



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104411336 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 11

(21) 申请号 201380034143. 8

G01N 33/53(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 06. 18

(30) 优先权数据

61/665, 361 2012. 06. 28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 12. 26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2013/055008 2013. 06. 18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/001967 EN 2014. 01. 03

(71) 申请人 辉瑞公司

地址 美国纽约

(72) 发明人 J·P·加德纳二世 V·Y·王

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 左路

(51) Int. Cl.

A61K 47/48(2006. 01)

C07K 16/44(2006. 01)

权利要求书7页 说明书33页

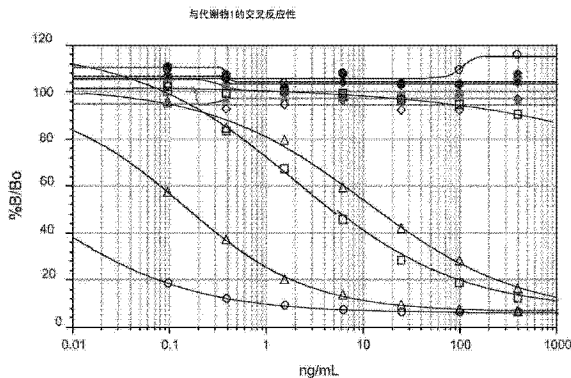
序列表12页 附图5页

(54) 发明名称

抗托法替尼抗体及其用于药物监测的用途

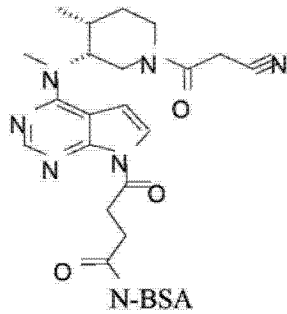
(57) 摘要

本发明提供选择性托法替尼抗体,可用作免疫原性分子以产生特异于托法替尼的抗体的免疫原性托法替尼缀合物,以及测量样品中托法替尼浓度的方法,产生所述抗体的方法和使用所述抗体的测定和试剂盒。



1. 一种免疫原性托法替尼缀合物,其包含与免疫原性载体结合的托法替尼,其中所述免疫原性载体是选自匙孔帽贝血蓝蛋白和牛血清白蛋白的蛋白质,进一步,其中

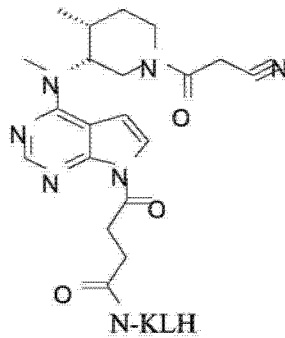
(a) 所述免疫原性托法替尼缀合物具有如下结构



式 V

其中 BSA 是牛血清白蛋白 ;或者

(b) 所述免疫原性托法替尼缀合物具有如下结构 :



式 VI

其中 KLH 是匙孔帽贝血蓝蛋白。

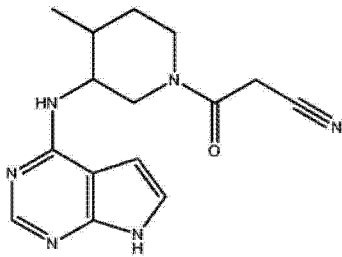
2. 评估样品中托法替尼浓度的方法,所述方法包括 :

(a) 提供疑似含有托法替尼的样品 ;

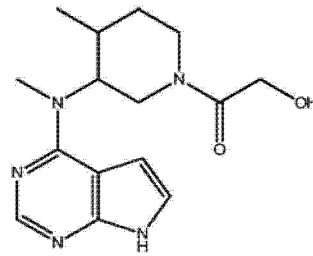
(b) 将所述样品或样品提取物与特异于托法替尼的抗体在适于抗体与托法替尼结合的条件下接触以形成测定混合物 ;及

(c) 检测所述抗体与托法替尼的结合。

3. 分离的抗体,其对于托法替尼的结合亲和性高于其对于式 II 的托法替尼代谢物 1 及式 III 的托法替尼代谢物 2 的结合亲和性



式 II



式 III。

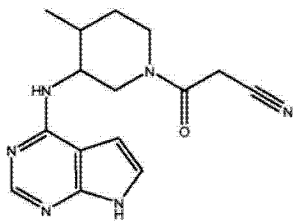
4. 权利要求 3 的分离的抗体,其中所述抗体对于托法替尼的结合亲和性是所述抗体对于代谢物 1 或代谢物 2 的结合亲和性的 25、30、40 或 50 倍。

5. 权利要求 4 的分离的抗体,其中所述抗体是使用免疫原性托法替尼缀合化合物获得的,所述化合物包含与免疫原性载体结合的托法替尼。

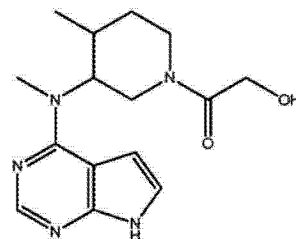
6. 确定样品中托法替尼的量的方法,所述方法包括:

- (a) 提供已知量的标记的竞争物,其包含与可检测标记结合的托法替尼;
- (b) 提供选择性抗托法替尼抗体;
- (c) 组合所述样品、所述选择性抗托法替尼抗体及所述标记的竞争物,其中所述样品中的托法替尼与所述标记的竞争物竞争结合选择性抗托法替尼抗体;及
- (d) 通过检测所述标记测量未与抗体结合的标记的竞争物的量而确定样品中托法替尼的量。

7. 权利要求 6 的方法,其中所述选择性抗托法替尼抗体对于托法替尼的结合亲和性和性高于所述抗体对于式 II 的托法替尼代谢物 1 和 / 或式 III 的托法替尼代谢物 2 的结合亲和性和性

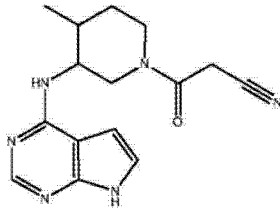


式 II

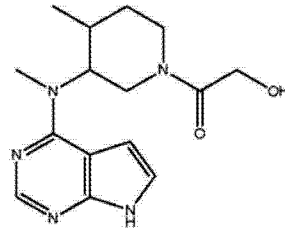


式 III。

8. 权利要求 7 的方法,其中所述抗体对于托法替尼的结合亲和性和性高于所述抗体对于式 II 的托法替尼代谢物 1 和式 III 的托法替尼代谢物 2 的结合亲和性和性



式 II



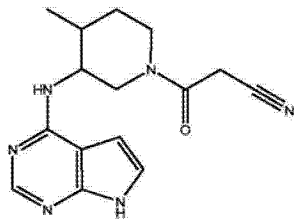
式 III。

9. 确定样品中托法替尼的量的试剂盒,所述试剂盒包含:

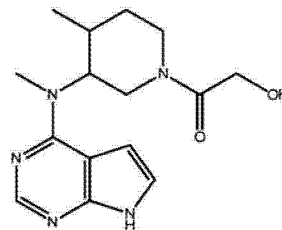
标记的竞争物,其包含与可检测标记结合的托法替尼;及至少一种选择性抗托法替尼抗体;

其中所述标记的竞争物与样品中的托法替尼竞争结合所述抗托法替尼抗体。

10. 权利要求 9 的试剂盒,其中所述选择性抗托法替尼抗体对于托法替尼的结合亲和性高于所述抗体对于选自式 II 的托法替尼代谢物 1 和式 III 的托法替尼代谢物 2 的至少一种托法替尼代谢物的结合亲和性

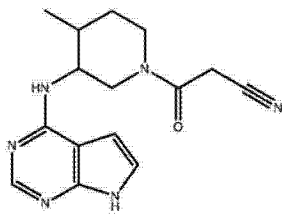


式 II

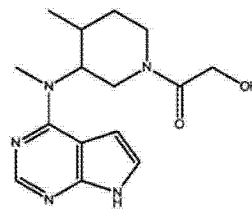


式 III。

11. 权利要求 10 的试剂盒,其中所述抗体对于托法替尼的结合亲和性高于与所述抗体对于式 II 的托法替尼代谢物 1 及对于式 III 的托法替尼代谢物 2 的结合亲和性



式 II



式 III。

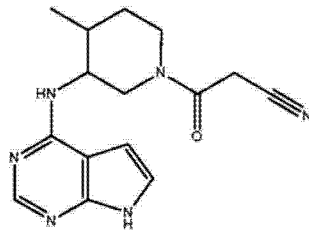
12. 用于确定样品中托法替尼浓度的竞争性免疫测定试剂盒,所述竞争性免疫测定包含:

- (a) 至少一种选择性抗托法替尼抗体;
- (b) 与可检测标记缀合的托法替尼化合物,

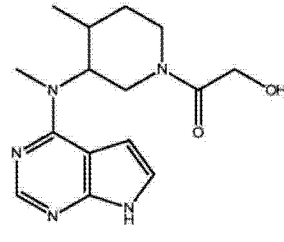
其中所述缀合的托法替尼化合物与样品中托法替尼竞争结合所述抗体;及

其中当样品中托法替尼以治疗性药物监测浓度存在时,所述标记提供表示样品中托法替尼浓度的信号。

13. 权利要求 12 的试剂盒,其中所述抗体对于托法替尼的结合亲和性高于所述抗体对于式 II 的托法替尼代谢物 1 及式 III 的托法替尼代谢物 2 的结合亲和性

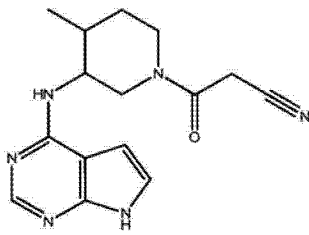


式 II

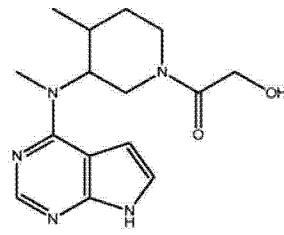


式 III。

14. 分离的抗体,其结合托法替尼但是基本上不结合选自式 II 的托法替尼代谢物 1 和式 III 的托法替尼代谢物 2 的至少一种托法替尼代谢物

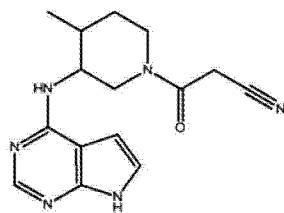


式 II

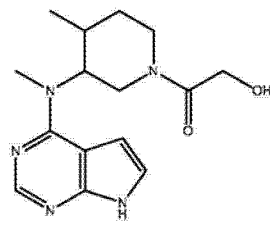


式 III。

15. 权利要求 14 的分离的抗体,其中所述抗体基本上不结合式 II 的托法替尼代谢物 1 和式 III 的托法替尼代谢物 2



式 II



式 III。

16. 权利要求 3 的抗体,其中所述抗体可检测样品中的托法替尼,但是基本上不能检测样品中的托法替尼代谢物,其中托法替尼的量范围为大约 5ng/mL-1215ng/mL、大约 5ng/mL-405ng/mL 或者大约 15ng/mL-1215ng/mL。

17. 一种分离的抗体,其对于托法替尼的结合亲和性高于其对于选自式 II 的托法替尼代谢物 1 和式 III 的托法替尼代谢物 2 的至少一种托法替尼代谢物的结合亲和性,所述抗体包含重链可变结构域和轻链可变结构域,其中重链可变结构域包含三个互补决定区 (HCDR1、HCDR2 和 HCDR3),选自:

(a)HCDR1,其包含选自 SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:30 和 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列;

(b)HCDR2,其包含选自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:31 和 SEQ ID NO:38 的氨基酸序列;

(c)HCDR3,其包含选自 SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:32 和 SEQ ID NO:39 的氨基酸序列;

并且其中所述轻链可变结构域包含三个 CDR(LCDR1、LCDR2 和 LCDR3),选自:

(d)LCDR1,其包含选自 SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:33 和 SEQ ID NO:34 的氨基酸序列;

(e)LCDR2,其包含选自 SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:28 和 SEQ ID NO:35 的氨基酸序列;及

(f)LCDR3,其包含选自 SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:29 和 SEQ ID NO:34 的氨基酸序列。

18. 权利要求 17 的抗体,其中所述抗体包含:

(a)HCDR1,其包含 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列;HCDR2,其包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列;HCDR3,其包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列;及进一步包含 LCDR1,其包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列;LCDR2,其包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列;及 LCDR3,其包含 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列;

(b)HCDR1,其包含 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列;HCDR2,其包含 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列;HCDR3,其包含 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列;及进一步包含 LCDR1,其包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列;LCDR2,其包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列;及 LCDR3,其包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列;

(c)HCDR1,其包含 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列;HCDR2,其包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列;HCDR3,其包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列;及进一步包含 LCDR1,其包含 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列;LCDR2,其包含 SEQ ID NO:28 的氨基酸序列;及 LCDR3,其包含 SEQ ID NO:29 的氨基酸序列;

(d)HCDR1,其包含 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列;HCDR2,其包含 SEQ ID NO:31 的氨基酸序列;HCDR3,其包含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列;及进一步包含 LCDR1,其包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列;LCDR2,其包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列;及 LCDR3,其包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列;

(e)HCDR1,其包含 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列;HCDR2,其包含 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列;HCDR3,其包含 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列;及进一步包含 LCDR1,其包含 SEQ ID NO:33 的氨基酸序列;LCDR2,其包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列;及 LCDR3,其包含 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列;

(f)HCDR1,其包含 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列;HCDR2,其包含 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列;HCDR3,其包含 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列;及进一步包含 LCDR1,其包含 SEQ ID NO:34 的氨基酸序列;LCDR2,其包含 SEQ ID NO:35 的氨基酸序列;及 LCDR3,其包含 SEQ ID NO:36 的氨基酸序列;

(g)HCDR1,其包含 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列;HCDR2,其包含 SEQ ID NO:38 的氨基酸序列;HCDR3,其包含 SEQ ID NO:39 的氨基酸序列;及进一步包含 LCDR1,其包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列;LCDR2,其包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列;及 LCDR3,其包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列;

(h) 重链可变结构域,其包含选自 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列,及进一步包含轻链可变结构域,其包含选自 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID

NO:11 的氨基酸序列；

(i) 重链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列；及轻链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列；

(j) 重链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列；及轻链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列；

(k) 重链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列；及轻链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列；

(l) 重链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列；及轻链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列；

(m) 重链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列；及轻链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列；

(n) 重链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列；及轻链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列；

(o) 重链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列；及轻链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列；

(p) 重链可变结构域,其包含选自 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列；及轻链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列；及

(q) 重链可变结构域,其包含选自 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列；及轻链可变结构域,其包含选自 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列。

19. 权利要求 15 的抗体,其中所述抗体选自：

(a) 包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3,且进一步包含 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3 的抗体,所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列,所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO:31 的氨基酸序列,所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列,所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列,所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列,所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列；

(b) 包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3,且进一步包含 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3 的抗体,所述 HCDR1 其包含 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列,所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO:38 的氨基酸序列,所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO:39 的氨基酸序列,所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列,所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列,所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列；

(c) 包含重链可变结构域,且进一步包含轻链可变结构域的抗体,所述重链可变结构域包含选自 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列,所述轻链可变结构域包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列；

(d) 包含重链可变结构域,且进一步包含轻链可变结构域的抗体,所述重链可变结构域包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列,所述轻链可变结构域包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列；及

(e) 包含重链可变结构域,且进一步包含轻链可变结构域的抗体,所述重链可变结构域包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列,所述轻链可变结构域包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列。

20. 权利要求 19(a) 的抗体,其中所述抗体能检测样品中浓度范围为大约 15ng/ml-1215ng/ml 的托法替尼。

21. 权利要求 19(b) 的抗体,其中所述抗体能检测样品中浓度范围为大约 5ng/

ml-405ng/ml 的托法替尼。

22. 权利要求 11 的试剂盒,其中所述试剂盒包含权利要求 19(a) 的抗体和权利要求 19(b) 的抗体,其中所述试剂盒可用于检测样品中浓度范围为大约 5ng/ml-1215ng/ml 的托法替尼。

23. 编码权利要求 18 的抗体的核酸。

24. 包含权利要求 23 的核酸的宿主细胞。

25. 产生权利要求 18 的抗体的方法,包括在产生所述抗体的条件下培养权利要求 24 的宿主细胞。

26. 权利要求 25 的方法,进一步包括分离所述抗体。

## 抗托法替尼抗体及其用于药物监测的用途

### 发明领域

[0001] 本发明涉及特异于托法替尼 (tofacitinib) 的抗体,其相对于两种已知代谢物选择性结合托法替尼。所述抗托法替尼抗体的选择性使其对于免疫测定特别有用。本发明进一步涉及包括特异于托法替尼的抗体的免疫测定或试剂盒。

[0002] 发明背景

[0003] 本发明涉及特异于托法替尼的抗体,其可用于例如监测血药水平的测定方法和测定试剂盒中。

[0004] 托法替尼是一种开发中的强力免疫抑制剂,用于治疗类风湿性关节炎 (RA)、银屑病、炎性肠病及其它免疫学疾病,以及用于预防器官移植排斥。托法替尼特异性抑制 Janus 激活的激酶 3 (JAK3),所述激酶在调控淋巴细胞存活、增殖、分化和凋亡的细胞因子信号转导中起关键作用。

[0005] 在某些情况中,当在人体中移植器官如肾、心脏、肺、骨髓和肝脏时,机体有时将排斥移植的组织。器官移植排斥的一种处理包括用免疫抑制药物如托法替尼以受控制的方式抑制免疫系统。免疫抑制药物要小心地给予移植接受体,以防止排斥外来(即非自身)组织。用免疫抑制药物的成功处理需要测量药物浓度,随后调整剂量使得效力最大化同时毒性最小化。因此,非常需要监测用托法替尼治疗的患者中托法替尼的血液水平以调节所述剂量。合适的剂量将维持足以达到药理学活性同时避免任何过分的副作用危险的最小药物活性水平。因此,作为开发托法替尼作为药物的部分,需要灵敏且可靠的测定以测量患者中托法替尼水平,所述测定在临床环境中可以快速及简便地进行。

[0006] 为了支持托法替尼在临床环境中的使用,特别是用于防止器官移植排斥,在许多患者中需要长期监测托法替尼的血浆水平以保证维持治疗水平,以及指导根据需要适时调整剂量。这种活动通常称作治疗性药物监测 (TDM)。TDM 在帮助临床医生维持免疫抑制药物在其各自的治疗范围内的血液和血浆水平中起关键作用。在限定的治疗范围之外的浓度变化可导致不利的临床结果。TDM 保证药物的浓度不会太高或太低,从而分别降低毒性或排斥的危险。免疫抑制药物的治疗性监测通常基于一些适于特定药物的测定和生物学液体(即全血、血浆)的选择。

[0007] 基于可靠的液态层析-质谱分析 (LC-MS/MS) 的测定可用于监测托法替尼的治疗水平。遗憾的是,在全国和全世界的大多数临床场所均未进行设置以在室内常规地进行 LC-MS/MS 测定。临床场所通常更喜欢相对快速、廉价及方便地进行测定以使其 TDM 工作简单化。因此,将免疫测定设定为检测患者血液、血清、血浆和/或其它生物学液体或样品中的托法替尼是有利的。因此,将基于托法替尼的免疫原用于产生抗托法替尼抗体是有利的。

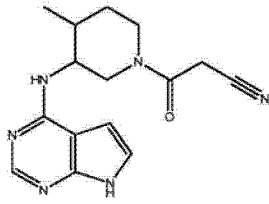
[0008] 进一步,结合托法替尼,但是基本上不结合至少一种托法替尼的代谢物的特异性抗托法替尼抗体是有利的。除了别的之外,这种抗体可用于检测来自经历治疗的患者的样品中托法替尼的临床相关浓度,其中给所述患者施用托法替尼。

[0009] 先前尚未报道识别托法替尼的单克隆抗体。在制备托法替尼的单克隆抗体中存在固有的困难,因为托法替尼不是免疫原性的并且是自身免疫抑制性的。此外,由于在文献

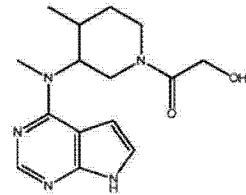


[0023] 本发明包括一种分离的抗体,其对于托法替尼的结合亲和性高于所述抗体对于式 II 的托法替尼代谢物 1 及式 III 的托法替尼代谢物 2 的结合亲和性

[0024]



式 II



式 III。

[0025] 一方面,所述分离的抗体对于托法替尼的结合亲和性是所述抗体对于托法替尼代谢物 1 或代谢物 2 的结合亲和性的 25、30、40 或 50 倍。

[0026] 另一方面,所述抗体是使用免疫原性托法替尼缀合化合物获得的,所述化合物包含与免疫原性载体结合的托法替尼。

[0027] 本发明包括一种确定样品中托法替尼的量的方法。所述方法包括:

[0028] 提供已知量的包含与可检测标记结合的托法替尼的标记的竞争物;

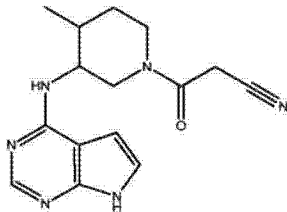
[0029] 提供选择性抗托法替尼抗体;

[0030] 组合所述样品、所述选择性抗托法替尼抗体及所述标记的竞争物,其中样品中的托法替尼与所述标记的竞争物竞争结合所述选择性抗托法替尼抗体;及

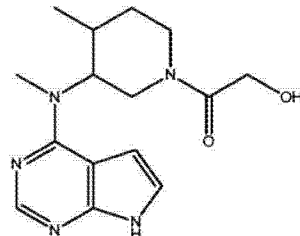
[0031] 通过检测所述标记测量未与抗体结合的标记的竞争物的量而确定样品中托法替尼的量。

[0032] 一方面,所述选择性抗托法替尼抗体对于托法替尼的结合亲和性高于其对于式 II 的托法替尼代谢物 1 和 / 或式 III 的托法替尼代谢物 2 的结合亲和性

[0033]



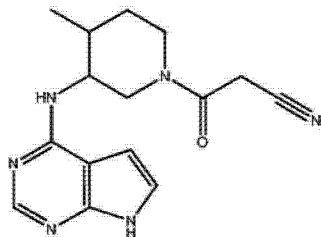
式 II



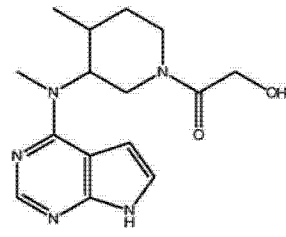
式 III。

[0034] 一方面,所述抗体对于托法替尼的结合亲和性高于其对于式 II 的托法替尼代谢物 1 和式 III 的托法替尼代谢物 2 的结合亲和性

[0035]



式 II



式 III。

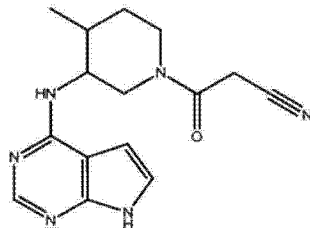
[0036] 本发明包括确定样品中托法替尼的量的试剂盒。

[0037] 所述试剂盒包含：

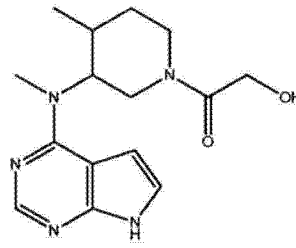
[0038] 标记的竞争物，其包含与可检测标记结合的托法替尼；及至少一种选择性抗托法替尼抗体；其中所述标记的竞争物与样品中的托法替尼竞争结合所述抗托法替尼抗体。

[0039] 一方面，所述选择性抗托法替尼抗体对于托法替尼的结合亲和性高于其对于选自式 II 的托法替尼代谢物 1 及式 III 的托法替尼代谢物 2 的至少一种托法替尼代谢物的结合亲和性

[0040]



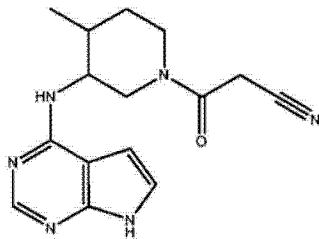
式 II



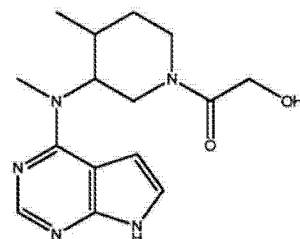
式 III。

[0041] 另一方面，所述抗体对于托法替尼的结合亲和性高于其对于式 II 的托法替尼代谢物 1 和式 III 的托法替尼代谢物 2 的结合亲和性

[0042]



式 II



式 III。

[0043] 另一方面，所述试剂盒可用于检测样品中浓度范围为大约 5ng/ml- 约 1215ng/ml 的托法替尼，及包含：

[0044] (a) 包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3，且进一步包含 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3 的抗体，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO:31 的氨基酸序列，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列，所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列；

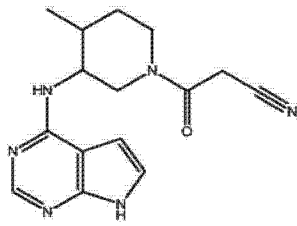
[0045] (b) 包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3，且进一步包含 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3 的抗体，所述 HCDR1 其包含包含 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO:38 的氨基酸序列，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO:39 的氨基酸序列，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列，所述 LCDR 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列。

[0046] 本发明包括一种确定样品中托法替尼浓度的竞争性免疫测定试剂盒。所述竞争性免疫测定包含：至少一种选择性抗托法替尼抗体；与可检测标记缀合的托法替尼化合物；其中所述缀合的托法替尼化合物与样品中托法替尼竞争结合所述抗体；及其中当样品中托

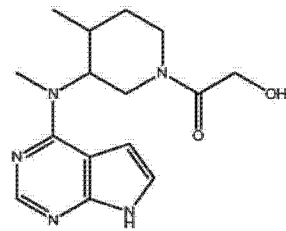
法替尼以治疗性药物监测浓度存在时,所述标记提供表示样品中托法替尼浓度的信号。

[0047] 一方面,所述抗体对于托法替尼的结合亲和性高于其对于式 II 的托法替尼代谢物 1 和式 III 的托法替尼代谢物 2 的结合亲和性

[0048]



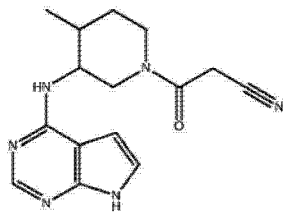
式 II



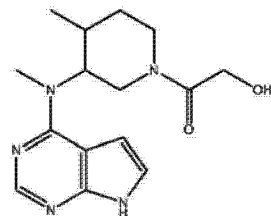
式 III。

[0049] 本发明包括分离的抗体,其结合托法替尼,但是基本上不结合选自式 II 的托法替尼代谢物 1 和式 III 的托法替尼代谢物 2 的至少一种托法替尼代谢物

[0050]



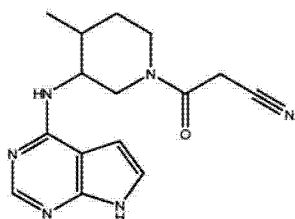
式 II



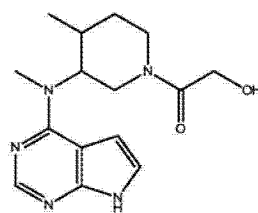
式 III。

[0051] 一方面,所述分离的抗体基本上不结合式 II 的托法替尼代谢物 1 和式 III 的托法替尼代谢物 2

[0052]



式 II



式 III。

[0053] 另一方面,所述抗体可检测样品中的托法替尼,但是基本上不能检测样品中的托法替尼代谢物,并且其中托法替尼的量的范围为大约 5ng/mL-1215ng/mL、大约 5ng/mL-405ng/mL 或者大约 15ng/mL-1215ng/mL。

[0054] 本发明包括分离的抗体,其对于托法替尼的结合亲和性高于其对于选自式 II 的托法替尼代谢物 1 和式 III 的托法替尼代谢物 2 的至少一种托法替尼代谢物的结合亲和性。所述抗体包含重链可变结构域和轻链可变结构域,其中所述重链可变结构域包含三个互补决定区 (HCDR1、HCDR2 和 HCDR3),选自:

[0055] (a)HCDR1,其包含选自 SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:30 和 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列;

[0056] (b)HCDR2,其包含选自SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:38的氨基酸序列;

[0057] (c)HCDR3,其包含选自SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:39的氨基酸序列;

[0058] 及其中所述轻链可变结构域包含三个CDR(LCDR1、LCDR2和LCDR3),选自:

[0059] (d)LCDR1,其包含选自SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34的氨基酸序列;

[0060] (e)LCDR2,其包含选自SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:35的氨基酸序列;及

[0061] (f)LCDR3,其包含选自SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:34的氨基酸序列。

[0062] 一方面,所述抗体包含:

[0063] (a)HCDR1,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;HCDR2,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;HCDR3,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;及进一步包含LCDR1,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;LCDR2,其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列;及LCDR3,其包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;

[0064] (b)HCDR1,其包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列;HCDR2,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列;HCDR3,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列;及进一步包含LCDR1,其包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列;LCDR2,其包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列;及LCDR3,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列;

[0065] (c)HCDR1,其包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列;HCDR2,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列;HCDR3,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列;及进一步包含LCDR1,其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列;LCDR2,其包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列;及LCDR3,其包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;

[0066] (d)HCDR1,其包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列;HCDR2,其包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列;HCDR3,其包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列;及进一步包含LCDR1,其包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列;LCDR2,其包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列;及LCDR3,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列;

[0067] (e)HCDR1,其包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列;HCDR2,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列;HCDR3,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列;及进一步包含LCDR1,其包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列;LCDR2,其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列;及LCDR3,其包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;

[0068] (f)HCDR1,其包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列;HCDR2,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列;HCDR3,其包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列;及进一步包含LCDR1,其包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列;LCDR2,其包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列;及LCDR3,其包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列;

[0069] (g)HCDR1,其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列;HCDR2,其包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列;HCDR3,其包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列;及进一步包含LCDR1,其包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列;LCDR2,其包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列;及LCDR3,其包含SEQ ID

NO:24 的氨基酸序列；

[0070] (h) 重链可变结构域,其包含选自 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列；及进一步包含轻链可变结构域,其包含选自 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列；

[0071] (i) 重链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列；及轻链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列；

[0072] (j) 重链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列；及轻链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列；

[0073] (k) 重链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列；及轻链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列；

[0074] (l) 重链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列；及轻链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列；

[0075] (m) 重链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列；及轻链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列；

[0076] (n) 重链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列；及轻链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列；

[0077] (o) 重链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列；及轻链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列；

[0078] (p) 重链可变结构域,其包含选自 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列；及轻链可变结构域,其包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列；及

[0079] (q) 重链可变结构域,其包含选自 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列；及轻链可变结构域,其包含选自 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列。

[0080] 另一方面,所述抗体选自：

[0081] (a) 包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3,且进一步包含 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3 的抗体,所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列,所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO:31 的氨基酸序列,所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列,所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列,所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列,所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列；

[0082] (b) 包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3,且进一步包含 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3 的抗体,所述 HCDR1 其包含 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列,所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO:38 的氨基酸序列,所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO:39 的氨基酸序列,所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列,所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列,所述 LCDR 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列；

[0083] (c) 包含重链可变结构域,且进一步包含轻链可变结构域的抗体,所述重链可变结构域包含选自 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列,所述轻链可变结构域包含 SEQ ID NO:4 所示氨基酸序列；

[0084] (d) 包含重链可变结构域,且进一步包含轻链可变结构域的抗体,所述重链可变结

构域包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列,所述轻链可变结构域包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列;及

[0085] (e) 包含重链可变结构域,且进一步包含轻链可变结构域的抗体,所述重链可变结构域包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列,所述轻链可变结构域包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列。

[0086] 一方面,所述抗体能检测样品中浓度范围为大约 15ng/ml-1215ng/ml 的托法替尼。

[0087] 另一方面,所述抗体能检测样品中浓度范围为大约 5ng/ml-405ng/ml 的托法替尼。

[0088] 再一方面,本发明包括编码抗体的核酸,所述抗体包含:

[0089] (a)HCDR1,其包含 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列;HCDR2,其包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列;HCDR3,其包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列;及进一步包含 LCDR1,其包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列;LCDR2,其包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列;及 LCDR3,其包含 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列;

[0090] (b)HCDR1,其包含 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列;HCDR2,其包含 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列;HCDR3,其包含 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列;及进一步包含 LCDR1,其包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列;LCDR2,其包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列;及 LCDR3,其包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列;

[0091] (c)HCDR1,其包含 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列;HCDR2,其包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列;HCDR3,其包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列;及进一步包含 LCDR1,其包含 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列;LCDR2,其包含 SEQ ID NO:28 的氨基酸序列;及 LCDR3,其包含 SEQ ID NO:29 的氨基酸序列;

[0092] (d)HCDR1,其包含 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列;HCDR2,其包含 SEQ ID NO:31 的氨基酸序列;HCDR3,其包含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列;及进一步包含 LCDR1,其包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列;LCDR2,其包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列;及 LCDR3,其包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列;

[0093] (e)HCDR1,其包含 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列;HCDR2,其包含 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列;HCDR3,其包含 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列;及进一步包含 LCDR1,其包含 SEQ ID NO:33 的氨基酸序列;LCDR2,其包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列;及 LCDR3,其包含 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列;

[0094] (f)HCDR1,其包含 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列;HCDR2,其包含 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列;HCDR3,其包含 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列;及进一步包含 LCDR1,其包含 SEQ ID NO:34 的氨基酸序列;LCDR2,其包含 SEQ ID NO:35 的氨基酸序列;及 LCDR3,其包含 SEQ ID NO:36 的氨基酸序列;

[0095] (g)HCDR1,其包含 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列;HCDR2,其包含 SEQ ID NO:38 的氨基酸序列;HCDR3,其包含 SEQ ID NO:39 的氨基酸序列;及进一步包含 LCDR1,其包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列;LCDR2,其包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列;及 LCDR3,其包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列;

[0096] (h) 重链可变结构域,其包含选自 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ

ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列；及进一步包含轻链可变结构域，其包含选自 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列；

[0097] (i) 重链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列；及轻链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列；

[0098] (j) 重链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列；及轻链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列；

[0099] (k) 重链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列；及轻链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列；

[0100] (l) 重链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列；及轻链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列；

[0101] (m) 重链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列；及轻链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列；

[0102] (n) 重链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列；及轻链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列；

[0103] (o) 重链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列；及轻链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列；

[0104] (p) 重链可变结构域，其包含选自 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列；及轻链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列；及

[0105] (q) 重链可变结构域，其包含选自 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列；及轻链可变结构域，其包含选自 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列。

[0106] 一方面，本发明包括宿主细胞，所述细胞包含所述核酸。

[0107] 另一方面，本发明包括一种产生抗体的方法。所述方法包括在产生抗体的条件下培养所述宿主细胞。在进一步的方面，所述方法包括分离所述抗体。

#### [0108] 附图简述

[0109] 公开的主题在此说明书完结处的权利要求书中特别指出和明确要求。公开的实施方案的前述及其它目的、特征和优势从如下结合附图的详细描述来看是明显的，其中：

[0110] 图 1 示出通过固相 ELISA 确定的血清抗体与实施例 2 的托法替尼-BSA 缀合物的结合。

[0111] 图 2 示出通过 ELISA 确定的所选择的抗托法替尼抗体与生物素化的托法替尼的结合。

[0112] 图 3 示出通过 ELISA 确定的所选择的抗托法替尼抗体与代谢物 1 的交叉反应性。

[0113] 图 4 示出通过 ELISA 确定的本发明所选择的单克隆抗体的最佳稀释范围。

[0114] 图 5 示出通过 ELISA 确定的本发明所选择的单克隆抗体的最佳稀释范围。

#### [0115] 发明详述

[0116] 本发明提供包含与免疫原性载体结合的托法替尼的新的免疫原性托法替尼缀合物，以及标记的托法替尼竞争物。本发明还涉及使用所述免疫原性托法替尼缀合物产生的多克隆和单克隆抗体。

[0117] 本发明还提供特异于托法替尼的多克隆和单克隆抗体。在一些实施方案中,本发明的抗体是应答接种新的免疫原性托法替尼缀合物而产生的,所述缀合物包含与免疫原性载体连接的托法替尼。

[0118] 这些抗体、缀合物和竞争物可用于检测生物学液体中托法替尼的免疫测定中。包含这些抗体、缀合物和竞争物的测定试剂盒很适合于在临床中使用,及提供比先前可能的结果更精确和可再现的结果。所述抗体也可用于托法替尼的纯化和分离中。

[0119] 术语“抗体”在本文包括完整抗体及其任何抗原片段(即抗原结合部分)或单链。“抗体”是指包含通过二硫键互相连接的至少两个重(H)链和两个轻(L)链的糖蛋白,或者其抗原结合部分。“抗体”也是指 IgA、IgD、IgE、IgG、IgM 抗体亚型。每个重链包含重链可变区(在本文缩写为  $V_H$ )和重链恒定区( $C_H$ )。所述重链恒定区通常包含三个结构域: $C_{H1}$ 、 $C_{H2}$ 和 $C_{H3}$ 。每个轻链包含轻链可变区(在本文缩写为  $V_L$ )和轻链恒定区。所述轻链恒定区包含一个结构域  $C_L$ 。所述  $V_H$ 和 $V_L$ 区可进一步再分为超变区,称作互补决定区(CDR),由称作框架区(FR)的较保守的区域间隔。每个  $V_H$ 和 $V_L$ 均由三个 CDR 和四个 FR 组成,从氨基末端至羧基末端以如下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合。

[0120] 可变结构域的“CDR”是可变区内的氨基酸残基,其根据 Kabat、Chothia 的定义、Kabat 和 Chothia 的积累、AbM、接触(contact)和/或构象定义或者本领域熟知的任何 CDR 确定方法而鉴定。抗体 CDR 可以鉴定为最初由 Kabat 等定义的超变区。见例如 Kabat et al., 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D. C. CDR 的位置也可以鉴定为最初由 Chothia 和其他人描述的结构环(structural loop)结构。见例如 Chothia et al., 1989, Nature 342:877-883。CDR 鉴定的其它方法包括“IMGT 定义”(Lefranc, M.-P. et al., 1999, Nucleic Acids Res. 27:209-212), 及“AbM 定义”, 其是在 Kabat 与 Chothia 之间的折中, 使用 Oxford Molecular's AbM 抗体建模软件(现在的 **Accelrys**<sup>®</sup>) 得到, 或者基于观测的抗原接触的 CDR 的“接触定义”, 如 MacCallum et al., 1996, J. Mol. Biol. 262:732-745 所述。在本文称作 CDR “构象定义”的另一种方法中, CDR 的位置可以鉴定为对抗原结合做出热焓(enthalpic)贡献的残基。见例如 Makabe et al., 2008, J. Biol. Chem. 283:1156-1166。其它的 CDR 边界定义可以不严格遵循上述方法之一, 但是与 Kabat CDR 至少部分重叠, 尽管其根据特定的残基或残基组或者甚至整个 CDR 不明显影响抗原结合的预测或实验发现而可以缩短或延长。如本文所用, CDR 可以是指通过本领域已知的任何方法包括方法的组合所定义的 CDR。本文使用的方法可利用根据任何这些方法定义的 CDR。对于含有多于一个 CDR 的任何给定的实施方案, CDR 可以根据任何 Kabat、Chothia、扩展的、AbM、接触和/或构象定义而限定。

[0121] 如本文所用, 术语抗体的“抗原结合部分”或者“抗原结合片段”(或者简单称作“抗体部分”)是指抗体的一或多个片段, 其保留特异性结合抗原(例如托法替尼)的能力。已经示出抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段进行。涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”内的结合片段的实例包括 (i) Fab 片段, 由  $V_L$ 、 $V_H$ 、 $C_L$  和  $C_H1$  结构域组成的单价片段; (ii) F(ab')<sub>2</sub> 片段, 包含在铰链区通过二硫键连接的两个 Fab 片段的二价片段; (iii) 由  $V_H$  和  $C_H1$  结构域组成的 Fd 片段; (iv) 由抗体单臂的  $V_L$  和  $V_H$  结构域组成的 Fv 片段; 及 (v) dAb

片段 (Ward et al., 1989, Nature 341:544-546), 其由一个  $V_H$  结构域组成; 以及 (vi) 分离的互补决定区。此外, 尽管 Fv 片段的两个结构域  $V_L$  和  $V_H$  是由单独的基因编码, 但是其可以使用重组方法通过合成的接头连接, 使其作为单一蛋白质链而产生, 其中  $V_L$  和  $V_H$  区配对形成单价分子 (称作单链 Fv(scFv); 见例如 Bird et al., 1988, Science 242:423-426 及 Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。这种单链抗体也涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”内。这些抗体片段是使用本领域技术人员已知的常规技术获得的, 以与完整抗体相同的方式筛选所述片段的效用。

[0122] 如本文所用, “分离的抗体”是指基本上没有具有不同抗原特异性的其它抗体的抗体 (例如特异性结合托法替尼的分离的抗体基本上没有特异性结合除了托法替尼之外的抗原的抗体)。此外, 分离的抗体可以基本上没有其它细胞材料和 / 或化学品。

[0123] 如本文所用, 术语“单克隆抗体”或者“单克隆抗体组合物”是指单一分子成分的抗体分子的制备物。单克隆抗体组合物展示对于特定表位的单一结合特异性和亲和性。

[0124] 如本文所用, 术语“重组抗体”包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有抗体, 如 (a) 自被转化以表达所述抗体的宿主细胞分离的抗体, (b) 自重组的组合的抗体文库分离的抗体, 及 (c) 通过任何其它方式包括将免疫球蛋白基因序列与其它 DNA 序列剪接而制备、表达、产生或分离的抗体。这种重组抗体包含可变区, 其中框架区和 CDR 区源自小鼠种系免疫球蛋白序列。然而, 在某些实施方案中, 可以对这种重组小鼠抗体进行体外诱变 (或者, 当使用用人 Ig 序列转基因的动物时, 进行体内体细胞诱变), 因此, 所述重组抗体的  $V_H$  和  $V_L$  区的氨基酸序列虽然是源自小鼠种系  $V_H$  和  $V_L$  序列并与小鼠种系  $V_H$  和  $V_L$  序列关联, 但是在体内可以不天然存在于小鼠抗体种系库内。

[0125] 如本文所用, “同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类别 (例如 IgM 或 IgG)。

[0126] 短语“识别抗原的抗体”和“特异于抗原的抗体”在本文可以与术语“特异性结合抗原的抗体”互换使用。

[0127] 术语“抗体衍生物”是指抗体的任何修饰的形式, 例如抗体与另一药物或抗体的缀合物。

[0128] 术语“人源化抗体”是指其中源自非人物种种系如小鼠的 CDR 序列已经被移植在人框架序列上的抗体。另外的框架区修饰可以在人框架序列内进行。

[0129] 术语“嵌合抗体”是指其中可变区序列源自一种物种、恒定区序列源自另一物种的抗体, 如其中可变区序列源自小鼠抗体及恒定区序列源自人抗体的抗体。嵌合抗体也可以包括 V 结构域和 C 结构域各来自两个不同来源的抗体, 即使所述不同来源都来自相同物种。

[0130] 如本文所用, “特异性结合托法替尼”的抗体或者“选择性托法替尼抗体”是指结合托法替尼但是基本上不结合托法替尼代谢物的抗体。抗体特异性结合托法替尼, 其中其不可检测地结合式 II 的托法替尼代谢物 1 和 / 或式 III 的托法替尼代谢物 2, 或者以更程度结合这种代谢物。例如, 如通过例如竞争性结合测定所测量的, 所述代谢物基本上不与托法替尼竞争结合所述抗体。选择性托法替尼抗体对于托法替尼的结合亲和性是其对于式 II 的代谢物 1 或者式 III 的代谢物 2 的结合亲和性的 5、10、15、25、30、40 或 50 倍。

[0131] 如本文所用, 术语“对象”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物, 例如哺乳动物和非哺乳动物, 如非人灵长目动物、绵羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

[0132] 在如下段落 (subsection) 中进一步详细描述本发明的各个方面。

[0133] 抗体的“可变区”是指单独或组合的抗体轻链的可变区或者抗体重链的可变区。正如本领域所已知,重链和轻链的可变区各由四个通过三个也称作超变区的互补决定区(CDR)连接的框架区(FR)组成,有助于抗体的抗原结合位点形成。如果需要对象可变区的变体,特别是具有 CDR 区域之外(即在框架区内)的氨基酸取代,可以通过对比对象可变区与其它抗体的可变区鉴定合适的氨基酸取代,优选保守氨基酸取代,所述其它抗体可变区含有与对象可变区相同标准类别的 CDR1 和 CDR2 序列(Chothia and Lesk, J Mol Biol 196(4):901-917, 1987)。当选择 FR 位于对象 CDR 侧面时,例如当人源化或最佳化抗体时,优选来自含有相同标准类别的 CDR1 和 CDR2 的抗体的 FR。

[0134] 可变结构域的“CDR”是在可变区内的氨基酸残基,其根据 Kabat、Chothia 的定义、Kabat 和 Chothia 二者的积累、AbM、接触、和 / 或构象定义或者本领域熟知的任何 CDR 确定方法鉴定。抗体 CDR 可以鉴定为最初由 Kabat 等定义的超变区,见例如 Kabat et al., 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C. CDR 的位置也可以鉴定为最初由 Chothia 等描述的结构环结构。见例如 Chothia et al., 1989, Nature 342:877-883。其他 CDR 鉴定方法包括“IMGT 定义”(Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res., 27, 209-212(1999))及“AbM 定义”,这是在 Kabat 与 Chothia 之间的折中,是使用 Oxford Molecular's AbM 抗体建模软件(现在的 **Accelrys**<sup>®</sup>)获得的,或者基于观测的抗原接触的 CDR “接触定义”,在 MacCallum et al., 1996, J. Mol. Biol., 262:732-745 中阐述。在本文称作 CDR 的“构象定义”的另一方法中, CDR 的位置可以鉴定为对抗原结合做出热焓贡献的残基。见例如 Makabe et al., 2008, Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166 所述。其它的 CDR 边界定义可不严格遵循上述方法之一,但是与 Kabat CDR 的至少部分有重叠,尽管其根据预测或实验性发现特定的残基或残基组或者甚至完整的 CDR 不明显影响抗原结合而可以缩短或延长。如本文所用, CDR 可以是指通过本领域已知的任何方法包括方法的组合定义的 CDR。本发明使用的方法可利用根据任何这些方法定义的 CDR。对于含有一个以上 CDR 的任何给定的实施方案,所述 CDR 可以根据任何 Kabat、Chothia、扩展的、AbM、接触和 / 或构象定义而定义。

[0135] 术语“单克隆抗体 (Mab)”是指源自单一拷贝或克隆的抗体,包括例如任何真核、原核或噬菌体克隆,不是通过产生所述抗体的方法。优选地,本发明的单克隆抗体存在于同源或基本同源的群体中。

[0136] 本发明的抗体可以使用本领域熟知的技术产生,例如重组技术、噬菌体展示技术、合成技术或者这些技术的组合,或者本领域已知的其它技术(见例如 Jayasena, S. D., 1999, Clin. Chem. 45:1628-1650 和 Fellouse et al., 2007, J. Mol. Biol., 373(4):924-940)。

[0137] 如本文使用,术语“特异性结合 (specific binding)”、“选择性结合 (selective binding)”、“选择性结合 (selectively binds)”或“特异性结合 (specifically binds)”是指以高于与非靶化合物的结合亲和性结合靶化合物或表位的能力。在说明性的实例中,特异性结合托法替尼的抗体对于托法替尼的结合亲和性高于其对于托法替尼代谢物如式 II 的代谢物 1 和式 III 的代谢物 2 的结合亲和性。在一些实施方案中,“特异性结合”或者“选择性结合”是指对于与靶化合物的结合亲和性是对于非靶化合物的结合亲和性的至少 5、

10、15、20、25、30、50、100、500、1000 或更多倍。

[0138] 术语“表位”是指分子的在一或多个抗体的抗原结合区能由抗体识别和结合的那部分。表位通常由化学活性的表面分子组 (surface grouping of molecules) 如氨基酸或糖侧链组成,并具有特异性三维结构特性以及特异性电荷特性。如本文所用,术语“抗原性表位”定义为多肽的部分,如通过本领域熟知的任何方法(例如通过常规的免疫测定)所确定的,所述部分可以与抗体特异性结合。“非线性表位”或者“构象表位”包含在特异于所述表位的抗体所结合的抗原性蛋白质内的不连续多肽(或者氨基酸)。

[0139] 如本文所用,术语“免疫原”和“免疫原性”是指在生物体内能产生或形成免疫应答的物质。免疫原也可以是抗原。通常地,免疫原具有相当高的分子量(例如大于 10,000),因此,各种大分子如蛋白质、脂蛋白、多糖、一些核酸和某些磷壁酸可以是免疫原。

[0140] “半抗原”是部分或不完全的抗原。其通常是无蛋白质的物质,大多数是低分子量的,其通常不能刺激抗体形成,但是与抗体反应。半抗原的抗体可以通过将半抗原与高分子量抗原性载体(例如免疫原)结合然后将该结合的产物即免疫原性缀合物注射进人或动物对象中而产生。例如,托法替尼是半抗原。

[0141] 如本文使用,术语“载体”或者“免疫原性载体”是指一种免疫原性物质,通常是蛋白质,其可以与半抗原连接,从而使得所述半抗原能够诱导免疫应答并引起与所述抗原(半抗原)特异性结合的抗体产生。载体物质包括蛋白质、糖蛋白、复合多糖、颗粒及核酸,其被识别为外来物,从而引起来自宿主的免疫应答。各种蛋白质均可以用作多肽免疫原性载体。这些蛋白质包括白蛋白和血清蛋白质,例如球蛋白、眼晶状体蛋白(ocular lens proteins)、脂蛋白等。举例的蛋白质包括牛血清白蛋白(BSA)、匙孔帽贝血蓝蛋白(KLH)、卵清蛋白、牛  $\gamma$ -球蛋白(BGG)等。或者,可以使用合成的多肽。所述免疫原性载体也可以是多糖,例如淀粉、糖原、纤维素、碳水化合物、树胶如阿拉伯树胶、琼脂等。所述多糖也可以含有多肽残基和/或脂质残基。所述免疫原性载体也可以是单独的或者与上述多肽或多糖之一缀合的多核苷酸。

[0142] 如本文所用,术语“免疫原性”是指分子诱导免疫应答的能力,这可以通过所注射的分子的固有化学结构及宿主动物的免疫系统是否识别所述化合物而确定。抗原结构中的微小改变可极大地改变化合物的免疫原性,已经广泛用作增加抗体、特别是针对十分保守的抗原的抗体的产生机会的常用方法。例如,这些修饰技术可改变免疫原的区域以提供更好的 T 细胞结合位点或者暴露新的表位以供 B 细胞结合。

[0143] 如本文使用,术语“标记”是指产生或者可以被诱导以产生可检测信号的任何分子。所述标记可以与待分析物、免疫原和/或抗体缀合。标记的非限制性实例包括放射性同位素、酶、酶片段、酶底物、酶抑制剂、辅酶、催化剂、荧光团、染料、化学发光剂、发光剂、增敏剂、非磁性或磁性颗粒、固体支持物、脂质体、配体、受体和半抗原放射性同位素。

[0144] 关于特异性抗体或标记的竞争物,术语“标记的”包括通过将可检测物质与抗体或标记的竞争物结合(例如物理连接)的直接标记,以及通过将所述抗体或标记的竞争物与标记的另一试剂结合的间接标记,而所述另一试剂在此则是直接标记的。间接标记的实例包括使用荧光素标记的二抗检测一抗。检测本发明抗原的体外技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、Western 印迹、免疫沉淀和免疫荧光。

[0145] 本文描述的抗体、标记的竞争物及潜在的治疗性化合物也适合与许多任何其它同

源和异源免疫测定和一系列检测系统一起使用。

[0146] 如本文所用,术语“抗原性化合物”是指用于产生免疫应答的化合物。例如,所述抗原性化合物是与免疫原性载体连接的半抗原,例如托法替尼。所述抗原性化合物用于产生希望的抗体。

[0147] 如本文使用,术语“标记的竞争物”是能特异性结合对托法替尼具有特异性的抗体的分子,其中所述分子与可检测标记或追踪剂连接。例如,所述分子是托法替尼或者其衍生物或分析物。

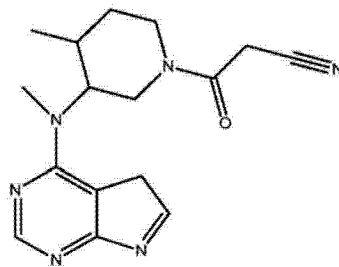
[0148] 术语“生物学样品”包括但不限于任何数量的分离自或源自活的对象或者先前是活的对象物质。该术语包括分离自对象的组织、细胞和生物学液体,以及在对象内存在的组织、细胞和生物学液体。对象包括但不限于鸡、人、小鼠、猴、大鼠、兔、马、骆驼及其它动物。这种物质包括但不限于血液、血浆、血清、精液、尿液、眼泪、唾液、细胞、器官、组织、骨、骨髓、淋巴、淋巴结、滑液组织或液体、软骨细胞、滑液巨噬细胞、内皮细胞和皮肤。

[0149] 一方面,本发明提供托法替尼的衍生物,其可用作免疫原性分子以产生用于测量托法替尼水平的特异于托法替尼的抗体。

[0150] 另一方面,本发明提供选择性检测样品中托法替尼的方法和试剂盒。

[0151] 托法替尼(式 I)是开发中的可口服的、JAK3 的强选择性抑制剂,用于治疗类风湿性关节炎(RA)及其它自身免疫失调,如炎性肠病、强直性脊柱炎、银屑病、银屑病关节炎,及防止移植排斥。

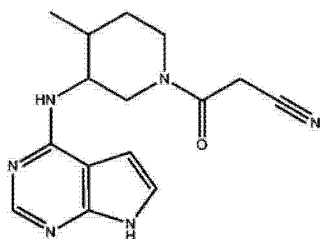
[0152]



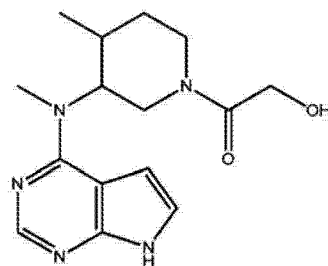
式 I

[0153] 托法替尼具有至少两种已知的代谢物,“代谢物 I(式 II)和代谢物 II(式 III)”。

[0154]



式 II



式 III

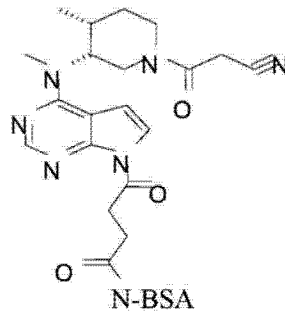
[0155] 难于进行免疫测定以检测小分子如托法替尼。在一些情况中,小分子缺少抗原性,使得难以产生针对其的抗体。这个挑战对于托法替尼是复杂的(compounded),因为其具有这种强力的免疫抑制性质。为了增加小分子的免疫原性,可以将较大的免疫原性化合物(包括但不限于牛血清白蛋白、卵清蛋白、匙孔帽贝血蓝蛋白等)与药物结合。样品中所述

药物的检测通常需要使用与抗体、托法替尼或托法替尼类似物缀合的可检测标记。

[0156] 在本发明之前,预料不到通过与免疫原性载体缀合可以使托法替尼更具免疫原性。因此,令人惊奇地,一方面,本发明提供免疫原性托法替尼缀合物,其包含与免疫原性载体结合的托法替尼,其中所述免疫原性载体是蛋白质、糖蛋白、复合多糖或者核酸,其由被免疫的动物识别为外来的,导致免疫应答。在一个说明性的实例中,所述免疫原性载体是选自匙孔帽贝血蓝蛋白(KLH)和牛血清白蛋白(BSA)的蛋白质。

[0157] 在一个实施方案中,本发明提供式 V 的免疫原性托法替尼缀合物,其具有如下结构:

[0158]

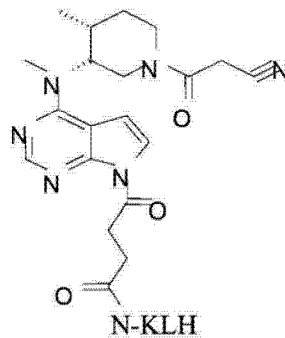


式 V

[0159] 其中 BSA 是牛血清白蛋白。

[0160] 在另一实施方案中,本发明提供式 VI 的免疫原性托法替尼缀合物,其具有如下结构:

[0161]



式 VI

[0162] 其中 KLH 是匙孔帽贝血蓝蛋白。

[0163] 本发明的免疫原性托法替尼缀合物可用于使用已知的抗体产生和筛选方法激发抗体。可以将所述免疫原性缀合物注射进合适的动物宿主中以刺激抗体的产生。可以收获如此产生的抗体,直接用于设置来检测托法替尼的免疫测定中。在一些情况中,需要有特异于托法替尼的单克隆抗体,相比于托法替尼代谢物,所述抗体选择性结合托法替尼。在一些实施方案中,所述抗体对于托法替尼的结合亲和性是所述抗体对于代谢物 1 或代谢物 2 的结合亲和性的大约 25、30、40 或 50 倍。在一些实施方案中,所述抗体结合代谢物 1 或代谢物 2 的亲和性与结合托法替尼的亲和性相比低大约 5%、4%、3%、2%、1% 或 0.5%。

[0164] 选择性抗托法替尼抗体

[0165] 本发明的抗体特征在于其特异性结合托法替尼（式 I），但是基本上不结合已知的托法替尼代谢物（即“式 II 的代谢物 1 和式 III 的代谢物 2”）的一或两者，以及产生及使用这些抗托法替尼抗体的方法。选择性托法替尼抗体结合托法替尼的亲合性是与式 II 的代谢物 1 或者式 III 的代谢物 2 的结合亲合性的 5、10、15、25、30、40 或 50 倍。

[0166] 评估所述抗体与托法替尼及其代谢物的结合亲合性的标准测定为本领域已知，包括例如 ELISA、Western 印迹、放射性免疫测定和流式细胞分析。合适的测定在实施例中详细描述。抗体的结合动力学（例如结合亲合性）可以通过本领域已知的标准测定评估，如通过 Biacore SPR 分析和 Octet 分析。

[0167] 本发明的抗体包括小鼠单克隆抗体 5A3、E5、10A6、C5、10F10、H5、6D9、A5、12H4、G2、16F10、E6 和 12D4、G6。5A3、E5、10A6、C5、10F10、H5、6D9、A5、12H4、G2、16F10、E6 和 12D4、G6 的  $V_H$  氨基酸序列在表 2 中示出，分别以 SEQ ID NO:1、3、5、7、8、10 和 12 表示。5A3、E5、10A6、C5、10F10、H5、6D9、A5、12H4、G2、16F10、E6 和 12D4、G6 的  $V_L$  氨基酸序列在表 2 中示出，分别以 SEQ ID NO:2、4、6、8、9、11 和 4 表示。

[0168] 所述  $V_H$  和  $V_L$  序列可以“混合和匹配”以产生本发明的其它选择性托法替尼结合分子。托法替尼与这种混合和匹配的抗体的结合以及所述抗体与代谢物 1 和 2 的一或两者的结合可以使用上述及实施例中描述的结合测定检测。任选地，当混合与匹配  $V_H$  和  $V_L$  链时，将来自特定  $V_H/V_L$  配对的  $V_H$  序列用结构相似的  $V_H$  序列置换。同样任选地，将来自特定  $V_H/V_L$  配对的  $V_L$  序列用结构相似的  $V_L$  序列置换。

[0169] 因此，一方面，本发明提供分离的单克隆抗体或者其抗原结合部分，包含：

[0170] (a) 重链可变结构域，其包含选自 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列；及进一步包含轻链可变结构域，其包含选自 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列；

[0171] (b) 重链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列；及轻链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列；

[0172] (c) 重链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列；及轻链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列；

[0173] (d) 重链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列；及轻链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列；

[0174] (e) 重链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列；及轻链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列；

[0175] (f) 重链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列；及轻链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列；

[0176] (g) 重链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列；及轻链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列；

[0177] (h) 重链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列；及轻链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列；

[0178] (i) 重链可变结构域，其包含选自 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列；及轻链可变结构域，其包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列；及

[0179] (j) 重链可变结构域,其包含选自 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列;及轻链可变结构域,其包含选自 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列。

[0180] 另一方面,本发明提供包含 5A3. E5、10A6. C5、10F10. H5、6D9. A5、12H4. G2、16F10. E6 和 12D4. G6 或者其组合的重链和 / 或轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的抗体。5A3. E5、10A6. C5、10F10. H5、6D9. A5、12H4. G2、16F10. E6 和 12D4. G6 的  $V_H$  CDR1 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:13、19、19、30、19、19 和 37 所示。5A3. E5、10A6. C5、10F10. H5、6D9. A5、12H4. G2、16F10. E6 和 12D4. G6 的  $V_H$  CDR2 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:14、20、25、31、20、20 和 38 所示。5A3. E5、10A6. C5、10F10. H5、6D9. A5、12H4. G2、16F10. E6 和 12D4. G6 的  $V_H$  CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:15、21、26、32、21、21 和 39 所示。5A3. E5、10A6. C5、10F10. H5、6D9. A5、12H4. G2、16F10. E6 和 12D4. G6 的  $V_L$  CDR1 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:16、22、27、22、33、34 和 22 所示。5A3. E5、10A6. C5、10F10. H5、6D9. A5、12H4. G2、16F10. E6 和 12D4. G6 的  $V_L$  CDR2 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:17、23、28、23、17、35 和 23 所示。5A3. E5、10A6. C5、10F10. H5、6D9. A5、12H4. G2、16F10. E6 和 12D4. G6 的  $V_L$  CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:18、24、29、24、18、36 和 24 所示。所述 CDR 区使用 Kabat 系统描述 (Kabat, E. A., et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242(1991))。

[0181] 抗体 5A3. E5 的重链和轻链 CDR 包含 SEQ ID NO:13、14、15、16、17、18。抗体 10A6. C5 的重链和轻链 CDR 包含 SEQ ID NO:19、20、21、22、23 和 24。抗体 10F10. H5 的重链和轻链 CDR 包含 SEQ ID NO:19、25、26、27、28 和 29。抗体 6D9. A5 的重链和轻链 CDR 包含 SEQ ID NO:30、31、32、22、23 和 24。抗体 12H4. G2 的重链和轻链 CDR 包含 SEQ ID NO:19、20、21、33、17 和 18。抗体 16F10. E6 的重链和轻链 CDR 包含 SEQ ID NO:19、20、21、34、35 和 36。抗体 12D4. G6 的重链和轻链 CDR 包含 SEQ ID NO:37、38、39、22、23 和 24。

[0182] 在再一个实施方案中,本发明的抗体包含重链和轻链可变区和 / 或重链和轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3,包含与先前描述的抗体的氨基酸序列同源的氨基酸序列,其中所述抗体保留本发明的选择性抗托法替尼抗体的希望的功能性质。

[0183] 在各种实施方案中,所述抗体可以是,例如,小鼠抗体、人源化抗体或者衍生自小鼠抗托法替尼抗体的嵌合抗体。在其它实施方案中,所述  $V_H$  和 / 或  $V_L$  氨基酸序列可以与上述序列 85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同源。如本文所用,两个氨基酸序列之间的百分比同源性等价于两个序列之间的百分比相同性。两个序列之间的百分比相同性是所述序列共有的相同位置数的函数,考虑缺口数和每个缺口的长度,需要引入所述缺口数和每个缺口的长度以进行两个序列最佳比对。

[0184] 在某些实施方案中,本发明的抗体包含重链和轻链可变区和 / 或重链和轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3,其中一或多个这些序列包含基于本文所述抗体的指定氨基酸序列或者其保守性修饰,及其中所述抗体保留本发明抗托法替尼抗体的希望的功能性质。

[0185] 在另外的实施方案中,所述抗体可以是,例如,小鼠抗体、人源化抗体或者嵌合抗体。

[0186] 如本文所用,术语“保守性序列修饰”是指不显著影响或改变含有所述氨基酸序列的抗体的结合特性的氨基酸修饰。这种保守性修饰包括氨基酸取代、添加和删除。可以通

过本领域已知的标准技术在本发明的抗体中导入修饰,如定点诱变和 PCR 介导的诱变等技术。保守性氨基酸取代是其中用具有相似侧链的氨基酸残基置换氨基酸残基的取代。在本领域中已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有无电荷极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、具有  $\beta$ -分支侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)以及具有芳香侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,本发明抗体的 CDR 区内的一或多个氨基酸残基可以用来自相同侧链家族的其他氨基酸残基置换,可以使用本发明所述功能测定测试改变的抗体的保留功能。

[0187] 在另一实施方案中,本发明提供结合托法替尼上与本发明抗托法替尼抗体相同表位的抗体(即具有与本发明抗体竞争结合托法替尼的能力的抗体)。在另外的实施方案中,进行竞争研究的参考抗体可以是单克隆抗体 5A3. E5、10A6. C5、10F10. H5、6D9. A5、12H4. G2、16F10. E6 和 12D4. G6。这种竞争抗体可以基于其在标准结合测定中与 5A3. E5、10A6. C5、10F10. H5、6D9. A5、12H4. G2、16F10. E6 或 12D4. G6 竞争结合托法替尼的能力而鉴定。例如, Biacore 分析、Octect 分析、ELISA 测定或者流式细胞计量术可用于证明与本发明抗体的交叉竞争。测试抗体抑制例如 5A3. E5、10A6. C5、10F10. H5、6D9. A5、12H4. G2、16F10. E6 或 12D4. G6 与托法替尼结合的能力表明所述测试抗体可与 5A3. E5、10A6. C5、10F10. H5、6D9. A5、12H4. G2、16F10. E6 和 12D4. G6 竞争结合托法替尼,并因此可以结合托法替尼上与 5A3. E5、10A6. C5、10F10. H5、6D9. A5、12H4. G2、16F10. E6、和 12D4. G6 结合的相同的表位,其中所述测试抗体基本上不结合代谢物 1 和 / 或代谢物 2。在进一步的实施方案中,与 5A3. E5、10A6. C5、10F10. H5、6D9. A5、12H4. G2、16F10. E6 和 12D4. G6 结合托法替尼上的相同表位的抗体是小鼠单克隆抗体。这种单克隆抗体可以如实施例所述或者通过本领域各种熟知的方法制备和分离。在其它实施方案中,与所述抗体竞争的抗体是人、人源化或小鼠抗体。

[0188] 本发明的抗体可以使用包含至少一个本发明公开的  $V_H$  和 / 或  $V_L$  序列的抗体作为起始材料工程化修饰的抗体而制备,所述修饰的抗体可具有与起始抗体不同的性质,但是其可与起始抗体结合相同或者基本相同的表位。抗体可以通过修饰一或两个可变区(即  $V_H$  和 / 或  $V_L$ ) 内的一或多个残基而被工程化,例如在一或多个 CDR 区内和 / 或一或多个框架区内。另外或二者选一,抗体可以通过修饰恒定区内的残基而被工程化,例如改变抗体的效应子功能。

[0189] 本发明提供编码本发明的托法替尼特异性抗体的核酸。编码本发明的抗体的核酸可以通过本领域已知的方法产生。正如本领域技术人员所理解的,由于核酸编码的简并性,许多核酸序列也可以编码本发明抗体的氨基酸序列。

[0190] 一种可以进行的可变区工程化是 CDR 移植。抗体主要通过位于六个重链和轻链互补决定区(CDR)中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。为此,在各个抗体之间 CDR 内的氨基酸序列比 CDR 外的序列更多样化。由于 CDR 序列与大多数抗体-抗原相互作用相关,因此可以通过构建表达载体表达模拟特定天然存在抗体的性质的重组抗体,所述表达载体包含移植到来自具有不同性质的不同抗体的框架序列上的来自特定天然存在抗体的 CDR 序列(见例如 Riechmann et al., 1998, Nature 332:323-327;

Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Queen et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86:10029-10033; 美国专利 No. 5, 225, 539, 5, 530, 101, 5, 585, 089, 5, 693, 762 和 6, 180, 370)。

[0191] 因此,本发明的另一实施方案涉及分离的单克隆抗体或者其抗原结合部分,其包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列,其分别包含选自 SEQ ID NO:13、19、30 和 37, SEQ ID NO:14、20、25、31 和 38 及 SEQ ID NO:15、21、26、32 和 39 的氨基酸序列,所述轻链可变区包含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列,其分别包含选自 SEQ ID NO:16、22、27、33 和 34, SEQ ID NO:17、23、28 和 35 及 SEQ ID NO:18、24、29 和 36 的氨基酸序列。这种抗体含有单克隆抗体 5A3. E5、10A6. C5、10F10. H5、6D9. A5、12H4. G2、16F10. E6 和 12D4. G6 的  $V_H$  和  $V_L$  CDR 序列,其可以含有与所述抗体不同的框架序列。这种框架序列可以得自公开的 DNA 数据库或者公开的参考文献,其包含种系抗体基因序列。

[0192] 另一种可变区修饰是使  $V_H$  和 / 或  $V_L$  CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 区内的氨基酸残基突变,从而改良感兴趣抗体的一或多种结合性质(例如亲和性)。可以进行定点诱变或者 PCR 介导的诱变以导入突变,对于感兴趣的抗体结合或者其它功能性质的影响可以在如本文所述及实施例中提供的体外或体内测定中评估。任选地,导入保守性修饰(如上文论述)。所述突变可以是氨基酸取代、添加或删除。此外,通常改变不超过 1、2、3、4 或 5 个 CDR 区内的残基。

[0193] 在再一个实施方案中,本发明提供包含重链可变区的分离的抗-磷酸化  $\tau$  蛋白(anti-phospho-tau)单克隆抗体或其抗原结合部分,所述重链可变区包含:

[0194] (a)  $V_H$  CDR1 区,其包含选自 SEQ ID NO:13、19、30 和 37 的氨基酸序列,或者与 SEQ ID NO:13、19、30 和 37 相比具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;(b)  $V_H$  CDR2 区,其包含选自 SEQ ID NO:14、20、25、31 和 38 的氨基酸序列,或者与 SEQ ID NO:14、20、25、31 和 38 相比具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;(c)  $V_H$  CDR3 区,其包含选自 SEQ ID NO:15、21、26、32 和 39 的氨基酸序列,或者与 SEQ ID NO:15、21、26、32 和 39 相比具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;(d)  $V_L$  CDR1 区,其包含选自 SEQ ID NO:16、22、27、33 和 34 的氨基酸序列,或者与 SEQ ID NO:16、22、27、33 和 34 相比具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;(e)  $V_L$  CDR2 区,其包含选自 SEQ ID NO:17、23、28 和 35 的氨基酸序列,或者与 SEQ ID NO:17、23、28 和 35 相比具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;及 (f)  $V_L$  CDR3 区,其具有选自 SEQ ID NO:18、24、29 和 36 的氨基酸序列,或者与 SEQ ID NO:18、24、29 和 36 相比具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列。

[0195] 本发明的工程化抗体包括其中对  $V_H$  和 / 或  $V_L$  内框架残基进行修饰,例如,以改良抗体的性质的那些抗体。典型地,进行这种框架修饰以降低所述抗体的免疫原性。例如,一种方法是将一或多个框架残基“回复突变”为相应的种系序列(也称作“种系化”)。更特别地,经历体细胞突变的抗体可含有与种系序列不同的框架残基,所述抗体源自所述种系序列。这种残基可以通过比较所述抗体框架序列与抗体自其中衍生的种系序列而鉴定,所述抗体源自所述种系序列。

[0196] 另一种框架修饰包括突变框架区内或者甚至一或多个 CDR 区内的一或多个残基,以除去 T 细胞表位,从而降低所述抗体的潜在免疫原性。这种方法也称作“去免疫化”,在美

国专利公开 No. 2003/0153043 中进一步详细描述。除了在框架区或 CDR 区内进行修饰之外或者可选地,还可以对本发明的抗体进行工程化以在 Fc 区内包括修饰,通常所述工程化改变所述抗体的一或多种功能性质,如血清半衰期、补体固定、Fc 受体结合和 / 或抗原依赖性细胞毒性。此外,本发明的抗体可以化学修饰(例如可以将一或多个化学部分附着于所述抗体)或者被修饰以改变其糖基化。

[0197] 本发明考虑的本文所述抗体的另一修饰是聚乙二醇化。抗体可以聚乙二醇化,例如,以增加抗体的生物学(例如血清)半衰期。为了使抗体聚乙二醇化,通常将所述抗体或其片段与聚合物反应,所述聚合物包括聚乙二醇(PEG),如 PEG 的反应性酯或醛衍生物,所述反应在使得一或多个 PEG 基团与所述抗体或抗体片段附着的条件下进行。或者,所述聚乙二醇化是通过与反应性 PEG 分子(或类似的反应性水溶性聚合物)的酰化或烷化反应而进行。如本文所用,术语“聚乙二醇”意在涵盖已经用于衍生其它蛋白质的 PEG 的任何形式,其,如单(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或者聚乙二醇-马来酰亚胺。在某些实施方案中,要聚乙二醇化的抗体是去糖基化抗体。聚乙二醇化蛋白质的方法为本领域已知,可用于本发明的抗体。

#### [0198] 工程化抗体的方法

[0199] 如上文所述,具有本文揭示的  $V_H$  和  $V_L$  序列的选择性抗托法替尼抗体可用于通过修饰  $V_H$  和 / 或  $V_L$  序列或者与其附着的恒定区而产生新的抗托法替尼抗体。因此,如上文所述,在本发明的另一方面中,本发明的抗托法替尼抗体的结构特征用于产生结构相关的抗托法替尼抗体,其保留本发明抗体的至少一种功能性质,如与托法替尼结合但是与代谢物 1 和 / 或代谢物 2 基本不结合。例如,5A3. E5、10A6. C5、10F10. H5、6D9. A5、12H4. G2、16F10. E6 和 / 或 12D4. G6 或其突变的一或多个 CDR 区可以与已知的框架区和 / 或前体 CDR 重组组合,以产生另外的重组工程化的抗托法替尼抗体。其它类型的修饰包括在前面章节中所述那些修饰。用于所述工程化方法的起始材料是本发明提供的一或多个  $V_H$  和 / 或  $V_L$  序列,或者其一或多个 CDR 区。为了产生工程化抗体,不必实际上制备(例如表达为蛋白质)具有本发明提供的一或多个  $V_H$  和 / 或  $V_L$  序列或者其一或多个 CDR 区的抗体。而是,使用所述序列中包含的信息作为起始材料产生衍生自原始序列的“第二代”序列,然后制备所述“第二代”序列并表达为蛋白质。

[0200] 标准分子生物学技术可用于制备和表达改变的抗体序列。

[0201] 任选地,由改变的抗体序列编码的抗体是保留本文所述抗托法替尼抗体的一种、一些或所有功能性质的抗体,所述功能性质包括但不限于:

[0202] (i) 基本上不结合式 II 的托法替尼代谢物 1 ;和 / 或

[0203] (ii) 基本上不结合式 III 的托法替尼代谢物 2。

[0204] 改变的抗体的功能性质可以使用在本领域可获得的和 / 或本文所述的标准测定以及本领域已知的或者未来发现的那些测定进行评估。

[0205] 在工程化本发明抗体的方法的某些实施方案中,可以沿着全部或部分抗托法替尼抗体编码序列随机或选择性导入突变,可以对所得修饰的抗托法替尼抗体根据如本文所述的结合活性和 / 或其它功能性质进行筛选。突变方法为本领域熟知。

#### [0206] 本发明单克隆抗体的产生

[0207] 本发明的单克隆抗体(mAb)可以通过各种技术产生,包括常规的单克隆抗体方

法。也可以制备本发明的小鼠、大鼠、兔、骆驼和人单克隆抗体,所述制备使用噬菌体展示方法筛选来自这些或许多其它物种的免疫球蛋白基因的文库。这种用于分离抗体的噬菌体展示方法在本领域中已经确立,涵盖从免疫的动物或人制备的噬菌体展示文库或者其中原始起始材料不是衍生自免疫动物的未免疫噬菌体展示文库。噬菌体展示为本领域熟知,且在例如美国专利 No. 5, 223, 409、WO 91/17271、WO92/20791 和 WO 92/15679 中描述。

[0208] 本发明的单克隆抗体也可以通过在合适条件下培养包含编码单克隆抗体的核酸的宿主细胞及回收所述抗体或其抗原结合片段而制备。这种宿主细胞培养方法为本领域熟知。

#### [0209] 使用方法

[0210] 本发明进一步提供评估样品中托法替尼的存在或浓度的方法,所述方法包括提供疑似含有托法替尼的样品;将所述样品或样品提取物与特异于托法替尼的抗体在适于所述抗体与托法替尼结合的条件下接触以形成测定混合物;及检测所述抗体与托法替尼的结合。

[0211] 在另一实施方案中,本发明提供确定样品中托法替尼浓度的方法。所述方法包括提供包含与可检测标记结合的托法替尼的标记的竞争物;提供结合托法替尼但是不结合代谢物 1 和 / 或 2 的选择性抗托法替尼抗体;将所述样品、选择性抗托法替尼抗体及标记的竞争物组合,其中样品中的托法替尼与标记的竞争物竞争结合选择性抗托法替尼抗体;通过检测所述标记测量与所述抗体未结合的标记的竞争物的量确定样品中托法替尼的浓度。在举例的实施方案中,检测不含有托法替尼的样品中标记的竞争物(托法替尼)的量,并将样品中所检测到的标记的量与在可能存在托法替尼的样品中存在的标记的量相比较。测量在不存在托法替尼条件下检测的标记的量与疑似含有托法替尼的样品中标记的量之间的差异。

[0212] 在另一实施方案中,本发明提供用于确定样品中是否存在托法替尼的竞争性免疫测定试剂盒。举例的竞争性免疫测定试剂盒如酶联免疫测定(ELISA)包含能特异性结合托法替尼的抗体,及与可检测的标记缀合的托法替尼化合物,其中缀合的托法替尼化合物被设定为与样品中的托法替尼竞争结合所述抗体,及其中当样品中的托法替尼以治疗性药物监测浓度存在时所述标记提供表示样品中托法替尼浓度的信号。

[0213] 在一个实施方案中,本发明提供用于确定样品中托法替尼以托法替尼的治疗性范围内的药物浓度存在的竞争性免疫测定。然而,应理解提供跨越更广泛范围的信息是有用的,并且所述免疫测定范围通常宽于治疗性范围。因此,监测治疗性药物浓度的免疫测定可提供跨越更宽范围托法替尼浓度的敏感性。一方面,所述竞争性免疫测定适于监测样品中以大约 0- 大约 1500ng/ml 范围浓度存在的托法替尼。另一方面,所述竞争性免疫测定适于监测样品中以大约 5- 大约 1215ng/ml 范围浓度存在的托法替尼。另一方面,所述竞争性免疫测定适于监测样品中以大约 5- 大约 500ng/ml 范围浓度存在的托法替尼。另一方面,所述竞争性免疫测定适于监测样品中以大约 5- 大约 405ng/ml 范围浓度存在的托法替尼。另一方面,所述竞争性免疫测定适于监测样品中以大约 15- 大约 1215ng/ml 范围浓度存在的托法替尼。

[0214] 在一个竞争性免疫测定中,标记的竞争物可以衍生自托法替尼,使用与免疫原性托法替尼缀合物相同或相似的连接。在一些竞争性免疫测定中,考虑到使所述标记的竞争

物在存在托法替尼的条件下更易于被置换,可取的是,使用以比托法替尼与所述抗托法替尼抗体低的特异性与抗托法替尼抗体的结合的标记的竞争物。

[0215] 本文描述的抗体、免疫原性托法替尼缀合物、标记的竞争物和 / 或其它缀合物也适于与许多任何其它同源和异源免疫测定和一系列检测系统一起使用。本发明的实施例不是限制性的。

[0216] 因此,本发明提供了托法替尼缀合物,其可用于制备免疫原和缀合物以用于检测托法替尼的免疫测定中。根据本发明,通过将托法替尼类似物与免疫原性载体物质结合,可以产生和分离多克隆或单克隆抗体,其是检测托法替尼的免疫测定的有用试剂。结合可以通过结合标记或载体的任何化学反应实现。

[0217] 举例的托法替尼免疫测定采用抗托法替尼抗体,其可以是多克隆或单克隆的。在举例的竞争性免疫测定中,所使用的抗体制备物是通过本文所述免疫原诱导的,是在水溶液如缓冲液等中配制的,或者在佐剂或相似组合物中提供。可以测试诱导的抗体以确定对于托法替尼特异性。

[0218] 本文所述的抗体和标记的竞争物也适于与许多任何其它同源和异源免疫测定和一系列检测系统一起使用。

#### [0219] 试剂盒

[0220] 本发明提供确定样品中托法替尼浓度的试剂盒,所述试剂盒包含至少一种选择性抗托法替尼抗体。一方面,所述试剂盒进一步包含标记的竞争物,所述竞争物包含与可检测标记结合的托法替尼。在另一实施方案中,所述标记的竞争物与样品中的托法替尼竞争结合抗托法替尼抗体。另一方面,选择性抗托法替尼抗体是使用免疫原性托法替尼缀合物产生的,所述缀合物包含与免疫原性载体结合的托法替尼。所述试剂盒也可以包含使用所述试剂盒的施药器 (applicator) 和 / 或指导材料。

[0221] 在另一实施方案中,本发明包括确定样品中托法替尼浓度的试剂盒,其中所述试剂盒包含至少一种选择性托法替尼抗体,其结合托法替尼但是基本上不结合选自式 II 的托法替尼代谢物 1 和式 III 的代谢物 2 的至少一种代谢物。一方面,所述试剂盒包含至少一种选择性托法替尼抗体,其结合托法替尼但是基本上不结合式 II 的托法替尼代谢物 1 及基本上不结合式 III 的托法替尼代谢物 2。一方面,所述试剂盒进一步包含施药器。另一方面,所述试剂盒包含使用该试剂盒的指导材料。

[0222] 一方面,所述试剂盒可检测 5ng/ml-1215ng/ml 范围的托法替尼浓度。另一方面,所述试剂盒可检测 5ng/ml-405ng/ml 范围的托法替尼浓度。再一方面,所述试剂盒可检测 15ng/ml-1215ng/ml 范围的托法替尼浓度。

[0223] 本发明通过如下实施例进一步例证,所述实施例不应被理解是进一步限制的。所有图和本申请全文所引用的所有参考文献、专利和公开的专利申请均明确并入本文作参考

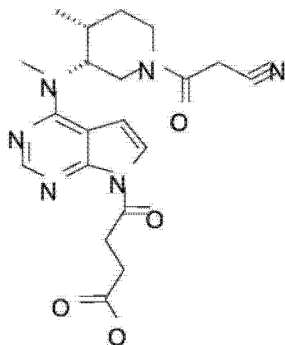
## 实施例

### [0224] 实施例 1:托法替尼与琥珀酸的缀合

[0225] 将 40mg 琥珀酸酐和 0.2ml TEA (50mM 三乙醇胺, 50mM KCl, 20mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.5) 加入到 47mg 的托法替尼溶于 0.8ml 乙腈中的溶液。将此反应混合物在 60°C 温度摇动 1 小时。在一小时,将另外的 50mg 琥珀酸酐加入反应混合物,随后在 60°C 摇动温育。在 HPLC 纯化之

后获得纯化材料,提供 25.2mg 式 IV 的托法替尼半琥珀酰中间物,所述 HPLC 纯化以 0-30% 乙腈 (ACNN) 的流动相梯度进行。

[0226]

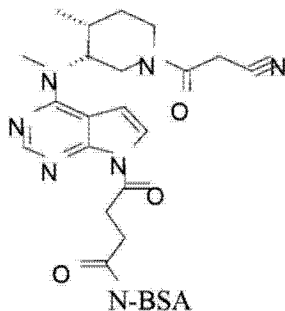


式 IV

[0227] 实施例 2:合成包含与 BSA 结合的托法替尼的免疫原性托法替尼缀合物

[0228] 将 1.5mg 式 IV 所示化合物溶解于 2ml 1-乙基-3-[3-二甲基氨基-丙基]碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 缀合缓冲液 (0.1M MES, 0.9M NaCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>, pH 4.7) 中。将 8mg BSA (Imject BSA, 得自 Pierce#77601) 溶解于 0.8ml 水中, 然后与式 IV 溶液混合。接着, 将 10mg EDC 溶解于 0.1ml H<sub>2</sub>O 中, 然后立即加入 BSA、式 IV 混合物中。将此混合物在室温轻轻摇动 2 小时。将混合物离心 (spun down), 通过脱盐纯化含有托法替尼-BSA 缀合物 (式 V) 的上清, 所述脱盐根据本领域技术人员已知的标准脱盐方法进行。通过基质辅助激光解吸附电离 (MALDI) 证实托法替尼与 BSA 的缀合。

[0229]

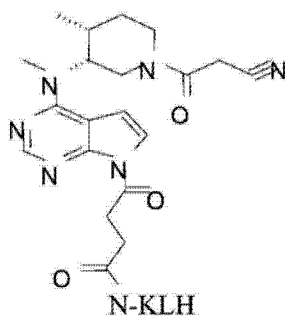


式 V

[0230] 实施例 3:合成包含与 BSA 结合的托法替尼的免疫原性托法替尼缀合物

[0231] 将 1.5mg 式 IV 的化合物溶解于 1.5ml EDC 缀合缓冲液中。将 10mg EDC 溶解于 0.2ml 水中, 并立即加入式 IV 溶液中。将式 IV/EDC 混合物加入 0.6ml 海洋生物 (Mariculture) 匙孔帽贝血蓝蛋白 (mcKLH, 得自 Pierce#77601) 溶液 (10mg/ml 水溶液)。将该反应混合物在室温轻轻摇动 2 小时。将混合物离心并通过脱盐纯化含有托法替尼-KLH 缀合物 (式 VI) 的上清, 所述脱盐根据本领域技术人员已知的标准脱盐方法。

[0232]



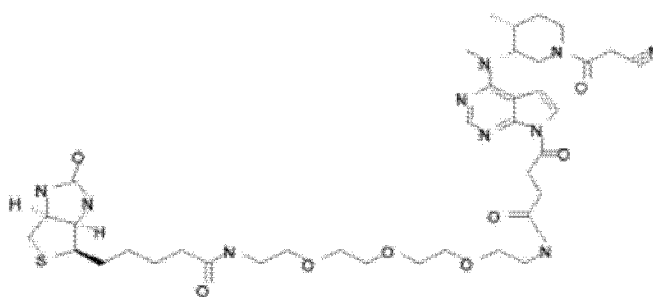
式 VI

[0233] 实施例 4:合成标记的托法替尼竞争物

[0234] 标记的托法替尼竞争物的一个实例是式 VII 的生物素化的托法替尼衍生物。式 VII 的生物素化的托法替尼衍生物如下所述产生。

[0235] 将 18mg 式 IV 的化合物和 20mg EDC 溶解于 1ml EDC 缀合缓冲液中。加入 0.1ml 乙腈以帮助溶解所述化合物。通过加入 10  $\mu$ l 5M NaOH 将溶液的 pH 调节为 5.5。然后,加入 23mg 胺-PEG3-生物素。将该混合物在室温摇动过夜。在温育过夜后,通过 HPLC 纯化生物素化的托法替尼(式 VII),提供 14mg 纯化的化合物,所述 HPLC 以 0-30% CAN 流动相梯度进行。

[0236]



式 VII

[0237] 实施例 5:产生抗托法替尼抗体

[0238] 多克隆和单克隆抗体通过使用常规技术产生,尤其是如 Kohler and Milstein, Nature 256:495-497 (1975) 所述进行。将三只雌性 Balb/C 小鼠用在完全弗氏佐剂中的实施例 3 的 100  $\mu$ g 免疫原性托法替尼-KLH 缀合物进行免疫,通过腹膜内注射(ip)施用。在初次注射后 10、20 和 30 天,通过腹膜内注射施用三剂随后的注射剂,所述注射剂包含 50  $\mu$ g/小鼠的不完全弗氏佐剂中的免疫原性托法替尼-KLH 缀合物。在第 37 天收集血清,并如下文所述,通过针对实施例 2 的免疫原性托法替尼-BSA 缀合物的固相 ELISA 确定与所述抗原反应的抗体的存在。

[0239] 固相 ELISA:将实施例 2 的免疫原性托法替尼-BSA 缀合物固定在微滴定平板的孔中。特别地,将微滴定平板用在包被缓冲液(0.2M 碳酸盐缓冲液(BuPH 碳酸盐-碳酸氢盐缓冲对(buffer pack), Pierce item#28382)中的 2-10  $\mu$ g/ml 托法替尼-BSA 缀合物在室温包被 1-2 小时或者在 4 $^{\circ}$ C 包被过夜,然后用封闭缓冲液(含有 1% (w/v) BSA 的 PBS) 在室温饱和 1 小时或者在 4 $^{\circ}$ C 饱和过夜,然后用洗涤缓冲液(含有 0.5% (v/v) Tween 20 的 PBS) 洗涤 3 次。将待筛选的抗体样品(即小鼠血清或者杂交瘤上清)在稀释剂(在 PBS 中

0.1% BSA 溶液) 中稀释。将稀释的抗体样品加入微滴定平板中, 并将平板在室温温育 1-2 小时。在用洗涤缓冲液洗去任何未结合的物质之后, 确定结合的抗托法替尼抗体的水平, 使用兔或山羊抗小鼠过氧化物酶缀合的二抗 (IgG 特异性的) 在推荐或经实验获得的在稀释剂中的稀释度 (通常为 1/1000-1/10,000) 进行。在室温温育 30 分钟及用洗涤缓冲液洗涤 3 次之后, 加入生色底物 OPD (o- 苯二胺), 然后生色 20 分钟, 通过加入 50  $\mu$ l 2 N 硫酸终止。测量在 490nm 的吸光度。图 1 示出通过固相 ELISA 确定的血清抗体与实施例 2 的托法替尼-BSA 缀合物的结合。如图 1 所示, 与抗原反应的抗体存在于小鼠 1、2 和 3 中。由于小鼠 3 具有最高的效价 (根据在 50% 最大信号的血清稀释度定义), 选择这个小鼠进行杂交瘤产生。

[0240] 杂交瘤产生: 展示最高血清抗体效价 (根据在 50% 最大信号的血清稀释度定义) 的小鼠, 小鼠 3, 接受包含 25  $\mu$ g 抗原的加强注射。三天后, 牺牲小鼠, 分离其脾细胞并根据标准融合方案与 NS1 骨髓瘤细胞融合。在融合后 10 天通过针对免疫原性托法替尼-BSA 的固相 ELISA (上述) 筛选这些称作亲代克隆的克隆混合物, 以鉴定分泌能结合托法替尼的抗体的亲代克隆。选择阳性亲代克隆进行进一步分析。

[0241] 将源自所述融合体的这些阳性亲代克隆从 96 孔平板扩张至 24 孔平板, 3 天后再次筛选以保证所述克隆仍产生抗体。从再次筛选, 将所选择的具有阳性杂交瘤 (即分泌能结合免疫原性托法替尼-BSA 缀合物但是不结合代谢物 -1-BSA、代谢物 -2-BSA 的抗体的杂交瘤) 的孔冷冻用与将来的使用及亚克隆以分离阳性细胞系。

[0242] 通过限制稀释对所选择的分泌能结合免疫原性托法替尼-BSA 缀合物的抗体的阳性亲代克隆进行亚克隆, 以获得单克隆杂交瘤细胞系。在亚克隆后大约 10 天, 从孔中除去小体积的培养基, 通过固相 ELISA 筛选以鉴定产生抗体的克隆。扩增所选择的阳性克隆并再次筛选, 以保证所述克隆仍产生抗体及证实特异性。将每个亲代系的最多两个阳性克隆, 包括 6D9. A5 和 12D4. G6, 进行扩张, 每个克隆冷冻 2 个小瓶。还收集 1ml 上清进行检测。

[0243] 除了实施例 5 所述直接固相 ELISA 之外, 开发另一种免疫测定形式, 包括竞争性免疫测定形式以检测实验样品中的托法替尼。举例的竞争性免疫测定方案在下文提供。

[0244] 鉴于托法替尼是一种有力的免疫抑制剂, 因此托法替尼的抗体的产生是令人惊奇的。甚至更惊奇的是, 这些抗体的精确 (exquisite) 选择性, 如下文示出, 其可以区分托法替尼与其两个代谢物, 选择性结合托法替尼但是基本上不结合任一或者两个代谢物。

[0245] 竞争性抗托法替尼免疫测定 -1

[0246] 将实施例 5 所述直接固相 ELISA 转变为竞争性 ELISA, 其中指定量的单克隆抗体代替免疫血清样品或杂交瘤上清, 然后将竞争物 (即托法替尼, 托法替尼代谢物) 加入单克隆抗体溶液中, 测量在存在和不存在所述竞争物的条件下所述单克隆抗体与托法替尼-BSA 缀合物的结合。

[0247] 竞争性抗托法替尼免疫测定 -2

[0248] 将微滴定平板用 100  $\mu$ l/ 孔的包被缓冲液中的 1  $\mu$ g/ml 纯化的抗托法替尼抗体在室温包被 3 小时, 然后更换为 300  $\mu$ l/ 孔封闭缓冲液 (含有 1% 脱脂奶粉的 PBS) 在室温封闭 30 分钟, 并用洗涤缓冲液 (含有 0.5% Tween 20 的 PBS) 洗涤 3 次。加入 100  $\mu$ l/ 孔生物素化的托法替尼 (0.03  $\mu$ g/ml) 与未标记的竞争物如托法替尼 (1.0-0.001  $\mu$ g/ml)、代谢物 1 或代谢物 2 及链霉亲和素-HRP (1:16,000 稀释, 可随着批次 (lot) 变化) 的混合物, 在

室温温育 2 小时。在 3 次洗涤后,加入 100  $\mu$ l OPD 底物,然后生色 20 分钟,通过加入 50  $\mu$ l 2N 硫酸终止反应。测量在 450nm 的吸光度。

[0249] 竞争性抗托法替尼免疫测定-3

[0250] 将 200  $\mu$ l/孔的含有抗托法替尼 MAb(1/100 至 1/1638400 稀释度)、生物素化的托法替尼 (1ng/ml) 及非标记的竞争物如托法替尼 (1000-0.001ng/ml)、代谢物 1(400 - 0.097ng/ml) 或者代谢物 2 的混合物加入山羊抗小鼠 IgG 预包被的平板中,在室温温育 1-2 小时。在洗涤该平板之后,加入 200  $\mu$ l 链霉亲和素 -HRP (50ng/ml),然后将平板在室温温育 0.5-1 小时。在再次洗涤平板之后,加入 200  $\mu$ l 的 TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺) 底物,然后生色 30 分钟,通过加入 50  $\mu$ l 2 N 硫酸终止反应。测量在 450nm 的吸光度。

[0251] 实施例 6:抗托法替尼单克隆抗体与生物素化的托法替尼的结合

[0252] 通过标准 ELISA 进一步测试所选择的抗体与托法替尼的结合。简而言之,共筛选 34 个克隆用于与生物素化的托法替尼结合。ELISA 的形式如下。将生物素化的托法替尼 (1ng/mL) 与 1:100 至 1:1,638,400 稀释范围的抗体稀释液在预包被的山羊抗小鼠 IgG 平板上温育 1 小时。在洗去任何未结合的物质之后,根据已知方法在加入链霉亲和素 -HRP 和相关的生色底物 TMB 之后测量生物素化的托法替尼与抗体的结合。

[0253] 图 2 示出通过 ELISA 确定的选择的抗托法替尼抗体与生物素化的托法替尼的结合。发现 11 个抗体以浓度依赖性方式结合生物素化的托法替尼。这些抗体中的 10 个抗体的数据在图 2 中示出,抗体 8B5.F2 的数据未示出。

[0254] 选择这 11 个克隆进行进一步分析。特别地,评估这 11 个克隆与托法替尼代谢物 1 的交叉反应性。

[0255] 实施例 7:抗托法替尼单克隆抗体与代谢物 1 的结合

[0256] 通过测量交叉反应性进一步鉴定抗体与托法替尼或托法替尼代谢物的结合,使用上述竞争性免疫测定-3 进行,其中托法替尼代谢物作为竞争物。

[0257] 对于这个实施例,使用竞争性免疫测定筛选 11 个抗托法替尼单克隆抗体用于与代谢物 1 的交叉反应性。将 200  $\mu$ l/孔的含有抗托法替尼 MAb(1/100 至 1/1638400 稀释度)、生物素化的托法替尼 (1ng/ml) 及代谢物 1(400-0.097ng/ml) 加入山羊抗小鼠 IgG 预包被的平板中,在室温温育 1-2 小时。在洗涤平板之后,加入 200  $\mu$ l 链霉亲和素 -HRP (50ng/ml),然后在室温温育 0.5-1 小时。再次洗涤平板之后,加入 200  $\mu$ l 的 TMB 底物,然后生色 30 分钟,通过加入 50  $\mu$ l 2 N 硫酸终止反应。测量在 450nm 的吸光度。

[0258] 图 3 示出使用竞争性免疫测定确定的所选择的抗托法替尼抗体与代谢物 1 的交叉反应性。如图 3 所证明,4 个抗体证明以剂量依赖性方式与代谢物 1 的交叉反应性(例如克隆 7C10.C11、1B2.B9、11G10.F12 和 8B5.F2)。7 个克隆是选择性的,其结合托法替尼但检测不到与代谢物 1 结合,例如 5A3.E5、10A6.C5、10F10.H5、6D9.A5(或 6D9.A8)、12H4.G2、16F10.E6 和 12D4.G6。这 7 个克隆的图在与图 3 中示出的曲线图的顶部近似垂直的线示出。更特别地,用于制备图 3 中示出的曲线图的数据在如下:

[0259] 表 1

[0260]

符号	4-P Fit: $y = (A-D)/(1 + (X/C)^B) + D$ :	A	B	C	D	R <sup>2</sup>
○	Plot#1 (克隆 7C10.C11: 浓度 vs %B/B <sub>0</sub> )	82.2	0.574	0.00544	4.46	1
□	Plot#2 (克隆 1B2.B9: 浓度 vs %B/B <sub>0</sub> )	118	0.526	2.06	5.47	0.999
△	Plot#3 (克隆 11G10.F12: 浓度 vs %B/B <sub>0</sub> )	102	0.544	10.6	5.08	0.996
◇	Plot#4 (克隆 5A3.E5: 浓度 vs %B/B <sub>0</sub> )	102	63.9	0.191	94.2	0.703
●	Plot#5 (克隆 10A6.C5: 浓度 vs %B/B <sub>0</sub> )	111	20.5	0.389	104	0.46
■	Plot#6 (克隆 10F10.H5: 浓度 vs %B/B <sub>0</sub> )	106	4.18	0.345	100	0.539
▲	Plot#7 (克隆 6D9.A8: 浓度 vs %B/B <sub>0</sub> )	95	13.4	0.354	97.6	0.635
◆	Plot#8 (克隆 12H4.G2: 浓度 vs %B/B <sub>0</sub> )	107	21.2	0.383	103	0.803
⊙	Plot#9 (克隆 16F10.E2: 浓度 vs %B/B <sub>0</sub> )	106	6.41	107	116	0.74
□	Plot#10 (克隆 12D4.G6: 浓度 vs %B/B <sub>0</sub> )	103	0.288	2.14x10 <sup>7</sup>	-192	0.954
⊙	Plot#11 (克隆 8B5.F2: 浓度 vs %B/B <sub>0</sub> )	96.4	0.677	0.144	6.44	0.999

[0261] 进一步测试未示出与代谢物 1 具有交叉反应性的 7 个克隆的亲代药物抑制。

[0262] 未示出与代谢物 1 具有交叉反应性的 7 个单克隆抗体克隆的重链和轻链可变结构域的氨基酸序列在下表 2 中提供。

[0263] 表 2

[0264]

抗体	重链 V 结构域(CDR <sup>a</sup> (粗体字))	轻链 V 结构域(CDR (粗体字))
5A3.E5	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFT <b>FNDYY</b> MTWVRQPPGKALEWLG <b>FIRNK</b> <b>ADGYTP</b> YSPSVKGRFTISRDNQSILY LQMNTLRTEDSATYYC <b>ARPHYYGFPF</b> <b>GYWGQ</b> GLVTVSA (SEQ ID NO: 1)	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGA <b>VTTNNY</b> ANWVQEKPDHLFTGLIG <b>GTN</b> SRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTE DEAMYFC <b>ALWYSNHWV</b> FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 2)
CDR1	GFTFNDYY (SEQ ID NO: 13)	TGAVTTNNY (SEQ ID NO: 16)
CDR2	IRNKADGYTP (SEQ ID NO: 14)	GTN (SEQ ID NO: 17)
CDR3	ARPHYYGFPFGY (SEQ ID NO: 15)	ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 18)
10A6.C5	DVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVT <b>GYS</b> <b>ITSGYS</b> WNWIRQFPGNTLEW <b>MGYIHYS</b> <b>GST</b> NYNPSLKSRSITRDTSKNQFFLQLN SVTTEDTATYYC <b>VRGPYGSSFY</b> WGQGT TLTVSS (SEQ ID NO: 3)	NIVMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASE <b>NVVTY</b> VSWYQKPEQSPKLLIY <b>GASNR</b> YTGVPDRFTGSGSATDFTLTISSVQAEDL ADYHC <b>GQGYSPYPT</b> FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 4)
CDR1	GYSITSGYS (SEQ ID NO: 19)	ENVVTY (SEQ ID NO: 22)
CDR2	IHYSGST (SEQ ID NO: 20)	GAS (SEQ ID NO: 23)
CDR3	VRGPYGSSFY (SEQ ID NO: 21)	GQGYSPYT (SEQ ID NO: 24)
10F10.H5	DVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVT <b>GYS</b> <b>ITSGYS</b> WNWIRQFPGNTLEW <b>MGYIHYS</b> <b>GTT</b> NYNPSLKSRSITRDTSKNQFFLQL NSVTAEDTATYYC <b>ARGPYGSSFY</b> WGQ GTTLAVSS (SEQ ID NO: 5)	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTVTCSASSV <b>SSMHWF</b> QKPGTSPKLLIY <b>STSN</b> LASG VPTRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDVATY YC <b>QQRNNYPYT</b> FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 6)
CDR1	GYSITSGYS (SEQ ID NO: 19)	SSVSS (SEQ ID NO: 27)
CDR2	IHYSGTT (SEQ ID NO: 25)	STS (SEQ ID NO: 28)
CDR3	ARGPYGSSFY (SEQ ID NO: 26)	QQRNNYPYT (SEQ ID NO: 29)
6D9.A5 <sup>b</sup>	QVQLKESGPGLVAPSESLTITCTV <b>S</b> <b>GFSL</b> <b>SRYSI</b> HWVRQPPGKLEWLG <b>MWGGG</b> <b>STDY</b> NSVLKSRLTIRKDYSKSQVFLKM NSLQTDDTAMYYC <b>ARIYYGIY</b> WGQGT LTVSA (SEQ ID NO: 7)	NIVMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASE <b>NVVTY</b> VSWYQKPEQSPKLLIY <b>GASNR</b> YTGVPDRFTGSGSATDFTLTISSVQAEDL ADYHC <b>GQGYSPYPT</b> FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 4)
CDR1	GFSLSRYS (SEQ ID NO: 30)	ENVVTY (SEQ ID NO: 22)
CDR2	IWGGGST (SEQ ID NO: 31)	GAS (SEQ ID NO: 23)
CDR3	ARIYYGIY (SEQ ID NO: 32)	GQGYSPYT (SEQ ID NO: 24)
12H4.G2	DVQLQSGGPDLVKPSQSLSLTCTVT <b>GYS</b> <b>ITSGYS</b> WNWIRQFPGNTLEW <b>MGFIHYS</b> <b>GST</b> NYNPSLKSRSITRDTSKNQFFLQLN SVTTEDTATYYC <b>VRGPYGSSFY</b> WGQGT TLTVSS (SEQ ID NO: 8)	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGA <b>VTTSNY</b> ATWVQEKPDHLFTGLIG <b>GTNN</b> RAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTE DEAIYFC <b>ALWYSNHWV</b> FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 9)

[0265]

抗体	重链 V 结构域(CDR <sup>a</sup> (粗体字))	轻链 V 结构域(CDR (粗体字))
CDR1	GYSITSGYS (SEQ ID NO: 19)	TGAVTTSNY (SEQ ID NO: 33)
CDR2	IHYSGST (SEQ ID NO: 20)	GTN (SEQ ID NO: 17)
CDR3	VRGPYGSSFY (SEQ ID NO: 21)	ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 18)
16F10.E6	DMQLQESGPD <del>LV</del> KPSQSLSLTCTVT <b>GYS</b> <b>ITSGYS</b> WNWIRQFPGNTLEW <b>MGYIHYS</b> <b>GNTV</b> YNPSLKSRLSITRDTSKNQFFLQL NSVTTEDTATYYC <b>VRGPYGSSFY</b> WGQ GTTLTVSS (SEQ ID NO: 10)	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQ <b>NVGTN</b> VAWYQQKPGQSPKALIY <b>SAS</b> YR YSGVPDRFTGSGSGTDFLTLSNVQSED LAEYFC <b>QQYYNYPLT</b> FGAGTKLELKR (SEQ ID NO: 11)
CDR1	GYSITSGYS (SEQ ID NO: 19)	QNVGTN (SEQ ID NO: 34)
CDR2	IHYSGNT (SEQ ID NO: 20)	SAS (SEQ ID NO: 35)
CDR3	VRGPYGSSFY (SEQ ID NO: 21)	QQYYNYPLT (SEQ ID NO: 36)
12D4.G6	QVQLKESGPGLVAPSQSLTCTV <b>SGFSL</b> <b>SIYS</b> VHWVRQPPGKGLEWLGMI <b>IWGGG</b> <b>NTDYN</b> SVLKSRLSISKDNSKQVFLKVN SLQTD <del>DD</del> TAMYYC <b>ARIYYGIF</b> WGQGLV TVSA (SEQ ID NO: 12)	NIVMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASE <b>NVVTY</b> VSWYQQKPEQSPKLLIY <b>GAS</b> NR YTGVDPDRFTGSGSATDFLTLSVQAEDL ADYH <b>CGQGYSPY</b> TFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 4)
CDR1	GFSLSIYS (SEQ ID NO: 37)	ENVVTY (SEQ ID NO: 22)
CDR2	IWGGGNT (SEQ ID NO: 38)	GAS (SEQ ID NO: 23)
CDR3	ARIYYGIF (SEQ ID NO: 39)	GQGYSPYT (SEQ ID NO: 24)

[0266] <sup>a</sup> 互补决定区 (CDRs) 以粗体字和下划线示出, 通过 IMGT 编号系统确定 (Lefranc, M.-P. et al., 1999, Nucleic Acids Research 27:209-212)。

[0267] <sup>b</sup> 抗体克隆 6D9. A8 和 16F10. E2 在建档过程 (archival process) 中未能存活。为此, 对亚克隆自相同亲代系的克隆 6D9. A5 和 16F10. E6 进行测序。

#### [0268] 实施例 8 : 抗原竞争

[0269] 对于这个实施例, 使用竞争性免疫测定形式确定托法替尼是否抑制所选择的与代谢物 1 不交叉反应的抗体克隆结合生物素化的托法替尼的能力。所选择的与代谢物 1 不交叉反应的抗体克隆在从初始抗体滴定中确定的其 EC<sub>50</sub> 稀释度测定 (见图 2)。将 200 μl 孔的含有抗托法替尼 MAbs (1/100 至 1/1638400 稀释度)、生物素化的托法替尼 (1ng/ml) 及未标记的托法替尼 (1000-0.001ng/ml) 的混合物加入山羊抗小鼠 IgG 预包被的平板中, 在室温温育 1-2 小时。在洗涤平板之后, 加入 200 μl 链霉亲和素-HRP (50ng/ml), 然后在室温温育 0.5-1 小时。在再次洗涤平板之后, 加入 200 μl of TMB 底物, 然后生色 30 分钟, 通过加入 50 μl 2N 硫酸终止反应。测量在 450nm 的吸光度。

[0270] 如下表 3 所示, 在克隆 6D9. A8 和 12D4. G6 看到竞争。特别地, 未标记的托法替尼对生物素化的托法替尼的结合抑制在克隆 6D9. A8 和 12D4. G6 观测到, ED<sub>50</sub> 分别为 202ng/mL 和 104ng/mL, 表 3 示出这个实验的 ED<sub>20</sub>、ED<sub>50</sub> 和 ED<sub>80</sub>。

[0271] 表 3 : 抗原竞争测定结果

[0272]

克隆	EC50 稀释度	Bo (OD450 nm)	ED20 (ng/mL)	ED50 (ng/mL)	ED80 (ng/mL)
6D9.A8	3785	0.517	1092	202	34
12D4.G6	5449	1.588	457	104	24

[0273] 实施例 9: 抗托法替尼单克隆抗体与代谢物 1 和代谢物 2 的结合

[0274] 测试两个克隆 6D9. A8 和 12D4. G6 与代谢物 1 和 2 的交叉反应性。在这个实验中, 代谢物制备为浓度为 200, 000-200ng/ml, 抗体克隆在表 1 示出的其 EC50 稀释度制备。将代谢物与生物素化的托法替尼 (1ng/mL) 和抗体在预包装的抗小鼠 IgG 平板上一起温育 1 小时。在洗去任何未结合的物质之后, 在加入链霉亲和素-HRP 和相关生色底物 TMB 之后根据已知方法测量生物素化的托法替尼与抗体的结合。

[0275] 下表 4 概括克隆 6D9. A8 和 12D4. G6 与代谢物 1 和代谢物 2 的交叉反应性。

[0276] 表 4: 克隆与代谢物 1 和代谢物 2 的交叉反应性

[0277]

克隆	抗原 ED50	代谢物 -1 交叉反应性	代谢物 -2 交叉反应性
6D9. A8	234ng/mL	3. 68%	0. 38%
12D4. G6	152ng/mL	4. 17%	0. 15%

[0278] 如表 4 所示, 克隆 6D9. A8 示出与代谢物 1 和 2 分别为 3. 68% 和 0. 38% 的交叉反应性; 克隆 12D4. G6 示出与代谢物 1 和 2 分别为 4. 17% 和 0. 15% 的交叉反应性。这些数据证明这些抗体基本上不结合代谢物 1 和 2。

[0279] 实施例 10: 托法替尼的标准曲线

[0280] 对于这个实施例, 使用含有已知浓度的标记的托法替尼 (例如 0. 001-1000ng/ml) 的溶液确定所选择的抗体对托法替尼的相对亲和性。图 4 示出通过 ELISA 确定的本发明的所选择的单克隆抗体例如 6D9. A8 (空心圆) 和 12D4. G6 (空心方框) 的最佳稀释范围。表 5 概括所述 ELISA 的测定条件和结果。表 6 示出用于产生图 5 中所示曲线图的数据值。

[0281] 表 5

[0282]

克隆	抗体稀释度	生物素化的托法替尼	标准范围
6D9.A8	4,000	1 ng/mL	15 - 1215 ng/mL
12D4.G6	22,000	1 ng/mL	5 - 405 ng/mL

[0283] 表 6

[0284]

符号	4-P Fit: $y = (A-D)/(1+(X/C)^B)+D$ :	A	B	C	D	R <sup>2</sup>
○	克隆 6D9. A8 (6D9. A8_1ng/ml_1:3785: 浓度	101	1. 32	195	5. 55	0. 987
□	克隆 12D4. G6 (12D4. G6_1ng/ml_1:21796: 浓度	97. 5	1. 39	109	3. 85	0. 997

[0285] 曲线拟合选项 - 固定加权值。亚克隆 6D9. A8 和 12D4. G6 表明与亲代药物的相似的剂量应答, 6D9. A8 稍微更有力。

[0286] 如图 4 和表 5 所示, 克隆 12D4. G6 示出标准范围为 5-405ng/ml (图 4), 表明这个单克隆抗体能检测水平低如 5ng/ml 的托法替尼。图 4 还示出 6D9. A8 的标准范围为 15-1215ng/ml。因此, 组合使用这两种抗体提供检测样品中托法替尼的剂量范围是大约 5ng/ml-1215ng/ml。

[0287] 实施例 11: 在肝素化人血浆中的掺入 (spike) 和复原 (recovery)

[0288] 对于这个实施例, 将托法替尼掺入 (spiked) 可商购的肝素人血浆中, 以确定稀释度对人血浆样品中托法替尼的线性和复原的作用。将托法替尼以浓度为 4864ng/ml 掺入肝素 - 血浆 (人) 中, 以 2 倍系列稀释以测试血浆的测定耐受性。稀释度线性百分比和复原百分比通过实施例 5 所述 ELISA 测定计算。

[0289] 表 7: 稀释度对人血浆样品中托法替尼的线性和复原的作用

[0290]

稀释倍数	观测值 Ng/ml	标称值 Ng/ml	% 稀释度线性	% 复原
2	>LOD <sup>a</sup>	2432	---	---
4	>LOD	1216	---	---
8	745	604	106	123
16	390	304	111	128
32	183	152	104	120
64	84	76	95	111
128	46	38	105	121
256	22	19	100	116
		平均值	103	120

[0291]

[0292] <sup>a</sup>LOD = 检测水平

[0293] 如表 7 所示, 在测定缓冲液中至少 1:8 稀释的得自商业来源的血浆样品具有可接受的稀释度线性和复原。稀释 2 和 4 倍的样品返回低于预期的吸光度值, 表示这些较低稀释度的样品的基质干扰。这些数据表明本发明的抗体甚至在复杂的生物学样品例如但不限于血浆中可精确地检测托法替尼的存在和浓度。

[0294] 实施例 12: 克隆 6D9. A5 表征

[0295] 对于这个实施例, 使用抗体克隆 6D9. A5、6D9. A8 或 12D4. G6 在这个测定中产生 (run) 托法替尼剂量应答曲线 (0.001-1000ng/ml)。结果在表 8 和图 5 中示出。进一步地, 用于产生图 5 中所示曲线图的数据在下表 9 中示出。本发明的数据表明 6D9. A5 具有与 6D9.

A8 相同的标准范围 (15 - 1215ng/ml), 及能检测样品中浓度低如大约 15ng/ml 及高如大约 1215ng/ml 的托法替尼。

[0296] 表 8

[0297]

克隆#	抗体稀释度	具有 2 ng/ml 托法替尼的 0 ng/m 标准物 (OD 450 nm)	托法替尼 ED50 (ng/ml)
6D9.A5	1:25,600	1.393	244
6D9.A8	1:4,000	2.098	230
12D4.G6	1:22,000	0.623	118

[0298] 表 9

[0299]

符号	4-P Fit: $y = (A-D)/(1 + (X/C)^B) + D$ :	A	B	C	D	R <sup>2</sup>
●	Plot#1 (标准物_6D9.A5: 浓度 vs %B/B <sub>0</sub> )	98.1	1.14	224	6.43	0.999
□	Plot#2 (标准物_6D9.A8: 浓度 vs %B/B <sub>0</sub> )	94.6	1.17	215	8.83	1
Δ	Plot#3 (标准物_12D4.G6: 浓度 vs %B/B <sub>0</sub> )	94.9	1.07	108	9.12	1

[0300] 曲线拟合选项 - 固定加权值。

[0301] 因此, 替代亚克隆抗体 6D9. A5 (代替 6D9. A8) 表明与亚克隆抗体 6D9. A8 相似的对亲代药物的剂量应答活性。此外, 本发明揭示的数据表明 6D9. A5 和 6D9. A8 抗体与抗体 12D4. G6 相比是相似的更有力的亲代药物结合剂。

[0302] 通过测量与代谢物的交叉反应性进一步表征 6D9. A5 抗体, 所述测量使用竞争性免疫测定 -3, 其中托法替尼代谢物用作竞争物, 或者使用实施例 5 所述直接 ELISA 测定, 其中微滴定平板用托法替尼 -BSA 缀合物包被。在表 10 中示出的数据表明克隆 6D9. A5 具有与克隆 6D9. A8 和克隆 12D4. G6 观测到的相似的交叉反应性。即与 12D4. G6 一样, 6D9. A5 基本上不结合代谢物 1 或 2。

[0303] 表 10

[0304]

克隆	抗原 ED50	代谢物 1 交叉反应性	代谢物 2 交叉反应性
6D9. A5	244ng/ml	4. 47%	<0. 01%
6D9. A8	230ng/mL	3. 68%	0. 38%
12D4. G6	118ng/mL	4. 17%	0. 15%

[0305] 尽管已经参考各种应用、方法、试剂盒和组合物描述了本发明, 但是应意识到在不偏离本文教导和下文权利要求书的精神, 可以对本发明进行各种改变和修饰。提供前述实施例只是为了更好地例证本发明, 无限制本发明范围之意。本发明的教导已经利用这些举

例的实施方案加以描述,本领域技术人员将易于理解在不进行过度实验可以对这些举例的实施方案进行各种改变和修饰。所有这些改变和修饰均在本发明范围内。

[0306] 本文引用的所有参考文献包括专利、专利申请、论文、教科书等均以其全部内容并入作参考。在一或多个提及的文献和相似材料与本申请不同或矛盾时,包括但不限于定义的术语、术语的用途、描述的技术等方面,以本申请为准。

[0307] 前文的描述和实施例详细描述了本发明的某些具体的实施方案,及描述了本发明人考虑的最佳模式。然而,应意识到无论前文中怎样详细描述,本发明可以许多方式进行,本发明应只根据所附权利要求书及其任何等价物阐述。

[0001]

## 序列表

<110> 辉瑞公司  
 J·P·加德纳二世  
 V·Y·王

<120> 抗托法替尼抗体及其用于药物监测的用途

<130> PC71701A

<140> PCT/US2013/to be assigned  
 <141> 2013-06-18

<150> US 61/665,361  
 <151> 2012-06-28

<160> 39

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 1

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr  
 20 25 30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asp Gly Tyr Thr Pro Tyr Tyr Ser Pro  
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile  
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Thr Glu Asp Ser Ala Thr Tyr  
 85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Pro His Tyr Tyr Gly Phe Pro Phe Gly Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115 120

<210> 2  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 2

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Asn

[0002]



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

<210> 5  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 5

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

<210> 6  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 6

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly

[0004]



Asp Val Gln Leu Gln Gly Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly  
20 25 30

Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Thr Leu Glu Trp  
35 40 45

Met Gly Phe Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu  
50 55 60

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

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

Val Arg Gly Pro Tyr Gly Ser Ser Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 9  
<211> 109  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 9

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
20 25 30

Asn Tyr Ala Thr Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly  
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe  
50 55 60

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

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
85 90 95

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 10  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

[0006]

&lt;400&gt; 10

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

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 11

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

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 114

[0007]

<212> PRT  
 <213> Mus musculus  
  
 <400> 12  
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ile Tyr  
 20 25 30  
 Ser Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Gly Met Ile Trp Gly Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Val Leu Lys  
 50 55 60  
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Val Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Arg Ile Tyr Tyr Gly Ile Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 100 105 110  
  
 Ser Ala

<210> 13  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 5A3-E5-HCDR1

<400> 13

Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr Tyr  
1 5

<210> 14  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 5A3-E5-HCDR2

<400> 14

Ile Arg Asn Lys Ala Asp Gly Tyr Thr Pro  
1 5 10

<210> 15  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 5A3-E5-HCDR3

[0008]

<400> 15

Ala Arg Pro His Tyr Tyr Gly Phe Pro Phe Gly Tyr  
1 5 10

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5A3-E5-LCDR1

<400> 16

Thr Gly Ala Val Thr Thr Asn Asn Tyr  
1 5

<210> 17

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5A3-E5-LCDR2

<400> 17

Gly Thr Asn  
1

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5A3-E5-LCDR3

<400> 18

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val  
1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 10A6-C5-HCDR1

<400> 19

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Ser  
1 5

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 10A6-C5-HCDR2

<400> 20

[0009]

Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr  
1 5

<210> 21  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 10A6-C5-HCDR3

<400> 21

Val Arg Gly Pro Tyr Gly Ser Ser Phe Tyr  
1 5 10

<210> 22  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 10A6-C5-LCDR1

<400> 22

Glu Asn Val Val Thr Tyr  
1 5

<210> 23  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 10A6-C5-LCDR2

<400> 23

Gly Ala Ser  
1

<210> 24  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 10A6-C5-LCDR3

<400> 24

Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 25  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 10F10-H5-HCDR2

<400> 25

Ile His Tyr Ser Gly Thr Thr

[0010]

1 5

<210> 26  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 10F10-H5-HCDR3

<400> 26  
 Ala Arg Gly Pro Tyr Gly Ser Ser Phe Tyr  
 1 5 10

<210> 27  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 10F10-H5-LCDR1

<400> 27  
 Ser Ser Val Ser Ser  
 1 5

<210> 28  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 10F10-H5-LCDR2

<400> 28  
 Ser Thr Ser  
 1

<210> 29  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 10F10-H5-LCDR3

<400> 29  
 Gln Gln Arg Asn Asn Tyr Pro Tyr Thr  
 1 5

<210> 30  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 6D9-A5-HCDR1

<400> 30  
 Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr Ser  
 1 5

[0011]

<210> 31  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 6D9-A5-HCDR2

<400> 31

Ile Trp Gly Gly Gly Ser Thr  
 1 5

<210> 32  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 6D9-A5-HCDR3

<400> 32

Ala Arg Ile Tyr Tyr Gly Ile Tyr  
 1 5

<210> 33  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 12H4-G2-LCDR1

<400> 33

Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr  
 1 5

<210> 34  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 16F10-E6-LCDR1

<400> 34

Gln Asn Val Gly Thr Asn  
 1 5

<210> 35  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 16F10-E6-LCDR2

<400> 35

Ser Ala Ser  
 1

<210> 36

[0012]

<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 16F10-E6-LCDR3

<400> 36

Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Leu Thr  
1 5

<210> 37  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 12D4-G6-HCDR1

<400> 37

Gly Phe Ser Leu Ser Ile Tyr Ser  
1 5

<210> 38  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 12D4-G6-HCDR2

<400> 38

Ile Trp Gly Gly Gly Asn Thr  
1 5

<210> 39  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 12D4-G6-HCDR3

<400> 39

Ala Arg Ile Tyr Tyr Gly Ile Phe  
1 5

RA-91013-A.01 TB1 效价 vs. RA-91013-A.01-BSA

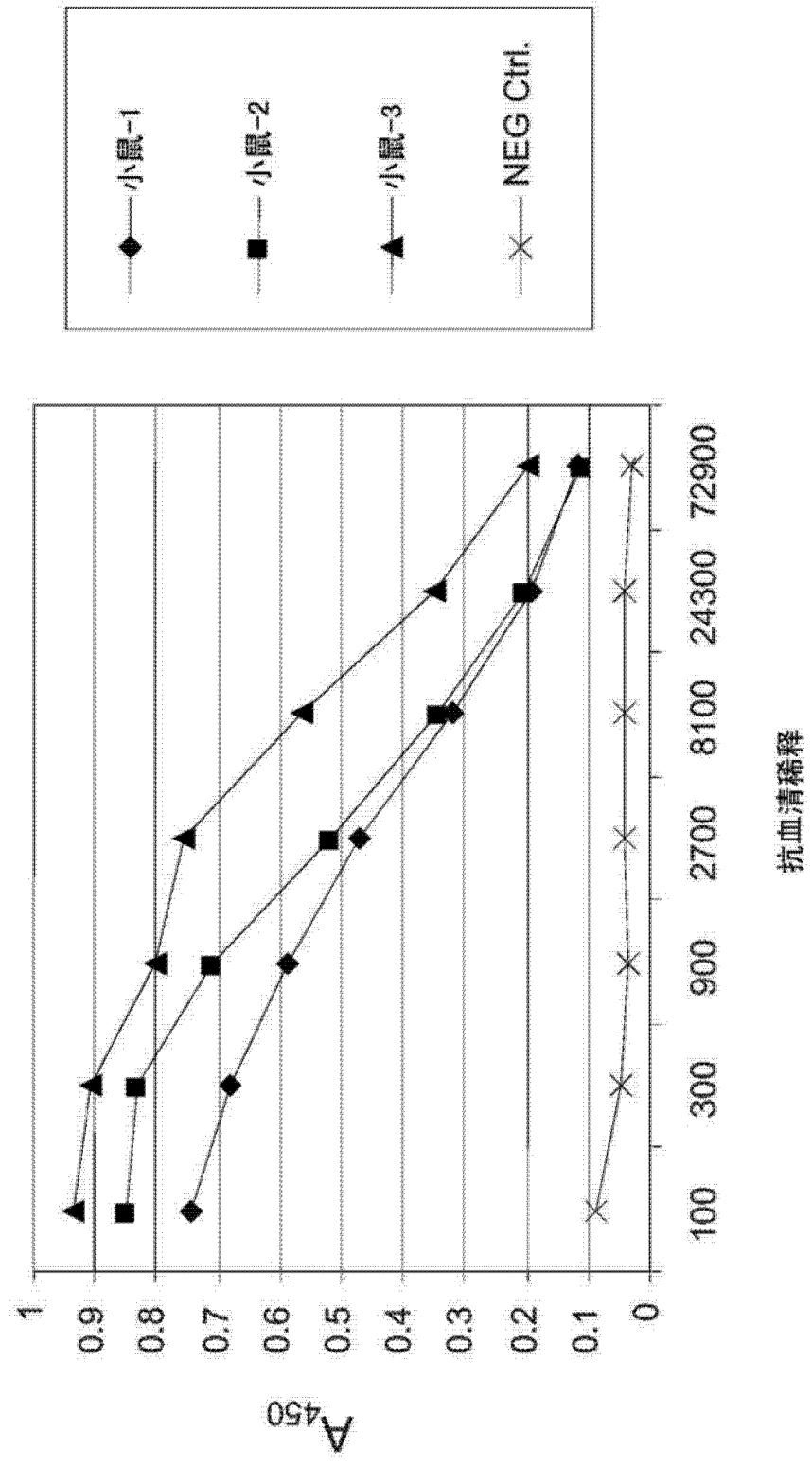


图 1

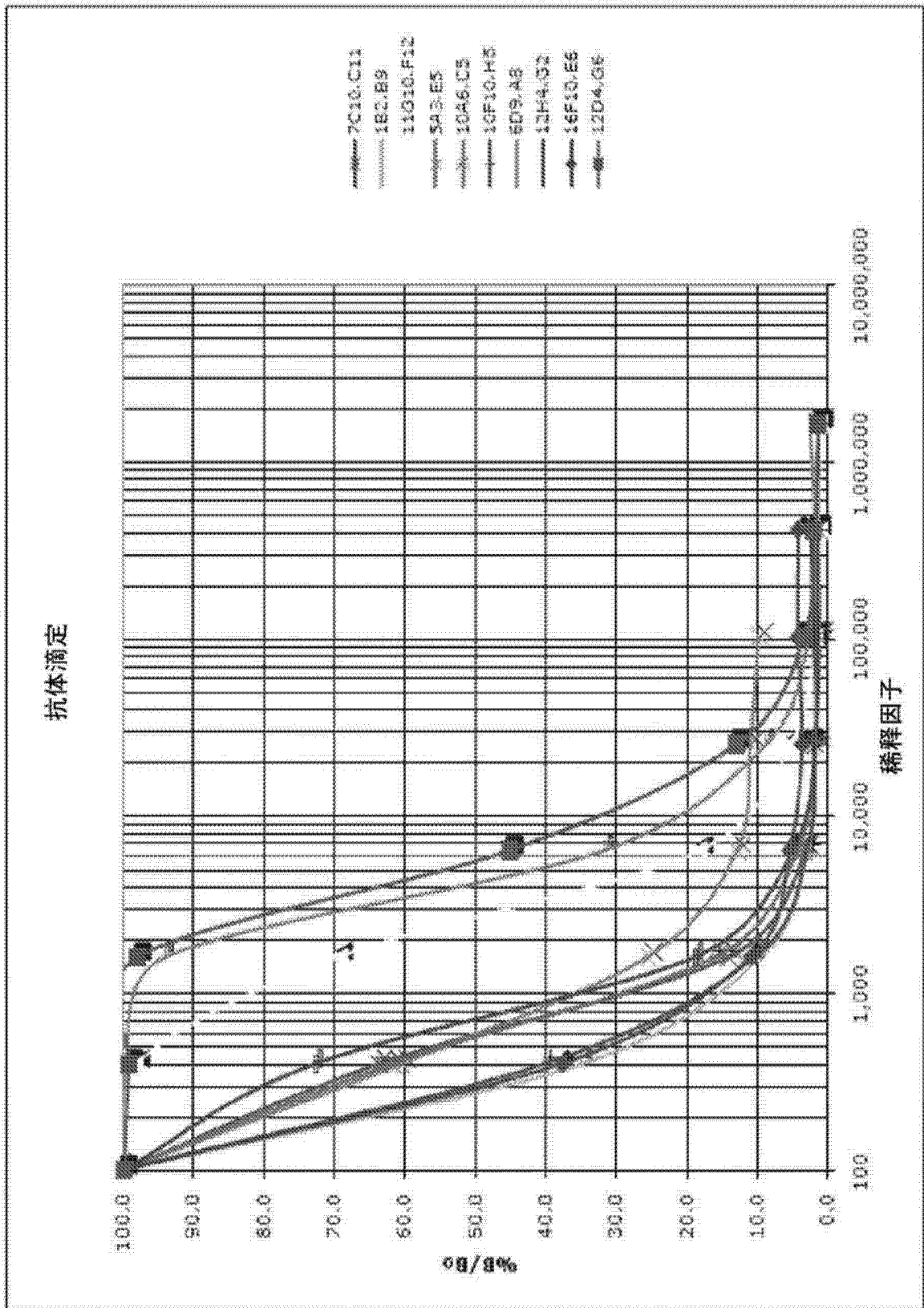


图 2

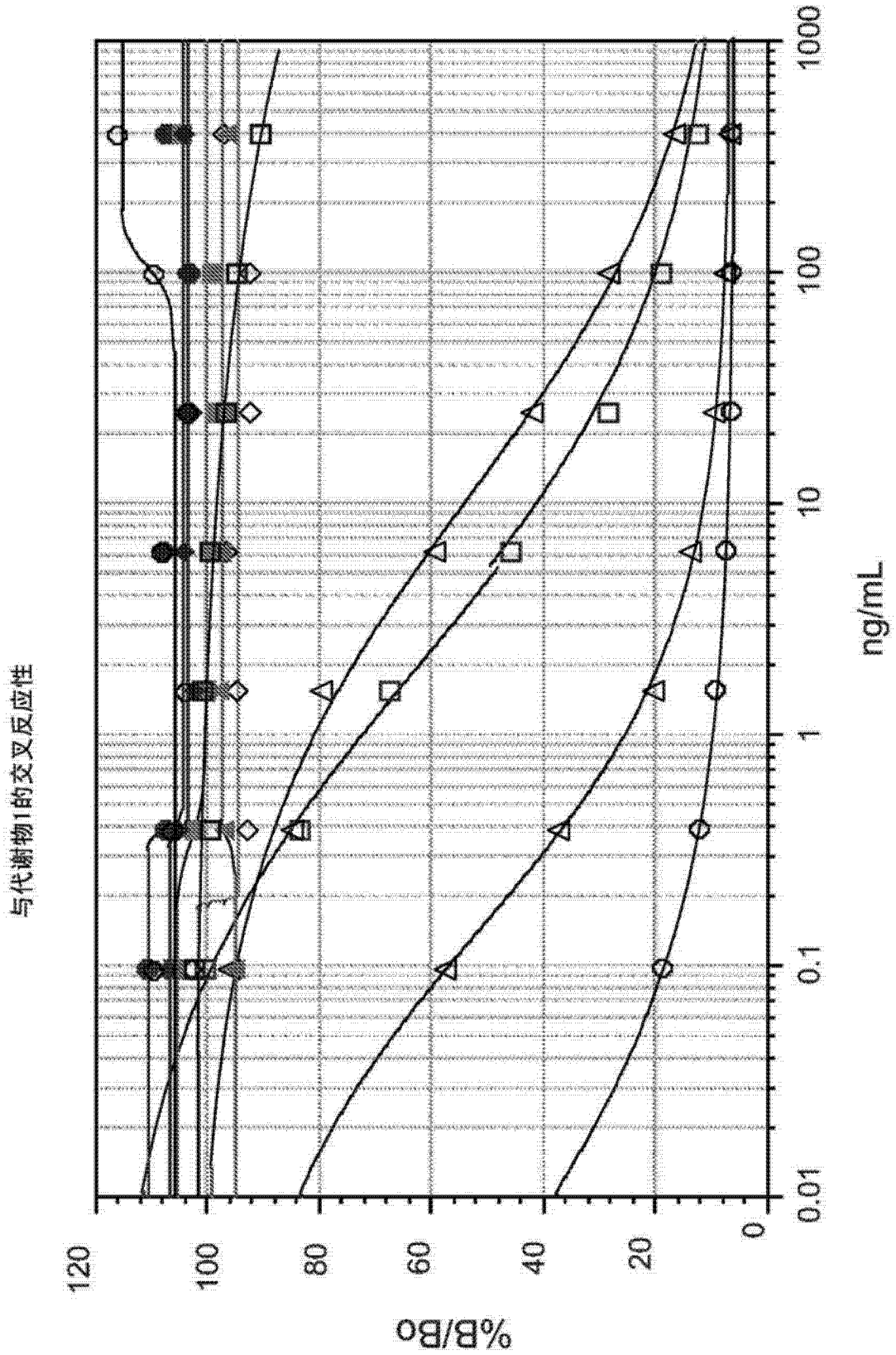


图 3

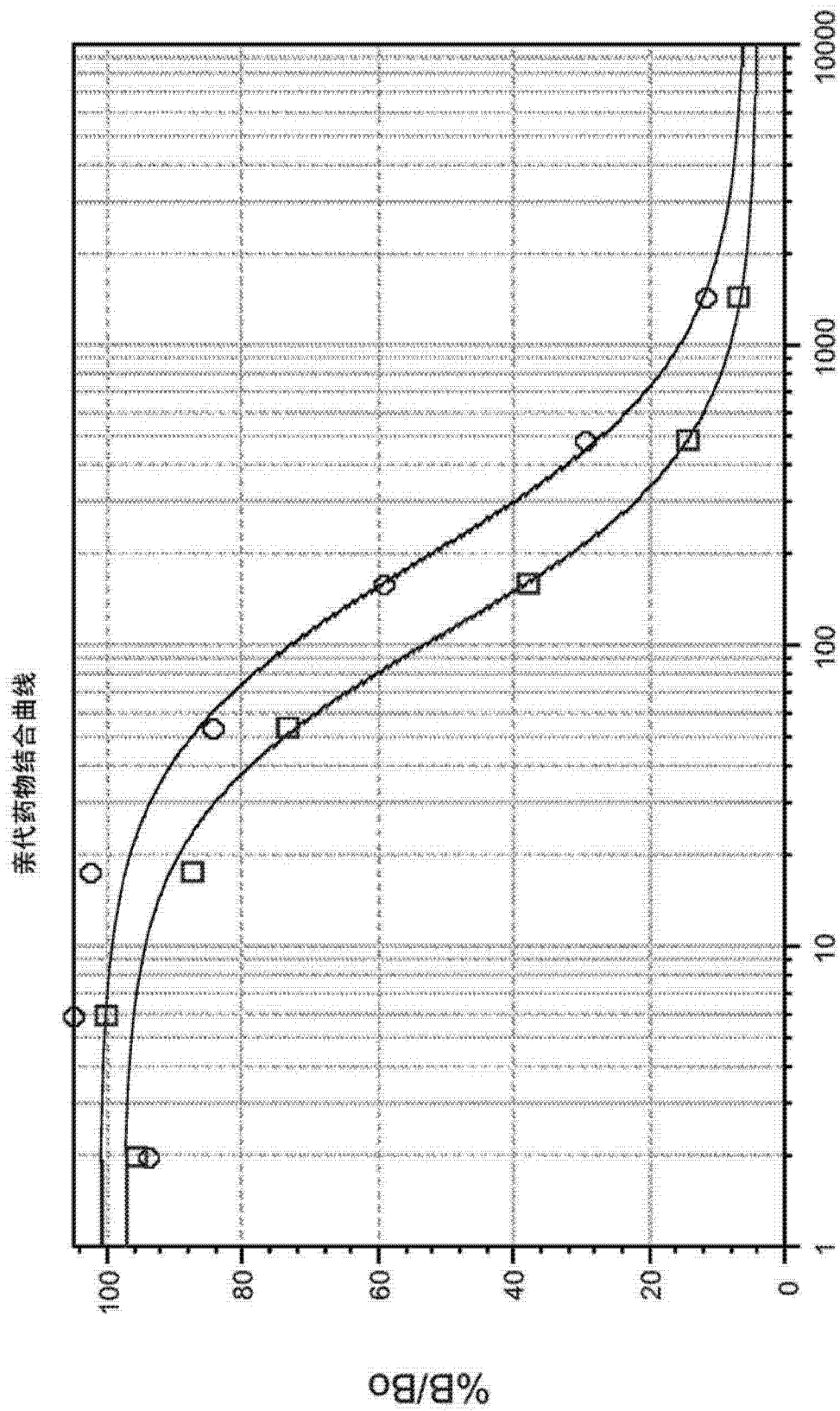


图 4

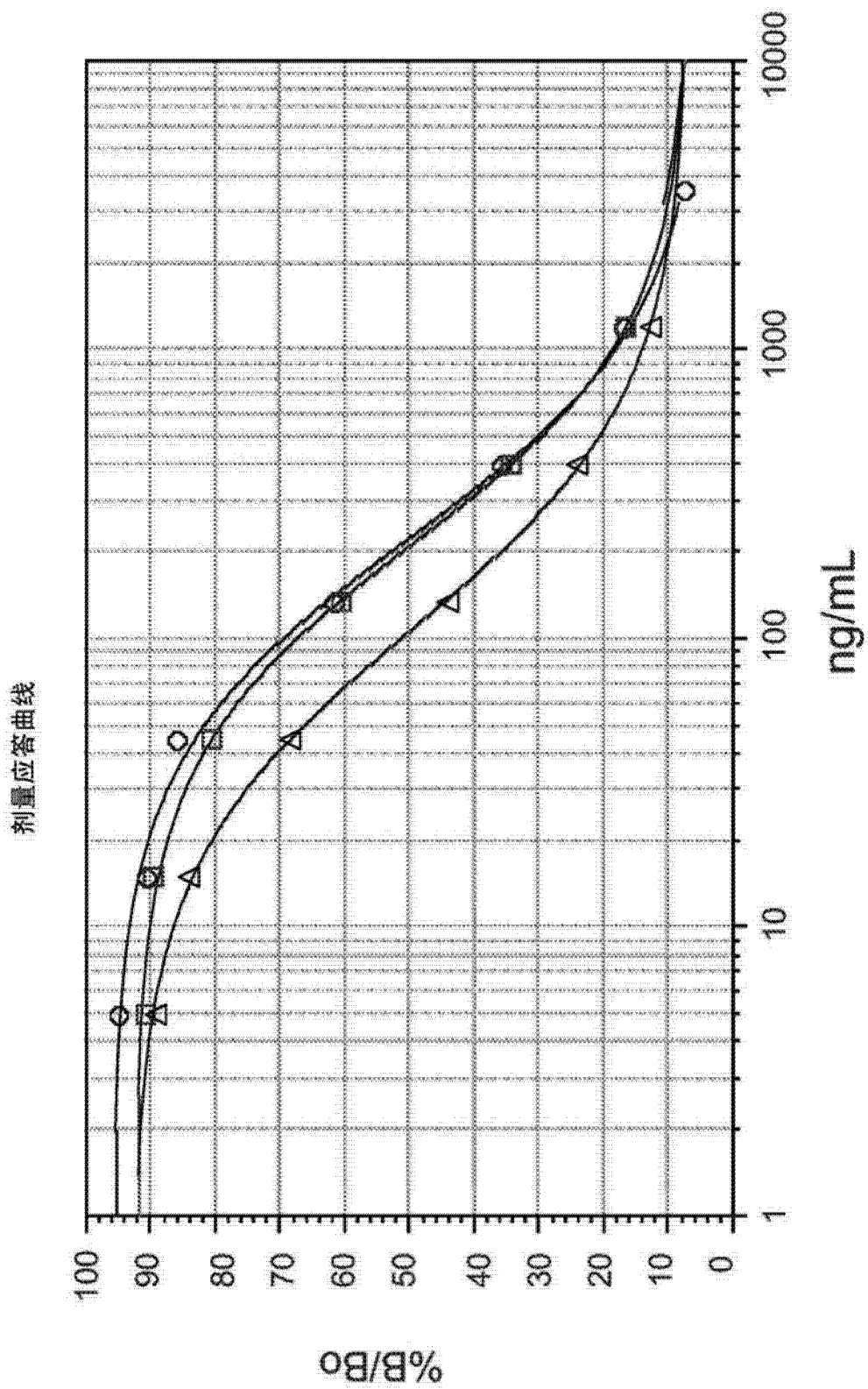


图 5

专利名称(译)	抗托法替尼抗体及其用于药物监测的用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN104411336A</a>	公开(公告)日	2015-03-11
申请号	CN201380034143.8	申请日	2013-06-18
[标]申请(专利权)人(译)	美国辉瑞有限公司		
申请(专利权)人(译)	辉瑞公司		
当前申请(专利权)人(译)	辉瑞公司		
[标]发明人	JP加德纳二世 VY王		
发明人	J·P·加德纳二世 V·Y·王		
IPC分类号	A61K47/48 C07K16/44 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/9493 C07K2317/33 C07K2317/92 C07K16/44 A61K47/48284 A61K47/643 A61K47/646 C07K2317/10 C07K2317/30 C07K2317/56 C07K2317/565		
优先权	61/665361 2012-06-28 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供选择性托法替尼抗体，可用作免疫原性分子以产生特异于托法替尼的抗体的免疫原性托法替尼缀合物，以及测量样品中托法替尼浓度的方法，产生所述抗体的方法和使用所述抗体的测定和试剂盒。

