的一些实施方案中,本发明的变体抗体将与4B4抗体竞争结合Mcm5。

[0123] 为了本发明的目的,如果当采用以下参数使用ClustalW(Thompson et al.,1994)评估时序列具有至少90%、95%、98%、99%或100%的同一性,则抗体与第二抗体“至少90%、95%、98%、99%或100%相同”:

[0124] 成对比对参数-Method:准确,Matrix:PAM,缺口开放罚分(Gap open penalty):10.00,缺口延伸罚分(Gap extension penalty):0.10;

[0125] 多重比对参数-Matrix:PAM,缺口开放罚分:10.00,延迟同一性百分比:30,对末端

缺口罚分:开,缺口分开距离:0,负矩阵:无,缺口延伸罚:0.20,残基特异性缺口罚分:开,亲水性缺口罚分:开,亲水性残基:GPSNDQEK R。

[0126] 如何制备结合Mcm5的本发明的变体抗体在本领域技术人员知识范围内。与SEQ ID NO:27、29、31或33相比,这样的变体抗体可包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50或100个置换或缺失突变。“缺失”变体抗体可以包含1、2、3、4、5个或更多个氨基酸的缺失,或者在一些情况下,缺失SEQ ID NO:27、29、31或33的整个区域。“置换”变体可以包含用相同数量的新氨基酸替换1、2、3、4、5个或更多个氨基酸。

[0127] 优选地,本发明的变体抗体包含通过保守氨基酸置换(任选仅通过保守氨基酸置换)而不同于SEQ ID NO:27、29、31或33的序列。本领域技术人员很清楚,这样的保守置换不太可能改变抗体的结合性质。

[0128] 与本发明的抗体竞争的抗体

[0129] 本发明进一步提供了与本发明的抗体竞争的抗体。例如,本发明提供了与以下抗体竞争的抗体:

[0130] (i) 结合具有SEQ ID NO:1或2的氨基酸序列的多肽。

[0131] (ii) 包含选自以下的至少一个CDR:12A7CDRH1,12A7CDRH2,12A7CDRH3,12A7CDRL1,12A7CDRL2,12A7CDRL3,4B4CDRH1,4B4CDRH2,4B4CDRH3,4B4CDRL1,4B4CDRL2和4B4CDRL3;

[0132] (iii) 包含具有与SEQ ID NO:29或33至少85%,90%、95%、98%、99%或100%相同的序列的重链可变区;或者

[0133] (iv) 包含具有与SEQ ID NO:27或31至少85%,90%、95%、98%、99%或100%相同的序列的轻链可变区序列。

[0134] 优选地,本发明提供了与包含12A7CDRH1,12A7CDRH2,12A7CDRH3,12A7CDRL1,12A7CDRL2和12A7CDRL3的抗体或包含4B4CDRH1,4B4CDRH2,4B4CDRH3,4B4CDRL1,4B4CDRL2和4B4CDRL3的抗体竞争的抗体。甚至更优选地,本发明提供了与包含具有与SEQ ID NO:29或33为100%相同的序列的重链可变区和具有与SEQ ID NO:27或31为100%相同的序列的轻链可变区的抗体竞争的抗体。在最优选的实施方案中,本发明提供了与抗体12A7或抗体4B4竞争的抗体。

[0135] 确定抗体是否与本发明的另一种抗体竞争是在本领域技术人员的能力范围内。

[0136] 例如,ELISA测定可以通过将参考抗体例如4B4或12A7抗体固定在ELISA板上来进行。然后用合适的封闭剂封闭板。加入过量的第二抗体(第二抗体是与4B4或12A7抗体竞争的能力待评估的抗体,例如与4B4或12A7竞争的本发明的抗体)。添加Mcm5。在合适的孵育时间段后,洗涤ELISA板并添加Mcm5检测剂以测量与固定的参考抗体结合的Mcm5的量。如果要使用该测试来检测抗体是否与4B4竞争,则合适的检测剂是标记的12A7抗体。类似地,如果该测试将用于检测抗体是否与12A7竞争,则合适的检测剂是标记的4B4抗体。发生50%抑制的浓度称为 K_i 。在优选的实施方案中,与12A7或4B4竞争的抗体以不结合Mcm5的抗体的二分之一,五分之一,十分之一,五十分之一或一百分之一的 K_i 结合Mcm5。

[0137] 在实施方案中,与本发明的抗体竞争的抗体是结合相同表位(例如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2)的抗体。通过进行将靶蛋白如Mcm5消化成片段的实验(例如参见下面的实施例3),可以确定抗体结合哪个表位。然后可以确定12A7和4B4抗体结合每种片段的亲和力。

一旦确定了第一抗体以合理的亲和力结合的片段(代表表位),就可以合成表位。然后通过测量第二抗体对该片段的结合亲和力来确定第二抗体是否能够结合相同的表位。

[0138] 标记的抗体

[0139] 本发明的抗体可以与标记物(例如铈³⁺或辣根过氧化物酶)缀合。标记可以直接附接或可以通过接头(如己二酸二酰肼(ADH))附接。

[0140] 标记可以通过化学缀合来附接。将标记缀合到抗体的方法是本领域已知的。例如,碳二亚胺缀合(Bauminger&Wilchek (1980) Methods Enzymol. 70, 151-159)可用于将标记缀合至抗体。也可以使用其他将标记缀合到抗体上的方法。例如,可以使用高碘酸钠氧化,接着还原烷基化合适的反应物,如戊二醛交联。然而,应该认识到,无论选择何种生产本发明缀合物的方法,都必须确定缀合抗体保持其靶向能力,并且缀合标记维持其功能。

[0141] 在优选的实施方案中,本发明的抗体通过缀合至铈标记。这可以使用EG&G Wallac DELFIA^(R) Eu标记试剂盒并遵循制造商的操作方案来实现。

[0142] 组合物

[0143] 在本发明的其他方面,提供了包含本发明抗体的组合物。这样的组合物可以进一步包含能够稳定溶液中的抗体的合适的稳定剂。例如,组合物可以包含选自TAPS (3-[[三(羟甲基)甲基]氨基]丙磺酸),Bicine (N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸),Tris (三(羟甲基)胺),Tricine (N-三(羟甲基)氨基甘氨酸),TAPSO (3-[N-三(羟甲基)甲基氨基]-2-羟基丙磺酸),HEPES (4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸),磷酸盐缓冲盐水和MOPS (3-(N-吗啉代)丙磺酸)的缓冲液。在优选的实施方案中,组合物包含pH7.6的磷酸盐缓冲盐水。在另一个优选的实施方案中,组合物包含具有0.01%至0.09%叠氮化钠的磷酸盐缓冲盐水。优选地,组合物包含适合于在室温或低于或等于15℃,10℃,7℃,5℃,0℃,-10℃或-25℃的温度下储存本发明抗体的试剂。在优选的实施方案中,组合物包含适合于在2℃和8℃之间的温度下储存本发明抗体的试剂。在另一个实施方案中,组合物包含稳定剂例如糖,例如乳糖或海藻糖。

[0144] 如果本发明的抗体缀合于例如铈标记,则在组合物中包含7.5%纯化的BSA稳定剂是有利的。

[0145] 核酸和载体

[0146] 本发明还涉及包含编码本发明抗体的核酸序列的多核苷酸。因此,本发明的多核苷酸可以包含编码如本文所述的任何抗体的核酸序列。术语“核酸分子”和“多核苷酸”在本文中可互换使用,是指任何长度的核苷酸,脱氧核糖核苷酸,核糖核苷酸或其类似物的聚合形式。

[0147] “编码”所选多肽的核酸是当置于合适调控序列的控制下时在体内转录(就DNA而言)和翻译(在mRNA的情况下)为多肽的核酸分子。编码序列的边界由5'(氨基)末端的起始密码子和3'(羧基)末端的翻译终止密码子决定。

[0148] 例如,本发明的多核苷酸可以包含编码抗体的核酸,抗体包含具有与SEQ ID NO: 29或33至少95%相同的序列的可变区,或抗体包含具有与SEQ ID NO: 27或31至少95%相同的序列的轻链可变区。本发明的多核苷酸可编码具有与SEQ ID NO: 29至少95%相同的序列的多肽和具有与SEQ ID NO: 27至少95%相同的序列的多肽。或者,本发明的多核苷酸可以编码具有与SEQ ID NO: 33至少95%相同的序列的多肽和具有与SEQ ID NO: 31至少95%相同的序列的多肽。

[0149] 本发明的示例性多核苷酸包含与SEQ ID NO:4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32或34至少85%，90%、95%、98%、99%或100%相同的核酸序列或由其组成。优选地，本发明的多核苷酸包含与SEQ ID NO:28、30、32或34至少85%，90%、95%、98%、99%或100%的核酸序列或由其组成。任选地，本发明的多核苷酸包含与SEQ ID NO:28具有至少95%同一性的多核苷酸序列和与SEQ ID NO:30具有至少95%同一性的多核苷酸序列。任选地，本发明的多核苷酸包含与SEQ ID NO:32具有至少95%同一性的多核苷酸序列和与SEQ ID NO:34具有至少95%同一性的多核苷酸序列。

[0150] 因此，本发明的抗体可以由编码并能够表达它的多核苷酸产生。当抗体包含两条或更多条链时，本发明的多核苷酸可编码抗体轻链、抗体重链或两者。可以提供两条多核苷酸，其中一条编码抗体轻链，另一条编码相应的抗体重链。这样的多核苷酸或多核苷酸对可以一起表达，从而产生本发明的抗体。

[0151] 本发明的多核苷酸可根据本领域众所周知的方法合成，如例如Sambrook等(1989, Molecular Cloning-a laboratory manual; Cold Spring Harbor Press)中所述。

[0152] 本发明进一步提供了包含本发明多核苷酸的载体(如质粒或重组病毒载体)。典型地，载体进一步包含与插入的序列可操作连接的调控序列，从而允许体内表达本发明的抗体。优选地，本发明的载体进一步包含合适的起始子，启动子，增强子和其他可能必需的元件，并且其位于正确的方向，以允许表达本发明的多肽。

[0153] 杂交瘤细胞系

[0154] 本发明进一步提供了能够产生本发明抗体的杂交瘤细胞系。当保持在合适的培养条件下时，这样的杂交瘤细胞系将产生本发明的抗体。

[0155] 开发表达本发明抗体的杂交瘤完全在本领域技术人员的能力范围内。这可以通过用抗原(例如Mcm5)免疫哺乳动物如小鼠，兔或豚鼠来进行。包括佐剂如弗氏完全佐剂可能是有益的。取出免疫的哺乳动物的脾细胞，并与骨髓瘤细胞融合形成杂交瘤细胞系，其在适当的条件下永生并分泌抗体。将杂交瘤分成单个克隆，评估每个克隆分泌的抗体结合Mcm5蛋白的能力。

[0156] 宿主细胞系

[0157] 本发明还提供了包含本发明的核酸或载体的宿主细胞。这种宿主细胞包括已经被修饰以表达本发明抗体的细胞。这种宿主细胞可以是真核细胞或原核细胞。例如，宿主细胞可以是哺乳动物细胞，昆虫细胞或细菌细胞。可以通过插入本发明的载体或核酸来修饰的宿主细胞的具体实例包括哺乳动物HEK293T, CHO, HeLa, NS0和COS细胞。或者可以使用诸如大肠杆菌的细菌细胞。

[0158] 可以使用常规方法培养这样的宿主细胞以产生本发明的抗体。

[0159] 抗体生产

[0160] 本发明的抗体可以使用任何方法产生。在一个实施方案中，抗体直接从杂交瘤细胞系产生。在本发明的另一个实施方案中，抗体是重组生产的。

[0161] 为了从杂交瘤细胞系产生抗体，可以在体外培养细胞系，例如在诸如细胞培养瓶或发酵罐的容器中，并且可以使用本领域已知的常规技术从容器中分离抗体。为了本发明的目的，如果抗体衍生自由杂交瘤细胞系产生的抗体，则认为抗体“由杂交瘤细胞系产生”。例如，从杂交瘤细胞系获得抗体，对抗体的氨基酸序列进行测序，并用编码抗体的氨基酸序

列的载体转染诸如CHO细胞或大肠杆菌细胞在本领域技术人员的能力范围内。可以认为这样的抗体已经从由杂交瘤细胞系产生的抗体“衍生”。在一个特定的实施方案中,本发明的抗体直接从杂交瘤细胞系本身产生。

[0162] 或者,本发明的抗体可以使用重组技术来生产。本发明抗体的序列可用于转染本发明的宿主细胞系。细胞系可以在培养瓶或发酵罐中生长,并且可以使用标准技术(例如亲和层析)分离和纯化细胞表达的抗体。

[0163] 一旦纯化,则抗体可以缀合至放射性标记物或固定至固体支持物。合适的固体支持物的例子是ELISA板。

[0164] 测定样品中Mcm5浓度的试剂盒和方法。

[0165] 本发明的抗体可以用作试剂盒的一部分。例如,抗体可以是用于检测样品(例如来自人类的样品)中的Mcm5浓度的试剂盒的一部分,这可以允许检测从其采集样品的受试者中的癌症。

[0166] 或者,本发明的抗体可以用于检测样品中Mcm5的浓度或量的方法(也称为本发明的Mcm5检测方法)。优选地,这样的方法包括以下步骤:

[0167] (i) 提供固定的第一抗体,其为固定至固体支持物的本发明的抗体;

[0168] (ii) 将样品暴露于固定的第一抗体,使得样品中的Mcm5能够结合固定的抗体以提供固定的Mcm5;

[0169] (iii) 提供标记的第二抗体,其为缀合至标记物的本发明抗体;

[0170] (iv) 将固定的Mcm5暴露于标记的第二抗体,使得标记的第二抗体可以结合Mcm5;和

[0171] (v) 检测标记的第二抗体的浓度。

[0172] 优选在步骤(iv)和(v)之间存在洗涤步骤以确保步骤(v)中检测到浓度的第二抗体与步骤(iv)中的Mcm5结合。任选地,在步骤(i)之后有进一步洗涤步骤以除去过量的第一抗体和/或在步骤(ii)之后除去过量的Mcm5。任选地,通过将固体支持物暴露于洗涤缓冲液来进行洗涤步骤。

[0173] 在一个实施方案中,试剂盒中存在的或本发明的或用于本发明方法中的抗体适用于检测泌尿系癌症如前列腺癌或膀胱癌。

[0174] 优选地,检测样品中Mcm5的浓度或量的方法使用或本发明的试剂盒包含两种彼此不竞争的本发明抗体(例如4B4和12A7抗体),并优选结合不同的目的抗原的表位。这可以通过进行如上所述的ELISA来确定。可以将两种抗体中的一种固定在ELISA板上。然后用合适的封闭剂封闭板。然后加入过量的另一抗体(要评估其与第一抗体竞争的抗体)。然后加入靶抗原,如Mcm5。在合适的孵育时间段之后,洗涤ELISA板并添加能够结合靶抗原的检测剂以测量与固定的抗体结合的靶抗原的量。如果两种抗体竞争,则与固定的抗体结合的靶抗原的量比抗体不竞争(并且任选结合不同表位)时的量低。发生50%抑制的浓度称为 K_i 。在优选的实施方案中,与另一种抗体竞争的抗体以不结合的抗体的二分之一,五分之一,十分之一,五十分之一或一百分之一的 K_i 结合。

[0175] 在优选的实施方案中,本发明的Mcm5检测方法使用本发明的第一抗体和本发明的第二抗体,或者本发明的试剂盒包含本发明的第一抗体和本发明的第二抗体。第一抗体可以结合(任选地特异性结合)SEQ ID NO:1,第二抗体可以结合(任选地特异性结合)SEQ ID

NO:2。第一抗体可以包含选自以下的至少一个CDR:12A7CDRH1,12A7CDRH2,12A7CDRH3,12A7CDRL1,12A7CDRL2和12A7CDRL3。第二抗体可以包含选自以下的至少一个CDR:4B4CDRH1,4B4CDRH2,4B4CDRH3,4B4CDRL1,4B4CDRL2和4B4CDRL3。优选地,第一抗体包含12A7CDRH1,12A7CDRH2,12A7CDRH3,12A7CDRL1,12A7CDRL2和12A7CDRL3。优选地,第二抗体包含12A7CDRH1,12A7CDRH2,12A7CDRH3,12A7CDRL1,12A7CDRL2和12A7CDRL3。在实施方案中,第一抗体包含具有与SEQ ID NO:29至少85%、90%、95%、98%、99%或100%相同的序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:27与至少85%、90%、95%、98%、99%或100%相同的序列的轻链可变区。在实施方案中,第二抗体包含与SEQ ID NO:33至少85%、90%、95%、98%、99%或100%相同的序列的重链可变区和与SEQ ID NO:31至少85%、90%、95%、98%、99%或100%相同的序列的轻链可变区。

[0176] DELFIA检测系统可以用在本发明的Mcm5检测方法中。在这样的实施方案中,第一抗体和第二抗体优选结合不同的表位。在这样的实施方案中,可以将抗体之一(第一或第二单克隆抗体)固定在板上。待测试的样品可以添加到板上。然后可以加入另一种抗体(未固定在板上的第一或第二抗体)。另一种抗体应该缀合至检测试剂如钕标记物。然后可以使用时间分辨荧光光谱来确定是否存在靶抗原(通过测量存在的标记抗体的量)。

[0177] 因此,在本发明的一个实施方案中,本发明的试剂盒包含缀合于放射性标记物例如钕的本发明的第一或第二抗体。可以使用任何方法将第一单克隆抗体或第二单克隆抗体缀合至钕标记。用于执行这种标记的试剂盒是可获得的。例如,可以使用Eu-NI-ITC螯合物将第一或第二单克隆抗体缀合至钕。

[0178] 在这样的实施方案中,本发明的试剂盒可以包含用于DELFIA检测系统的其它组分。这样的其它组分可以包括DELFIA增强溶液或DELFIA检测溶液。

[0179] 定义

[0180] 术语“包含”是指“包括”。因此,词语“包含(comprises)”以及诸如“包含(comprise)”和“包含(comprising)”的变化将被理解为暗示包括所述的化合物或组合物或步骤,或化合物或步骤的组,但不排除任何其他化合物、组合物、步骤或其组合。

[0181] 上述说明书中提到的所有出版物都通过引用并入本文。对于本领域技术人员而言,在不脱离本发明的范围的情况下,本发明的所描述的方面和实施方案的各种修改和变化将是显而易见的。尽管已经结合具体的优选实施方案描述了本发明,但是应当理解,所要求保护的本发明不应该不适当地限于这些具体实施方案。实际上,对于本领域技术人员来说显而易见的用于实施本发明的所描述的模式的各种修改意在落入所附权利要求书的范围内。

[0182] 表1:序列

[0183]

SEQ ID NO	核苷酸/多肽
1	WDETKGE (抗体 12A7 结合的表位)
2	DDRVAIH (抗体 4B4 结合的表位)
3	12A7 轻链 CDR 1 多肽序列
4	12A7 轻链 CDR 1 核苷酸序列
5	12A7 轻链 CDR 2 多肽序列
6	12A7 轻链 CDR 2 核苷酸序列
7	12A7 轻链 CDR 3 多肽序列
8	12A7 轻链 CDR 3 核苷酸序列
9	12A7 重链 CDR 1 多肽序列
10	12A7 重链 CDR 1 核苷酸序列
11	12A7 重链 CDR 2 多肽序列
12	12A7 重链 CDR 2 核苷酸序列

[0184]

13	12A7 重链 CDR 3 多肽序列
14	12A7 重链 CDR 3 核苷酸序列
15	4B4 轻链 CDR 1 多肽序列
16	4B4 轻链 CDR 1 核苷酸序列
17	4B4 轻链 CDR 2 多肽序列
18	4B4 轻链 CDR 2 核苷酸序列
19	4B4 轻链 CDR 3 多肽序列
20	4B4 轻链 CDR 3 核苷酸序列
21	4B4 重链 CDR 1 多肽序列
22	4B4 重链 CDR 1 核苷酸序列
23	4B4 重链 CDR 2 多肽序列
24	4B4 重链 CDR 2 核苷酸序列
25	4B4 重链 CDR 3 多肽序列
26	4B4 重链 CDR 3 核苷酸序列
27	12A7 全长轻链可变区序列(多肽)
28	12A7 全长轻链可变区序列(核苷酸)
29	12A7 全长重链可变区序列(多肽)
30	12A7 全长重链可变区序列(核苷酸)
31	4B4 全长轻链可变区序列(多肽)
32	4B4 全长轻链可变区序列(核苷酸)可变区
33	4B4 全长重链可变区序列(多肽)
34	4B4 全长重链可变区序列(核苷酸)
35	Mcm5 多肽序列
36	Mcm5 多核苷酸序列

实施例

[0185] Mcm5的克隆

[0186] 阶段I:克隆策略

[0187] 1. 获得含有人MCM5cDNA的经验证的IMAGE克隆,并用作PCR模板以扩增648bp的DNA片段。正向PCR引物编码n起始密码子以及修饰的未获得专利的多组氨酸标签(HQ)4。

[0188] 2. 使用双重限制性位点策略将PCR片段克隆到诱导型大肠杆菌表达载体pTRC99a中。该载体允许杂trp/lac“trc”启动子指导的诱导型表达。下游是lacZ核糖体结合位点(RBS),其位于距ATG起始密码子的优化距离处(由NcoI克隆位点提供)。

[0189] 阶段IIA:表达和纯化(小规模-10ml)

[0190] 3. 将含有Mcm5片段的重组质粒转化到BL21大肠杆菌(非λDE3)中以确保表达蛋白的高产率。

[0191] 4. 用IPTG诱导几个小体积大肠杆菌培养物。细胞将在SDS上样缓冲液中裂解,并通过SDS-PAGE分离总蛋白。使用由Urosens供应的小鼠单克隆抗体通过蛋白质印迹鉴定高表达克隆。

[0192] 阶段IIB:表达和纯化(大规模-500ml)

[0193] 5. 将鉴定出的含有高水平重组蛋白的克隆以0.5L规模培养并用IPTG诱导。将细胞沉淀并储存在-70℃。细胞在Stoeber et al. *J Natl Cancer Inst* 2002 94 1071-9描述的变性裂解缓冲液中被破坏。

[0194] 6. 加His-标签的重组蛋白在变性条件下在固定的金属亲和(IMAC)层析柱上亲和纯化。使用酸性缓冲液洗脱蛋白质并对储存缓冲液(含有0.3SDS的PBS)透析

[0195] 7. 通过SDS-PAGE和使用由Urosens供应的小鼠单克隆抗体进行蛋白质印迹来分析和定量洗脱的蛋白质。

[0196] 实施例1-MAb筛选ELISA

[0197] 蛋白A纯化的MAb获自Wellcome/CRUK癌症和发育生物研究所。筛选这些抗体结合Mcm5的能力。

[0198] 重组加His 6标签的Mcm5的ELISA使用Ni-NTA His-Sorb 96孔微量滴定包被的板孔(Qiagen)进行。用BSA预先封闭的Ni-NTA包被的板,与通过被动吸附板涂层将Mcm5随机呈现至孔中相比,确保通过镍亲和性结合至间隔物而定向呈现加6x His标签的Mcm。浓度为625ng/ml的Mcm5以200μl/孔以镍亲和固定至96孔板的Ni-NTA His-Sorb表面(Qiagen),得到125ng HisMcm5/孔。这是按照制造商的说明将加His-6标签的蛋白质或肽以>100ng/孔的滴度施加到板孔中完成的。这样做是为了确保蛋白质或肽不限制于Ab检测。使用Mcm5的酶联免疫吸附测定(ELISA)进行Mcm5IFMA开发的MAb的筛选。为了筛选MAb,将来自表达MAb的杂交瘤培养物的上清液在室温下在微量滴定孔中孵育3小时,然后用自动化的96孔板洗涤器洗涤。使用与HRP缀合的山羊抗小鼠IgG,TMB试剂和1M H₂SO₄测定终止溶液,通过比色ELISA检测MAb的Mcm5Ag-Ab复合物,以测量450nm处的光吸收(Abs 450nm)。通过在不含MAb的孔上进行ELISA,排除山羊抗小鼠HRP缀合物与Ni-NTA His-Sorb表面和Mcm5的非特异性结合(NSB)的不存在。通过在不含Mcm5的孔中进行(与在含有Mcm5经镍亲和固定至微量滴定孔的ELISA孔平行进行)ELISA来建立小鼠MAb筛选至Ni-NTA包被的聚苯乙烯孔的NSB程度。

[0199] 在采集自杂交瘤(表2)的培养基样品中小鼠MAb的比色ELISA性能,用于选择突出显示的克隆12A7和4B4。根据制造商的说明书(Amersham Pharmacia Biotech Little Chalfont Buckinghamshire,UK),使用固相蛋白-A分离法使所选择的MAb杂交瘤生长以产生用于从培养物上清液纯化的IgG。12A7MAb引起针对Mcm5的最大反应。

[0200] 表2:杂交瘤MAb筛选ELISA抗体450-650结果

[0201]	Mcm5 MAb	Mcm5孔反应	NSB孔反应	Mcm5特异性反应
--------	----------	---------	--------	-----------

12A7	1.404	0.421	0.983
4B4	1.622	1.040	0.582

[0202] MAb相对亲和力

[0203] 蛋白A纯化的MAb的相对亲和力通过使Ab浓度标准化并在Ag限制条件下将MAb应用于比色筛选测定来确定。Ag限制条件通过在Ni-NTA His-Sorb微量滴定板孔上线性滴定Mcm5来确定。观察到<3.000的最大Abs 450nm表示Ag限制条件,因为当Ag是非限制性时可获得的最大Abs 450读数是4.000。使用兔子Mcm5PAb (101) 和山羊抗兔HRP进行Ag滴定来测量ELISA反应。给出25ng Mcm5可用于与每个Ni-NTA孔结合的浓度限于PAb的ELISA Abs 450响应。选择兔子PAb以确定用于研究小鼠MAb的Ag限制性条件,因为Mcm5表位的全部阵列被PAb结合。这确保了可以在联合孵育研究中调查MAb以确定表位竞争的程度。

[0204] 通过分光光度计中测量Abs 280nm确定蛋白-A纯化的MAb溶液中的IgG浓度,通过在PBS中稀释标准化MAb浓度。然后通过在Ag限制条件下应用于镍亲和力Mcm5孔的ELISA的MAb的线性稀释物测定50%最大结合浓度。为了证实结合信号对平板上的25ng/孔hsMcm5rf的平稳状态,MAb 7A3在更大的浓度范围内在ELISA中进行。12A7的50%最大结合响应在浓度为20ng/孔时获得。通过其50%最大结合浓度显示12A7,以证明对hsMcm5的最高相对亲和力。(表3)。

[0205] 表3:针对偶联至Ni-NTA的限制性25ng/孔抗原的MAb滴定

nb/孔 MAb	MAb	
	4B4	12A7
0	0.086	0.051
0.25	0.108	0.189
2.5	0.464	0.762
25	0.966	1.804
500	1.848	2.808
1000	2.414	3.099

[0207] 实施例2-抗体表位竞争

[0208] 对于双位点免疫测定,需要靶向不同表位的两种MAb。在Ag限制性条件下,竞争相同表位的一对MAb将提供ELISA Abs 450nm测量,其等于在不存在竞争性MAb的条件下孵育时较高相对亲和力Ab的Abs 450nm信号,然而,只要没有空间位阻,孵育靶向不同表位的一对MAb将提供等于两种MAb针对可用的有限Ag的单个Abs450nm反应的总和的Abs 450测量值。将MAb 12A7和4B4标准化至20ng/孔的最高相对亲和力MAb 12A7的50%最大结合浓度。在25ng/孔Mcm5Ag限制性Ni-NTA板上,使用单独和成对的Ab孵育,标准化浓度的MAb进行ELISA。从一对MAb的组合孵育测量的最高Abs450nm信号将表示用于双位点IFMA的最合适的MAb。

[0209] 抗体表位竞争结果

[0210] Ab Ag表位竞争ELISA研究结果(表4)显示MAb 4B4靶向与使用12A7的双位点结合相容的不同表位。当4B4与其他MAb平行孵育时,Abs 450反应等于两个MAb结合有限Ag的总和,证明4B4靶向的不同表位。

[0211] 表4:Ab Ag表位竞争ELISA研究结果

MAb 20ng/孔孵育	Mcm5 25ng/孔Abs 450-650反应
--------------	--------------------------

12A7	1.375
4B4	1.244
12A7+4B4	2.693

[0213] 将MAb以20ng/孔的标准化浓度(MAb的50%最大结合浓度,最高相对亲和力12A7)进行孵育。用于双位点免疫测定开发的最佳MAb以蓝色突出显示,并且它们的ELISA Abs 450反应以黄色突出显示。

[0214] 实施例3-表位作图

[0215] 使用的材料:

[0216]	微阵列内容:	将抗原 Mcm5 (氨基酸 367-582) 的序列翻译成具有肽-肽重叠的 15 个氨基酸的肽
	样品:	小鼠单克隆 IgG 抗体 12A7 和 4B4
	洗涤缓冲液:	0.05% Tween 20 的 PBS, pH 7.4(每次测定后 3x1 min)
	封闭缓冲液:	Rockland 封闭缓冲液 MB-070 (在第一次测定前 30
[0217]		min)
	孵育缓冲液:	0.05% Tween 20 的 PBS, pH 7.4 和 10% Rockland 封闭缓冲液
	测定条件:	抗体浓度为孵育缓冲液中 1 µg/ml 和 10 µg/ml; 4℃孵育 16h
	第二抗体:	山羊抗小鼠 IgG (H+L) DyLight 680 抗体;
	对照抗体:	单克隆抗 HA (12CA5)-DyLight680 (1:1000),单克隆抗 FLAG(M2)-DyLight800 (1:500); 染色于
	扫描系统:	LI-COR Odyssey Imaging System; 扫描偏移量 0.8 mm,解析度 21 µm,扫描强度红/绿为 5/7

[0218] 用1:5000的稀释度的第二抗体山羊抗小鼠IgG (H+L) DyLight680进行肽微阵列之一的预染色,以研究与可能干扰主要测定的抗原衍生肽的背景相互作用。随后用浓度为1µg/ml和10µg/ml的小鼠单克隆IgG抗体12A7和4B4在孵育缓冲液中孵育肽微阵列,然后用第二抗体染色,并以5的扫描强度(红色)读出。最后将构成肽阵列的HA和Flag对照肽作为内部质量控制进行染色以确认测定的质量和肽微阵列完整性(扫描强度红/绿:5/7)。

[0219] 用**PepSlide®**分析仪进行点强度的定量和肽注释。软件算法将每个点的荧光强度分解为原始信号、前景信号和背景信号,并计算前景中值强度的标准偏差。基于平均的前景中值强度,生成强度图谱,并且通过强度颜色代码突出显示肽图中的相互作用,其中红色代表高强度,白色代表低强度点。

[0220] 我们进一步绘制了所有测定的平均点强度,以抗体样品针对从N-到C-末端的抗原序列,以显现总的点强度和信噪比。强度图与肽和强度图谱以及微阵列扫描的视觉检查相关联,以鉴定抗体样品识别的肽和表位。如果不清楚某个氨基酸是否有助于抗体结合。

[0221] 在洗涤缓冲液中预先溶胀15分钟并且在封闭缓冲液中30分钟后,将肽微阵列之一用稀释度为1:5000的第二抗体山羊抗小鼠IgG (H+L) DyLight680抗体在最初室温孵育30分钟以分析与抗原衍生肽的背景相互作用。在扫描强度为5时,由于第二抗体的非特异性结合,我们没有观察到任何背景。使用**PepSlide®**分析仪进行数据定量既不可能也不需要,

因为没有任何点模式妨碍了微阵列网格的对齐。

[0222] 将肽微阵列与1 μ g/ml和10 μ g/ml的小鼠单克隆抗体12A7一起孵育(右上)。每次孵育后,用第二抗体山羊抗小鼠IgG (H+L) DyLight680抗体染色,然后以5的扫描强度读出。我们观察到由一排具有共有基序的相邻肽形成的强的和明确的表位样点图案,具有优异的信噪比。

[0223] 构成肽微阵列的HA和Flag对照肽的最终染色产生预期的和明确的点模式,并验证总体肽微阵列完整性。

[0224] 数据定量之后是肽和强度图谱的产生,以及浓度为1 μ g/ml和10 μ g/ml的小鼠单克隆抗体12A7的测定的强度图;后者的强度图被调平以提供更清楚的数据概览。信号是基于微阵列扫描中观察到的表位样点模式,并归因于具有共有基序WDETKGE的肽。

[0225] 将肽微阵列用1 μ g/ml和10 μ g/ml浓度的小鼠单克隆抗体4B4孵育。在每次孵育后,用第二抗体山羊抗小鼠IgG (H+L) DyLight680抗体染色,然后在5的扫描强度下读出。我们观察到由一排具有共有基序的相邻肽形成的两个强的和明确的表位样点图案,具有优异的信噪比。在10 μ g/ml的抗体浓度下,表位样点模式的原始强度相似,但背景相互作用稍微增加,表明在1-10 μ g/ml浓度范围内抗体的信号饱和。构成肽微阵列的HA和Flag对照肽的最终染色产生预期的和明确的点模式,并验证总体肽微阵列完整性。

[0226] 数据定量之后是肽和强度图谱的产生,以及浓度为1 μ g/ml和10 μ g/ml的小鼠单克隆抗体4B4的测定的强度图;后者的强度图被调平以提供更清楚的数据概览。在10 μ g/ml的抗体浓度下,表位样点图案的原始强度相似,但是背景相互作用稍微增加,导致标准化信号强度降低。信号是基于在微阵列扫描中观察到的表位样点模式,并归因于具有共有基序DDRVAIH和WDETKGE的肽。

[0227] 序列表

[0228] SEQ ID NO:1

[0229] WDETKGE

[0230] SEQ ID NO:2

[0231] DDRVAIH

[0232] SEQ ID NO:3

[0233] QNLVQSNGNTY

[0234] SEQ ID NO:4

[0235] CAGAACCTTGTAACAAAGTAATGGAAACACCTATTTA

[0236] SEQ ID NO:5

[0237] KVS

[0238] SEQ ID NO:6:

[0239] AAGTTTCCAA

[0240] SEQ ID NO:7:

[0241] SQSTRVPYT

[0242] SEQ ID NO:8:

[0243] TCTCAAAGTACACGTGTTCCGTACACA

[0244] SEQ ID NO:9:

[0245] GFSLSTSGMG
[0246] SEQ ID NO:10:
[0247] GGGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGGGT
[0248] SEQ ID NO:11:
[0249] IFWDDDK
[0250] SEQ ID NO:12:
[0251] ATTTTCTGGGATGATGACAAG
[0252] SEQ ID NO:13:
[0253] ARRSYNYYSMDY
[0254] SEQ ID NO:14:
[0255] GCGCGCGAAGTGACTACAATTACTACTCTATGGACTAC
[0256] SEQ ID NO:15:
[0257] QDIGSS
[0258] SEQ ID NO:16:
[0259] CAGGACATTGGTAGTAGC
[0260] SEQ ID NO:17:
[0261] ATS
[0262] SEQ ID NO:18:
[0263] GCCACATCC
[0264] SEQ ID NO:19:
[0265] LQYASSPPT
[0266] SEQ ID NO:20:
[0267] CTACAATATGCTAGTTCTCCTCCGACG
[0268] SEQ ID NO:21:
[0269] GFTFSNYA
[0270] SEQ ID NO:22:
[0271] GGATTCACCTTTCAGTAACTATGCC
[0272] SEQ ID NO:23:
[0273] ISRGGSYT
[0274] SEQ ID NO:24:
[0275] ATTAGTCGTGGTGGTAGTTACACC
[0276] SEQ ID NO:25:
[0277] ARHGYNYDDGAWFAN
[0278] SEQ ID NO:26:
[0279] GCAAGACATGGATATAATTACGACGACGGGGCCTGGTTTGCTAAC
[0280] SEQ ID NO:27:
[0281] DIMLTQSPLSLSVTLGDQASISCRSSQNLVQSNNGNTYLTWYLQKPGQSPKVLINKVSNRFYGVDPDRFSG
SGSGTDFTLRISRVEADLGIYFCSQSTRVPYTFGGGTKLEIRR
[0282] SEQ ID NO:28:

[0283] GATATCATGCTGACCAATCTCCACTCTCCCTGTCTGTCACTCTTGGAGATCAGGCCTCCATCTCTTGC
AGATCTAGTCAGAACCTTGTACAAAGTAATGGAAACACCTATTAACTTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCC
AAAGGTCCTGATCAACAAAGTTTCCAACCGATTTTATGGGGTCCCAGACAGGTTCA GTGGCAGTGGATCAGGGACAG
ATTTCACTCAGGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACGTGTTCCG
TACACATTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAGACG

[0284] SEQ ID NO:29:

[0285] QQDLQQSGPGILQPTQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQSSNMGLEWLAHIFWDDDKRYNPSLRSR
LTLSKDTSSSQVFLMITSVSTADSATYYCARRSDYNYYSMDYWGQGTAVTVSSSEQ ID NO:30:

[0286] CAGCAAGATCTGCAGCAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCACCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTTCT
TTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGGGTGTGAGTTGGATTCGTCAATCTTCAAATATGGGTCTGGAGTG
GCTGGCACACATTTTCTGGGATGATGACAAGCGCTATAATCCCTCCCTGAGGAGCCGACTCACGCTCTCCAAGGATA
CCTCCAGTAGCCAGGTATTTCTCATGATCACCAGTGTGAGTACTGCAGATTCTGCCACATACTACTGTGCGCGGCGA
AGTGACTACAATTACTACTCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCGCAGTCACCGTCTCCTCA

[0287] SEQ ID NO:31:

[0288] DIMLTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSSLNLQQEPDGTIKRLIYATSSLD SGVPKRFSGRSGS
DYSLTISSESEDFVDYYCLQYASSPPTFGGGTKLEIK

[0289] SEQ ID NO:32:

[0290] GATATCATGCTGACCAATCTCCATCCTCCTTATCTGCCTCTCTGGGAGAAAGAGTCAGTCTCACTTGT
CGGGCAAGTCAGGACATTGGTAGTAGCTTAACTGGCTTCAACAGGAACCAGATGGAATATTAAACGCCTAATCTA
CGCCACATCCAGTTTAGATTCTGGTGTCCCCAAAAGGTTCA GTGGCAGTAGGTCTGGGTCA GATTATTCTCTACCA
TCAGCAGCCTTGAGTCTGAAGATTTGTAGACTATTACTGTCTACAATATGCTAGTTCTCCTCCGACGTTCCGGTGA
GGCACCAAGCTGGAAATCAAAC

[0291] SEQ ID NO:33:

[0292] VKLQESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSNYAMSWVRQNPEKRLEWVATISRGGSYTYYPDSVKGRFTI
SRDNAKNTLYLQMNSLRSED TAMYFCARHGYN YDDGAWFANWGQGLVTVSA

[0293] SEQ ID NO:34:

[0294] TAGGTGAAACTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCA
GCCTCTGGATTCACTTTAGTAAGTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGAATCCGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTGCG
AACCATTAGTCGTGGTGGTAGTTACACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGTCGATTACCATCTCCAGAGACAATG
CCAAGAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGATTTCTGTGCAAGACATGGA
TATAATTACGACGACGGGGCTGGTTTGCTAACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

[0295] SEQ ID NO:35:

10 20 30 40 50 60
 MSGFDDPGIF YSDSFGGDAQ ADEGQARKSQ LQRRFKEFLR QYRVGTDRTG FTFKYRDELK
 70 80 90 100 110 120
 RHYNLGEYWI EVEMEDLASF DEDLADYLYK QPAEHLQLE EAAKEVADEV TRPRPSGEEV
 130 140 150 160 170 180
 LQDIQVMLKS DASPSSIRSL KSDMMSHLVK IPGIIAASA VRAKATRISI QCRSCRNTLT
 [0296] 190 200 210 220 230 240
 NIAMRPGLEG YALPRKCNTD QAGRPKCPLD PYFIMPDKCK CVDFQTLKLQ ELPDAVPHGE
 250 260 270 280 290 300
 MPRHMQLYCD RYLCDKVVPG NRVTIMGIYS IKKFGLTTSR GRDRVGVGIR SSIYIRVLGIQ
 310 320 330 340 350 360
 VDTDGSGRSF AGAVSPQEEE EFRRLAALPN VYEVISKSIA PSIFGGTDMK KAIACLLFGG
 370 380 390 400 410 420
 SRKRLPDGLT RRGDINLLML GDPGTAKSQL LKFVEKCSPI GVYTSGKGSS AAGLTASVMR
 430 440 450 460 470 480
 DPSSRNFIME GGAMVLADGG VVCIDEFDKM REDDRVAIHE AMEQQTISIA KAGITTTLNS
 490 500 510 520 530 540
 RCSVLAAANS VFGRWDETKG EDNIDFMPTI LSRFDMIFIV KDEHNEERDV MLAKHVITLH
 550 560 570 580 590 600
 VSALTQTQAV EGEIDLAKLK KFIAYCRVKC GPRLSAEAAE KLKNRYIIMR SGARQHERDS
 [0297] 610 620 630 640 650 660
 DRRSSIPITV RQLEAIVRIA EALSKMKLQP FATEADVEEA LRLFQVSTLD AALSGTSLGV
 670 680 690 700 710 720
 EGFTSQEDQE MLSRIEKQLK RRFAIGSQVS EHSIIKDFTK QKYPEHAIHK VLQLMLRRGE
 730
 IQHRMQRKVL YRLK

[0298] SEQ ID NO:36

[0299] 智人微染色体维持复合物组分5 (MCM5), mRNA

[0300] NCBI参考序列:NM_006739.3

[0301] lggaaaaccag aggcgcagtc atgtcgggat tcgacgatcc tggcattttc tacagcgaca

[0302] 6lgttcggggg cgacgccag gccgacgagg ggcaggcccg caaatcgag ctgcagaggc

[0303] 12lgttcaagga gtctctgcgg cggtagcgag tgggcaccga ccgcacgggc ttcaccttca

[0304] 18laatacaggga tgaactcaag cggcattaca acctggggga gtactggatt gaggtggaga

[0305] 24ltggaggatct ggccagcttt gatgaggacc tgcccgacta cttgtacaag cagccagccg

[0306] 30lagcacctgca gctgctggag gaagctgcc aaggagtagc tgatgaggtg acccgcccc

[0307] 361ggccttcttg ggaggaggtg ctccaggaca tccaggtcat gctcaagtcg gacgccagcc
[0308] 421cttcagcat tcgtagcctg aagtcggaca tgatgtcaca cctggtgaag atccctggca
[0309] 481tcatcatcgc ggcctctgcg gtccgtgcc aaggccaccg catctctatc cagtgccgca
[0310] 541gctgccgcaa caccctcacc aacattgcc tgcgccctgg cctcgagggc tatgccctgc
[0311] 601ccaggaagtg caacacagat caggctgggc gcccacaaatg cccattggac ccgtacttca
[0312] 661tcatgcccga caaatgcaaa tgcgtggact tccagaccct gaagctgcag gagctgcctg
[0313] 721atgcagtccc ccacggggag atgccagac acatgcagct ctactgcgac aggtacctgt
[0314] 781gtgacaaggt cgtccctggg aacagggtta ccatcatggg catctactcc atcaagaagt
[0315] 841ttggcctgac taccagcagg ggccgtgaca ggggtggcgt gggcatccga agctcctaca
[0316] 901tccgtgtcct gggcatccag gtggacacag atggctctgg ccgcagcttt gctggggccg
[0317] 961tgagccccc ggaggaggag gagttccgtc gcctggctgc cctcccaa at gtctatgagg
[0318] 1021tcatctccaa gagcatcgcc cctccatct ttgggggcac agacatgaag aaggccattg
[0319] 1081cctgcctgct ctttgggggc tcccgaaaga ggctccctga tggacttact cgccgaggag
[0320] 1141acatcaacct gctgatgcta ggggaccctg ggacagccaa gtcccagctt ctgaagtttg
[0321] 1201tgagaagtg ttctccatt ggggtataca cgtctgggaa aggagcagc gcagctggac
[0322] 1261tgacagcctc ggtgatgagg gacccttcgt cccggaattt catcatggag ggccggagcca
[0323] 1321tggtcctggc cgatggtggg gtctctgtga ttgacgagtt tgacaagatg cgagaagatg
[0324] 1381 accgtgtggc aatccacgaa gccatggagc agcagaccat ctctatcgcc
aaggctggga
[0325] 1441 tcaccaccac cctgaactcc cgctgctccg tcctggctgc tgccaactca
gtgttcggcc
[0326] 1501 gctgggatga gacgaagggg gaggacaaca ttgacttcat gccaccatc
ttgtcgcgt
[0327] 1561 tcgacatgat cttcatcgtc aaggatgagc acaatgagga gagggatgtg
atgctggcca
[0328] 1621 agcatgtcat cactctgcac gtgagcgcac tgacacagac acaggctgtg
gagggcgaga
[0329] 1681 ttgacctggc caagctgaag aagtttattg cctactgccg agtgaagtgt
ggccccggc
[0330] 1741 tgtcagcaga ggctgcagag aaactgaaga accgctacat catcatcgcg
agcggggccc
[0331] 1801 gtcagcacga gagggacagt gaccgccgt ccagcatccc catcactgtg
cggcagctgg
[0332] 1861 aggccattgt gcgcatcgcg gaagccctca gcaagatgaa gctgcagccc
ttcgccacag
[0333] 1921 aggcagatgt ggaggaggcc ctgcggctct tccaagtgtc cacgttggat
gctgccttgt
[0334] 1981 ccggtaccct gtcaggggtg gagggcttca ccagccagga ggaccaggag
atgctgagcc

[0335] 2041 gcatcgagaa gcagctcaag cgccgctttg ccattggctc ccaggtgtct
gagcacagca
[0336] 2101 tcatcaagga cttcaccaag cagaaatacc cggagcacgc catccacaag
gtgctgcagc
[0337] 2161 tcatgctgcg gcgcggcgag atccagcatc gcatgcagcg caaggttctc
taccgcctca
[0338] 2221 agtgagtcgc gccgcctcac tggactcatg gactcgccca cgctcgccc
ctcctgcgc
[0339] 2281 tgcctgccat tgacaatgtt gctgggacct ctgcctcccc actgcagccc
tcgaacttcc
[0340] 2341 caggcacccct cctttctgcc ccagaggaag gagctgtagt gtcttgctgc
ctctgggcgc
[0341] 2401 ccgcctctag cgcggttctg ggaagtgtgc ttttggcatc cgtaataat
aaagccacgg
[0342] 2461 tgtgttcagg taaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
aaaaaaaaaa
[0343] 2521 aaaaaaaaaa aaaa

[0001]	序列表
[0002]	<110> Arquer Diagnostics Ltd
[0003]	<120> MCM5测定
[0004]	<130> N403141W0
[0005]	<140> tbc
[0006]	<141> tbc
[0007]	<150> tbc
[0008]	<151> tbc
[0009]	<160> 36
[0010]	<170> PatentIn version 3.5
[0011]	<210> 1
[0012]	<211> 7
[0013]	<212> PRT
[0014]	<213> 人工序列
[0015]	<220>
[0016]	<223> 抗体12A7结合的表位
[0017]	<400> 1
[0018]	Trp Asp Glu Thr Lys Gly Glu
[0019]	1 5
[0020]	<210> 2
[0021]	<211> 7
[0022]	<212> PRT
[0023]	<213> 人工序列
[0024]	<220>
[0025]	<223> 抗体4B4结合的表位
[0026]	<400> 2
[0027]	Asp Asp Arg Val Ala Ile His
[0028]	1 5
[0029]	<210> 3
[0030]	<211> 11
[0031]	<212> PRT
[0032]	<213> 人工序列
[0033]	<220>
[0034]	<223> 12A7轻链CDR1多肽序列
[0035]	<400> 3
[0036]	Gln Asn Leu Val Gln Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
[0037]	1 5 10
[0038]	<210> 4
[0039]	<211> 36
[0040]	<212> DNA
[0041]	<213> 人工序列

[0042] <220>
[0043] <223> 12A7轻链CDR1核苷酸序列
[0044] <400> 4
[0045] cagaaccttg tacaaagtaa tggaaacacc tattta 36
[0046] <210> 5
[0047] <211> 4
[0048] <212> PRT
[0049] <213> 人工序列
[0050] <220>
[0051] <223> 12A7轻链CDR2多肽序列
[0052] <220>
[0053] <221> misc_feature
[0054] <222> (4) .. (4)
[0055] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0056] <400> 5
[0057] Lys Val Ser Xaa
[0058] 1
[0059] <210> 6
[0060] <211> 10
[0061] <212> DNA
[0062] <213> 人工序列
[0063] <220>
[0064] <223> 12A7轻链CDR2核苷酸序列
[0065] <400> 6
[0066] aagtttccaa 10
[0067] <210> 7
[0068] <211> 9
[0069] <212> PRT
[0070] <213> 人工序列
[0071] <220>
[0072] <223> 12A7轻链CDR3多肽序列
[0073] <400> 7
[0074] Ser Gln Ser Thr Arg Val Pro Tyr Thr
[0075] 1 5
[0076] <210> 8
[0077] <211> 27
[0078] <212> DNA
[0079] <213> 人工序列
[0080] <220>
[0081] <223> 12A7轻链CDR3核苷酸序列
[0082] <400> 8
[0083] tctcaaagta cacgtgttcc gtacaca 27

[0084] <210> 9
[0085] <211> 10
[0086] <212> PRT
[0087] <213> 人工序列
[0088] <220>
[0089] <223> 12A7重链CDR1多肽序列
[0090] <400> 9
[0091] Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly
[0092] 1 5 10
[0093] <210> 10
[0094] <211> 30
[0095] <212> DNA
[0096] <213> 人工序列
[0097] <220>
[0098] <223> 12A7重链CDR1核苷酸序列
[0099] <400> 10
[0100] gggttttcac tgagcacttc tggatatgggt 30
[0101] <210> 11
[0102] <211> 7
[0103] <212> PRT
[0104] <213> 人工序列
[0105] <220>
[0106] <223> 12A7重链CDR2多肽序列
[0107] <400> 11
[0108] Ile Phe Trp Asp Asp Asp Lys
[0109] 1 5
[0110] <210> 12
[0111] <211> 21
[0112] <212> DNA
[0113] <213> 人工序列
[0114] <220>
[0115] <223> 12A7重链CDR2核苷酸序列
[0116] <400> 12
[0117] attttctggg atgatgacaa g 21
[0118] <210> 13
[0119] <211> 13
[0120] <212> PRT
[0121] <213> 人工序列
[0122] <220>
[0123] <223> 12A7重链CDR3多肽序列
[0124] <400> 13
[0125] Ala Arg Arg Ser Asp Tyr Asn Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr

[0126]	1	5	10
[0127]	<210> 14		
[0128]	<211> 39		
[0129]	<212> DNA		
[0130]	<213> 人工序列		
[0131]	<220>		
[0132]	<223> 12A7重链CDR3核苷酸序列		
[0133]	<400> 14		
[0134]	gcgcggcgaa gtgactacaa ttactactct atggactac 39		
[0135]	<210> 15		
[0136]	<211> 6		
[0137]	<212> PRT		
[0138]	<213> 人工序列		
[0139]	<220>		
[0140]	<223> 4B4轻链CDR1多肽序列		
[0141]	<400> 15		
[0142]	Gln Asp Ile Gly Ser Ser		
[0143]	1	5	
[0144]	<210> 16		
[0145]	<211> 18		
[0146]	<212> DNA		
[0147]	<213> 人工序列		
[0148]	<220>		
[0149]	<223> 4B4轻链CDR1核苷酸序列		
[0150]	<400> 16		
[0151]	caggacattg gtagtagc 18		
[0152]	<210> 17		
[0153]	<211> 4		
[0154]	<212> PRT		
[0155]	<213> 人工序列		
[0156]	<220>		
[0157]	<223> 4B4轻链CDR2多肽序列		
[0158]	<220>		
[0159]	<221> misc_feature		
[0160]	<222> (4) .. (4)		
[0161]	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸		
[0162]	<400> 17		
[0163]	Ala Thr Ser Xaa		
[0164]	1		
[0165]	<210> 18		
[0166]	<211> 10		
[0167]	<212> DNA		

[0168] <213> 人工序列
[0169] <220>
[0170] <223> 4B4轻链CDR2核苷酸序列
[0171] <220>
[0172] <221> misc_feature
[0173] <222> (10) .. (10)
[0174] <223> n是a, c, g或t
[0175] <400> 18
[0176] gccacatccn 10
[0177] <210> 19
[0178] <211> 9
[0179] <212> PRT
[0180] <213> 人工序列
[0181] <220>
[0182] <223> 4B4轻链CDR3多肽序列
[0183] <400> 19
[0184] Leu Gln Tyr Ala Ser Ser Pro Pro Thr
[0185] 1 5
[0186] <210> 20
[0187] <211> 27
[0188] <212> DNA
[0189] <213> 人工序列
[0190] <220>
[0191] <223> 4B4轻链CDR3核苷酸序列
[0192] <400> 20
[0193] ctacaatatg ctagttctcc tccgacg 27
[0194] <210> 21
[0195] <211> 8
[0196] <212> PRT
[0197] <213> 人工序列
[0198] <220>
[0199] <223> 4B4重链CDR1多肽序列
[0200] <400> 21
[0201] Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala
[0202] 1 5
[0203] <210> 22
[0204] <211> 24
[0205] <212> DNA
[0206] <213> 人工序列
[0207] <220>
[0208] <223> 4B4重链CDR1核苷酸序列
[0209] <400> 22

[0210]	ggattcactt tcagtaacta tgcc 24
[0211]	<210> 23
[0212]	<211> 8
[0213]	<212> PRT
[0214]	<213> 人工序列
[0215]	<220>
[0216]	<223> 4B4重链CDR2多肽序列
[0217]	<400> 23
[0218]	Ile Ser Arg Gly Gly Ser Tyr Thr
[0219]	1 5
[0220]	<210> 24
[0221]	<211> 24
[0222]	<212> DNA
[0223]	<213> 人工序列
[0224]	<220>
[0225]	<223> 4B4重链CDR2核苷酸序列
[0226]	<400> 24
[0227]	attagtcgtg gtggtagtta cacc 24
[0228]	<210> 25
[0229]	<211> 15
[0230]	<212> PRT
[0231]	<213> 人工序列
[0232]	<220>
[0233]	<223> 4B4重链CDR3多肽序列
[0234]	<400> 25
[0235]	Ala Arg His Gly Tyr Asn Tyr Asp Asp Gly Ala Trp Phe Ala Asn
[0236]	1 5 10 15
[0237]	<210> 26
[0238]	<211> 45
[0239]	<212> DNA
[0240]	<213> 人工序列
[0241]	<220>
[0242]	<223> 4B4重链CDR3核苷酸序列
[0243]	<400> 26
[0244]	gcaagacatg gatataatta cgacgacggg gcctggtttg ctaac 45
[0245]	<210> 27
[0246]	<211> 113
[0247]	<212> PRT
[0248]	<213> 人工序列
[0249]	<220>
[0250]	<223> 12A7全长可变轻链序列(多肽)
[0251]	<400> 27

[0252]	Asp Ile Met Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
[0253]	1 5 10 15
[0254]	Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Leu Val Gln Ser
[0255]	20 25 30
[0256]	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Thr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[0257]	35 40 45
[0258]	Pro Lys Val Leu Ile Asn Lys Val Ser Asn Arg Phe Tyr Gly Val Pro
[0259]	50 55 60
[0260]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
[0261]	65 70 75 80
[0262]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
[0263]	85 90 95
[0264]	Thr Arg Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg
[0265]	100 105 110
[0266]	Arg
[0267]	<210> 28
[0268]	<211> 338
[0269]	<212> DNA
[0270]	<213> 人工序列
[0271]	<220>
[0272]	<223> 12A7全长可变轻链序列(核苷酸)
[0273]	<400> 28
[0274]	gatatcatgc tgaccaatc tccactctcc ctgtctgtca ctcttgaggaga tcaggcctcc 60
[0275]	atctcttgca gatctagtca gaaccttgta caaagtaatg gaaacaccta tttaacttgg 120
[0276]	tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag gtctgatca acaaagtttc caaccgattt 180
[0277]	tatgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaggatc 240
[0278]	agcagagtgg aggctgagga tctgggaatt tatttctgct ctcaaagtac acgtgttccg 300
[0279]	tacacattcg gaggggggac caagctggaa ataagacg 338
[0280]	<210> 29
[0281]	<211> 121
[0282]	<212> PRT
[0283]	<213> 人工序列
[0284]	<220>
[0285]	<223> 12A7全长可变重链序列(多肽)
[0286]	<400> 29
[0287]	Gln Gln Asp Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Thr Gln
[0288]	1 5 10 15
[0289]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
[0290]	20 25 30
[0291]	Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Ser Ser Asn Met Gly Leu Glu
[0292]	35 40 45
[0293]	Trp Leu Ala His Ile Phe Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser

[0294]	50	55	60
[0295]	Leu Arg Ser Arg Leu Thr Leu Ser Lys Asp Thr Ser Ser Ser Gln Val		
[0296]	65	70	75 80
[0297]	Phe Leu Met Ile Thr Ser Val Ser Thr Ala Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr		
[0298]	85	90	95
[0299]	Cys Ala Arg Arg Ser Asp Tyr Asn Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly		
[0300]	100	105	110
[0301]	Gln Gly Thr Ala Val Thr Val Ser Ser		
[0302]	115	120	
[0303]	<210> 30		
[0304]	<211> 363		
[0305]	<212> DNA		
[0306]	<213> 人工序列		
[0307]	<220>		
[0308]	<223> 12A7全长可变重链序列(核苷酸)		
[0309]	<400> 30		
[0310]	cagcaagatc tgcagcagtc tggccctggg atattgcagc ccaccagac cctcagtcgtg	60	
[0311]	acttgttctt tctctgggtt ttactgagc acttctggta tgggtgtgag ttggattcgt	120	
[0312]	caatcttcaa atatgggtct ggagtggctg gcacacattt tctgggatga tgacaagcgc	180	
[0313]	tataatccct ccctgaggag ccgactcacg ctctccaagg atacctccag tagccaggta	240	
[0314]	tttctcatga tcaccagtgt gactactgca gattctgcca catactactg tgcgcggcga	300	
[0315]	agtgactaca attactactc tatggactac tgggtcaag gaaccgcagt caccgtctcc	360	
[0316]	tca	363	
[0317]	<210> 31		
[0318]	<211> 107		
[0319]	<212> PRT		
[0320]	<213> 人工序列		
[0321]	<220>		
[0322]	<223> 4B4全长可变轻链序列(多肽)		
[0323]	<400> 31		
[0324]	Asp Ile Met Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly		
[0325]	1	5	10 15
[0326]	Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Ser		
[0327]	20	25	30
[0328]	Leu Asn Trp Leu Gln Gln Glu Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile		
[0329]	35	40	45
[0330]	Tyr Ala Thr Ser Ser Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly		
[0331]	50	55	60
[0332]	Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser		
[0333]	65	70	75 80
[0334]	Glu Asp Phe Val Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ala Ser Ser Pro Pro		
[0335]	85	90	95

[0336]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0337]	100 105
[0338]	<210> 32
[0339]	<211> 322
[0340]	<212> DNA
[0341]	<213> 人工序列
[0342]	<220>
[0343]	<223> 4B4全长可变轻链序列(核苷酸)
[0344]	<400> 32
[0345]	gatatcatgc tgaccaatc tccatcctcc ttatctgcct ctctgggaga aagagtcagt 60
[0346]	ctcacttgtc gggcaagtca ggacattggt agtagcttaa actggcttca acaggaacca 120
[0347]	gatggaacta ttaaagcct aatctacgcc acatccagtt tagattctgg tgtecccaaa 180
[0348]	aggttcagtg gcagtaggtc tgggtcagat tattctctca ccatcagcag ccttgagtct 240
[0349]	gaagattttg tagactatta ctgtctacaa tatgctagtt ctctccgac gttcggtgga 300
[0350]	ggcaccaagc tggaatcaa ac 322
[0351]	<210> 33
[0352]	<211> 121
[0353]	<212> PRT
[0354]	<213> 人工序列
[0355]	<220>
[0356]	<223> 4B4全长可变重链序列(多肽)
[0357]	<400> 33
[0358]	Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser
[0359]	1 5 10 15
[0360]	Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala
[0361]	20 25 30
[0362]	Met Ser Trp Val Arg Gln Asn Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala
[0363]	35 40 45
[0364]	Thr Ile Ser Arg Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
[0365]	50 55 60
[0366]	Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
[0367]	65 70 75 80
[0368]	Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Ala
[0369]	85 90 95
[0370]	Arg His Gly Tyr Asn Tyr Asp Asp Gly Ala Trp Phe Ala Asn Trp Gly
[0371]	100 105 110
[0372]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
[0373]	115 120
[0374]	<210> 34
[0375]	<211> 366
[0376]	<212> DNA
[0377]	<213> 人工序列

[0378]	<220>
[0379]	<223> 4B4全长可变重链序列(核苷酸)
[0380]	<400> 34
[0381]	tagtgaaac tgcaggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
[0382]	tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactatgcca tgtcttgggt tcgccagaat 120
[0383]	ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtcgtg gtggtagtta cacctactat 180
[0384]	ccagacagtg tgaagggtcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtat 240
[0385]	ctgcaaatga acagtctgag gtctgaggac acggccatgt atttctgtgc aagacatgga 300
[0386]	tataattacg acgacggggc ctggtttgct aactggggcc aagggactct ggtcactgtc 360
[0387]	tctgca 366
[0388]	<210> 35
[0389]	<211> 734
[0390]	<212> PRT
[0391]	<213> 智人
[0392]	<220>
[0393]	<223> Mcm5(多肽)
[0394]	<400> 35
[0395]	Met Ser Gly Phe Asp Asp Pro Gly Ile Phe Tyr Ser Asp Ser Phe Gly
[0396]	1 5 10 15
[0397]	Gly Asp Ala Gln Ala Asp Glu Gly Gln Ala Arg Lys Ser Gln Leu Gln
[0398]	20 25 30
[0399]	Arg Arg Phe Lys Glu Phe Leu Arg Gln Tyr Arg Val Gly Thr Asp Arg
[0400]	35 40 45
[0401]	Thr Gly Phe Thr Phe Lys Tyr Arg Asp Glu Leu Lys Arg His Tyr Asn
[0402]	50 55 60
[0403]	Leu Gly Glu Tyr Trp Ile Glu Val Glu Met Glu Asp Leu Ala Ser Phe
[0404]	65 70 75 80
[0405]	Asp Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Leu Tyr Lys Gln Pro Ala Glu His Leu
[0406]	85 90 95
[0407]	Gln Leu Leu Glu Glu Ala Ala Lys Glu Val Ala Asp Glu Val Thr Arg
[0408]	100 105 110
[0409]	Pro Arg Pro Ser Gly Glu Glu Val Leu Gln Asp Ile Gln Val Met Leu
[0410]	115 120 125
[0411]	Lys Ser Asp Ala Ser Pro Ser Ser Ile Arg Ser Leu Lys Ser Asp Met
[0412]	130 135 140
[0413]	Met Ser His Leu Val Lys Ile Pro Gly Ile Ile Ile Ala Ala Ser Ala
[0414]	145 150 155 160
[0415]	Val Arg Ala Lys Ala Thr Arg Ile Ser Ile Gln Cys Arg Ser Cys Arg
[0416]	165 170 175
[0417]	Asn Thr Leu Thr Asn Ile Ala Met Arg Pro Gly Leu Glu Gly Tyr Ala
[0418]	180 185 190
[0419]	Leu Pro Arg Lys Cys Asn Thr Asp Gln Ala Gly Arg Pro Lys Cys Pro

[0420]	195	200	205
[0421]	Leu Asp Pro Tyr Phe Ile Met Pro Asp Lys Cys Lys Cys Val Asp Phe		
[0422]	210	215	220
[0423]	Gln Thr Leu Lys Leu Gln Glu Leu Pro Asp Ala Val Pro His Gly Glu		
[0424]	225	230	235
[0425]	Met Pro Arg His Met Gln Leu Tyr Cys Asp Arg Tyr Leu Cys Asp Lys		
[0426]	245	250	255
[0427]	Val Val Pro Gly Asn Arg Val Thr Ile Met Gly Ile Tyr Ser Ile Lys		
[0428]	260	265	270
[0429]	Lys Phe Gly Leu Thr Thr Ser Arg Gly Arg Asp Arg Val Gly Val Gly		
[0430]	275	280	285
[0431]	Ile Arg Ser Ser Tyr Ile Arg Val Leu Gly Ile Gln Val Asp Thr Asp		
[0432]	290	295	300
[0433]	Gly Ser Gly Arg Ser Phe Ala Gly Ala Val Ser Pro Gln Glu Glu Glu		
[0434]	305	310	315
[0435]	Glu Phe Arg Arg Leu Ala Ala Leu Pro Asn Val Tyr Glu Val Ile Ser		
[0436]	325	330	335
[0437]	Lys Ser Ile Ala Pro Ser Ile Phe Gly Gly Thr Asp Met Lys Lys Ala		
[0438]	340	345	350
[0439]	Ile Ala Cys Leu Leu Phe Gly Gly Ser Arg Lys Arg Leu Pro Asp Gly		
[0440]	355	360	365
[0441]	Leu Thr Arg Arg Gly Asp Ile Asn Leu Leu Met Leu Gly Asp Pro Gly		
[0442]	370	375	380
[0443]	Thr Ala Lys Ser Gln Leu Leu Lys Phe Val Glu Lys Cys Ser Pro Ile		
[0444]	385	390	395
[0445]	Gly Val Tyr Thr Ser Gly Lys Gly Ser Ser Ala Ala Gly Leu Thr Ala		
[0446]	405	410	415
[0447]	Ser Val Met Arg Asp Pro Ser Ser Arg Asn Phe Ile Met Glu Gly Gly		
[0448]	420	425	430
[0449]	Ala Met Val Leu Ala Asp Gly Gly Val Val Cys Ile Asp Glu Phe Asp		
[0450]	435	440	445
[0451]	Lys Met Arg Glu Asp Asp Arg Val Ala Ile His Glu Ala Met Glu Gln		
[0452]	450	455	460
[0453]	Gln Thr Ile Ser Ile Ala Lys Ala Gly Ile Thr Thr Thr Leu Asn Ser		
[0454]	465	470	475
[0455]	Arg Cys Ser Val Leu Ala Ala Ala Asn Ser Val Phe Gly Arg Trp Asp		
[0456]	485	490	495
[0457]	Glu Thr Lys Gly Glu Asp Asn Ile Asp Phe Met Pro Thr Ile Leu Ser		
[0458]	500	505	510
[0459]	Arg Phe Asp Met Ile Phe Ile Val Lys Asp Glu His Asn Glu Glu Arg		
[0460]	515	520	525
[0461]	Asp Val Met Leu Ala Lys His Val Ile Thr Leu His Val Ser Ala Leu		

[0462]	530	535	540
[0463]	Thr Gln Thr Gln Ala Val Glu Gly Glu Ile Asp Leu Ala Lys Leu Lys		
[0464]	545	550	555 560
[0465]	Lys Phe Ile Ala Tyr Cys Arg Val Lys Cys Gly Pro Arg Leu Ser Ala		
[0466]	565	570	575
[0467]	Glu Ala Ala Glu Lys Leu Lys Asn Arg Tyr Ile Ile Met Arg Ser Gly		
[0468]	580	585	590
[0469]	Ala Arg Gln His Glu Arg Asp Ser Asp Arg Arg Ser Ser Ile Pro Ile		
[0470]	595	600	605
[0471]	Thr Val Arg Gln Leu Glu Ala Ile Val Arg Ile Ala Glu Ala Leu Ser		
[0472]	610	615	620
[0473]	Lys Met Lys Leu Gln Pro Phe Ala Thr Glu Ala Asp Val Glu Glu Ala		
[0474]	625	630	635 640
[0475]	Leu Arg Leu Phe Gln Val Ser Thr Leu Asp Ala Ala Leu Ser Gly Thr		
[0476]	645	650	655
[0477]	Leu Ser Gly Val Glu Gly Phe Thr Ser Gln Glu Asp Gln Glu Met Leu		
[0478]	660	665	670
[0479]	Ser Arg Ile Glu Lys Gln Leu Lys Arg Arg Phe Ala Ile Gly Ser Gln		
[0480]	675	680	685
[0481]	Val Ser Glu His Ser Ile Ile Lys Asp Phe Thr Lys Gln Lys Tyr Pro		
[0482]	690	695	700
[0483]	Glu His Ala Ile His Lys Val Leu Gln Leu Met Leu Arg Arg Gly Glu		
[0484]	705	710	715 720
[0485]	Ile Gln His Arg Met Gln Arg Lys Val Leu Tyr Arg Leu Lys		
[0486]	725	730	
[0487]	<210> 36		
[0488]	<211> 2534		
[0489]	<212> DNA		
[0490]	<213> 智人		
[0491]	<220>		
[0492]	<223> Mcm5 (mRNA)		
[0493]	<400> 36		
[0494]	ggaaaaccag aggcgcagtc atgtcgggat tcgacgatcc tggcattttc tacagcgaca	60	
[0495]	gcttcggggg cgacgcccag gccgacgagg ggcaggcccg caaatcgag ctgcagaggc	120	
[0496]	gcttcaagga gttcctgcgg cggtaccgag tgggcaccga ccgcacgggc ttcacattca	180	
[0497]	aatacaggga tgaactcaag cggcattaca acctggggga gtactggatt gaggtggaga	240	
[0498]	tggaggatct ggccagcttt gatgaggacc tggccgacta cttgtacaag cagccagccg	300	
[0499]	agcactgca gctgctggag gaagctgcca aggaggtagc tgatgaggtg acccgcccc	360	
[0500]	ggccttctgg ggaggagtg ctccaggaca tccaggtcat gctcaagtgc gacgccagcc	420	
[0501]	cttcagcat tcgtagcctg aagtcggaca tgatgtcaca cctggtgaag atccctggca	480	
[0502]	tcatcatcgc ggcctctgcg gtccgtgcca aggccaccg catctctatc cagtgccgca	540	
[0503]	gctgccgcaa caccctcacc aacattgcca tgcgccttg cctcgagggc tatgcctgc	600	

[0504]	ccaggaagtg caacacagat caggctgggc gcccctaatg cccattggac ccgtacttca	660
[0505]	tcatgcccga caaatgcaaa tgctgggact tccagaccct gaagctgcag gagctgcctg	720
[0506]	atgcagtccc ccacggggag atgcccagac acatgcagct ctactgcgac aggtacctgt	780
[0507]	gtgacaaggt cgtccctggg aacagggtta ccatcatggg catctactcc atcaagaagt	840
[0508]	ttggcctgac taccagcagg ggccgtgaca ggggtgggcgt gggcatccga agctcctaca	900
[0509]	tccgtgtcct gggcatccag gtggacacag atggctcttg ccgcagcttt gctggggccg	960
[0510]	tgagcccca ggaggaggag gagttccgtc gcctggctgc cctcccaat gtctatgagg	1020
[0511]	tcatctccaa gagcatgcc cctccatct ttggggggcac agacatgaag aaggccattg	1080
[0512]	cctgcctgct ctttgggggc tcccgaaaga ggctccctga tggacttact cgccgaggag	1140
[0513]	acatcaacct gctgatgcta ggggacctg ggacagccaa gtcccagctt ctgaagtttg	1200
[0514]	tggagaagtg ttctcccatt ggggtataca cgtctgggaa aggcagcagc gcagctggac	1260
[0515]	tgacagcctc ggtgatgagg gaccttcgt cccggaattt catcatggag ggcggagcca	1320
[0516]	tggtcctggc cgatggtggg gtcgtctgta ttgacagtt tgacaagatg cgagaagatg	1380
[0517]	accgtgtggc aatccacgaa gccatggagc agcagaccat ctctatgcc aaggctggga	1440
[0518]	tcaccaccac cctgaactcc cgctgtccg tcctggctgc tgccaactca gtgttcggcc	1500
[0519]	gctgggatga gacgaagggg gaggacaaca ttgacttcat gccaccatc ttgtcgcgt	1560
[0520]	tcgacatgat cttcatcgtc aaggatgagc acaatgagga gagggatgtg atgctggcca	1620
[0521]	agcatgtcat cactctgcac gtgagcgac tgacacagac acaggctgtg gagggcgaga	1680
[0522]	ttgacctggc caagctgaag aagtttattg cctactgccg agtgaagtgt ggccccggc	1740
[0523]	tgtcagcaga ggctgcagag aaactgaaga accgtacat catcatgcgg agcggggccc	1800
[0524]	gtcagcacga gagggacagt gaccgccgt ccagcatccc catcactgtg cggcagctgg	1860
[0525]	aggccattgt gcgcatcgc gaagccctca gcaagatgaa gctgcagccc ttcgccacag	1920
[0526]	aggcagatgt ggaggaggcc ctgcggctct tccaagtgc cacgttggat gctgccttgt	1980
[0527]	ccggtaccct gtcaggggtg gagggcttca ccagccagga ggaccaggag atgctgagcc	2040
[0528]	gcatcgagaa gcagctcaag cgccgctttg ccattggctc ccaggtgtct gagcacagca	2100
[0529]	tcatcaagga cttaccaag cagaaatacc cggagcacgc catccacaag gtgctgcagc	2160
[0530]	tcatgctgcg gcgcggcgag atccagcatc gcatgcagcg caaggttctc taccgcctca	2220
[0531]	agtgagtcgc gccgcctcac tggactcatg gactcgccca cgcctcgccc ctctctgccg	2280
[0532]	tgcttgccat tgacaatgtt gctgggacct ctgcctcccc actgcagccc tcgaacttcc	2340
[0533]	caggcacct ctttctgcc ccagaggaag gagctgtagt gtctgtctgc ctctgggcgc	2400
[0534]	ccgcctctag cgcggttctg ggaagtgtgc ttttggcatc cgttaataat aaagccacgg	2460
[0535]	tgtgttcagg taaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	2520
[0536]	aaaaaaaaa aaaa	2534