



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119677779 A

(43) 申请公布日 2025. 03. 21

(21) 申请号 202380050633.0

(22) 申请日 2023.04.27

(30) 优先权数据

20220100349 2022.04.27 GR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.12.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/066283 2023.04.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/212632 EN 2023.11.02

(71) 申请人 儿童医学中心公司

地址 美国

申请人 剑桥有限公司

(72) 发明人 康斯坦丁诺斯·策列皮斯

瑞安·A·弗林 本松·M·乔治

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

专利代理师 张珊珊 陈九洲

(51) Int.Cl.

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书5页 说明书35页

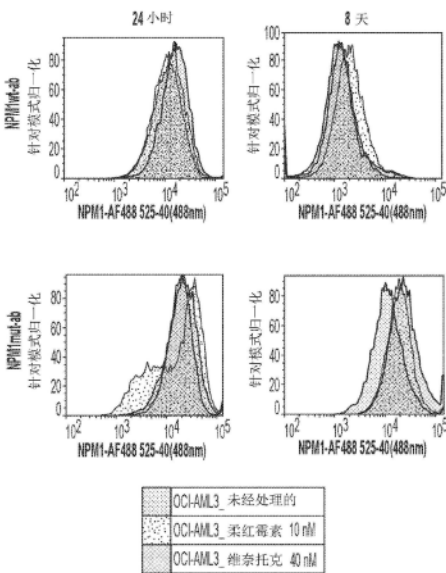
序列表(电子公布) 附图92页

(54) 发明名称

抗核仁磷蛋白1抗体和抗体缀合物组合治疗

(57) 摘要

本文中提供了对核仁磷蛋白1(NPM1)具有特异性的抗体,其能够与位于细胞表面上的核仁磷蛋白1结合;以及提供了包含这样的抗体的抗体-药物缀合物(ADC)。本文中还提供了治疗其中NPM1在癌细胞表面上表达的癌症的方法,其通过向对象施用本文中所述的结合NPM1的抗体或抗体缀合物以及化学治疗药物进行。



1. 治疗表达核仁磷蛋白1 (NPM1) 的癌症的方法, 所述方法包括向有此需要的对象施用有效量的与NPM1结合的抗体和化学治疗药物。

2. 治疗表达NPM1的癌症的方法, 所述方法包括向有此需要的对象施用有效量的与NPM1结合的抗体, 其中所述对象正在接受或已经接受过采用化学治疗药物的治疗。

3. 治疗表达NPM1的癌症的方法, 所述方法包括向有此需要的对象施用有效量的化学治疗药物, 其中所述对象正在接受或已经接受过采用与NPM1结合的抗体的治疗。

4. 权利要求1至3中任一项所述的方法, 其中所述抗体包含:

重链可变区, 其包含含有氨基酸序列NIFVH (SEQ ID NO:1) 的重链 (HC) 互补决定区 (CDR) 1、含有氨基酸序列KIDPANDNTKFAPNFQG (SEQ ID NO:2) 的HC CDR2、和含有氨基酸序列DSSGYDAVDY (SEQ ID NO:3) 的HC CDR3; 以及

轻链可变区, 其包含含有氨基酸序列RASESVYTYLA (SEQ ID NO:9) 的轻链 (LC) CDR1、含有氨基酸序列NAKTLTE (SEQ ID NO:10) 的LC CDR2、和含有氨基酸序列QHGYGTPYT (SEQ ID NO:11) 的LC CDR3。

5. 权利要求4所述的方法, 其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:28中所示氨基酸序列; 和/或者所述轻链可变区包含SEQ ID NO:29中所示氨基酸序列。

6. 权利要求1至3中任一项所述的方法, 其中所述抗体包含:

重链可变区, 其包含含有氨基酸序列SYAMS (SEQ ID NO:15) 的重链 (HC) 互补决定区 (CDR) 1、含有氨基酸序列AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:16) 的HC CDR2、和含有氨基酸序列WRNNAFDY (SEQ ID NO:17) 的HC CDR3; 以及

轻链可变区, 其包含含有氨基酸序列QGDSLRSYYAS (SEQ ID NO:22) 的轻链 (LC) CDR1、含有氨基酸序列GKNRPS (SEQ ID NO:23) 的LC CDR2、和含有氨基酸序列NSSPRLKHRV (SEQ ID NO:24) 的LC CDR3。

7. 权利要求6所述的方法, 其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:30中所示氨基酸序列; 和/或者所述轻链可变区中包含SEQ ID NO:31中所示氨基酸序列。

8. 权利要求1至7中任一项所述的方法, 其中所述抗体是全长抗体或其抗原结合片段。

9. 权利要求8所述的方法, 其中所述抗体是全长抗体, 所述全长抗体选自免疫球蛋白G (IgG)、免疫球蛋白A (IgA)、免疫球蛋白D (IgD)、免疫球蛋白E (IgE) 和免疫球蛋白M (IgM)。

10. 权利要求9所述的方法, 其中所述抗体是IgG。

11. 权利要求1至7中任一项所述的方法, 其中所述抗体是抗原结合片段, 所述抗原结合片段选自Fab片段、F(ab')₂片段、Ig单体、Fd片段、scFv、scAb、dAb、Fv、亲和体、双抗体、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。

12. 权利要求1至11中任一项所述的方法, 其中所述抗体是人抗体或人源化抗体。

13. 权利要求1至7中任一项所述的方法, 其中所述抗体还包含重链恒定区。

14. 权利要求13所述的方法, 其中所述重链恒定区包含SEQ ID NO:32中所示氨基酸序列。

15. 权利要求1至7中任一项所述的方法, 其中所述抗体还包含轻链恒定区。

16. 权利要求15所述的方法, 其中所述轻链恒定区包含SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:34中所示氨基酸序列。

17. 权利要求13至16中任一项所述的方法, 其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:35的氨

氨基酸序列的重链和/或含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链。

18. 权利要求13至16中任一项所述的方法,其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链和/或含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的轻链。

19. 权利要求13至16中任一项所述的方法,其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的重链和/或含有SEQ ID NO:45的氨基酸序列的轻链。

20. 权利要求4、5、和8至17中任一项所述的方法,其中所述抗体优先与野生型NPM1结合。

21. 权利要求6至16和18至19中任一项所述的方法,其中所述抗体优先与突变体NPM1结合。

22. 权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述抗体与试剂缀合。

23. 权利要求22所述的方法,其中所述试剂是药物。

24. 权利要求23所述的方法,其中所述药物选自:澳瑞他汀E、澳瑞他汀F、单甲基澳瑞他汀D(MMAD)、单甲基澳瑞他汀F(MMAF)、单甲基澳瑞他汀E(MMAE)、放线菌素、放线菌素X2、 α -鹅膏蕈碱、 β -鹅膏蕈碱、 γ -鹅膏蕈碱、 ϵ -鹅膏蕈碱、aerophysinin、阿多柔比星、agrochelin、安莎三烯、安丝菌素P-3、阿非迪霉素、凋亡素、L-天冬酰胺酶、阿扎胞苷、巴佛洛霉素A1、巴佛洛霉素B1、巴佛洛霉素B2、巴佛洛霉素C1、巴佛洛霉素C2、巴佛洛霉素D、巴佛洛霉素E、加利车霉素、喜树碱、毛壳素、球毛壳菌素、chlamydocin、烬灰红菌素B、克拉屈滨、秋水仙碱、康普瑞汀A1、康普瑞汀A4、虫草素、隐藻素、葫芦素B、葫芦素E、curvulin、环巴胺、环磷酰胺、阿糖胞苷、更生霉素、柔红霉素、地西他滨、地塞米松、多拉司他汀10、多拉司他汀15、倍癌霉素SA、倍癌霉素TM、倍癌霉素MA、倍癌霉素DM、多柔比星、恩格林A、埃博霉素A、埃博霉素B、埃博霉素C、依托泊苷、氟达拉滨、烟曲霉素、格尔德霉素、坦螺旋霉素(17-AAG)、葡萄糖杀粉蝶菌素A、短杆菌肽A、草环氧二烯、9-羟基玫瑰树碱、羟基脲、吸水菌酯素、寄端霉素、伊达比星、伊利马醌、isatropolone A、isofistularin-3、伊沙匹隆、JW55、乳胞素、luisol A、美登醇、美登素(DM1)、美登素DM3、ravtansine(DM4)、美登素类化合物AP-3、mechercharmycin A、mensacarcin、甲氨蝶呤、6-巯嘌呤、microcolin B、微囊藻毒素LR、米托蒽醌、muscotoxin A、肌基质蛋白、mytoxin B、奈拉滨、奈莫柔比星、nocuolin A、冲酯霉素、寡霉素A、寡霉素B、紫杉醇、拉洛他赛、milataxel、奥他赛、tesetaxel、类鬼笔毒环肽、鬼笔环肽、植物鞘氨醇、杀青虫素A、比洛尼素、鬼臼毒素、聚酮霉素、泼尼松、土槿甲酸B、pseurotin A、puwainaphycin F、吡咯并苯并二氮杂萘、喹哪朵肽、雷查霉素、雷别卡霉素、Ro 5-3335、番红菌素B、山卓霉素、血根碱、皂草毒蛋白、西奈芬净、塔托布林、特罗他汀、6-硫鸟嘌呤、硫代秋水仙碱、单歧藻毒素、tripolin A、雷公藤甲素、妥布霉素A、微管溶素A、微管溶素M、微管溶素IM-1、微管溶素IM-2、微管溶素IM-3、维奈托克和长春新碱。

25. 权利要求24所述的方法,其中所述药物是皂草毒蛋白、柔红霉素、维奈托克或阿扎胞苷。

26. 权利要求22至25中任一项所述的方法,其中所述抗体与所述药物通过接头缀合。

27. 权利要求26所述的方法,其中所述接头是可切割接头。

28. 权利要求27所述的方法,其中所述接头是pH敏感性接头、谷胱甘肽敏感性接头或蛋白酶可切割接头。

29. 权利要求27或28所述的方法,其中所述可切割接头选自:N-琥珀酰亚胺基4-(2-吡

啶基二硫代)戊酸酯(SPP)、N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯(SPDB)、磺基-SPDB、缬氨酸-瓜氨酸(Val-cit)、乙酰丁酸酯、CL2A、马来酰亚胺基己酰基(MC)和Mal-EBE-Mal。

30. 权利要求26所述的方法,其中所述接头是不可切割接头。

31. 权利要求30所述的方法,其中所述不可切割接头选自:N-琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)和马来酰亚胺基甲基环己烷-1-羧酸酯(MCC)、MC-VC-PAB。

32. 权利要求23至31中任一项所述的方法,其中所述抗体与所述药物的比率为1:1至1:10。

33. 权利要求32所述的方法,其中所述抗体与所述试剂的比率为1:4。

34. 权利要求22所述的方法,其中所述试剂是放射性同位素。

35. 权利要求34所述的方法,其中所述放射性同位素选自:碘-131、镱-188、钇-90、铋-213和铟-225。

36. 权利要求1至35中任一项所述的方法,其中所述表达NPM1的癌症是其中NPM1在癌细胞表面上表达的癌症。

37. 权利要求1至36中任一项所述的方法,其中所述表达NPM1的癌症是这样的癌症:其中由于施用所述化学治疗药物或用所述化学治疗药物进行治疗而导致NPM1在癌细胞表面上表达。

38. 权利要求36或37所述的方法,其中所述表达NPM1的癌症是其中野生型NPM1和/或突变体NPM1在癌细胞表面上表达的癌症。

39. 权利要求1至38中任一项所述的方法,其中所述癌症是实体癌或液体癌症,所述实体癌或液体癌症选自:血液学癌症、肺癌、乳腺癌、脑癌、胃肠癌、肝癌、肾癌、膀胱癌、胰腺癌、卵巢癌、睾丸癌、前列腺癌、子宫内膜癌、肌肉癌、骨癌、神经内分泌癌、结缔组织癌、头颈癌或皮肤癌。

40. 权利要求1至39中任一项所述的方法,其中所述癌症选自:急性髓系白血病(AML)、急性早幼粒细胞白血病(APL)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、非霍奇金淋巴瘤和骨髓增生异常综合征(MDS)。

41. 权利要求1至40中任一项所述的方法,其中所述癌症是转移性癌症。

42. 权利要求1至41中任一项所述的方法,其中所述癌症是治疗相关癌症或继发性恶性病。

43. 权利要求42所述的方法,其中所述癌症是治疗相关AML(t-AML)或非霍奇金淋巴瘤的继发性恶性病。

44. 权利要求1至43中任一项所述的方法,其中所述化学治疗药物选自:澳瑞他汀E、澳瑞他汀F、单甲基澳瑞他汀D(MMAD)、单甲基澳瑞他汀F(MMAF)、单甲基澳瑞他汀E(MMAE)、放线菌素、放线菌素X2、 α -鹅膏蕈碱、 β -鹅膏蕈碱、 γ -鹅膏蕈碱、 ϵ -鹅膏蕈碱、aerophysinin、阿多柔比星、agrochelin、安莎三烯、安丝菌素P-3、阿非迪霉素、凋亡素、L-天冬酰胺酶、阿扎胞苷、巴佛洛霉素A1、巴佛洛霉素B1、巴佛洛霉素B2、巴佛洛霉素C1、巴佛洛霉素C2、巴佛洛霉素D、巴佛洛霉素E、加利车霉素、喜树碱、毛壳素、球毛壳菌素、chlamydocin、烬灰红菌素B、克拉屈滨、秋水仙碱、康普瑞汀A1、康普瑞汀A4、虫草素、隐藻素、葫芦素B、葫芦素E、

curvulin、环巴胺、环磷酰胺、阿糖胞苷、更生霉素、柔红霉素、地西他滨、地塞米松、多拉司他汀10、多拉司他汀15、倍癌霉素SA、倍癌霉素TM、倍癌霉素MA、倍癌霉素DM、多柔比星、恩格林A、埃博霉素A、埃博霉素B、埃博霉素C、依托泊苷、氟达拉滨、烟曲霉素、格尔德霉素、坦螺旋霉素(17-AAG)、葡萄糖杀粉蝶菌素A、短杆菌肽A、草环氧二烯、9-羟基玫瑰树碱、羟基脲、吸水菌酯素、寄端霉素、伊达比星、伊利马醌、isatropolone A、isofistularin-3、伊沙匹隆、JW55、乳胞素、luisol A、美登醇、美登素(DM1)、美登素DM3、ravtansine(DM4)、美登素类化合物AP-3、mechercharmycin A、mensacarcin、甲氨蝶呤、6-巯嘌呤、microcolin B、微囊藻毒素LR、米托蒽醌、muscotoxin A、肌基质蛋白、mytoxin B、奈拉滨、奈莫柔比星、nocuolin A、冲酯霉素、寡霉素A、寡霉素B、紫杉醇、拉洛他赛、milataxel、奥他赛、tesetaxel、类鬼笔毒环肽、鬼笔环肽、植物鞘氨醇、杀青虫素A、比洛尼素、鬼臼毒素、聚酮霉素、泼尼松、土槿甲酸B、pseurotin A、puwainaphycin F、吡咯并苯并二氮杂~~革~~、喹哪朵肽、雷查霉素、雷别卡霉素、Ro 5-3335、番红菌素B、山卓霉素、血根碱、皂草毒蛋白、西奈芬净、塔托布林、特罗他汀、6-硫鸟嘌呤、硫代秋水仙碱、单歧藻毒素、tripolin A、雷公藤甲素、妥布霉素A、微管溶素A、微管溶素M、微管溶素IM-1、微管溶素IM-2、微管溶素IM-3、维奈托克和长春新碱。

45. 权利要求44所述的方法,其中所述化学治疗药物是皂草毒蛋白、柔红霉素、维奈托克或阿扎胞苷。

46. 权利要求1至45中任一项所述的方法,其中所述化学治疗药物是所述癌症对其具有抗性的化学治疗药物。

47. 权利要求1至46中任一项所述的方法,其中所述施用全身地或局部地进行。

48. 权利要求47所述的方法,其中所述施用经口或通过注射进行。

49. 权利要求48所述的方法,其中所述注射是静脉内注射、皮下注射、腹膜内注射或瘤内注射。

50. 权利要求1至49中任一项所述的方法,其中所述施用每天一次至每六个月一次地进行。

51. 权利要求1至50中任一项所述的方法,其中所述对象是哺乳动物。

52. 权利要求51所述的方法,其中所述对象是人。

53. 权利要求1至52中任一项所述的方法,其中与单独施用所述抗体相比,所述施用导致所述抗体与所述对象中表达NPM1的癌细胞之间的结合提高。

54. 权利要求1至53中任一项所述的方法,其中与单独施用所述抗体相比,所述施用导致所述对象中表达NPM1的癌细胞的生长降低。

55. 权利要求1至54中任一项所述的方法,其中与单独施用所述抗体相比,所述施用导致所述对象中表达NPM1的癌细胞的细胞死亡提高。

56. 组合物,其用于治疗表达核仁磷蛋白1(NPM1)的癌症,所述治疗包括向有此需要的对象施用所述组合物,其中所述组合物包含与NPM1结合的抗体或抗体缀合物以及化学治疗药物。

57. 组合物,其用于治疗表达核仁磷蛋白1(NPM1)的癌症,所述治疗包括向有此需要的对象施用所述组合物,其中所述组合物包含与NPM1结合的抗体或抗体缀合物,并且其中所述对象正在接受或已经接受过采用化学治疗药物的治疗。

58. 组合物,其用于治疗表达核仁磷蛋白1(NPM1)的癌症,所述治疗包括向有此需要的

对象施用所述组合物,其中所述组合物包含化学治疗药物,并且其中所述对象正在接受或已经接受过采用与NPM1结合的抗体或抗体缀合物的治疗。

抗核仁磷蛋白1抗体和抗体缀合物组合治疗

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2022年4月27提交的题为“ANTI-NUCLEOPHOSMIN 1ANTIBODY AND ANTIBODY CONJUGATE COMBINATION THERAPIES”的希腊申请No.20220100349的优先权权益,其内容通过引用整体并入本文。

[0003] 电子序列表的引用

[0004] 电子序列表(C123370245W000-SEQ-VLJ.xml;大小:47,000字节;以及创建日期:2023年4月21日)的内容通过引用整体并入本文。

背景技术

[0005] 核仁磷蛋白1(nucleophosmin 1,NPM1)是通常存在于细胞的核和胞质溶胶中的蛋白质。然而,在某些癌症,例如急性髓系白血病(acute myeloid leukemia,AML)中,NPM1可错误定位至细胞表面。一些癌症的特征还在于NPM1中的突变,这导致突变体NPM1(称为NPM1c)的翻译,与野生型NPM1相比,所述突变体NPM1以甚至更大的量而错误定位至细胞表面。NPM1c突变存在于相当多的患有AML的患者亚群中。

发明内容

[0006] 本公开内容是基于与核仁磷蛋白1(NPM1)特异性结合的抗体的鉴定。这些抗体能够靶向位于细胞(包括癌细胞)表面上的野生型(wild-type,WT)和/或突变体NPM1,并且可用于结合细胞毒性有效载荷并任选地将细胞毒性有效载荷靶向至具有WT和/或突变体NPM1的细胞表面表达的细胞。这些抗体或来源于这些抗体的抗体-药物缀合物(antibody-drug conjugate,ADC)的效力可通过在其之前、同时和/或之后施用化学治疗药物来增强。

[0007] 因此,本公开内容的一些方面涉及治疗表达NPM1的癌症的方法,其包括向有此需要的对象施用有效量的与NPM1结合的抗体或ADC以及化学治疗药物。

[0008] 在一些方面中,本公开内容涉及治疗表达NPM1的癌症的方法,其包括向有此需要的对象施用有效量的与NPM1结合的抗体或ADC,其中对象正在接受或已经接受过采用化学治疗药物的治疗。

[0009] 在一些方面中,本公开内容涉及治疗表达NPM1的癌症的方法,其包括向有此需要的对象施用有效量的化学治疗药物,其中对象正在接受或已经接受过采用与NPM1结合的抗体或ADC的治疗。

[0010] 在一些实施方案中,抗体与WT NPM1结合。在一些实施方案中,抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含含有氨基酸序列NIFVH(SEQ ID NO:1)的重链(heavy chain,HC)互补决定区(complementarity determining region,CDR)1、含有氨基酸序列KIDPANDNTKFAPNFQG(SEQ ID NO:2)的HC CDR2、和含有氨基酸序列DSSGYDAVDY(SEQ ID NO:3)的HC CDR3;所述轻链可变区包含含有氨基酸序列RASESVYTYLA(SEQ ID NO:9)的轻链(light chain,LC)CDR1、含有氨基酸序列NAKTLTE(SEQ ID NO:10)的LC CDR2、和含有氨基酸序列QHGYGTPYT(SEQ ID NO:11)的LC CDR3。在一些实施方案中,重链可变区包含SEQ ID

N0:28中所示氨基酸序列;和/或者轻链可变区包含SEQ ID N0:29中所示氨基酸序列。

[0011] 在一些实施方案中,抗体与突变体NPM1结合。在一些实施方案中,抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含含有氨基酸序列SYAMS (SEQ ID N0:15)的重链(HC)互补决定区(CDR)1、含有氨基酸序列AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID N0:16)的HC CDR2、和含有氨基酸序列WRNNAFDY (SEQ ID N0:17)的HC CDR3;所述轻链可变区包含含有氨基酸序列QGDSLRSYYAS (SEQ ID N0:22)的轻链(LC)CDR1、含有氨基酸序列GKNNRPS (SEQ ID N0:23)的LC CDR2、和含有氨基酸序列NSSPRLKHRVV (SEQ ID N0:24)的LC CDR3。在一些实施方案中,重链可变区包含SEQ ID N0:30中所示氨基酸序列;和/或者轻链可变区中包含SEQ ID N0:31中所示氨基酸序列。

[0012] 在一些实施方案中,抗体是全长抗体或其抗原结合片段。

[0013] 在一些实施方案中,抗体是全长抗体,所述全长抗体选自免疫球蛋白G(IgG)、免疫球蛋白A(IgA)、免疫球蛋白D(IgD)、免疫球蛋白E(IgE)和免疫球蛋白M(IgM)。在一些实施方案中,抗体是IgG。

[0014] 在一些实施方案中,抗体是抗原结合片段,所述抗原结合片段选自Fab片段、F(ab')₂片段、Ig单体、Fd片段、scFv、scAb、dAb、Fv、亲和体(affibody)、双抗体、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。

[0015] 在一些实施方案中,抗体是人抗体或人源化抗体。

[0016] 在一些实施方案中,抗体还包含重链恒定区。在一些实施方案中,重链恒定区包含SEQ ID N0:32或SEQ ID N0:46中所示氨基酸序列。

[0017] 在一些实施方案中,抗体还包含轻链恒定区。在一些实施方案中,轻链恒定区包含SEQ ID N0:33、SEQ ID N0:34或SEQ ID N0:47中所示氨基酸序列。

[0018] 在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID N0:35的氨基酸序列的重链和/或含有SEQ ID N0:37的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID N0:36的氨基酸序列的重链和/或含有SEQ ID N0:38的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID N0:44的氨基酸序列的重链和/或含有SEQ ID N0:45的氨基酸序列的轻链。

[0019] 在一些实施方案中,抗体优先与野生型NPM1结合。在一些实施方案中,抗体优先与突变体NPM1结合。在一些实施方案中,抗体与野生型NPM1和突变体NPM1二者结合。

[0020] 在一些实施方案中,抗体与试剂缀合。

[0021] 在一些实施方案中,试剂是药物。在一些实施方案中,药物选自:澳瑞他汀(auristatin)E、澳瑞他汀F、单甲基澳瑞他汀D(monomethyl auristatin D, MMAD)、单甲基澳瑞他汀F(monomethyl auristatin F, MMAF)、单甲基澳瑞他汀E(monomethyl auristatin E, MMAE)、放线菌素(actinomycin)、放线菌素X2、 α -鹅膏蕈碱(α -amanitin)、 β -鹅膏蕈碱、 γ -鹅膏蕈碱、 ϵ -鹅膏蕈碱、aerophysinin、阿多柔比星(aldoxorubicin)、agrochelin、安莎三烯(ansatrienin)、安丝菌素P-3、阿非迪霉素(aphidicolin)、凋亡素(apoptolidin)、L-天冬酰胺酶、阿扎胞苷(azacitidine)、巴佛洛霉素(bafilomycin)A1、巴佛洛霉素B1、巴佛洛霉素B2、巴佛洛霉素C1、巴佛洛霉素C2、巴佛洛霉素D、巴佛洛霉素E、加利车霉素(calicheamicin)、喜树碱(camptothecin)、毛壳素 chaetocin)、球毛壳菌素(chametoglobosin)、chlamydocin、烬灰红菌素(cinerubin)B、克拉屈滨(cladribine)、秋水仙碱、康普瑞汀(combretastatin)A1、康普瑞汀A4、虫草素(cordycepin)、隐藻素

(cryptophycin)、葫芦素(cucurbitacin)B、葫芦素E、curvulin、环巴胺、环磷酰胺、阿糖胞苷(cytarabine)、更生霉素(dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、地西他滨(decitabine)、地塞米松(dexamethasone)、多拉司他汀(dolastatin)10、多拉司他汀15、倍癌霉素(duocarmycin)SA、倍癌霉素TM、倍癌霉素MA、倍癌霉素DM、多柔比星(doxorubicin)、恩格林(englerin)A、埃博霉素(epothilone)A、埃博霉素B、埃博霉素C、依托泊苷(etoposide)、氟达拉滨(fludarabine)、烟曲霉素(fumagillin)、格尔德霉素(geldanamycin)、坦螺旋霉素(tanespimycin)(17-AAG)、葡萄糖杀粉蝶菌素(glucopiericidin)A、短杆菌肽A、草环氧二烯(herboxidiene)、9-羟基玫瑰树碱、羟基脲、吸水菌酯素(hygrolidin)、寄端霉素(hypothemycin)、伊达比星(idarubicin)、伊利马醌(ilimaquinone)、isatropolone A、isofistularin-3、伊沙匹隆(ixabepilone)、JW55、乳胞素、luisol A、美登醇、美登素(mertansine)(DM1)、美登素(maytansine)DM3、ravtansine(DM4)、美登素类化合物(maytansinoid)AP-3、mechercharmyn A、mensacarcin、甲氨蝶呤、6-巯嘌呤、microcolin B、微囊藻毒素(microcystin)LR、米托蒽醌(mitoxantrone)、muscotoxin A、肌基质蛋白(myoseverin)、mytoxin B、奈拉滨(nelarabine)、奈莫柔比星(nemorubicin)、nocuolin A、冲酯霉素(okilactomycin)、寡霉素A、寡霉素B、紫杉醇、拉洛他赛(larotaxel)、milataxel、奥他赛(ortataxel)、tesetaxel、类鬼笔毒环肽(phallacidin)、鬼笔环肽(phalloidin)、植物鞘氨醇、杀青虫素(piericidin)A、比洛尼素(pironetin)、鬼臼毒素(podophyllotoxin)、聚酮霉素(polyketomycin)、泼尼松(prednisone)、土槿甲酸(pseudolaric acid)B、pseurotin A、puwainaphycin F、吡咯并苯并二氮杂^葎、喹哪朵肽(quinaldopeptin)、雷查霉素(rachelmycin)、雷别卡霉素(rebeccamycin)、Ro 5-3335、番红菌素(safracin)B、山卓霉素(sandramycin)、血根碱(sanguinarine)、皂草毒蛋白(saporin)、西奈芬净(sinefungin)、塔托布林(taltobulin)、特罗他汀(telomestatin)、6-硫鸟嘌呤、硫代秋水仙碱、单歧藻毒素(tolytoxin)、tripolin A、雷公藤甲素(triptolide)、妥布霉素(tubastatin)A、微管溶素(tubulysin)A、微管溶素M、微管溶素IM-1、微管溶素IM-2、微管溶素IM-3、维奈托克(venetoclax)和长春新碱(vincristine)。在一些实施方案中,药物是皂草毒蛋白、柔红霉素或维奈托克。

[0022] 在一些实施方案中,抗体与药物通过接头缀合。

[0023] 在一些实施方案中,接头是可切割接头。在一些实施方案中,接头是pH敏感性接头、谷胱甘肽敏感性接头或蛋白酶可切割接头。在一些实施方案中,可切割接头选自:N-琥珀酰亚胺基4-(2-吡啶基二硫代)戊酸酯(SPP)、N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯(SPDB)、磺基-SPDB、缬氨酸-瓜氨酸(Val-cit)、乙酰丁酸酯、CL2A、马来酰亚胺基己酰基(MC)和Mal-EBE-Mal。

[0024] 在一些实施方案中,接头是不可切割接头。在一些实施方案中,不可切割接头选自:N-琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)和马来酰亚胺基甲基环己烷-1-羧酸酯(MCC)、MC-VC-PAB。

[0025] 在一些实施方案中,抗体与药物的比率为1:1至1:10。在一些实施方案中,抗体与试剂的比率为1:4。

[0026] 在一些实施方案中,试剂是放射性同位素。在一些实施方案中,放射性同位素选自:碘-131、铯-137、钷-147、钷-153、钷-159、钷-161、钷-163、钷-165、钷-167、钷-169、钷-171、钷-173、钷-175、钷-177、钷-179、钷-181、钷-183、钷-185、钷-187、钷-189、钷-191、钷-193、钷-195、钷-197、钷-199、钷-201、钷-203、钷-205、钷-207、钷-209、钷-211、钷-213、钷-215、钷-217、钷-219、钷-221、钷-223、钷-225、钷-227、钷-229、钷-231、钷-233、钷-235、钷-237、钷-239、钷-241、钷-243、钷-245、钷-247、钷-249、钷-251、钷-253、钷-255、钷-257、钷-259、钷-261、钷-263、钷-265、钷-267、钷-269、钷-271、钷-273、钷-275、钷-277、钷-279、钷-281、钷-283、钷-285、钷-287、钷-289、钷-291、钷-293、钷-295、钷-297、钷-299、钷-301、钷-303、钷-305、钷-307、钷-309、钷-311、钷-313、钷-315、钷-317、钷-319、钷-321、钷-323、钷-325、钷-327、钷-329、钷-331、钷-333、钷-335、钷-337、钷-339、钷-341、钷-343、钷-345、钷-347、钷-349、钷-351、钷-353、钷-355、钷-357、钷-359、钷-361、钷-363、钷-365、钷-367、钷-369、钷-371、钷-373、钷-375、钷-377、钷-379、钷-381、钷-383、钷-385、钷-387、钷-389、钷-391、钷-393、钷-395、钷-397、钷-399、钷-401、钷-403、钷-405、钷-407、钷-409、钷-411、钷-413、钷-415、钷-417、钷-419、钷-421、钷-423、钷-425、钷-427、钷-429、钷-431、钷-433、钷-435、钷-437、钷-439、钷-441、钷-443、钷-445、钷-447、钷-449、钷-451、钷-453、钷-455、钷-457、钷-459、钷-461、钷-463、钷-465、钷-467、钷-469、钷-471、钷-473、钷-475、钷-477、钷-479、钷-481、钷-483、钷-485、钷-487、钷-489、钷-491、钷-493、钷-495、钷-497、钷-499、钷-501、钷-503、钷-505、钷-507、钷-509、钷-511、钷-513、钷-515、钷-517、钷-519、钷-521、钷-523、钷-525、钷-527、钷-529、钷-531、钷-533、钷-535、钷-537、钷-539、钷-541、钷-543、钷-545、钷-547、钷-549、钷-551、钷-553、钷-555、钷-557、钷-559、钷-561、钷-563、钷-565、钷-567、钷-569、钷-571、钷-573、钷-575、钷-577、钷-579、钷-581、钷-583、钷-585、钷-587、钷-589、钷-591、钷-593、钷-595、钷-597、钷-599、钷-601、钷-603、钷-605、钷-607、钷-609、钷-611、钷-613、钷-615、钷-617、钷-619、钷-621、钷-623、钷-625、钷-627、钷-629、钷-631、钷-633、钷-635、钷-637、钷-639、钷-641、钷-643、钷-645、钷-647、钷-649、钷-651、钷-653、钷-655、钷-657、钷-659、钷-661、钷-663、钷-665、钷-667、钷-669、钷-671、钷-673、钷-675、钷-677、钷-679、钷-681、钷-683、钷-685、钷-687、钷-689、钷-691、钷-693、钷-695、钷-697、钷-699、钷-701、钷-703、钷-705、钷-707、钷-709、钷-711、钷-713、钷-715、钷-717、钷-719、钷-721、钷-723、钷-725、钷-727、钷-729、钷-731、钷-733、钷-735、钷-737、钷-739、钷-741、钷-743、钷-745、钷-747、钷-749、钷-751、钷-753、钷-755、钷-757、钷-759、钷-761、钷-763、钷-765、钷-767、钷-769、钷-771、钷-773、钷-775、钷-777、钷-779、钷-781、钷-783、钷-785、钷-787、钷-789、钷-791、钷-793、钷-795、钷-797、钷-799、钷-801、钷-803、钷-805、钷-807、钷-809、钷-811、钷-813、钷-815、钷-817、钷-819、钷-821、钷-823、钷-825、钷-827、钷-829、钷-831、钷-833、钷-835、钷-837、钷-839、钷-841、钷-843、钷-845、钷-847、钷-849、钷-851、钷-853、钷-855、钷-857、钷-859、钷-861、钷-863、钷-865、钷-867、钷-869、钷-871、钷-873、钷-875、钷-877、钷-879、钷-881、钷-883、钷-885、钷-887、钷-889、钷-891、钷-893、钷-895、钷-897、钷-899、钷-901、钷-903、钷-905、钷-907、钷-909、钷-911、钷-913、钷-915、钷-917、钷-919、钷-921、钷-923、钷-925、钷-927、钷-929、钷-931、钷-933、钷-935、钷-937、钷-939、钷-941、钷-943、钷-945、钷-947、钷-949、钷-951、钷-953、钷-955、钷-957、钷-959、钷-961、钷-963、钷-965、钷-967、钷-969、钷-971、钷-973、钷-975、钷-977、钷-979、钷-981、钷-983、钷-985、钷-987、钷-989、钷-991、钷-993、钷-995、钷-997、钷-999、钷-1001、钷-1003、钷-1005、钷-1007、钷-1009、钷-1011、钷-1013、钷-1015、钷-1017、钷-1019、钷-1021、钷-1023、钷-1025、钷-1027、钷-1029、钷-1031、钷-1033、钷-1035、钷-1037、钷-1039、钷-1041、钷-1043、钷-1045、钷-1047、钷-1049、钷-1051、钷-1053、钷-1055、钷-1057、钷-1059、钷-1061、钷-1063、钷-1065、钷-1067、钷-1069、钷-1071、钷-1073、钷-1075、钷-1077、钷-1079、钷-1081、钷-1083、钷-1085、钷-1087、钷-1089、钷-1091、钷-1093、钷-1095、钷-1097、钷-1099、钷-1101、钷-1103、钷-1105、钷-1107、钷-1109、钷-1111、钷-1113、钷-1115、钷-1117、钷-1119、钷-1121、钷-1123、钷-1125、钷-1127、钷-1129、钷-1131、钷-1133、钷-1135、钷-1137、钷-1139、钷-1141、钷-1143、钷-1145、钷-1147、钷-1149、钷-1151、钷-1153、钷-1155、钷-1157、钷-1159、钷-1161、钷-1163、钷-1165、钷-1167、钷-1169、钷-1171、钷-1173、钷-1175、钷-1177、钷-1179、钷-1181、钷-1183、钷-1185、钷-1187、钷-1189、钷-1191、钷-1193、钷-1195、钷-1197、钷-1199、钷-1201、钷-1203、钷-1205、钷-1207、钷-1209、钷-1211、钷-1213、钷-1215、钷-1217、钷-1219、钷-1221、钷-1223、钷-1225、钷-1227、钷-1229、钷-1231、钷-1233、钷-1235、钷-1237、钷-1239、钷-1241、钷-1243、钷-1245、钷-1247、钷-1249、钷-1251、钷-1253、钷-1255、钷-1257、钷-1259、钷-1261、钷-1263、钷-1265、钷-1267、钷-1269、钷-1271、钷-1273、钷-1275、钷-1277、钷-1279、钷-1281、钷-1283、钷-1285、钷-1287、钷-1289、钷-1291、钷-1293、钷-1295、钷-1297、钷-1299、钷-1301、钷-1303、钷-1305、钷-1307、钷-1309、钷-1311、钷-1313、钷-1315、钷-1317、钷-1319、钷-1321、钷-1323、钷-1325、钷-1327、钷-1329、钷-1331、钷-1333、钷-1335、钷-1337、钷-1339、钷-1341、钷-1343、钷-1345、钷-1347、钷-1349、钷-1351、钷-1353、钷-1355、钷-1357、钷-1359、钷-1361、钷-1363、钷-1365、钷-1367、钷-1369、钷-1371、钷-1373、钷-1375、钷-1377、钷-1379、钷-1381、钷-1383、钷-1385、钷-1387、钷-1389、钷-1391、钷-1393、钷-1395、钷-1397、钷-1399、钷-1401、钷-1403、钷-1405、钷-1407、钷-1409、钷-1411、钷-1413、钷-1415、钷-1417、钷-1419、钷-1421、钷-1423、钷-1425、钷-1427、钷-1429、钷-1431、钷-1433、钷-1435、钷-1437、钷-1439、钷-1441、钷-1443、钷-1445、钷-1447、钷-1449、钷-1451、钷-1453、钷-1455、钷-1457、钷-1459、钷-1461、钷-1463、钷-1465、钷-1467、钷-1469、钷-1471、钷-1473、钷-1475、钷-1477、钷-1479、钷-1481、钷-1483、钷-1485、钷-1487、钷-1489、钷-1491、钷-1493、钷-1495、钷-1497、钷-1499、钷-1501、钷-1503、钷-1505、钷-1507、钷-1509、钷-1511、钷-1513、钷-1515、钷-1517、钷-1519、钷-1521、钷-1523、钷-1525、钷-1527、钷-1529、钷-1531、钷-1533、钷-1535、钷-1537、钷-1539、钷-1541、钷-1543、钷-1545、钷-1547、钷-1549、钷-1551、钷-1553、钷-1555、钷-1557、钷-1559、钷-1561、钷-1563、钷-1565、钷-1567、钷-1569、钷-1571、钷-1573、钷-1575、钷-1577、钷-1579、钷-1581、钷-1583、钷-1585、钷-1587、钷-1589、钷-1591、钷-1593、钷-1595、钷-1597、钷-1599、钷-1601、钷-1603、钷-1605、钷-1607、钷-1609、钷-1611、钷-1613、钷-1615、钷-1617、钷-1619、钷-1621、钷-1623、钷-1625、钷-1627、钷-1629、钷-1631、钷-1633、钷-1635、钷-1637、钷-1639、钷-1641、钷-1643、钷-1645、钷-1647、钷-1649、钷-1651、钷-1653、钷-1655、钷-1657、钷-1659、钷-1661、钷-1663、钷-1665、钷-1667、钷-1669、钷-1671、钷-1673、钷-1675、钷-1677、钷-1679、钷-1681、钷-1683、钷-1685、钷-1687、钷-1689、钷-1691、钷-1693、钷-1695、钷-1697、钷-1699、钷-1701、钷-1703、钷-1705、钷-1707、钷-1709、钷-1711、钷-1713、钷-1715、钷-1717、钷-1719、钷-1721、钷-1723、钷-1725、钷-1727、钷-1729、钷-1731、钷-1733、钷-1735、钷-1737、钷-1739、钷-1741、钷-1743、钷-1745、钷-1747、钷-1749、钷-1751、钷-1753、钷-1755、钷-1757、钷-1759、钷-1761、钷-1763、钷-1765、钷-1767、钷-1769、钷-1771、钷-1773、钷-1775、钷-1777、钷-1779、钷-1781、钷-1783、钷-1785、钷-1787、钷-1789、钷-1791、钷-1793、钷-1795、钷-1797、钷-1799、钷-1801、钷-1803、钷-1805、钷-1807、钷-1809、钷-1811、钷-1813、钷-1815、钷-1817、钷-1819、钷-1821、钷-1823、钷-1825、钷-1827、钷-1829、钷-1831、钷-1833、钷-1835、钷-1837、钷-1839、钷-1841、钷-1843、钷-1845、钷-1847、钷-1849、钷-1851、钷-1853、钷-1855、钷-1857、钷-1859、钷-1861、钷-1863、钷-1865、钷-1867、钷-1869、钷-1871、钷-1873、钷-1875、钷-1877、钷-1879、钷-1881、钷-1883、钷-1885、钷-1887、钷-1889、钷-1891、钷-1893、钷-1895、钷-1897、钷-1899、钷-1901、钷-1903、钷-1905、钷-1907、钷-1909、钷-1911、钷-1913、钷-1915、钷-1917、钷-1919、钷-1921、钷-1923、钷-1925、钷-1927、钷-1929、钷-1931、钷-1933、钷-1935、钷-1937、钷-1939、钷-1941、钷-1943、钷-1945、钷-1947、钷-1949、钷-1951、钷-1953、钷-1955、钷-1957、钷-1959、钷-1961、钷-1963、钷-1965、钷-1967、钷-1969、钷-1971、钷-1973、钷-1975、钷-1977、钷-1979、钷-1981、钷-1983、钷-1985、钷-1987、钷-1989、钷-1991、钷-1993、钷-1995、钷-1997、钷-1999、钷-2001、钷-2003、钷-2005、钷-2007、钷-2009、钷-2011、钷-2013、钷-2015、钷-2017、钷-2019、钷-2021、钷-2023、钷-2025、钷-2027、钷-2029、钷-2031、钷-2033、钷-2035、钷-2037、钷-2039、钷-2041、钷-2043、钷-2045、钷-2047、钷-2049、钷-2051、钷-2053、钷-2055、钷-2057、钷-2059、钷-2061、钷-2063、钷-2065、钷-2067、钷-2069、钷-2071、钷-2073、钷-2075、钷-2077、钷-2079、钷-2081、钷-2083、钷-2085、钷-2087、钷-2089、钷-2091、钷-2093、钷-2095、钷-2097、钷-2099、钷-2101、钷-2103、钷-2105、钷-2107、钷-2109、钷-2111、钷-2113、钷-2115、钷-2117、钷-2119、钷-2121、钷-2123、钷-2125、钷-2127、钷-2129、钷-2131、钷-2133、钷-2135、钷-2137、钷-2139、钷-2141、钷-2143、钷-2145、钷-2147、钷-2149、钷-2151、钷-2153、钷-2155、钷-2157、钷-2159、钷-2161、钷-2163、钷-2165、钷-2167、钷-2169、钷-2171、钷-2173、钷-2175、钷-2177、钷-2179、钷-2181、钷-2183、钷-2185、钷-2187、钷-2189、钷-2191、钷-2193、钷-2195、钷-2197、钷-2199、钷-2201、钷-2203、钷-2205、钷-2207、钷-2209、钷-2211、钷-2213、钷-2215、钷-2217、钷-2219、钷-2221、钷-2223、钷-2225、钷-2227、钷-2229、钷-2231、钷-2233、钷-2235、钷-2237、钷-2239、钷-2241、钷-2243、钷-2245、钷-2247、钷-2249、钷-2251、钷-2253、钷-2255、钷-2257、钷-2259、钷-2261、钷-2263、钷-2265、钷-2267、钷-2269、钷-2271、钷-2273、钷-2275、钷-2277、钷-2279、钷-2281、钷-2283、钷-2285、钷-2287、钷-2289、钷-2291、钷-2293、钷-2295、钷-2297、钷-2299、钷-2301、钷-2303、钷-2305、钷-2307、钷-2309、钷-2311、钷-2313、钷-2315、钷-2317、钷-2319、钷-2321、钷-2323、钷-2325、钷-2327、钷-2329、钷-2331、钷-2333、钷-2335、钷-2337、钷-2339、钷-2341、钷-2343、钷-2345、钷-2347、钷-2349、钷-2351、钷-2353、钷-2355、钷-2357、钷-2359、钷-2361、钷-2363、钷-2365、钷-2367、钷-2369、钷-2371、钷-2373、钷-2375、钷-2377、钷-2379、钷-2381、钷-2383、钷-2385、钷-2387、钷-2389、钷-2391、钷-2393、钷-2395、钷-2397、钷-2399、钷-2401、钷-2403、钷-2405、钷-2407、钷-2409、钷-2411、钷-2413、钷-2415、钷-2417、钷-2419、钷-2421、钷-2423、钷-2425、钷-2427、钷-2429、钷-2431、钷-2433、钷-2435、钷-2437、钷-2439、钷-2441、钷-2443、钷-2445、钷-2447、钷-2449、钷-2451、钷-2453、钷-2455、钷-2457、钷-2459、钷-2461、钷-2463、钷-2465、钷-2467、钷-2469、钷-2471、钷-2473、钷-2475、钷-2477、钷-2479、钷-2481、钷-2483、钷-2485、钷-2487、钷-2489、钷-2491、钷-2493、钷-2495、钷-2497、钷-2499、钷-2501、钷-2503、钷-2505、钷-2507、钷-2509、钷-2511、钷-2513、钷-2515、钷-2517、钷-2519、钷-2521、钷-2523、钷-2525、钷-2527、钷-2529、钷-2531、钷-2533、钷-2535、钷-2537、钷-2539、钷-2541、钷-2543、钷-2545、钷-2547、钷-2549、钷-2551、钷-2553、钷-2555、钷-2557、钷-2559、钷-2561、钷-2563、钷-2565、钷-2567、钷-2569、钷-2571、钷-2573、钷-2575、钷-2577、钷-2579、钷-2581、钷-2583、钷-2585、钷-2587、钷-2589、钷-2591、钷-2593、钷-2595、钷-2597、钷-2599、钷-2601、钷-2603、钷-2605、钷-2607、钷-2609、钷-2611、钷-2613、钷-2615、钷-2617、钷-2619、钷-2621、钷-2623、钷-2625、钷-2627、钷-2629、钷-2631、钷-2633、钷-2635、钷-2637、钷-2639、钷-2641、钷-2643、钷-2645、钷-2647、钷-2649、钷-2651、钷-2653、钷-2655、钷-2657、钷-2659、钷-2661、钷-2663、钷-2665、钷-2667、钷-2669、钷-2671、钷-2673、钷-2675、钷-2677、钷-2679、钷-2681、钷-2683、钷-2685、钷-2687、钷-2689、钷-2691、钷-2693、钷-2695、钷-2697、钷-2699、钷-2701、钷-2703、钷-2705、钷-2707、钷-2709、钷-2711、钷-2713、钷-2715、钷-2717、钷-2719、钷-2721、钷-2723、钷-2725、钷-2727、钷-2729、钷-2731、钷-2733、钷-2735、钷-2737、钷-2739、钷-2741、钷-2743、钷-2745、钷-2747、钷-2749、钷-2751、钷-2753、钷-2755、钷-2757、钷-2759、钷-2761、钷-2763、钷-2765、钷-2767、钷-2769、钷-2771、钷-2773、钷-2775、钷-2777、钷-2779、钷-2781、钷-2783、钷-2785、钷-2787、钷-2789、钷-2791、钷-2793、钷-2795、钷-2797、钷-2799、钷-2801、钷-2803、钷-2805、钷-2807、钷-2809、钷-2811、钷-2813、钷-2815、钷-2817、钷-2819、钷-2821、钷-2823、钷-2825、钷-2827、钷-2829、钷-2831、钷-2833、钷-2835、钷-2837、钷-2839、钷-2841、钷-2843、钷-2845、钷-2847、钷-2849、钷-2851、钷-2853、钷-2855、钷-2857、钷-2859、钷-2861、钷-2863、钷-2865、钷-2867、钷-2869、钷-2871、钷-2873、钷-2875、钷-2877、钷-2879、钷-2881、钷-2883、钷-2885、钷-2887、钷-2889、钷-2891、钷-2893、钷-2895、钷-2897、钷-2899、钷-2901、钷-2903、钷-2905、钷-2907、钷-2909、钷-2911、钷-2913、钷-2915、钷-2917、钷-2919、钷-2921、钷-2923、钷-2925、钷-2927、钷-2929、钷-2931、钷-2933、钷-2935、钷-2937、钷-2939、钷-2941、钷-2943、钷-2945、钷-2947、钷-2949、钷-2951、钷-2953、钷-2955、钷-2957、钷-2959、钷-2961、钷-2963、钷-2965、钷-2967、钷-2969、钷-2971、钷-2973、钷-2975、钷-2977、钷-2979、钷-2981、钷-2983、钷-2985、钷-2987、钷-2989、

[0027] 在一些实施方案中,表达NPM1的癌症是其中NPM1在癌细胞表面上表达的癌症。在一些实施方案中,表达NPM1的癌症是这样的癌症:其中由于施用化学治疗药物或用化学治疗药物进行治疗,使得NPM1在癌细胞的表面上表达。在一些实施方案中,表达NPM1的癌症是其中野生型NPM1和/或突变体NPM1在癌细胞表面上表达的癌症。

[0028] 在一些实施方案中,癌症是实体癌或液体癌症,所述实体癌或液体癌症选自:血液学癌症、肺癌、乳腺癌、脑癌、胃肠癌、肝癌、肾癌、膀胱癌、胰腺癌、卵巢癌、睾丸癌、前列腺癌、子宫内膜癌、肌肉癌、骨癌、神经内分泌癌、结缔组织癌、头颈癌或皮肤癌。在一些实施方案中,癌症选自:急性髓系白血病(AML)、急性早幼粒细胞白血病(acute promyeloid leukemia,APL)、急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia,ALL)、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)和骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome,MDS)。在一些实施方案中,癌症是转移性癌症。在一些实施方案中,癌症是治疗相关癌症或继发性恶性病。在一些实施方案中,癌症是治疗相关AML(therapy-related AML,t-AML)或非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)的继发性恶性病。

[0029] 在一些实施方案中,化学治疗药物选自:澳瑞他汀E、澳瑞他汀F、单甲基澳瑞他汀D(MMAD)、单甲基澳瑞他汀F(MMAF)、单甲基澳瑞他汀E(MMAE)、放线菌素、放线菌素X2、 α -鹅膏蕈碱、 β -鹅膏蕈碱、 γ -鹅膏蕈碱、 ϵ -鹅膏蕈碱、aerophysinin、阿多柔比星、agrochelin、安莎三烯、安丝菌素P-3、阿非迪霉素、凋亡素、L-天冬酰胺酶、阿扎胞苷、巴佛洛霉素A1、巴佛洛霉素B1、巴佛洛霉素B2、巴佛洛霉素C1、巴佛洛霉素C2、巴佛洛霉素D、巴佛洛霉素E、加利车霉素、喜树碱、毛壳素、球毛壳菌素、chlamydocin、烬灰红菌素B、克拉屈滨、秋水仙碱、康普瑞汀A1、康普瑞汀A4、虫草素、隐藻素、葫芦素B、葫芦素E、curvulin、环巴胺、环磷酰胺、阿糖胞苷、更生霉素、柔红霉素、地西他滨、地塞米松、多拉司他汀10、多拉司他汀15、倍癌霉素SA、倍癌霉素TM、倍癌霉素MA、倍癌霉素DM、多柔比星、恩格林A、埃博霉素A、埃博霉素B、埃博霉素C、依托泊苷、氟达拉滨、烟曲霉素、格尔德霉素、坦螺旋霉素(17-AAG)、葡糖杀粉蝶菌素A、短杆菌肽A、草环氧二烯、9-羟基玫瑰树碱、羟基脲、吸水菌酯素、寄端霉素、伊达比星、伊利马醌、isatropolone A、isofistularin-3、伊沙匹隆、JW55、乳胞素、luisol A、美登醇、美登素(DM1)、美登素DM3、ravtansine(DM4)、美登素类化合物AP-3、mechercharmyn A、mensacarcin、甲氨蝶呤、6-巯嘌呤、microcolin B、微囊藻毒素LR、米托蒽醌、muscotoxin A、肌基质蛋白、mytoxin B、奈拉滨、奈莫柔比星、nocuolin A、冲酯霉素、寡霉素A、寡霉素B、紫杉醇、拉洛他赛、milataxel、奥他赛、tesetaxel、类鬼笔毒环肽、鬼笔环肽、植物鞘氨醇、杀青虫素A、比洛尼素、鬼臼毒素、聚酮霉素、泼尼松、土槿甲酸B、pseurotin A、puwainaphycin F、吡咯并苯并二氮杂葑、喹哪朵肽、雷查霉素、雷别卡霉素、Ro 5-3335、番红菌素B、山卓霉素、血根碱、皂草毒蛋白、西奈芬净、塔托布林、特罗他汀、6-硫鸟嘌呤、硫代秋水仙碱、单歧藻毒素、tripolin A、雷公藤甲素、妥布霉素A、微管溶素A、微管溶素M、微管溶素IM-1、微管溶素IM-2、微管溶素IM-3、维奈托克和长春新碱。在一些实施方案中,化学治疗药物是皂草毒蛋白、柔红霉素、维奈托克或阿扎胞苷。

[0030] 在一些实施方案中,化学治疗药物是癌症对其具有抗性的化学治疗药物。

[0031] 在一些实施方案中,施用全身地或局部地进行。在一些实施方案中,施用通过注射进行。在一些实施方案中,注射是静脉内注射、皮下注射、腹膜内注射或瘤内注射。在一些实施方案中,施用经口进行。

[0032] 在一些实施方案中,施用进行多于一次。在一些实施方案中,施用每天一次至每六个月一次地进行。

[0033] 在一些实施方案中,对象是哺乳动物。在一些实施方案中,对象是人。

[0034] 在一些实施方案中,与单独施用抗体相比,所述施用导致抗体与对象的表达NPM1的癌细胞之间的结合提高。

[0035] 在一些实施方案中,与单独施用抗体相比,所述施用导致对象中表达NPM1的癌细胞的生长降低。

[0036] 在一些实施方案中,与单独施用抗体相比,所述施用导致对象中表达NPM1的癌细胞的细胞死亡提高。

[0037] 本公开内容的另一些方面涉及用于治疗与表达细胞表面核仁磷蛋白1 (NPM1) 的细胞相关的疾病的方法,所述方法包括向有此需要的对象施用有效量的与NPM1结合的本文中所述的抗体或缀合物。

[0038] 本公开内容的另一些方面涉及组合物,其用于治疗表达NPM1的癌症,所述治疗包括向有此需要的对象施用组合物,其中组合物包含与NPM1结合的抗体或抗体缀合物以及化学治疗药物。

[0039] 本公开内容的另一些方面涉及组合物,其用于治疗表达NPM1的癌症,所述治疗包括向有此需要的对象施用组合物,其中组合物包含与NPM1结合的抗体或抗体缀合物,并且对象正在接受或已经接受过采用化学治疗药物的治疗。

[0040] 本公开内容的另一些方面涉及组合物,其用于治疗表达NPM1的癌症,所述治疗包括向有此需要的对象施用组合物,其中组合物包含化学治疗药物,并且对象正在接受或已经接受过采用与NPM1结合的抗体或抗体缀合物的治疗。

附图说明

[0041] 附图并非旨在按比例绘制。在附图中,在不同图中示出的每个相同或几乎相同的组件由相同的数字表示。出于清楚的目的,可能不会在每幅附图中都标记每个组件。

[0042] 在附图中:

[0043] 图1A至1E示出了NPM1定位于癌细胞类型的表面。图1A示出了从多种人白血病细胞系收集的胞质和膜级分中的WT NPM1和突变体NPM1的免疫印迹。图1B示出了人白血病细胞系中NPM1表面表达的FACS分析。图1C和1D示出了在鼠骨髓 (bone marrow, BM) 或外周血 (peripheral blood, PB) 细胞的表面上表达的相对低水平的NPM1。图1E示出了FACS分析, NPM1在健康人BM细胞上不会稳建表达。FACS分析用分离的抗NPM1抗体,如图2A和图2B所示,以及商业抗NPM1抗体 (Santa Cruz Biotechnology抗WT NPM1#sc-32256) 进行。

[0044] 图2A和2B示出了抗NPM1抗体的制备。图2A示出了与WT NPM1结合的抗体的分离。图2B示出了与突变体NPM1结合的抗体的分离。

[0045] 图3A和3B示出了抗NPM1-ADC对人癌细胞具有毒性。图3A示出了包含对WT NPM1具有特异性的抗体的ADC对OCI-AML3细胞的细胞毒性。链霉亲和素-皂草毒蛋白 (saporin) 与生物素化的抗WT NPM1或抗小鼠IgG结合,在此之后将复合物添加至OCI-AML3细胞并孵育24小时。在孵育之后,洗涤细胞并通过FACS分析细胞杀伤。图3B示出了与图3A相同的情况,其中孵育48小时。

[0046] 图4A和4B示出了NPM1在哺乳动物物种之间是高度保守的。图4A示出了描述人与鼠NPM1氨基酸序列(SEQ ID NO:39至40)之间保守性的成对比对。图4B示出了描述人与恒河猴(Rhesus macaque)NPM1氨基酸序列(SEQ ID NO:39和41)之间保守性的成对比对。

[0047] 图5A至5C示出了NPM1存在于人AML细胞系和原代鼠AML细胞的表面上。图5A示出了抗NPM1抗体(Merck/Sigma抗B23#B0556)与位于人OCI-AML3细胞和MOLM13细胞表面上的NPM1的结合。在活细胞和经固定细胞二者中测定与NPM1的结合。OCI-AML3细胞表达突变体NPM1,而MOLM13细胞表达相对较低量的WT NPM1。图5B和图5C示出了抗NPM1抗体(Merck/Sigma抗B23#B0556)与位于经固定原代鼠MLL-AF4/FLT3^{1td/+}、MLL-AF9/FLT3^{1td/+}、MLL-ENL/FLT3^{1td/+}和Npm1c/FLT3^{1td/+} AML细胞表面上的NPM1的结合。

[0048] 图6A至6F示出了NPM1c(突变体NPM1)存在于人髓性白血病细胞系的表面。图6A示出了抗TY1标签抗体(Diagenode TY1#C15200054)结合表达TY1标记的WT NPM1或TY1标记的NPM1c的人K562髓性白血病细胞的表面。图6B将图6A中的数据示出为单独的图,其中定量了由TY1抗体和抗NPM1抗体(Merck/Sigma抗B23#B0556)阳性结合的细胞的百分比。图6C示出了抗NPM1抗体(Diagenode TY1#C15200054;Merck/Sigma抗B23#B0556)与胞内WT NPM1和突变体NPM1以及细胞表面WT NPM1和突变体NPM1的结合。相关细胞表达空的TY1慢病毒载体、TY1标记的NPM1野生型慢病毒载体或TY1标记的NPM1c慢病毒载体。图6D示出了抗NPM1抗体(Diagenode TY1#C15200054;Merck/Sigma抗B23#B0556)与胞内WT NPM1和突变体NPM1之间的结合。相关细胞表达空的TY1慢病毒载体、TY1标记的NPM1野生型慢病毒载体或TY1标记的NPM1c慢病毒载体。图6E示出了抗NPM1抗体(Diagenode TY1#C15200054;Merck/Sigma抗B23#B0556)与K562细胞或MOLM13细胞(阴性对照)表面上的WT NPM1和突变体NPM1之间的结合。相关细胞表达空的TY1慢病毒载体、TY1标记的NPM1野生型慢病毒载体或TY1标记的NPM1c慢病毒载体。图6F示出了描述抗NPM1抗体(Diagenode TY1#C15200054;Merck/Sigma抗B23#B0556)与K562细胞或MOLM13细胞(阴性对照)表面上的WT NPM1和突变体NPM1之间的结合的免疫荧光。相关细胞表达空的TY1慢病毒载体、TY1标记的NPM1野生型慢病毒载体或TY1标记的NPM1c慢病毒载体。

[0049] 图7A和7B示出了抗NPM1抗体与原代鼠AML细胞表面上的NPM1结合。图7A示出了分离的WT抗NPM1抗体和突变体抗NPM1抗体与位于原代鼠MLL重排的(MLL-rearranged, MLL-r) AML细胞表面上的NPM1之间的结合。图7B示出了分离的WT抗NPM1抗体和突变体抗NPM1抗体与位于原代鼠NPM1c AML细胞表面上的NPM1之间的结合。

[0050] 图8A至8D示出了抗NPM1抗体与在鼠模型中植入的人AML患者来源的异种移植瘤(patient-derived xenograft, PDX)表面上的NPM1结合。图8A示出了分离的WT抗NPM1抗体和突变体抗NPM1抗体与位于PDX-1细胞(MLL-r)表面上的NPM1之间的结合。与PDX-1细胞相反,宿主(小鼠)骨髓细胞(下图)示出了相对低的结合。图8B示出了分离的WT抗NPM1抗体和突变体抗NPM1抗体与位于PDX-2(NPM1c)细胞表面上的NPM1之间的结合。图8C示出了分离的WT抗NPM1抗体和突变体抗NPM1抗体与位于PDX-3(MLL-r, BCOR)细胞表面上的NPM1之间的结合。图8D示出了分离的WT抗NPM1抗体和突变体抗NPM1抗体与位于PDX-4(DNMT3A, N/KRAS)细胞表面上的NPM1之间的结合。

[0051] 图9A至9D示出了用于治疗AML的化学治疗药物与靶向细胞表面NPM1的抗体之间的协同作用。图9A示出了在用10nM柔红霉素或40nM维奈托克处理之后,尤其是在处理后8天之

后,抗NPM1抗体(Merck/Sigma anti-B23#B0556)与维奈托克抗性AML细胞系OCI-AML3表面上的NPM1之间的结合提高。图9B示出了在用10nM柔红霉素或40nM维奈托克处理之后8天,图9A中所示FACS分析的单独重复。图9C示出了在用10nM柔红霉素或40nM维奈托克处理之后,尤其是在处理后8天之后,分离的抗NPM1抗体(图2A和图2B)与OCI-AML3表面上的NPM1之间的结合提高。图9D示出了在用40nM 5-氮杂胞苷(5-Aza)处理之后,抗NPM1抗体((Merck/Sigma anti-B23#B0556))或分离的抗NPM1抗体(图2A和图2B)与OCI-AML3表面上的NPM1之间的结合提高。

[0052] 图10A至10B示出了来自细胞系OCI-AML3的同种型和NPM1的胞内和细胞表面染色(图10A)以及来自四种细胞系的生化级分(胞质溶胶和膜级分)的变性蛋白凝胶和western印迹(western blotting,WB)(图10B)。

[0053] 图11A至11B示出了用抗NPM1抗体(AF647信号)对培养的人悬浮细胞系(图11A)和原代鼠细胞系(图11B)进行的活细胞染色的结果。

[0054] 图12A至12B示出了在用不可透过细胞的生物素化试剂进行细胞表面生物素化之后的细胞的western印迹。western印迹检测这些细胞的膜级分中的NPM1,并且NPM1 IP能够更稳健地富集来自膜裂解物中的NPM1(图12A)。对来自这些级分(细胞表面暴露的蛋白质)的生物素信号的检查表明了NPM1 IP中单一条带的分离(图12B),这表明全长NPM1暴露于活细胞的表面。

[0055] 图13A至13B是对HL-60和OCI-AML3二者(图13A)与黏附细胞系PANC1(图13B)的细胞表面的抗NPM1染色的衍射限制(diffraction limited,DL)和超分辨率重建(resolution reconstruction,SR)。细胞表面NPM1显示为不同的簇。

[0056] 图14是用Ab2.2或可商购获得的NPM1抗体染色的活的(顶部)或经固定和透化的(底部)OCI-AML3细胞的荧光图像。

[0057] 图15A至15B示出了用Ab2.2染色并针对造血系统的多种标志物进行分选的三个健康供体骨髓样品。Ab2.2部分地与CD33+细胞结合,但是未观察到与CD34+(HSC)细胞的结合。图15B通过western印迹示出了商业抗NPM1抗体的结合以及Ab2.2与蛋白质裂解物样品的结合。条带图案是相同的。

[0058] 图16是描述12名AML患者样品的表。

[0059] 图17A至17B示出了12名AML的流式细胞术分析。

[0060] 图18是描述从15名AML患者收集的样品的表。

[0061] 图19A至19E示出了15名AML患者的流式细胞术分析。

[0062] 图20A至20B示出了如何在体内评估Ab2.2的毒性。图20A是实验方案的示意图。图20B是重量结果,以及来自WBC、PLT和HGB的血液样品分析的结果。

[0063] 图21A至21G示出了如何在体内评估Ab2.2处理的效力。图21A是实验设计的示意图。图21B示出了与该AML模型结合的抗体。图21C示出了WBC计数。图21D是来自AML等位基因的qPCR分析的结果。图21E示出了经IgG和Ab2.2处理的小鼠的脾以及脾的重量。图21F是血液样品的HGB和HCT分析的结果。图21G示出了来自存活测定的结果。

[0064] 图22A至22C示出了如何对小鼠进行亚致死辐照和原代鼠AML细胞移植以评估效力(效力模型2)。图22A是实验设计的示意图。图22B示出了抗体结合。图22C示出了来自存活测定的结果。

[0065] 图23A至23I示出了用Ab2.2处理降低了移植模型中的肿瘤负荷。图23A示出的是实验设计的示意图。图23B是经IgG或Ab2.2处理的小鼠的脾、肺和肝的重量。图23C示出了来自存活测定的结果。图23D至23E示出了流式细胞术结果。图23F是来自血液样品的WBC计数和PLT水平。图23G示出了WBC随时间的变化。图23H示出了经IgG或Ab2.2处理的小鼠的脾的图像和脾的重量的图。图23I示出了BM和PB中的AML%。

[0066] 图24A至24B示出了Ab2.2的肿瘤杀伤活性的免疫依赖性；它依赖于完整的免疫系统。图24A示出了实验设计。图24B示出了经Ab2.2或IgG处理的小鼠的存活曲线。

[0067] 图25A至25C示出了Ab2.2的实体瘤活性。图25A示出了实验设计。图25B示出了在第10天和第13天的肿瘤体积。图25C示出了从第7天至第13天肿瘤体积随时间的变化。

[0068] 图26A至26B示出了用亚致死辐照和Ab2.2处理的野生型健康小鼠没有表现出Ab2.2处理的可观察到的作用。图26A示出了实验设计。图26B示出了来自血液样品的重量和WBC计数、HGB和PLT分析。

[0069] 图27A至27D示出了使用流式细胞术分析的多种癌细胞类型的体外模型，以评估Ab2.2与人或鼠肿瘤结合的能力。

[0070] 图28示出了在单一Dmmt3a R882H突变体细胞(白血病前期细胞)上的Npm1c的高的表面检测。

[0071] 图29示出了NPM1如何在一些模型中可充当ADC靶标。用阴性对照、同种型皂草毒蛋白缀合物或Ab2.2-皂草毒蛋白缀合物处理OCI-AML3细胞，以用ADC评估Ab2.2的体外活性。

[0072] 图30A至30C示出了Ab2.2在人AML细胞系的移植模型中延长了寿命。图30A是实验设计的示意图。图30B示出了使用流式细胞术的抗体结合。图30C是存活测定的结果的图。

[0073] 图31A至31C示出了Ab2.2在人AML-PDX细胞系的移植模型中延长了寿命。图31A是实验设计的示意图。图31B示出了使用流式细胞术的抗体结合。图31C是存活测定的结果的图。

[0074] 图32示出了OCI-AML3细胞如何暴露于对照或低剂量化学治疗处理。

[0075] 图33示出了暴露于低剂量化学治疗剂(柔红霉素、维奈托克)的未经转化细胞类型(HPC7、HOXB8)的体外模型。在48和72小时内使用流式细胞术分析细胞。

具体实施方式

[0076] 本公开内容的一些方面基于对核仁磷蛋白1(NPM1)(也称为核仁磷蛋白B23或numatrin)具有特异性的发现抗体，所述核仁磷蛋白1可用于将物质(例如，化学治疗药物、放射性同位素)靶向至对象中的某些细胞类型(例如，癌细胞)。不希望受理论的束缚，NPM1是通常与单链和双链核酸结合并且存在于细胞的核和胞质溶胶中的多功能蛋白质。然而，当某些细胞类型暴露于细胞应激(例如癌性转化)时，相反大量NPM1可错误地定位于它们暴露于胞外环境的细胞表面。尽管细胞膜定位的NPM1的增加可发生于任何类型的癌症中，但由于编码NPM1的基因中发生的突变，这种增加在白血病(例如，急性髓系白血病(AML))中尤其常见。作为这种突变的结果，许多患者的白血病(例如，AML)细胞开始表达NPM1的突变体变体，称为NPM1c，其从核错误定位至胞质，在胞质中其被运输至细胞膜并暴露于胞外环境。已知NPM1c也仅出现在癌细胞中，因为它驱动AML中的恶性转化。原则上，对野生型NPM1或突变体NPM1(NPM1c)具有特异性的抗体或其他物质可与细胞毒性有效载荷缀合并用于靶向癌

细胞。另外,NPM1特异性抗体本身在与癌细胞结合时可足以刺激抗体依赖性细胞毒性 (antibody dependent cellular cytotoxicity,ADCC) 或抗体依赖性细胞吞噬 (antibody dependent cell phagocytosis,ADCP),而不与细胞毒性有效载荷缀合。然而,尽管对NPM1具有特异性的抗体是可商购获得的,但缺乏可有效与活细胞表面上的野生型NPM1和/或突变体NPM1结合的抗体。另外,大多数可商购获得的抗NPM1抗体是多克隆的,并且目前不存在可用的与NPM1c结合的单克隆抗体。因此,已经开发了新的抗体,其能够有效且特异性地与细胞(包括癌细胞)表面上的野生型NPM1和突变体NPM1结合。这些抗体及其分子缀合物(例如,抗体-药物缀合物)可用于检测和治疗在其细胞表面上表达NPM1的癌症,并且可用于治疗患有癌症(针对所述癌症没有已知的有效治疗)的对象。

[0077] 结合NPM1的抗体

[0078] 本公开内容提供了与NPM1结合的抗体,例如,野生型(WT)NPM1或突变体NPM1。这样的抗体对WT NPM1的亲合力可高于对突变体NPM1的亲合力,或者对突变体NPM1的亲合力可高于对WT NPM1的亲合力。

[0079] 本文中使用的术语“抗体”是指能够通过抗原上的至少一个识别位点与靶标(称为“抗原”,例如但不限于蛋白质或肽)特异性结合的免疫球蛋白分子。本文中使用的术语“抗体”包括全长免疫球蛋白分子(具有两条重链和两条轻链的免疫球蛋白,例如单克隆或多克隆全长抗体)及其抗原结合片段二者,例如但不限于嵌合抗体、双抗体、线性抗体、纳米抗体、单链抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、或保留对抗原的特异性结合的另外的抗原结合片段。“免疫球蛋白(Ig)”是主要由浆细胞产生的大的Y形蛋白质,其由免疫系统用于中和外源物质(例如,病原体,例如细菌和病毒)。“抗体片段”包括任何抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或其单链。在一些实施方案中,“抗体”是指包含通过二硫键互相连接的至少两条重(heavy,H)链和两条轻(light,L)链的糖蛋白或其抗原结合部分。每条重链由重链可变区(本文中缩写为 V_H)和重链恒定区构成。重链恒定区由三个结构域 C_H1 、 C_H2 和 C_H3 构成。每条轻链由轻链可变区(本文中缩写为 V_L)和轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 构成。 V_H 和 V_L 区可进一步细分成称为互补决定区(complementarity determining region,CDR)的高变区,散布有称为框架区(framework region,FR)的更保守的区域。每个 V_H 和 V_L 由三个CDR和四个FR构成,其从氨基端至羧基端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区包含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,所述宿主组织或因子包括免疫系统的多种细胞(例如,效应细胞)和经典补系统的第一组分(C1q)。在一些实施方案中,抗体是免疫球蛋白(Ig)单体。抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。

[0080] 在一些实施方案中,抗体是由两条相同的L链和两条H链构成的异四聚体糖蛋白(IgM抗体由5个基础异四聚体单元和称为J链的另外的多肽组成,并因此包含10个抗原结合位点,而分泌的IgA抗体可聚合以形成包含2至5个基础4链单元和J链的多价聚集体)。在IgG的情况下,4链单元通常为约150,000道尔顿。每条L链通过一个共价二硫键与H链连接,而两条H链则根据H链同种型通过一个或更多个二硫键彼此连接。每条H和L链还具有规则间隔的链内二硫桥。每条H链在N端具有可变结构域(variable domain, V_H),随后是对于每个 α 和 γ 链的三个恒定结构域(constant domain, C_H)以及对于 μ 和 ϵ 同种型的四个 C_H 结构域。每条L链在N端具有可变结构域(variable domain, V_L),随后是在其另一端的恒定结构域(constant

domain, C_L)。 V_L 与 V_H 对齐, 并且 C_L 与重链的第一恒定结构域对齐。认为特定的氨基酸残基在轻链与重链可变结构域之间形成界面。 V_H 和 V_L 的配对一起形成单一抗原结合位点。对于不同类别抗体的一些非限制性实例的结构和特性, 参见, 例如, Basic and Clinical Immunology, 第8版, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, 第71页和第6章, 其通过引用并入本文。在一些实施方案中, 抗体是 IgG。

[0081] 来自任何脊椎动物物种的L链可基于其恒定结构域的氨基酸序列分配为两种明显不同的类型(称为 κ 和 λ)之一。根据其重链的恒定结构域(C_H)的氨基酸序列, 免疫球蛋白可分配为不同类别或同种型。存在五类免疫球蛋白: 具有分别命名为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 的重链的IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。基于 C_H 序列和功能中相对较小的差异, 将 γ 和 α 类进一步分为亚类, 例如, 人表达以下亚类: IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。

[0082] V结构域介导抗原结合并限定特定抗体对其特定抗原的特异性。然而, 可变性不是均匀地分布于可变结构域的110个氨基酸跨度(span)中。相反, V区由15至30个氨基酸的称为框架区(FR)的相对不变的区段(stretch)组成, 所述相对不变的区段被每个9至12个氨基酸长的称为“高变区”的极度可变的较短区域分隔。天然重链和轻链的可变结构域各自包含通过被形成环连接的三个高变区连接的四个FR, 所述四个FR主要采用 β -片层构型, 并且在一些情况下形成 β -片层结构的一部分。每条链中的高变区通过FR紧密贴近地保持在一起, 并且与来自其他链的高变区一起有助于抗体的抗原结合位点的形成(参见, 例如, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), 其通过引用并入本文)。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合, 但表现出多种效应物功能, 例如使抗体参与抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和/或抗体依赖性细胞吞噬(ADCP)。

[0083] 在一些实施方案中, 抗体是单克隆抗体。“单克隆抗体”是从基本上均质的抗体的群中获得的抗体, 即, 除了可能以少量存在的天然存在的突变以外, 包含单独抗体的该群是相同的。单克隆抗体是高度特异性的, 针对单一抗原位点。此外, 与包含针对不同决定子(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反, 每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定子。除它们的特异性之外, 单克隆抗体的优点还在于其可被合成而不受其他抗体的污染。修饰语“单克隆”不应被解释为要求通过任何特定方法产生抗体。例如, 本发明中可用的单克隆抗体可通过最初由Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)描述的杂交瘤方法来制备, 或者可使用重组DNA方法在细菌、真核动物或植物细胞中制备(参见, 例如美国专利No. 4,816,567)。单克隆抗体还可例如使用Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)和Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)描述的技术从噬菌体抗体库中分离, 其通过引用并入本文。

[0084] 本文中所述的单克隆抗体涵盖“嵌合”抗体, 其中重链和/或轻链的一部分与来源于特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的对应序列相同或同源, 而所述链的其余部分与来源于另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体以及这样的抗体的片段中的对应序列相同或同源, 只要它们表现出期望的生物活性即可(参见美国专利No. 4,816,567; 和 Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984))。本文中的目的嵌合抗体包括包含来源于非人灵长类(例如, 旧大陆猴(Old World Monkey)、猿(Ape)等)的可变结

构域抗原结合序列和人恒定区序列的“灵长类化”抗体。

[0085] 在一些实施方案中,抗体是多克隆抗体。“多克隆抗体”是与抗原的多于一个免疫原性决定子反应的不同抗体分子的混合物。多克隆抗体可从哺乳动物的血液、分泌物或其他流体或者从卵中分离或纯化。多克隆抗体也可以是重组的。重组多克隆抗体是通过使用重组技术产生的多克隆抗体。重组产生的多克隆抗体通常包含高浓度的不同抗体分子,其全部或大部分(例如,多于80%、多于85%、多于90%、多于95%、多于99%或更多)都对由多于一个表位构成的抗原显示出所期望的结合活性。

[0086] 在一些实施方案中,抗体被“人源化”以在人中使用(例如,作为治疗剂)。非人(例如,啮齿动物)抗体的“人源化”形式是包含最小的来源于非人抗体之序列的嵌合抗体。人源化抗体是人免疫球蛋白(接受体抗体),其中来自接受体的高变区的残基被来自具有期望的抗体特异性、亲和力和容量的非人物种(供体抗体)(例如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类)的高变区的残基替代。在一些情况下,人免疫球蛋白的框架区(FR)残基被相应的非人残基替代。此外,人源化抗体可包含不存在于接受体抗体或供体抗体中的残基。进行这些修饰以进一步改善抗体性能。通常来说,人源化抗体将包含至少一个并且通常是两个可变结构域的基本上全部,其中高变环的全部或基本上全部对应于非人免疫球蛋白的高变环,并且FR的全部或基本上全部是人免疫球蛋白序列的FR。人源化抗体还任选地将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)(通常是人免疫球蛋白的恒定区)的至少一部分。对于另外的细节,参见Jones et al., Nature 321:522-525(1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329(1988); 和Presta, Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992)。

[0087] 本公开内容的一些方面涉及与NPM1结合的抗体。这样的抗体可优先与WT NPM1或突变体NPM1结合。术语“优先结合”是指与特定抗原的结合比与其他抗原的结合的发生更频繁、更高速、持续时间更长和/或亲和力更高。术语“优先结合”和“特异性结合”可互换使用。术语“优先结合”和“特异性结合”不一定表示排他性结合,即优先与抗原结合的抗体可与或可不与一种或更多种其他抗原结合。在一些实施方案中,本文中所述的抗体可与或可不与特定抗原的其他形式(变体)结合。在一些实施方案中,与WT NPM1结合的抗体可与或可不与包含一个或更多个氨基酸插入、缺失或替换的NPM1变体(即,突变体NPM1)结合,并且包含一个或更多个氨基酸插入、缺失或替换的NPM1变体(即,突变体NPM1)可与或可不与WT NPM1结合。

[0088] 本文中使用的“野生型NPM1”或“WT NPM1”是指NPM1蛋白,其包含与完整的、全功能NPM1的公认参考序列相同的氨基酸序列。例如,WT NPM1可以由编码WT NPM1(NCBI参考序列:NG_016018.1)的基因表达的NPM1同种型(例如,NCBI参考序列:NP_001341935.1)。本文中使用的“突变体NPM1”是指相对于WT NPM1序列,包含含有一个或更多个氨基酸插入、缺失或替换的氨基酸序列的NPM1蛋白。例如,相对于WT NPM1序列,突变体NPM1可包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个氨基酸插入、缺失或替换。与WT NPM1相比,突变体NPM1可具有降低的活性和/或改变的亚细胞定位。本文中所述的WT NPM1或突变体NPM1可以是哺乳动物WT NPM1或哺乳动物突变体NPM1。在一些实施方案中,本文中所述的WT NPM1或突变体NPM1是人WT NPM1或人突变体NPM1。

[0089] 在一些实施方案中,与NPM1结合的抗体是全长抗体。本文中所述的全长抗体可以是基于其重链恒定区的氨基酸序列的任何抗体类别。例如,与NPM1结合的全长抗体可以是

免疫球蛋白G(IgG)、免疫球蛋白A(IgA)、免疫球蛋白D(IgD)、免疫球蛋白E(IgE)和免疫球蛋白M(IgM)或其亚类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)。在一些实施方案中,本文中所述的抗体是抗原结合片段。抗原结合片段可以是Fab片段、F(ab')₂片段、Ig单体、Fd片段、scFv、scAb、dAb、Fv、亲和体、双抗体、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体的形式。本文中所述的抗体可以是鼠、大鼠、人或任何其他来源的。在一些实施方案中,本文中所述的抗体是人抗体或人源化抗体。

[0090] 在一些实施方案中,与NPM1(例如,WT NPM1或突变体NPM1)结合的抗体包含重链可变区和轻链可变区。在一些实施方案中,重链可变区和轻链可变区各自包含一组确定底物特异性的互补决定区(CDR)序列。CDR序列可使用本领域通常已知的任何编号方案(例如,Kabat、Chothia、Contact、IGMT)来确定。

[0091] 在一些实施方案中,与NPM1结合的抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含含有氨基酸序列NIFVH(SEQ ID NO:1)的重链CDR1、含有氨基酸序列KIDPANDNTKFAPNFQG(SEQ ID NO:2)的HC CDR2和含有氨基酸序列DSSGYDAVDY(SEQ ID NO:3)的HC CDR3。在一些实施方案中,与NPM1结合的抗体包含轻链,所述轻链包含含有氨基酸序列RASESVYTYLA(SEQ ID NO:9)的轻链CDR1、含有氨基酸序列NAKTLTE(SEQ ID NO:10)的LC CDR2和含有氨基酸序列QHHYGTPYT(SEQ ID NO:11)的LC CDR3。

[0092] 在一些实施方案中,与NPM1结合的抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含含有氨基酸序列SYAMS(SEQ ID NO:15)的重链CDR1、含有氨基酸序列AISGSGGSTYYADSVKG(SEQ ID NO:16)的HC CDR2和含有氨基酸序列WRNNAFDY(SEQ ID NO:17)的HC CDR3。在一些实施方案中,与NPM1结合的抗体包含轻链可变区,所述轻链可变区包含含有氨基酸序列QGDSLRSYYAS(SEQ ID NO:22)的轻链CDR1、含有氨基酸序列GKNNRPS(SEQ ID NO:23)的LC CDR2和含有氨基酸序列NSSPRLKHRVV(SEQ ID NO:24)的LC CDR3。

[0093] 表1提供了对NPM1(WT和/或突变体NPM1)具有特异性的示例性抗体(“Ab1”和“Ab2”)的重链CDR和轻链CDR的氨基酸序列。如使用本领域通常已知的任何编号方案(例如,Kabat、Chothia、Contact、IGMT)确定的,具有与表1中提供的相同的重链CDR或轻链CDR序列的抗体在本公开内容的范围内。

[0094] 表1:抗NPM1抗体的CDR序列

[0095]

CDR	Kabat	Chothia	Contact
CDR-H1 (Ab1)	NIFVH (SEQ ID NO: 1)	GFNIKNI (SEQ ID NO: 4)	KNIFVH (SEQ ID NO: 6)
CDR-H2 (Ab1)	KIDPANDNTKFAPNFQG (SEQ ID NO: 2)	DPANDN (SEQ ID NO: 5)	WIGKIDPANDNTK (SEQ ID NO: 7)
CDR-H3 (Ab1)	DSSGYDAVDY (SEQ ID NO: 3)	DSSGYDAVDY (SEQ ID NO: 3)	ASDSSGYDAVD (SEQ ID NO: 8)
CDR-L1 (Ab1)	RASESVYTYLA (SEQ ID NO: 9)	RASESVYTYLA (SEQ ID NO: 9)	YTYLAWY (SEQ ID NO: 12)
CDR-L2 (Ab1)	NAKTLTE (SEQ ID NO: 10)	NAKTLTE (SEQ ID NO: 10)	LLVYNAKTLT (SEQ ID NO: 13)
CDR-L3 (Ab1)	QHGYGTPYT (SEQ ID NO: 11)	QHGYGTPYT (SEQ ID NO: 11)	QHGYGTPY (SEQ ID NO: 14)
CDR-H1 (Ab2 和 Ab2.2)	SYAMS (SEQ ID NO: 15)	GFTFSSY (SEQ ID NO: 18)	SSYAMS (SEQ ID NO: 20)
CDR-H2 (Ab2 和 Ab2.2)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 16)	SGSGGS (SEQ ID NO: 19)	WVSAISGSGGSTY (SEQ ID NO: 48)
CDR-H3 (Ab2 和 Ab2.2)	WRNNAFDY (SEQ ID NO: 17)	WRNNAFDY (SEQ ID NO: 17)	AKWRNNAFD (SEQ ID NO: 21)
CDR-L1 (Ab2 和 Ab2.2)	QGDSLRSYYAS (SEQ ID NO: 22)	QGDSLRSYYAS (SEQ ID NO: 22)	SYIASWY (SEQ ID NO: 25)
CDR-L2 (Ab2 和 Ab2.2)	GKNNRPS (SEQ ID NO: 23)	GKNNRPS (SEQ ID NO: 23)	LVIYGKNNRP (SEQ ID NO: 26)
CDR-L3 (Ab2 和 Ab2.2)	NSSPRLKHRVV (SEQ ID NO: 24)	NSSPRLKHRVV (SEQ ID NO: 24)	NSSPRLKHRV (SEQ ID NO: 27)

[0096] 在一些实施方案中,包含在表1中表示为“Ab1”的一个或多个重链CDR和/或轻链CDR序列的抗体与WT NPM1结合(例如,优先结合)。在一些实施方案中,包含在表1中表示为“Ab2”的一个或多个重链CDR和/或轻链CDR序列的抗体与突变体NPM1(NPM1c)结合(例如,优先结合)。在一些实施方案中,包含在表1中表示为“Ab2.2”的一个或多个重链CDR和/或轻链CDR序列的抗体与突变体NPM1(NPM1c)结合(例如,优先结合)。

[0097] 在一些实施方案中,与NPM1结合的抗体包含表2中提供的重链可变区(V_H)序列和/或轻链可变区(V_L)序列。在一些实施方案中,与NPM1结合的抗体还包含表2中提供的重链恒定区(C_H)序列和/或轻链可变区(C_L)序列。在一些实施方案中,与NPM1结合的抗体包含表2中提供的重链序列和/或轻链序列。

[0098] 表2:抗NPM1抗体的重链和轻链序列

[0099]

抗体区	序列
V _H (Ab1)	EVQLQQSVAELVRPGASVKLSCTASGFNIKNI FVHWVKQRPEQGLEWIGKIDPA NDNTKFAPNFQGKAAISADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAIYYCASDSSGYDAVDY WGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 28)
V _L (Ab1)	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASESVYTYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTL TEGVPSRFSGSGSGTQFSLRINSLQPEDFGSY YCQHGYGTPYTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 29)
V _H (Ab2 和 Ab2.2)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWRNNAFDY WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 30)
V _L (Ab2 和 Ab 2.2)	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRP SGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSSPRLKHRVVFGGGKLTVL (SEQ ID NO: 31)
C _H (Ab1/ Ab2)	AKTTAPSVYPLAPVCGD TTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFP AVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPC KCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVE VHTAQ TQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMMSGKEFKCKVNNKDLPIPIERTIS KPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTNNGKTELN YKNTPEVLDS DGSYFMYSKLRVEKKNWVERN SYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSR TPGK (SEQ ID NO: 32)
C _H (Ab2.2)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYCKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG (SEQ ID NO: 46)
C _L (Ab1)	RADAAPT VSIFFPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY PKDINVKWKIDGSE RQNGVLNS WTDQDSK DSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID NO: 33)
C _L (Ab2)	GQPKSSPSVTLFPPSSEELTNKATLVCTITDFY PGVTVVDWKVDGTPVTQGMET TQPSKQSN NKYMASSYLTLTARAWERHSSYS CQVTHEGHTVEKSLSRADCS (SEQ ID NO: 34)
C _L (Ab2.2)	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVE TTTPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 47)
重链 (Ab1)	MYRMQLLSIALSLALVTNSEVQLQQSVAELVRPGASVKLSCTASGFNIKNI FVH WVKQRPEQGLEWIGKIDPANDNTKFAPNFQGKAAISADTSSNTAYLQLSSLTSE DTAIYYCASDSSGYDAVDYWGQGTSTVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGD TTGSSVT LGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQS ITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQ TQTHREDYNSTLRVVSALPI QH QDWMMSGKEFKCKVNNKDLPIPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKK

[0100]

	QVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEK KNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (SEQ ID NO: 35)
重链 (Ab2)	MYRMQLLSICIALSLALVTNSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKWRNNAFDYWGGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDITGSS VTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPS QSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQQTTHREDYNSTLRVVS LPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMT KKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLR VEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (SEQ ID NO: 36)
重链 (Ab2.2)	MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKWRNNAFDYWGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 44)
轻链 (Ab1)	MYRMQLLSICIALSLALVTNSDIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASESVYTYLAW YQQKQKGKSPQLLVYNAKLTTEGVPSRFSGSGSGTQFSLRINSLQPEDFGSYQC HYGTPYTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDIN VWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHK TSTSPIVKSFNRECE (SEQ ID NO: 37)
轻链 (Ab2)	MYRMQLLSICIALSLALVTNSSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASW YQQKPGQAPVLIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNS SPRLKHRVVFGGGKLTTLVGGQPKSSPSVTLFPPSSEELTNKATLVCTITDFYPGV VTVDWKVDGTPVTQGMETTQPSKQSNKYMASSYLTLTARAWERHSSYSQCV THEGHTVEKSLSRADCS (SEQ ID NO: 38)
轻链 (Ab2.2)	MSVPTQVLGLLLLWLTDA RCSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYAS WYQQKPGQAPVLIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC NSSPRLKHRVVFGGGKLTTLVGGQPKAAPS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFY PGA VTVAWKADSSPVKAGVETTTQPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 45)

[0101] 在一些实施方案中,与NPM1结合的抗体可相对于表1或表2中提供的CDR、 V_H 、 V_L 、 C_H 、 C_L 、重链或轻链序列包含一个或更多个突变(例如,氨基酸插入、缺失或替换)。在一些实施方案中,与NPM1结合的抗体可相对于表1或表2中提供的CDR、 V_H 、 V_L 、 C_H 、 C_L 、重链或轻链序列包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个突变(例如,氨基酸插入、缺失或替换)。在一些实施方案中,与NPM1结合的抗体可与表1或表2中提供的CDR、 V_H 、 V_L 、 C_H 、 C_L 、重链或轻链序列具有至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%的同一性。

[0102] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含SEQ ID NO:1的重链互补决定区1(CDR-H1)(根据IMGT定义系统)、SEQ ID NO:2的重链互补决定区2(CDR-H2)(根据Kabat定义系统)、SEQ ID NO:3的重链互补决定区3(CDR-H3)(根据Kabat定义系统)、SEQ ID NO:9的轻链互补决定区1(CDR-L1)(根据Kabat定义系统)、SEQ ID NO:10的轻链互补决定区2(CDR-L2)(根据Kabat定义系统)和SEQ ID NO:11的轻链互补决定区3(CDR-L3)(根据Kabat定义系统)。

[0103] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含SEQ ID NO:15的重链互补决定区1(CDR-H1)(根据Kabat定义系统)、SEQ ID NO:16的重链互补决定区2(CDR-H2)(根据Kabat定义系统)、SEQ ID NO:17的重链互补决定区3(CDR-H3)(根据Kabat定义系统)、SEQ ID NO:22的轻链互补决定区1(CDR-L1)(根据Kabat定义系统)、SEQ ID NO:23的轻链互补决定区2(CDR-L2)(根据Kabat定义系统)和SEQ ID NO:24的轻链互补决定区3(CDR-L3)(根据Kabat定义系统)。

[0104] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含SEQ ID NO:4的重链互补决定区1(CDR-H1)(根据IMGT定义系统)、SEQ ID NO:2的重链互补决定区5(CDR-H2)(根据Chothia定义系统)、SEQ ID NO:3的重链互补决定区3(CDR-H3)(根据Chothia定义系统)、SEQ ID NO:9的轻链互补决定区1(CDR-L1)(根据Chothia定义系统)、SEQ ID NO:10的轻链互补决定区2(CDR-L2)(根据Chothia定义系统)和SEQ ID NO:11的轻链互补决定区3(CDR-L3)(根据Chothia定义系统)。

[0105] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含SEQ ID NO:18的重链互补决定区1(CDR-H1)(根据Chothia定义系统)、SEQ ID NO:19的重链互补决定区2(CDR-H2)(根据Chothia定义系统)、SEQ ID NO:17的重链互补决定区3(CDR-H3)(根据Chothia定义系统)、SEQ ID NO:22的轻链互补决定区1(CDR-L1)(根据Chothia定义系统)、SEQ ID NO:23的轻链互补决定区2(CDR-L2)(根据Chothia定义系统)和SEQ ID NO:24的轻链互补决定区3(CDR-L3)(根据Chothia定义系统)。

[0106] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含SEQ ID NO:6的重链互补决定区1(CDR-H1)(根据IMGT定义系统)、SEQ ID NO:7的重链互补决定区2(CDR-H2)(根据Contact定义系统)、SEQ ID NO:8的重链互补决定区3(CDR-H3)(根据Contact定义系统)、SEQ ID NO:12的轻链互补决定区1(CDR-L1)(根据Contact定义系统)、SEQ ID NO:13的轻链互补决定区2(CDR-L2)(根据Contact定义系统)和SEQ ID NO:14的轻链互补决定区3(CDR-L3)(根据Contact定义系统)。

[0107] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含SEQ ID NO:20的重链互补决定区1(CDR-H1)(根据Contact定义系统)、SEQ ID NO:48的重链互补决定区2(CDR-H2)(根据Contact定义系统)、SEQ ID NO:21的重链互补决定区3(CDR-H3)(根据Contact定义系统)、SEQ ID NO:25的轻链互补决定区1(CDR-L1)(根据Contact定义系统)、SEQ ID NO:26的轻链互补决定区2(CDR-L2)(根据Contact定义系统)和SEQ ID NO:27的轻链互补决定区3(CDR-L3)(根据Contact定义系统)。

[0108] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含重链可变区(VH),所述重链可变区(VH)与包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的VH相比,在框架区中包含不超过25个氨基酸变异(例如,不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的抗体包含轻链可变区(VL),所述轻链可变区(VL)与包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VL相比,在框架区中包含不超过25个氨基酸变异(例如,不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。

[0109] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含重链可变区(VH),所述重链可变区(VH)与包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VH相比,在框架区中包含不超过25个氨基酸变异(例如,不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的抗体包含轻链可变区(VL),所述轻链可变区(VL)与包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VL相比,在框架区中包含不超过25个氨基酸变异(例如,不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。

[0110] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含VH,所述VH在框架区中包含与包含SEQ

ID NO:28的氨基酸序列的VH具有至少75% (例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列。作为替代或补充 (例如,补充), 在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含VL,所述VL在框架区中包含与包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VL具有至少75% (例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列。

[0111] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含VH,所述VH在框架区中包含与包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VH具有至少75% (例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列。作为替代或补充 (例如,补充), 在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含VL,所述VL在框架区中包含与包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VL具有至少75% (例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列。

[0112] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的VH。作为替代或补充 (例如,补充), 在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VL。

[0113] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VH。作为替代或补充 (例如,补充), 在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VL。

[0114] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含重链,所述重链包含与SEQ ID NO:35的氨基酸序列具有至少75% (例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含重链,所述重链包含与SEQ ID NO:35的氨基酸序列具有至少75% (例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列。作为替代或补充 (例如,补充), 本公开内容的抗体包含轻链,所述轻链包含与SEQ ID NO:37的氨基酸序列具有至少75% (例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列。作为替代或补充 (例如,补充), 本公开内容的抗体包含轻链,所述轻链包含与SEQ ID NO:37的氨基酸序列具有至少75% (例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列。

[0115] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含重链,所述重链包含与SEQ ID NO:36的氨基酸序列具有至少75% (例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含重链,所述重链包含与SEQ ID NO:36的氨基酸序列具有至少75% (例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列。作为替代或补充 (例如,补充), 本公开内容的抗体包含轻链,所述轻链包含与SEQ ID NO:38的氨基酸序列具有至少75% (例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列。作为替代或补充 (例如,补充), 本公开内容的抗体包含轻链,所述轻链包含与SEQ ID NO:38的氨基酸序列具有至少75% (例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列。

[0116] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含重链,所述重链包含与SEQ ID NO:44的氨基酸序列具有至少75% (例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含重链,所述重链包含与SEQ ID NO:44的氨基酸序列具有至少75% (例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同一性的氨基酸序列。作为替代或补充 (例如,补充), 本公开内容的抗体包含轻链,所述轻链包含与SEQ ID NO:45的氨基酸序列具有至少75% (例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%) 同

一性的氨基酸序列。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的抗体包含轻链,所述轻链包含与SEQ ID NO:45的氨基酸序列具有至少75%(例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列。

[0117] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含含有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的重链。在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含含有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的重链。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的抗体包含含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的抗体包含含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链。

[0118] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链。在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的抗体包含含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的轻链。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的抗体包含含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的轻链。

[0119] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含含有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的重链。在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含含有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的重链。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的抗体包含含有SEQ ID NO:45的氨基酸序列的轻链。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的抗体包含含有SEQ ID NO:45的氨基酸序列的轻链。

[0120] 抗NPM1抗体的制备

[0121] 如本文中所述的能够结合NPM1的抗体可通过本领域已知的任何方法来制备。参见,例如,Harlow and Lane, (1998) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York。在一些实例中,通过重组技术制备抗NPM1抗体。

[0122] 例如,可使用本领域广泛已知的技术从表达本文中所述抗体的淋巴细胞和永生化骨髓瘤细胞制备杂交瘤细胞系(参见,例如,Kohler and Milstein, (1975) *Nature* 256: 495-497;或Buck, et al., (1982) *In Vitro*, 18: 377-381)。通常来说,杂交瘤的产生涉及使用融合剂(例如,聚乙二醇或电流)将骨髓瘤细胞与淋巴样细胞融合以产生能够产生和分泌期望抗体的永生化细胞系。杂交瘤可在本领域已知的条件下在培养基中培养。

[0123] 或者,可使用本领域已知的重组技术将编码如本文中所述的抗NPM1抗体的重链和轻链的核酸克隆到一个或更多个载体中,其中每个核苷酸序列与合适的启动子(例如,本领域已知的组成型或诱导型启动子)可操作地连接。载体可以是表达载体,可由其在特定细胞类型中表达抗NPM1抗体的多肽序列。一个或更多个表达载体包含一个或更多个启动子,用于驱动可操作地连接的基因(通常在启动子序列的3')的表达。编码重链和轻链的各个核苷酸序列可与不同的启动子可操作地连接。或者,编码重链和轻链的核苷酸序列可与相同的启动子可操作地连接(例如,在相同的表达载体内)。表达载体和/或启动子的选择取决于用于产生抗体的宿主细胞的类型。必要时,可在重链编码序列和轻链编码序列之间插入内部核糖体进入位点(internal ribosomal entry site, IRES)以增强重组表达。可使用本领域已知的任何技术(例如,化学转染、病毒转染)将编码抗NPM1抗体的表达载体插入用于表达的细胞中。细胞可以是可使用本领域已知的技术培养。细胞可以是能够表达异源抗体序列的任何细胞类型,例如如可体外培养的人细胞、鼠细胞、大鼠细胞、非人灵长类细胞

或昆虫细胞。在足以表达抗体的条件下(例如,在足以进行表达的温度和生长培养基条件下)培养这样的细胞之后,可从培养基(如果抗体是分泌的)或从裂解之后的细胞分离抗NPM1抗体。用于从细胞和/或培养基中分离抗体的技术是本领域通常已知的,但通常包括亲和色谱。

[0124] 抗NPM1抗体缀合物

[0125] 本公开内容还提供了分子缀合物,其包含通过化学接头与试剂连接的本文中所述的抗NPM1抗体(例如,与WT NPM1或突变体NPM1结合的抗体)。

[0126] 在一些实施方案中,本文中所述的缀合物包含与药物连接的抗NPM1抗体。包含与药物缀合的抗NPM1抗体的缀合物可称为“ADC”。在一些实施方案中,药物是小分子。术语“小分子”是指无论是天然存在的还是人工创造的(例如,通过化学合成),具有相对较低分子量的分子。通常来说,小分子是有机化合物(例如,其包含碳)。小分子可包含多个碳-碳键、立体中心和其他官能团(例如胺、羟基、羰基和杂环等)。在某些实施方案中,小分子的分子量不大于约1,000g/mol、不大于约900g/mol、不大于约800g/mol、不大于约700g/mol、不大于约600g/mol、不大于约500g/mol、不大于约400g/mol、不大于约300g/mol、不大于约200g/mol或不大于约100g/mol。在某些实施方案中,小分子的分子量为至少约100g/mol、至少约200g/mol、至少约300g/mol、至少约400g/mol、至少约500g/mol、至少约600g/mol、至少约700g/mol、至少约800g/mol或至少约900g/mol或至少约1,000g/mol。上述范围的组合(例如至少约200g/mol且不大于约500g/mol)也是可以的。

[0127] 在一些实施方案中,药物是细胞毒性药物(例如,细胞毒性小分子)。在一些实施方案中,药物是细胞抑制性药物(例如,细胞抑制性小分子)。在一些实施方案中,药物是化学治疗药物。适用于本文中所述的ADC的药物的一些非限制性实例包括澳瑞他汀E、澳瑞他汀F、单甲基澳瑞他汀D(MMAD)、单甲基澳瑞他汀F(MMAF)、单甲基澳瑞他汀E(MMAE)、放线菌素、放线菌素X2、 α -鹅膏蕈碱、 β -鹅膏蕈碱、 γ -鹅膏蕈碱、 ϵ -鹅膏蕈碱、aerophysinin、阿多柔比星、agrochelin、安莎三烯、安丝菌素P-3、阿非迪霉素、凋亡素、L-天冬酰胺酶、阿扎胞苷、巴佛洛霉素A1、巴佛洛霉素B1、巴佛洛霉素B2、巴佛洛霉素C1、巴佛洛霉素C2、巴佛洛霉素D、巴佛洛霉素E、加利车霉素、喜树碱、毛壳素、球毛壳菌素、chlamydocin、焔灰红菌素B、克拉屈滨、秋水仙碱、康普瑞汀A1、康普瑞汀A4、虫草素、隐藻素、葫芦素B、葫芦素E、curvulin、环巴胺、环磷酰胺、阿糖胞苷、更生霉素、柔红霉素、地西他滨、地塞米松、多拉司他汀10、多拉司他汀15、倍癌霉素SA、倍癌霉素TM、倍癌霉素MA、倍癌霉素DM、多柔比星、恩格林A、埃博霉素A、埃博霉素B、埃博霉素C、依托泊苷、氟达拉滨、烟曲霉素、格尔德霉素、坦螺旋霉素(17-AAG)、葡萄糖杀粉蝶菌素A、短杆菌肽A、草环氧二烯、9-羟基玫瑰树碱、羟基脲、吸水菌酯素、寄端霉素、伊达比星、伊利马醌、isatropolone A、isofistularin-3、伊沙匹隆、JW55、乳胞素、luisol A、美登醇、美登素(DM1)、美登素DM3、ravtansine(DM4)、美登素类化合物AP-3、mechercharmyn A、mensacarcin、甲氨蝶呤、6-巯嘌呤、microcolin B、微囊藻毒素LR、米托蒽醌、muscotoxin A、肌基质蛋白、mytoxin B、奈拉滨、奈莫柔比星、nocuolin A、冲酯霉素、寡霉素A、寡霉素B、紫杉醇、拉洛他赛、milataxel、奥他赛、tesetaxel、类鬼笔毒环肽、鬼笔环肽、植物鞘氨醇、杀青虫素A、比洛尼素、鬼臼毒素、聚酮霉素、泼尼松、土槿甲酸B、pseurotin A、puwainaphycin F、吡咯并苯并二氮杂~~草~~、喹哪朵肽、雷查霉素、雷别卡霉素、Ro 5-3335、番红菌素B、山卓霉素、血根碱、皂草毒蛋白、西奈芬净、塔托布林、特罗他汀、6-

硫鸟嘌呤、硫代秋水仙碱、单歧藻毒素、tripolin A、雷公藤甲素、妥布霉素A、微管溶素A、微管溶素M、微管溶素IM-1、微管溶素IM-2、微管溶素IM-3、维奈托克和长春新碱。本文中所述的ADC可包含本领域已知对特定细胞类型(例如癌细胞)具有细胞毒性或细胞抑制性的另一药物(例如化学治疗药物)。

[0128] 在一些实施方案中,本文中所述的抗NPM1抗体与多于一种的试剂(例如,药物)分子缀合,即抗体与试剂以大于1:1的比率缀合在一起。在一些实施方案中,抗体与试剂之间的比率为1:1至1:10。在一些实施方案中,抗体与试剂之间的比率为1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9或1:10。

[0129] 在一些实施方案中,使用本领域已知的化学接头将本文中所述的抗NPM1抗体与试剂缀合(连接)。本文中使用的术语“缀合”、“连接”和“附接”意指两个分子优选地通过共价键或以足够的亲和力缔合,从而实现两个实体之间的缔合的治疗或诊断益处。

[0130] 在一些实施方案中,接头是可切割接头。本文中使用的可切割接头能够响应于刺激来释放缀合部分。在一些实施方案中,刺激是生理刺激。刺激的一些非限制性实例包括酶的存在、酸性条件、碱性条件或还原条件。例如,可切割接头包括肽接头、 β -葡萄糖苷酸接头、谷胱甘肽敏感性接头(或二硫化物接头)和pH敏感性接头。在一些实施方案中,pH敏感性接头在5.0至6.5的pH或4.5至5.0的pH下被切割。在一些实施方案中,当pH为7至7.5时,pH敏感性接头不被切割。在一些实施方案中,当pH为7.3至7.5时,pH敏感性接头不被切割。在一些实施方案中,可切割接头是蛋白酶敏感性接头。可切割接头的一些实例包括N-琥珀酰亚胺基4-(2-吡啶基二硫代)戊酸酯(SPP)、N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯(SPDB)、磺基-SPDB、缬氨酸-瓜氨酸二肽(Val-Cit)、丁酸乙酯、CL2A、马来酰亚胺基己酰基(MC)和Mal-EBE-Mal。参见,例如Donaghy, mAbs. 2016 May-Jun; 8(4): 659-71, 其通过引用并入本文。

[0131] 在一些实施方案中,接头是不可切割的。在一些实施方案中,不可切割接头是在对象中的体循环内不切割的接头。在一些实施方案中,不可切割接头是对蛋白酶切割具有抗性的接头。不可切割接头包括N-琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、马来酰亚胺基甲基环己烷-1-羧酸酯(MCC)和MC-VC-PAB。

[0132] 本文中所述的缀合物中的任一种可使用本领域已知的方法合成。参见,例如Yao et al., Int J Mol Sci. 2016 Feb 2; 17(2)。

[0133] 包含与药物缀合的抗NPM1抗体的ADC有利于治疗性使用,部分是因为药物(例如,化学治疗药物)是毒性的并且可靶向至表达细胞表面NPM1的特定细胞类型(例如,表达NPM1的癌细胞)。通过将药物与抗NPM1抗体缀合,ADC的毒性与以其游离形式的药物相比可降低至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少99%。

[0134] 在一些实施方案中,与抗NPM1抗体连接的试剂是放射性同位素。在一些实施方案中,放射性同位素是可用于治疗癌症的放射性同位素(即,治疗性放射性同位素),例如如可用于治疗急性髓系白血病(AML)、急性早幼粒细胞白血病(APL)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、非霍奇金淋巴瘤或骨髓增生异常综合征(MDS)的放射性同位素。可用于治疗癌症的放射性同位素是本领域公知的,并且包括但不限于碘-131 (^{131}I)、铼-188 (^{188}Re)、钇-90 (^{90}Y)、铋-213 (^{213}Bi) 和锕-225 (^{225}Ac)。放射性同位素连接的抗体的一些实例和用于产生这样的抗体的技术也是本领域公知的(参见,例如Rosenblat TL, et al. “Sequential

cytarabine and alpha-particle immunotherapy with bismuth-213-lintuzumab (HuM195) for acute myeloid leukemia". Clin Cancer Res. 2010 Nov 1; 16(21):5303-11, 其通过引用并入本文)。包含放射性同位素的抗体有利于治疗性使用, 部分是因为放射性同位素是毒性的并且可靶向至表达细胞表面NPM1的特定细胞类型(例如, 表达NPM1的癌细胞)。通过将放射性同位素与抗NPM1抗体缀合, 放射性同位素的毒性与以其游离形式的放射性同位素相比可降低至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少99%。

[0135] 组合物

[0136] 本公开内容还提供了包含与本文中提供的NPM1结合的抗体(例如, 与WT NPM1或突变体NPM1结合的抗体)的组合物。在一些实施方案中, 药物组合物还包含可药用载体。“可药用”是指在合理的医学判断范围内适用于与人和动物的组织接触而没有过多毒性、刺激、变应性响应或其他问题或并发症的与合理的效益/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。“可药用载体”可以是涉及将主题试剂从身体的一个器官或一部分运送或运输至身体的另一个器官或另一部分的可药用材料、组合物或载剂, 例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或封装材料。每种载体在与制剂的其他成分相容且在对患者的组织无害的意义上必须是“可接受的”(例如, 生理学上相容、无菌、生理pH等)。术语“载体”表示与活性成分组合以有利于施加的天然或合成的有机或无机成分。药物组合物的组分还能够以使得将会显著损害期望的药物效力的相互作用不存在的方式与本公开内容的分子以及彼此共混合。可用作可药用载体的材料的一些实例包括: (1) 糖, 例如乳糖、葡萄糖和蔗糖; (2) 淀粉, 例如玉米淀粉和马铃薯淀粉; (3) 纤维素及其衍生物, 例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素和乙酸纤维素; (4) 粉末状西黄蓍胶; (5) 麦芽; (6) 明胶; (7) 润滑剂, 例如硬脂酸镁、十二烷基硫酸钠和滑石; (8) 赋形剂, 例如可可豆脂和栓剂蜡; (9) 油类, 例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和豆油; (10) 二醇类, 例如丙二醇; (11) 多元醇类, 例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇(PEG); (12) 酯类, 例如油酸乙酯和月桂酸乙酯; (13) 琼脂; (14) 缓冲剂, 例如氢氧化镁和氢氧化铝; (15) 海藻酸; (16) 无热原水; (17) 等张盐水; (18) 林格液; (19) 乙醇; (20) pH缓冲溶液; (21) 聚酯、聚碳酸酯和/或聚酸酐; (22) 填充剂, 例如多肽和氨基酸; (23) 血清组分, 例如血清白蛋白、HDL和LDL; (22) C2-C12醇类, 例如乙醇; 以及 (23) 药物制剂中使用的其他无毒性相容物质。制剂中也可存在润湿剂、着色剂、释放剂、包衣剂、甜味剂、矫味剂、芳香剂、防腐剂和抗氧化剂。

[0137] 药物组合物可方便地以单位剂量形式存在, 并且可通过药学领域中公知的任何方法来制备。术语“单位剂量”当关于本公开内容的药物组合物使用时, 是指适合作为施用于对象的单一剂量的物理上离散的单元, 每个单元包含与所需稀释剂(即, 载体或载剂)缔合的经计算以产生期望治疗作用的预定量活性物质。

[0138] 药物组合物的制剂可取决于施用于对象的途径。适合于肠胃外施用或腹膜内、瘤内、瘤周围、病灶内或病灶周围施用的可注射制剂包括例如无菌可注射水性或油性混悬剂, 并且可根据已知技术使用合适的分散剂或润湿剂和助悬剂来配制。可注射制剂还可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液剂、混悬剂或乳剂, 例如如1,3丙二醇或1,3丁二醇中的溶液剂。在可用的载剂和溶剂中, 可使用水、林格液、U.S.P.和等张氯化钠溶液。另外, 无菌的不挥发油通常用作溶剂或助悬介质。出于该目的, 可使用任何温和

的不挥发油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。另外,脂肪酸(例如油酸)可用于可注射剂的制剂中。可对可注射制剂进行灭菌,例如,通过细菌保留过滤器进行过滤,或者通过并入以无菌固体组合物形式的灭菌剂,所述无菌固体组合物在使用之前可溶解或分散在无菌水或其他无菌可注射介质中。

[0139] 适合于经口施用的组合物可以以各自包含预定量抗炎剂的离散单元(例如胶囊剂、片剂、锭剂)存在。其他组合物包括水性液体或非水性液体中的混悬剂,例如糖浆剂、酞剂或乳剂。

[0140] 在一些实施方案中,本文中提供的组合物(例如,施用于对象的药物组合物)必须是无菌的。无菌通过无菌过滤膜(例如,0.2微米膜)经由过滤来容易地实现。或者,可使用防腐剂以防止微生物的生长或作用。多种防腐剂是公知的,并且包括例如苯酚和抗坏血酸。如果药物组合物对热变性和氧化变性高度稳定,则通常将药物组合物以冻干形式或作为水性溶液储存。制剂的pH通常将为约6至8,尽管更高或更低的pH值在某些情况下也可适合。

[0141] 抗NPM1缀合物的施用

[0142] 本公开内容还提供了向对象施用本文中所述的抗NPM1抗体、包含本文中所述的抗NPM1抗体的缀合物、或其组合物(例如,药物组合物)。在一些实施方案中,提供了通过以下来治疗与NPM1的细胞表面表达相关的疾病(例如表达NPM1的癌症)的方法:向对象施用本文中所述的抗NPM1抗体、包含本文中所述的抗NPM1抗体的缀合物、或其组合物(例如药物组合物)。

[0143] 在一些方面中,本公开内容提供了用于在对象中治疗表达NPM1的癌症的方法,其包括向有此需要的对象施用有效量的本文中所述的抗NPM1抗体、包含与本文中所述试剂(例如,药物、放射性同位素)缀合的抗NPM1抗体的缀合物、或其组合物(例如,药物组合物)。

[0144] 本文中使用的术语“施用”及其变化形式是指在对象体内或在对象上植入、吸收、摄入、注射、吸入或以其他方式引入本文中所述的试剂(例如,抗体、缀合物)或其组合物(例如,药物组合物)。本文中使用的术语“治疗”及其变化形式是指出于在对象中降低疾病(例如,癌症)的严重程度的目的,将本文中所述的试剂(例如,抗体、缀合物)或其组合物(例如,药物组合物)施加或施用于有此需要的对象。“有此需要的对象”是指患有疾病、具有疾病症状或对疾病有倾向的个体。用于治疗疾病的方法可涵盖向对象施用本文中所述的试剂(例如,抗体、缀合物)或其组合物(例如,药物组合物),目的是在对象中治愈、治疗、减轻、缓解、改变、救治、改良、改善或影响疾病、疾病的症状或对疾病的倾向。用于治疗疾病的方法可涵盖预防,其中出于预防疾病发生的目的,例如,在不知道患有疾病,但在未来可发生该疾病或处于发生该疾病的风险中的对象中,向对象施用试剂。

[0145] 本文中使用的“治疗有效量”或“有效量”是指足以在对象中引发期望的生物学响应(例如,减轻疾病(例如,癌症)的一种或更多种症状)的试剂(例如,本文中所述的抗体或缀合物)的量。治疗有效量可以是单独或与一种或更多种其他试剂组合施用于对象的量。如本领域技术人员所认识到的,有效量根据这样的因素而变化,所述因素如期望的生物学终点、所施用试剂的药代动力学、所治疗的特定病症或疾病、病症或疾病的严重程度、对象的个体参数(包括年龄、身体状况、尺寸、性别和体重)、治疗的持续时间、任何其他同步治疗的性质、具体的施用途径,以及健康从业者知识和专长范围内确定的类似因素。这些因素对于本领域普通技术人员来说是公知的并且可以在不超出常规实验的情况下来解决。通常优选

地使用本文中所述的单个试剂(例如,本文中所述的抗体或缀合物)或其任意组合的最大剂量,其最多是根据合理的医学判断可安全施用于对象的最高剂量。优选地,有效剂量低于可安全施用于对象的最高剂量。然而,本领域普通技术人员将理解,对象或健康从业者可以选择较低的剂量(例如最小有效剂量)以减轻任何潜在的治疗风险,例如治疗的副作用。

[0146] 在一些实施方案中,对于正常体重的成年对象,可施用约0.01至1000mg/kg剂量的试剂(例如,本文中所述的抗体或缀合物)。在一些实施方案中,剂量为1至200mg。具体的剂量方案(即,剂量、时间和重复)将取决于特定对象和该对象的病史以及试剂的特性(例如试剂的药代动力学)以及本领域中公知的其他考虑因素。

[0147] 治疗疾病(例如,癌症)可包括延迟疾病的发生或进展,或者降低疾病严重程度。治疗疾病并不一定需要治愈性结果。本文中使用的“延迟”疾病的发生意指在对象中延迟、阻碍、减慢、延缓、稳定和/或推迟疾病的进展。延迟疾病的进展可包括在对象中延迟或预防疾病扩散的发生,例如如在对象中延迟或预防癌症向尚未受该癌症影响的一个或更多个器官或组织转移的发生。这种延迟可以是不同的时间长度,这取决于病史和/或被治疗的个体。“延迟”疾病发生或延迟疾病发作的方法是这样的方法,其与没有这样的方法相比,在给定时间框架内降低发生一种或更多种疾病症状的可能性和/或降低症状的程度。比较通常基于使用足以给出统计学上显著结果的许多对象的临床研究。

[0148] 疾病(例如,癌症)的“发生”或“进展”是指在对象中疾病的初始表现和/或随后的进展。使用本领域中公知的标准临床技术可检测和评估疾病的发生。然而,发生也指不可检测到的进展。出于本公开内容的目的,发生或进展可以是指疾病症状的发生或进展。术语“发生”包括疾病发生、复发和发作。本文中使用的疾病的“发作”或“发生”包括疾病的初始发作以及疾病的复发(即,在先前患有该疾病的对象中)。

[0149] 考虑施用的“对象”是指人(即,任何年龄组的男性或女性,例如,儿科对象(例如,婴儿、儿童或青少年)或成人对象(例如,年轻成人、中年成人或老年成人))或非人动物。在一些实施方案中,非人动物是哺乳动物(例如,啮齿动物,例如,小鼠或大鼠)、灵长类动物(例如,食蟹猴或恒河猴)、商业相关的哺乳动物(例如,牛、猪、马、绵羊、山羊、猫或犬)或鸟(例如,商业相关的鸟,例如鸡、鸭、鹅或火鸡)。非人动物可以是处于任何发育阶段的雄性或雌性,并且可以是幼年动物或成年动物。非人动物可以是转基因动物或经遗传改造的动物。

[0150] 在一些实施方案中,对象是伴侣动物(例如,宠物或服务动物)。本文中使用的“伴侣动物”是指宠物和其他家养动物。伴侣动物的一些非限制性实例包括犬和猫;牲畜,例如马、牛、猪、绵羊、山羊和鸡;以及其他动物,例如小鼠、大鼠、豚鼠和仓鼠。在一些实施方案中,对象是研究动物。研究动物的一些非限制性实例包括啮齿动物(例如,大鼠、小鼠、豚鼠和仓鼠)、兔或非人灵长类动物。

[0151] 在一些实施方案中,对象患有、疑似患有表达NPM1的癌症,或处于表达NPM1的癌症的风险中。术语“表达NPM1的癌症”是指以NPM1的表达为特征的癌症(例如,与非癌细胞相比,NPM1的表达增强),其还可以以NPM1的亚细胞定位的改变为特征,例如如存在于细胞表面上的NPM1的增加。表达NPM1的癌症可表达WT NPM1和/或突变体NPM1。表达NPM1的癌症可在细胞表面上表达WT NPM1和/或突变体NPM1。表达NPM1的癌症也可以是指这样的癌症,其最初不以NPM1的表达为特征,但响应于施用试剂(例如,化学治疗药物)或用试剂(例如,化学治疗药物)治疗而表达NPM1(例如,细胞表面WT NPM1和/或突变体NPM1)。在一些实施方案

中,表达NPM1的癌症是实体(组织)或液体(生物流体,例如血液)癌症。在一些实施方案中,表达NPM1的癌症是选自以下的癌症:血液学癌症、肺癌、乳腺癌、脑癌、胃肠癌、肝癌、肾癌、膀胱癌、胰腺癌、卵巢癌、睾丸癌、前列腺癌、子宫内膜癌、肌癌、骨癌、神经内分泌癌、结缔组织癌、头颈癌或皮肤癌。在一些实施方案中,表达NPM1的癌症是急性髓系白血病(AML)、急性早幼粒细胞白血病(APL)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、非霍奇金淋巴瘤和骨髓增生异常综合征(MDS)。在一些实施方案中,表达NPM1的癌症是转移性癌症。在一些实施方案中,表达NPM1的癌症是治疗相关的癌症或继发性恶性病。治疗相关的癌症或继发性恶性病可以是癌症,例如白血病、癌或淋巴瘤,由先前的用化学治疗剂或放射性同位素的治疗引起。在一些实施方案中,表达NPM1的癌症是治疗相关的AML(therapy-related AML,t-AML)或非霍奇金淋巴瘤的继发性恶性病。

[0152] 在一些实施方案中,对象先前已对表达NPM1的癌症进行过治疗。在一些实施方案中,对象患有对一种或更多种治疗(例如,用一种或更多种化学治疗药物的治疗)有抗性的表达NPM1的癌症。如果治疗不能有效地杀伤癌症细胞和/或使癌症细胞失活,例如由于癌症中发生的遗传和/或表观遗传变化导致一种或更多种治疗药物的失活和/或外排,或一种或更多种治疗的下游效应的抑制,尤其是如果治疗先前对杀伤癌症细胞和/或使癌症细胞失活是有效的,则表达NPM1的癌症被认为对治疗(例如,用一种或更多种化学治疗药物的治疗)有抗性。在一些实施方案中,对一种或更多种治疗(例如,用一种或更多种化学治疗药物的治疗)有抗性的表达NPM1的癌症在癌细胞表面上表达NPM1,作为癌症对其有抗性或已经变得有抗性的先前治疗(例如,用一种或更多种化学治疗药物的先前治疗)的结果。在一些实施方案中,对一种或更多种治疗(例如,用一种或更多种化学治疗药物的治疗)有抗性的表达NPM1的癌症的表面上NPM1水平提高,作为癌症对其有抗性或已经变得有抗性的先前治疗(例如,用一种或更多种化学治疗药物的先前治疗)的结果。

[0153] 根据待治疗疾病(例如,癌症)的类型或疾病(例如,癌症)的部位,可使用医学领域普通技术人员已知的常规方法将抗体、缀合物或其组合物(例如,药物组合物)施用于对象。抗体、缀合物或其组合物(例如,药物组合物)可全身(即,在整个身体中)或局部(即,于体内的一个或更多个特定器官、组织或位置)施用。抗体、缀合物、或其组合物(例如,药物组合物)可通过任何常规途径施用,例如经口、肠胃外、通过吸入喷雾、表面、经直肠、经鼻、经颊、经阴道、腹膜内或通过植入的储库施用。本文中使用的术语“肠胃外”包括皮下、皮内、静脉内、肌内、关节内、动脉内、滑膜内、胸骨内、腹膜内、鞘内、病灶内和颅内注射或输注技术。在一些实施方案中,抗体、缀合物、或其组合物(例如,药物组合物)通过静脉注射或输注施用。另外,抗体、缀合物、或其组合物(例如,药物组合物)可通过可注射的储器施用途施用于对象,例如使用1个月、3个月或6个月储器式可注射或可生物降解材料和方法。在一些实施方案中,抗体、缀合物或其组合物(例如,药物组合物)通过注射施用。在一些实施方案中,注射是静脉内注射或瘤内注射。

[0154] 在一些实施方案中,施用进行多于一次。在一些实施方案中,施用每天一次、每2天一次、每3天一次、每4天一次、每5天一次、每6天一次、每周一次、每2周一次、每3周一次、每月一次、每2个月一次、每3个月一次、每4个月一次、每6个月一次、每7个月一次、每8个月一次、每9个月一次、每10个月一次、每11个月一次或每年一次进行。

[0155] 在一些方面中,本公开内容提供了用于在对象中治疗表达NPM1的癌症的方法,所

述方法包括向有此需要的对象施用有效量的组合,所述组合包含本文中所述的抗NPM1抗体、含有与本文中所述的试剂(例如,药物、放射性同位素)缀合的抗NPM1抗体的缀合物、或其组合物(例如,药物组合物)和化学治疗药物或其组合物(例如,药物组合物)。在一些实施方案中,预期的组合包含本文中所述的抗体或缀合物和本文中所述的单一化学治疗药物。在一些实施方案中,预期的组合包含本文中所述的抗体或缀合物和多于一种本文中所述的化学治疗药物。

[0156] 在一些实施方案中,施用组合的对象患有、疑似患有表达NPM1的癌症,或处于表达NPM1的癌症的风险中。表达NPM1的癌症可表达WT NPM1和/或突变体NPM1。表达NPM1的癌症可在癌细胞表面上表达WT NPM1和/或突变体NPM1。在一些实施方案中,表达NPM1的癌症是实体(组织)或液体(生物流体,例如血液)癌症。在一些实施方案中,表达NPM1的癌症是选自以下的癌症:血液学癌症、肺癌、乳腺癌、脑癌、胃肠癌、肝癌、肾癌、膀胱癌、胰腺癌、卵巢癌、睾丸癌、前列腺癌、子宫内膜癌、肌癌、骨癌、神经内分泌癌、结缔组织癌、头颈癌或皮肤癌。在一些实施方案中,表达NPM1的癌症是急性髓系白血病(AML)、急性早幼粒细胞白血病(APL)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、非霍奇金淋巴瘤和骨髓增生异常综合征(MDS)。在一些实施方案中,表达NPM1的癌症是转移性癌症。在一些实施方案中,表达NPM1的癌症是治疗相关癌症或继发性恶性病。在一些实施方案中,表达NPM1的癌症是治疗相关AML(t-AML)或非霍奇金淋巴瘤的继发性恶性病。

[0157] 在一些实施方案中,施用组合的对象先前已针对表达NPM1的癌症进行过治疗。在一些实施方案中,对象患有对一种或更多种治疗(例如,用一种或更多种化学治疗药物的治疗)有抗性的表达NPM1的癌症。如本文中所例示的(参见实施例4),用化学治疗药物(例如柔红霉素、维奈托克、5-氮杂胞苷)处理癌细胞可提高癌细胞上和/或癌细胞中(例如白血病癌细胞上,例如AML)的NPM1水平。不希望受理论束缚,用低剂量的化学治疗药物预给药癌细胞(包括化学治疗抗性癌症)加强(增强)癌细胞与本文中所述的抗体或缀合物之间的结合。通过以这种方式加强由抗体或缀合物的结合,可更容易地在对象中治疗癌细胞。例如,已经用低剂量化学治疗药物处理的癌细胞可通过施用比其他方式可能的(即,在没有用低剂量化学治疗药物治疗的情况下)更低剂量的抗体或缀合物来有效地治疗。“低剂量”可以是指其本身不足以在对象中有效治疗癌症的化学治疗药物的剂量。

[0158] 原则上,本领域通常已知的用于治疗癌症的任何化学治疗药物可作为组合的一部分施用于对象。在一些实施方案中,向对象施用化学治疗药物导致对象中癌细胞表面上的WT和/或突变体NPM1的水平提高。在一些实施方案中,向对象施用有效量的化学治疗药物导致对象中癌细胞表面上的WT和/或突变体NPM1的水平提高多至5%、多至10%、多至15%、多至20%、多至25%、多至30%、多至35%、多至40%、多至45%、多至50%、多至60%、多至70%、多至80%、多至90%、多至100%、多至2倍、多至3倍、多至4倍、多至5倍、多至6倍、多至7倍、多至8倍、多至9倍或多至10倍。在一些实施方案中,向对象施用有效量的化学治疗药物不提高对象中非癌性细胞表面上的WT和/或突变体NPM1的水平,或者在对象中将对象中的非癌性细胞表面上的WT和/或突变体NPM1的水平提高至小于对象中癌细胞表面上的WT和/或突变体NPM1的水平。

[0159] 适用于组合的化学治疗药物的一些非限制性实例包括澳瑞他汀E、澳瑞他汀F、单甲基澳瑞他汀D(MMAD)、单甲基澳瑞他汀F(MMAF)、单甲基澳瑞他汀E(MMAE)、放线菌素、放线

菌素X2、 α -鹅膏蕈碱、 β -鹅膏蕈碱、 γ -鹅膏蕈碱、 ϵ -鹅膏蕈碱、aeroplysin、阿多柔比星、agrochelin、安莎三烯、安丝菌素P-3、阿非迪霉素、凋亡素、L-天冬酰胺酶、阿扎胞苷、巴佛洛霉素A1、巴佛洛霉素B1、巴佛洛霉素B2、巴佛洛霉素C1、巴佛洛霉素C2、巴佛洛霉素D、巴佛洛霉素E、加利车霉素、喜树碱、毛壳素、球毛壳菌素、chlamydocin、烬灰红菌素B、克拉屈滨、秋水仙碱、康普瑞汀A1、康普瑞汀A4、虫草素、隐藻素、葫芦素B、葫芦素E、curvulin、环巴胺、环磷酰胺、阿糖胞苷、更生霉素、柔红霉素、地西他滨、地塞米松、多拉司他汀10、多拉司他汀15、倍癌霉素SA、倍癌霉素TM、倍癌霉素MA、倍癌霉素DM、多柔比星、恩格林A、埃博霉素A、埃博霉素B、埃博霉素C、依托泊苷、氟达拉滨、烟曲霉素、格尔德霉素、坦螺旋霉素(17-AAG)、葡萄糖杀粉蝶菌素A、短杆菌肽A、草环氧二烯、9-羟基玫瑰树碱、羟基脲、吸水菌酯素、寄端霉素、伊达比星、伊利马醌、isatropolone A、isofistularin-3、伊沙匹隆、JW55、乳胞素、luisol A、美登醇、美登素(DM1)、美登素DM3、ravtansine(DM4)、美登素类化合物AP-3、mechercharmycin A、mensacarcin、甲氨蝶呤、6-巯嘌呤、microcolin B、微囊藻毒素LR、米托蒽醌、muscotoxin A、肌基质蛋白、mytoxin B、奈拉滨、奈莫柔比星、nocuolin A、冲酯霉素、寡霉素A、寡霉素B、紫杉醇、拉洛他赛、milataxel、奥他赛、tesetaxel、类鬼笔毒环肽、鬼笔环肽、植物鞘氨醇、杀青虫素A、比洛尼素、鬼臼毒素、聚酮霉素、泼尼松、土槿甲酸B、pseurotin A、puwainaphycin F、吡咯并苯并二氮杂~~草~~、喹哪朵肽、雷查霉素、雷别卡霉素、Ro 5-3335、番红菌素B、山卓霉素、血根碱、皂草毒蛋白、西奈芬净、塔托布林、特罗他汀、6-硫鸟嘌呤、硫代秋水仙碱、单歧藻毒素、tripolin A、雷公藤甲素、妥布霉素A、微管溶素A、微管溶素M、微管溶素IM-1、微管溶素IM-2、微管溶素IM-3、维奈托克和长春新碱。在一些实施方案中,组合包含的化学治疗药物是皂草毒蛋白、柔红霉素、维奈托克或氮杂胞苷。

[0160] 在一些实施方案中,向对象同时施用组合的抗体、缀合物、或其组合物(例如,药物组合物)和组合的化学治疗药物或其组合物(例如,药物组合物),即向对象同时施用或约同时施用。在一些实施方案中,向对象顺序施用组合的抗体、缀合物、或其组合物(例如,药物组合物)和组合的化学治疗药物或其组合物(例如,药物组合物),即在不同时间向对象施用。在一些实施方案中,组合的抗体、缀合物、或其组合物(例如,药物组合物)在组合的化学治疗药物之前施用。在一些实施方案中,组合的抗体、缀合物或其组合物(例如,药物组合物)在组合的化学治疗药物之后施用。在一些实施方案中,组合的抗体、缀合物、或其组合物(例如,药物组合物)和组合的化学治疗药物相隔1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、10分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、12小时、18小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月或6个月向对象施用。

[0161] 可使用医学领域普通技术人员已知的常规方法将组合施用于对象,这取决于待治疗疾病(例如,癌症)的类型或疾病(例如,癌症)的部位。组合可全身(即,在整个身体中)或局部(即,于体内的一个或更多个特定器官、组织或位置)施用。组合还可通过任何常规途径施用,例如经口、肠胃外、通过吸入喷雾、表面、经直肠、经鼻、经颊、经阴道、腹膜内或通过植入的储库施用。本文中使用的术语“肠胃外”包括皮下、皮内、静脉内、肌内、关节内、动脉内、滑膜内、胸骨内、腹膜内、鞘内、病灶内和颅内注射或输注技术。在一些实施方案中,组合的一个或更多个部分(例如,抗体或缀合物、化学治疗药物)通过静脉注射或输注施用。另外,组合的一个或更多个部分(例如,抗体或缀合物、化学治疗药物)可通过可注射的储器施用。

途径施用于对象,例如使用1个月、3个月或6个月储器式可注射或可生物降解材料和方法。在一些实施方案中,组合的一个或多个部分(例如,抗体或缀合物、化学治疗药物)通过注射施用。在一些实施方案中,注射是静脉内注射或瘤内注射。在一些实施方案中,抗体、缀合物、或其组合物(例如,药物组合物)和化学治疗药物或其组合物(例如,药物组合物)通过相同的施用途向对象施用。在一些实施方案中,抗体、缀合物或其组合物(例如,药物组合物)和化学治疗药物或其组合物(例如,药物组合物)通过不同的施用途向对象施用。

[0162] 在一些实施方案中,多于一次施用组合。在一些实施方案中,每天一次、每2天一次、每3天一次、每4天一次、每5天一次、每6天一次、每周一次、每2周一次、每3周一次、每月一次、每2个月一次、每3个月一次、每4个月一次、每6个月一次、每7个月一次、每8个月一次、每9个月一次、每10个月一次、每11个月一次或每年一次施用组合。

[0163] 在一些实施方案中,施用组合的对象是人,即,任何年龄组的男性或女性,例如,儿科对象(例如,婴儿、儿童或青少年)或成人对象(例如,年轻成人、中年成人或老年成人))或非人动物。在一些实施方案中,非人动物是哺乳动物(例如,啮齿动物,例如,小鼠或大鼠)、灵长类(例如,食蟹猴或恒河猴)、商业相关的哺乳动物(例如,牛、猪、马、绵羊、山羊、猫或犬)或禽类(bird)(例如,商业相关的禽类,例如鸡、鸭、鹅或火鸡)。非人动物可以是处于任何发育阶段的雄性或雌性,并且可以是幼年动物或成年动物。非人动物可以是转基因动物或经遗传改造的动物。

[0164] 在一些实施方案中,施用组合的对象是伴侣动物(例如,宠物或服务动物)。伴侣动物的一些非限制性实例包括犬和猫;牲畜,例如马、牛、猪、绵羊、山羊和鸡;以及其他动物,例如小鼠、大鼠、豚鼠和仓鼠。在一些实施方案中,施用组合的对象是研究动物。研究动物的一些非限制性实例包括啮齿动物(例如,大鼠、小鼠、豚鼠和仓鼠)、兔或非人灵长类。

[0165] 在一些实施方案中,对象先前既未被施用组合的抗体、缀合物、或其组合物(例如,药物组合物)(例如,用其治疗),也未被施用组合的化学治疗药物或其组合物(例如,药物组合物)(例如,用其治疗)。在一些实施方案中,对象先前已被施用组合的抗体、缀合物、或其组合物(例如,药物组合物)(例如,用其治疗),并随后被施用组合的化学治疗药物或其组合物(例如,药物组合物)。在一些实施方案中,对象先前已经施用组合的化学治疗药物、或其组合物(例如,药物组合物)(例如,用其治疗),并随后被施用组合的抗体、缀合物、或其组合物(例如,药物组合物)。

[0166] 在一些实施方案中,与不存在本文中所述化学治疗药物的情况下施用的等剂量的本文中所述的抗体或缀合物将实现的生物学响应相比,向对象施用组合在对象中引发增强的生物学响应。在一些实施方案中,与不存在本文中所述抗体或缀合物的情况下施用的等剂量的本文中所述化学治疗药物将实现的生物学响应相比,向对象施用组合在对象中引发增强的生物学响应。在一些实施方案中,将本文中所述的抗体或缀合物与化学治疗药物进行组合增强了向对象施用的抗体或缀合物的效力。由组合施用产生的增强的生物学响应可包括但不限于在对象中减轻疾病的一种或更多种症状,或者在对象中有效预防疾病的发作或复发。

[0167] 在一些实施方案中,与单独施用抗体或缀合物相比,向对象施用组合导致所施用的组合的抗体或缀合物与对象中表达NPM1的癌细胞之间的结合提高。本文中使用的“结合提高”是指施用于对象的抗体或缀合物与对象中表达NPM1的癌细胞结合的比例(例如,施用

于对象的抗体或缀合物与对象中表达NPM1的癌细胞表面的WT和/或突变体NPM1的结合的比例)提高。在一些实施方案中,与单独施用抗体或缀合物相比,向对象施用组合使所施用的组合的抗体或缀合物与对象中表达NPM1的癌细胞之间的结合提高多至5%、多至10%、多至15%、多至20%、多至25%、多至30%、多至35%、多至40%、多至45%、多至50%、多至60%、多至70%、多至80%、多至90%、多至100%、多至2倍、多至3倍、多至4倍、多至5倍、多至6倍、多至7倍、多至8倍、多至9倍或多至10倍。

[0168] 在一些实施方案中,与单独施用组合的抗体或缀合物相比,向对象施用组合导致对象中表达NPM1的癌细胞的生长降低。本文中使用的“生长降低”是指对象中表达NPM1的癌细胞发生细胞分裂(有丝分裂)的速率降低。在一些实施方案中,与单独施用抗体或缀合物相比,向对象施用组合使对象中表达NPM1的癌细胞的生长降低多至5%、多至10%、多至15%、多至20%、多至25%、多至30%、多至35%、多至40%、多至45%、多至50%、多至60%、多至70%、多至80%、多至90%、多至100%、多至2倍、多至3倍、多至4倍、多至5倍、多至6倍、多至7倍、多至8倍、多至9倍或多至10倍。

[0169] 在一些实施方案中,与单独施用组合的抗体或缀合物相比,向对象施用组合导致对象中表达NPM1的癌细胞的细胞死亡提高。本文中使用的“细胞死亡”是指对象中表达NPM1的癌细胞通过细胞停息不再有生存力的任何途径(例如,但不限于凋亡、自噬、坏死和吞噬)发生细胞死亡的速率提高。在一些实施方案中,与单独施用抗体或缀合物相比,向对象施用组合使对象中表达NPM1的癌细胞的细胞死亡提高多至5%、多至10%、多至15%、多至20%、多至25%、多至30%、多至35%、多至40%、多至45%、多至50%、多至60%、多至70%、多至80%、多至90%、多至100%、多至2倍、多至3倍、多至4倍、多至5倍、多至6倍、多至7倍、多至8倍、多至9倍或多至10倍。

[0170] 本领域技术人员将认识到,本文中所述的治疗方法也可适合于治疗与表达细胞表面NPM1的细胞相关的其他疾病或障碍,例如,与WT NPM1或突变体NPM1的细胞表面表达相关的非癌性疾病或障碍。

[0171] 实施例

[0172] 实施例1-NPM1位于人白血病细胞表面上。

[0173] 评价了多种人白血病细胞系的核仁磷蛋白1(NPM1)的细胞表面表达。简言之,将K562、Kasumi、OCI-AML2、OCI-AML3、MOLM13、Jeko1、Nalm6、Jurkat和SupT1细胞在体外用补充有10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和1%青霉素-链霉素(penicillin-streptomycin, Pen/Strep)的RPM1培养基培养。使用已建立的技术(参见,例如, Flynn et al., Cell. 2021; 184(12): 3109-3124.e22)收集细胞膜和胞质级分,并用以下市售抗体进行免疫印迹: NPM1-WT (Santa Cruz Biotechnology#sc-32256)、NPM1-Mut (Thermo Scientific#PA1-46356)、 β -肌动蛋白(Santa Cruz Biotechnology#sc-47778)和RPN1 (Santa Cruz Biotechnology#sc-48367)。虽然大多数NPM1位于每种细胞类型的胞质溶胶中,但在所有细胞类型的表面上鉴定出大量的野生型(WT)和突变体(mutant, Mut)NPM1(图1A)。活细胞的进一步荧光活化细胞分选(fluorescence activated cell sorting, FACS)分析确定了被测定的每种细胞类型表面上NPM1的不同水平。

[0174] 这些结果表明,对WT和/或突变体NPM1具有特异性的抗体可用于将细胞毒性载荷携带至在患者中表达NPM1的癌症,例如,如在患有急性髓系白血病(AML)、非霍奇金淋巴瘤

和骨髓增生异常综合征 (MDS) 的患者中。然而,这样的治疗策略依赖于在癌细胞表面上表达的NPM1水平高于非癌细胞表面上,尤其是癌症最初来源的细胞表面上表达的NPM1水平。因此,评估了外周血 (PB) 和骨髓 (BM) 细胞表面上的NPM1水平。在测试的大多数鼠PB和BM细胞中,NPM1细胞表面表达相对低,但在表达突变体NPM1的细胞中有所提高 (图1C和1D)。这些结果由人BM细胞的FACS分析确定,其中对WT NPM1具有特异性的抗体不能有效地结合人BM细胞 (图1E)。这些结果强烈表明,对NPM1具有特异性的抗体可用于有效地治疗表达NPM1的癌症。

[0175] 实施例2-多种对NPM1具有特异性的抗体的开发

[0176] 为了进一步评估对NPM1具有特异性的抗体可用于治疗表达NPM1的癌症的可能性,产生了对NPM1具有特异性的新的抗体。产生了对NPM1具有特异性的不同抗体 (“Ab1”和“Ab2”;图2A和2B)。

[0177] 为了评估分离的抗体是否可用于治疗癌症,将Ab1抗NPM1抗体布置在抗体-药物缀合物中,并用于体外处理OCI-AML3细胞。OCI-AML3细胞是用于人急性髓系白血病 (AML) 的模型。简言之,将约150,000个细胞在含10% FBS和1% Pen/Strep的RPMI培养基中培养。将链霉亲和素-皂草毒蛋白 (Strep-ZAP) 与生物素化抗体 (2.6 μ g Strep-ZAP与1 μ g IgG) 在冰上结合30分钟。将Strep-ZAP与生物素化的Ab1抗NPM1抗体 (图2A) 或生物素化的抗小鼠同种型对照 (Strep-ZAP-IgG) (Thermo Scientific#31800) 结合。在结合之后,将Strep-ZAP-IgG复合物添加至细胞,并使细胞在37 $^{\circ}$ C下生长24小时或48小时。在每个时间点之后,收获细胞,在PBS中洗涤,用AnnexinV染色以检测凋亡,并用DAPI染色以检测细胞是否是活的。在染色之后,将细胞洗涤并通过FACS进行分析。在孵育之后,观察到OCI-AML3细胞的杀伤呈剂量依赖性方式,其中在最高剂量下在48小时之后观察到更少的活细胞 (图3A和3B)。重要的是,在相同量的缺乏细胞表面靶向的Strep-ZAP (Strep-ZAP-IgG样品) 中,观察到较少的凋亡和细胞死亡。这些结果表明了基于抗NPM1抗体的ADC用于将细胞毒性药物靶向至表达细胞表面NPM1的癌细胞的效用。

[0178] 虽然这些研究是用人类细胞系进行的,但应该注意的是,由于NPM1的高度保守性,NPM1抗体可用于靶向非人类细胞类型表面上的内源性NPM1。值得注意的是,WT NPM1的氨基酸序列在人与小鼠之间具有约95%的同一性 (图4A),并且在人与其他灵长类之间具有大于99%的同一性 (图4B)。高度保守性还表明,通过在例如鼠细胞或小鼠中测试抗NPM1抗体或ADC的作用而获得的结果将预期延伸至人。

[0179] 实施例3-抗体在人和鼠模型表面上检测WT和突变体NPM1

[0180] 为了进一步确定NPM1抗体可用于靶向癌细胞上的NPM1,使用FACS分析探索了多种人和鼠癌细胞表面上的NPM1水平。在一些情况下,对活细胞进行测定以观察细胞表面定位的NPM1。在另一些情况下,对固定的细胞进行测定以观察NPM1的胞内和细胞表面水平。在活的OCI-AML3细胞表面上观察到显著水平的NPM1,然而在MOLM13细胞上没有稳健地观察到显著数量的NPM1 (图5A)。类似于OCI-AML3细胞,在多种原代鼠AML细胞系的表面上观察到显著水平的NPM1 (图5B和5C)。为了进一步探索非AML细胞系中的细胞表面NPM1,还评估了人K562细胞,其是用于髓细胞性白血病的模型。在这些实验中,外源性NPM1用TY1标签表示,其中外源性NPM1是WT NPM1或突变体NPM1 (NPM1c)。使用活细胞和固定细胞流式细胞术,发现TY1信号存在于表达WT-NPM1-TY1或NPM1c-TY1的细胞表面上,表明NPM1c蛋白也可存在于细胞表

面上(图6A至6E)。正交免疫荧光检测策略确定了经TY1标记的NPM1分子的表面分布(图6F)。

[0181] 鉴于多种鼠和人白血病细胞系表达细胞表面WT和/或突变体NPM1,随后评估了分离的抗体是否也能与这些细胞的表面结合。如通过FACS分析确定的,分离的Ab1抗NPM1(图2A)和Ab2抗NPM1(图2B)抗体各自均能够与原代鼠MLL重排的AML细胞(图7A)和原代鼠NPM1cAML细胞(图7B)上表面定位的NPM1结合。此外,抗体与移植到小鼠模型中的人患者来源的异种移植体(patient derived xenograft,PDX)细胞上的NPM1结合,而不与宿主鼠骨髓细胞结合(图8A至8D)。这些结果与以上结果组合,提供了另外的证据,即包含这些抗NPM1抗体之一的ADC可用于选择性地将化学治疗剂导向癌细胞,而对非癌组织的毒性风险较低。这些抗体可进一步用于其他应用,包括例如通过将抗体与显像剂缀合代替诊断剂,其可继而用于在患者中定位和测量癌细胞的相对丰度。

[0182] 实施例4-用于治疗AML的化学治疗提高NPM1的细胞表面水平

[0183] 接下来,评估了目前批准用于治疗AML的化学治疗剂对细胞表面NPM1水平的作用。原则上,向对象施用这些药物可改变WT和/或突变体NPM1的细胞表面表达,其继而将调节向对象施用的抗NPM1抗体或ADC的效力。评估了用于治疗AML的两种化学治疗剂(柔红霉素和维奈托克)对抗NPM1抗体(Merck/Sigma抗B23#B0556)与OCI-AML3细胞表面上的NPM1的结合的作用。出乎意料地,在用10nM柔红霉素或40nM维奈托克处理48小时之后,抗体与细胞的结合增强(图9A)。该作用在处理8天之后显著增强(图9A和图9B)。与这些结果一致,用柔红霉素或维奈托克处理也增强了上述分离的抗WT NPM1和抗突变体NPM1抗体(图2A和图2B)与OCI-AML3细胞表面上的NPM1(图9C)之间的结合。当用替代化学治疗剂(5-氮杂胞苷(5-Aza;阿扎胞苷))处理OCI-AML3细胞时,观察到相同的作用,其也用于治疗骨髓增生异常综合征(MDS)(图9D)。值得注意的是,在用5-Aza处理仅24小时之后,分离的抗突变体NPM1与OCI-AML3细胞之间的结合显著增强。这些数据表明,多种化学治疗剂可靠地增强抗NPM1抗体与癌细胞表面的结合。虽然这种作用的原因尚不能马上明了,但可能是这些药物提高了癌细胞中的细胞应激水平,其进一步将NPM1从细胞核和胞质溶胶转移到细胞膜。这些结果表明,组合治疗可尤其可用于治疗某些癌症,其中向对象施用化学治疗剂不仅是出于杀伤癌细胞的目的,而且是为了提高癌细胞表面上的NPM1水平,其可用于被共施用于对象的抗NPM1抗体或ADC结合。潜在地,化学治疗剂和抗NPM1抗体或ADC可同时(例如,作为同一组合物的一部分或作为单独的组合物)或在治疗过程期间的不同时间向对象施用。

[0184] 实施例5:NPM1是细胞表面蛋白。

[0185] 为了评估核仁磷蛋白1(NPM1)的亚细胞定位,在OCI-AML3(人细胞系)上进行共聚焦成像。进行胞内和细胞表面染色二者。通过在染色之前固定细胞和使细胞透化来实现胞内染色。相比之下,通过在固定之前对细胞进行染色来进行细胞表面染色。染色结果显示, NPM1存在于细胞内部和细胞表面二者处。在细胞内,NPM1处于核仁,以及在细胞表面上,NPM1形成簇(图10A)。为了研究生物化学分级是否是特异性的,研究了其他RNA结合蛋白(RNABinding Protein,RBP),包括异质核糖核蛋白U(Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U,HNRNPU)、核仁RNA解旋酶2(DDX21)、多核苷二磷酸寡糖蛋白糖基转移酶亚基1(RPN1)和RIO激酶1(RIOK1)。在包括293、A549、K562和AML3在内的多种细胞系的胞质和膜室中测量RBP。生物化学分级和western印迹(WB)的结果显示出,一些其他RBP但非全部高度丰富的胞质蛋白质存在于多种细胞的膜级分中(图10B)。

[0186] 除了评估NPM1在人细胞上的细胞表面表达之外,还使用活细胞流式细胞术研究了原代鼠急性髓系白血病(AML)细胞。如人OCI-AML3细胞系那样,在原代鼠AML细胞上检测到NPM1的细胞表面表达(图11A至11B)。

[0187] 还使用western印迹测试了NPM1的细胞表面定位。抗NPM1从细胞膜级分中捕获了全长NPM1(图12A)。细胞表面NHS-生物素化(仅表面蛋白),随后是来自膜级分的抗NPM1 IP,选择性地分离NPM1分子量处的生物素化条带(图12B)。

[0188] 此外,为了评估NPM1在细胞表面上形成纳米簇的能力,在HL-60(人白血病细胞系)和OCI-AML3细胞上进行超分辨率显微术。超分辨率显微术界定了120至150纳米(nm)簇。这些NPM1簇存在于HL-60和OCI-AML3细胞系二者的细胞表面上。NPM1标志物的成簇和非随机模式表明高度受调节的细胞生物学过程(图13A至13B)。在PANC1细胞系(胰腺癌)上进行的超分辨率显微术也表明NPM1在癌细胞表面上形成纳米簇(图13B)。

[0189] 胞内和细胞表面染色、活细胞流式细胞术和western印迹的结果表明NPM1在人和鼠细胞系二者中都是细胞表面蛋白。另外,超分辨率显微术表明,NPM1在多种人癌细胞系的细胞表面上形成规则的纳米簇,所述人癌细胞系包括急性髓系白血病、白血病和胰腺癌。

[0190] 实施例6:Ab2.2抗体靶向NPM1。

[0191] 产生具有重链(Ab2.2)(SEQ ID NO:44)和轻链(Ab2.2)(SEQ ID NO:45)的抗体(下文称为“Ab2.2”),并将其用于靶向人和非人细胞类型的表面上的NPM1。

[0192] 使用活细胞显微术以及经固定和透化的细胞的显微术二者来测试Ab2.2与癌细胞(OCI-AML3细胞)细胞表面上的NPM1结合的能力。将Ab2.2与市售NPM1抗体进行比较。所使用的市售NPM1抗体是Santa Cruz(SC)抗NPM1-AF647。活细胞显微术显示出,市售的NPM1抗体和maAb2二者都对表面斑点染色。因此,Ab2.2与市售的NPM1抗体在细胞表面上的表现类似(图14)。经固定和透化的细胞的显微术显示出,市售NPM1抗体导致核仁和细胞质的染色,而Ab2.2抗体导致核仁和更主要的细胞质染色。因此,与市售NPM1抗体相比,Ab2.2在突变OCI-AML3细胞中检测到更多的细胞质NPM1(图14)。

[0193] 还使用流式细胞术测试了Ab2.2与健康非癌细胞的细胞表面上的NPM1结合的能力。用于测量Ab2.2结合的细胞是白细胞(CD45+细胞)、髓样细胞(CD33+细胞)和造血干细胞(hematopoietic stem cell) (“HSC”,CD34+细胞)。供体1中仅3.78%的细胞是CD34+和Ab2.2双阳性(供体2和供体3的双阳性低于3%)。因此,几乎没有观察到Ab2.2与健康HSC的结合(图15A)。

[0194] 使用western印迹进一步验证Ab2.2抗体,并与市售抗体进行比较。市售抗体由Santa Cruz提供(SC FC8791)。评价了两种来源的裂解物,WCE和粗制膜(Mem)。Ab2.2和市售抗体二者都产生约38kB的条带。因此,市售的和Ab2.2显示出对于NPM1几乎相同的条带模式(图15B)。

[0195] 实施例7:Ab2.2在体外靶向癌细胞中的NPM1。

[0196] 为了在体外确定Ab2.2是否靶向癌细胞中的NPM1,使用了从Dana-Farber癌症研究所(Dana-Farber Cancer Institute,DFCI)和英国(United Kingdom,UK)收集的患者样品。从12名来自DFCI的急性髓系白血病(AML)患者(图16)和15名来自UK的AML患者(图18)的骨髓中分离细胞,并使用流式细胞术进行分析细胞(图17A至17B和图19A至19C)。结果显示Ab2.2与AML骨髓母细胞(图17A至17B,患者5)和NPM1c AML骨髓(图19D至19E)强结合。此外,

NPM1c母细胞是低CD34的,从而允许检查出由Ab2.2高度结合的LSC群体。因此,Ab2.2与NPM1c患者骨髓中的LSC结合最好(图19D至19E)。来自DFCI的结果表明Ab2.2对母细胞进行强染色,而与突变状态、疾病状态或既往治疗无关。来自UK的结果显示出Ab2.2对母细胞进行强染色。此外,在NPM1c患者中,其LSC是CD34⁻,Ab2.2进行了强染色,并因此Ab2.2将靶向白血病起始细胞。

[0197] 实施例8:Ab2.2在小鼠中不引起毒性。

[0198] 为了评估Ab2.2在体内的毒性,使野生型(WT,C57BL/6J)小鼠每周接受Ab2.2处理。每组有5只小鼠。通过IP注射施用使靶向组接受2.5mg/kg、5mg/kg或10mg/kg剂量的Ab2.2。向对照组施用5mg/kg的IgG(图20A)。总共递送了四剂,每周剂。在处理的第1天(D)、第7天、第14天、第20天和第27天,进行每周采血以收集样品。在D1、D7、D14、D20和D27对小鼠进行称重,并对样品的白细胞(white blood cell,WBC)、血小板(platelet,PLT)和血红蛋白(hemoglobin,HGB)进行测试。Ab2.2处理没有在小鼠中导致可观察到的毒性(图20B)。

[0199] 实施例9:Ab2.2处理提高了AML小鼠模型的存活,并且不影响健康小鼠。

[0200] 使用不同的模型评估Ab2.2的处理效力。在效力模型1中,使小鼠经受亚致死辐照,随后移植原代鼠AML细胞。向接受原代鼠AML的小鼠以5mg/kg的剂量每周施用Ab2.2抗体处理。通过IP注射进行施用。进行每周采血,并进行小鼠总存活、骨髓(BM)和脾分析以及分子表型分型(图21A)。所使用的原代鼠细胞是NPM1c/F1t3-ITD AML,并且使用同系AML小鼠模型。使对照组接受5mg/kg剂量(IgG),并且使靶向组接受5mg/kg剂量(Ab2.2)。施用三剂(每周1剂)。观察到抗体结合,并且来自总WBC计数和qPCR的结果表明经Ab2.2处理的小鼠中的肿瘤负荷降低(图21B至21D)。此外,脾重量、HGB和血细胞比容(hematocrit,HCT)水平表明Ab2.2解决了由AML引起的造血缺陷(图21E至21F)。最后,Ab2.2处理提高了小鼠的总存活(图21G)。存活研究在第100天由于方案而并非毒性或AML复发所结束。

[0201] 在效力模型2中,使小鼠经受亚致死辐照,随后移植原代鼠AML细胞。向接受原代鼠AML的小鼠以5mg/kg的剂量每周施用Ab2.2抗体处理。通过IP注射进行施用。进行每周采血,并进行小鼠的总存活和分子表型分型(图22A)。用于移植的原代鼠细胞是MLL-AF9/F1t3-ITD AML。使用同系AML小鼠模型。使对照组接受5mg/kg剂量(IgG),并且使靶向组接受5mg/kg剂量(Ab2.2)。总共施用4剂Ab2.2。使用流式细胞术观察到抗体结合(图22B)。经Ab2.2处理组的平均存活显著高于经IgG处理的动物($p=0.0027$)。与经Ab2.2处理的小鼠中存活为约55天相比,经IgG处理的小鼠中存活为约20天(图22C)。因此,Ab2.2提高了具有较低NPM1表面水平的AML模型的总存活。此外,这些结果表明,NPM1的任何量的表面表达将导致Ab2.2处理的存活益处。

[0202] 在对照(IgG)和经Ab2.2处理组之间比较第一剂Ab2.2处理之后三天所收集的脾、肺和肝样品。经Ab2.2处理的小鼠的脾、肺和肝全都称重低于经IgG处理的小鼠(图23B)。这些结果表明单剂量的Ab2.2导致器官重量的稳健减少,表明了肿瘤清除。

[0203] 效力模型2也用于评估在次级接受者中Ab2.2的LSC靶向(图23A)。移植的原代鼠细胞是MLL-AF9/F1t3-ITD AML,并且使用同系AML小鼠模型。使对照组接受5mg/kg剂量(IgG),并且使靶向组接受5mg/kg剂量(Ab2.2)。在使次级接受者接受移植之前对其施用一剂Ab2.2。使对照组中的次级接受者接受来自经IgG处理的小鼠的移植细胞。使靶向组接受来自经Ab2.2处理的小鼠的移植细胞。移植相同数目的细胞,并进行存活测定、流式细胞术、移

植检查和LSC功能测量。存活测定的结果表明,与靶向组的约50天相比,对照组的平均存活少于30天(图23C)。经Ab2.2处理的小鼠的寿命延长表明经Ab2.2处理的小鼠中存在较少的干细胞。流式细胞术分析显示出Ab2.2对干细胞区室的染色略微好于大肿瘤(图23D),并且MLL-AF9模型在表面上具有NPM1的低表达(图23E)。在经Ab2.2处理的小鼠中,WBC计数减少,并且PLT增加(图23F)。对WBC的随时间的进一步分析表明,随着时间,与经IgG处理的小鼠相比,经Ab2.2处理的小鼠中WBC保持更低(图23G)。经Ab2.2处理的次级接受者的脾称重低于经IgG处理的小鼠(图23H)。这些结果表明Ab2.2处理导致器官重量的稳健减少,表明了肿瘤清除。评估骨髓(BM)和外周血(PB)的AML百分比(%)。在BM和PB二者中,与IgG对照相比,经Ab2.2处理组中的AML%降低(图23I)。这些结果表明Ab2.2在仅一次剂量之后靶向肿瘤。

[0204] 对接受了亚致死辐照的野生型小鼠测试Ab2.2处理的作用。使WT C57BL/6J小鼠经亚致死辐照和四次Ab2.2处理。通过IP注射每周进行Ab2.2处理,并进行每周采血。使对照组接受5mg/kg的IgG,并且使Ab2.2处理组接受10mg/kg的Ab2.2。进行常规血细胞计数、动物表型分型和不良/毒性作用的测量(图26A)。结果显示出,在第1天(D)和D27之间,在经IgG处理的小鼠和经Ab2.2处理的小鼠之间的重量、WBC计数、HGB水平或PLT水平没有观察到显著差异(图26B)。因此,WT小鼠没有表现出可观察到的Ab2.2处理的作用。

[0205] 实施例10:Ab2.2对存活的作用取决于免疫系统。

[0206] 使用效力模型3评估Ab2.2的免疫介导的杀伤能力。在效力模型3中,向接受了原代鼠AML细胞移植的NSG小鼠每周给予Ab2.2处理,并评估总存活(图24A)。移植的原代鼠细胞是MLL-AF9/F1t3-ITD AML。所使用的小鼠模型是免疫受损的AML小鼠模型(NSG)。使对照组接受5mg/kg剂量(IgG),并且使靶向组接受5mg/kg剂量(Ab2.2)。总共施用四剂Ab2.2。存活测定的结果表明,对照组和靶向组的平均存活为约30天(图24B)。因此,在没有完整的免疫系统的情况下,Ab2.2不提供存活益处。

[0207] 实施例11:Ab2.2处理减小了体内肿瘤体积。

[0208] 使用效力模型4在体内评估Ab2.2的实体瘤活性。在效力模型4中,使已接受移植的小鼠每周经Ab2.2处理,并评估总存活、计算肿瘤负荷和分子表型分型(图25A)。移植的细胞来自MC38小鼠结直肠腺癌。使用同系小鼠模型。使对照组接受10mg/kg剂量(IgG),并且使靶向组接受10mg/kg剂量(Ab2.2)。总共施用三剂(每周1剂)。肿瘤负荷的计算结果表明,在第10天和第13天,Ab2.2减小了肿瘤体积(图25B至25C)。

[0209] 实施例12:Ab2.2存在于癌前细胞上。

[0210] DNMT3a突变与不确定潜能的克隆性造血(clonal hematopoiesis of indeterminate potential,CHIP)和前白血病直接相关。为了测试Ab2.2是否可以在Dmt3a R882H突变细胞上检测到Npm1c,用IgG对照或Ab2.2对Dmmt3a^{R882H/-}和Dmmt3a^{R882H/-}/Npm1c细胞进行染色。结果显示出,甚至在单个Dmmt3a R882H突变细胞上也存在高的Npm1c表面检出(图28)。

[0211] 实施例13:Ab2.2在体外与人肿瘤结合。

[0212] 为了评估Ab2.2与人肿瘤结合的能力,使用流式细胞术研究了多种类型的体外模型。用于评估Ab2.2结合的肿瘤模型是鼠黑素瘤、肺癌(人)、喉癌、结直肠癌(人和鼠)、尤文肉瘤(人)、咽癌(人)、胰腺癌(人)、食管癌(人)、骨肉瘤(人)、神经母细胞瘤(人)、脑肿瘤(人)、血液恶性病、纤维肉瘤、前列腺癌和胰腺腺癌(鼠)(图27A至27O)。结果表明Ab2.2在体

外与多种人肿瘤模型组结合。

[0213] 实施例14:Ab2.2-皂草毒蛋白ADC表现出体外活性。

[0214] 为了评估ADC情况下的Ab2.2的体外活性,将OCI-AML3细胞用阴性对照、同种型皂草毒蛋白缀合物或Ab2.2-皂草毒蛋白缀合物处理。将细胞处理24、48和72小时。在这些时间点时评估每 μL 活细胞的数目。在72小时时,与阴性对照相比,经Ab2.2-皂草毒蛋白缀合物处理的细胞中活细胞的数目减少了约30% (图29)。因此,NPM1至少在一些模型中可以充当ADC靶标。

[0215] 实施例15:Ab2.2处理延长了移植有人AML细胞系的小鼠的寿命。

[0216] 评估了Ab2.2在异种移植有人AML细胞系的小鼠模型中延长寿命的能力。使SCID CB17小鼠接受OCI-AML3细胞(人AML)的移植。接下来,使移植的小鼠每周接受Ab2.2(靶向组)或IgG(对照组)处理。使靶向组接受10mg/kg剂量的Ab2.2。使小鼠接受总共4剂。评估小鼠的总存活以及进行分子表型分型(图30A)。

[0217] 使用流式细胞术评估抗体结合(图30B)。存活测定的结果表明,用Ab2.2处理的移植小鼠的存活在移植之后存活超过40天,显著长于经IgG处理的小鼠($p=0.0015$)。(图30C)。因此,在移植有人AML细胞系以及经Ab2.2处理的自然杀伤(natural killer,NK)细胞和补体的小鼠中观察到寿命延长。

[0218] 实施例16:Ab2.2处理延长了移植有人AML-PDX细胞系的小鼠的寿命。

[0219] 评估了Ab2.2在异种移植有人AML-PDX的小鼠模型中延长寿命的能力。使SCID CB17小鼠接受PDX (MLL-R) 细胞(人AML-PDX)的移植。接下来,使移植的小鼠每周接受Ab2.2(靶向组)或IgG(对照组)处理。使靶向组接受10mg/kg剂量的Ab2.2。使小鼠接受总共4剂。评估小鼠的总存活以及进行分子表型分型(图31A)。

[0220] 使用流式细胞术评估抗体结合(图31B)。存活测定的结果表明,用Ab2.2处理的移植小鼠的存活在移植之后存活超过60天,这显著长于经IgG处理的小鼠($p=0.0023$)。(图31C)。因此,在移植有人AML-PDX细胞系以及经Ab2.2处理的自然杀伤(NK)细胞和补体的小鼠中观察到寿命延长。

[0221] 实施例17:低剂量化疗诱导细胞表面NPM1。

[0222] 为了确定低剂量的化学治疗药剂(柔红霉素和维奈托克)是否诱导细胞表面NPM1,将OCI-AML3细胞暴露于对照或低剂量的化学治疗性处理。OCI-AML3细胞对BLC2i具有抗性。柔红霉素以10纳摩尔(nM)施用,并且维奈托克以40nM施用。柔红霉素的施用在48小时提高了细胞表面上的NPM1,并维持较高表达持续至少9天。维奈托克和单独的5-Aza的施用在48小时提高NPM1,并维持较高表达持续至少7天(图32)。这些结果表明,低剂量的化学治疗药剂诱导AML细胞上的细胞表面NPM1并且Ab2.2增强了已批准药物的安全性或效力。

[0223] 测试了低剂量化学治疗药剂(柔红霉素和维奈托克)在未经转化细胞上诱导细胞表面NPM1的能力。将正常造血前体细胞系HPC7和正常髓样祖细胞系HOXB8暴露于对照或低剂量的化学治疗性处理。柔红霉素和维奈托克的剂量分别以10纳摩尔(nM)和40nM施用。通过流式细胞术测量的抗体结合结果显示,与对照相比,低剂量化学治疗剂没有变化(图33)。因此,低剂量的化学治疗药剂不在正常的、未经转化的细胞上诱导NPM1表达。

[0224] 等同方案和范围

[0225] 本领域技术人员将认识到或仅使用常规实验能够确定本文中所述一些实施方案

的许多等同方案。本公开内容的范围并不旨在限于以上描述,而是如在所附权利要求中阐述的那样。

[0226] 除非指出相反或者在其他情况下从上下文中明显,否则没有数量词修饰的名词可意指一个/种或多于一个/种。除非指出相反或者在其他情况下从上下文中明显,否则如果存在一个、多于一个或全部组成员,则在组的两个或更多个成员之间包含“或/或者”的权利要求或描述被认为符合要求。在两个或更多个组成员之间包含“或/或者”的组的公开内容提供了其中存在恰好一个组成员的实施方案、其中存在多于一个组成员的实施方案以及其中存在全部组成员的实施方案。为简洁起见,这些实施方案在本文中没有被单独地阐述,但是应理解,这些实施方案中的每一个都在本文中提供并且可被具体地要求保护或放弃保护。

[0227] 应理解,本公开内容涵盖其中将来自一个或更多个权利要求或来自说明书的一个或更多个相关部分的一个或更多个限制、要素、条款或描述性术语引入到另一个权利要求中的所有变化、组合和排列。例如,引用另一权利要求的权利要求可被修改为包含在引用相同基础权利要求的任何其他权利要求中找到的一个或更多个限制。此外,在权利要求书中记载组合物的情况下,应理解,除非另有说明或者除非对于本领域普通技术人员明显的是将出现矛盾或不一致,否则包括根据本文中所公开的任一种制造或使用的方法或者根据本领域中已知的方法制造或使用组合物的方法(如果有的话)。

[0228] 在要素以列表(例如,以马库什组形式)表示的情况下,应理解还公开了要素的每个可能的亚组,并且任何要素或要素的亚组都可从该组中移除。还应注意,术语“包含/包括”旨在是开放性的,并且允许包含另外的要素或步骤。应理解,一般而言,在实施方案、产品或方法被称为包含特定要素、特征或步骤的情况下,还提供了由这样的要素、特征或步骤组成或者基本上由这样的要素、特征或步骤组成的实施方案、产品或方法。为简洁起见,这些实施方案在本文中没有被单独地阐述,但是应理解,这些实施方案中的每一个都在本文中提供并且可被具体地要求保护或放弃保护。

[0229] 在给出范围的情况下,包括端点。此外,应理解,除非另有说明或者在其他情况下从上下文和/或本领域普通技术人员的理解中明显,则表示为范围的值在一些实施方案中可假定为所述范围内的任何特定值至所述范围下限的单位的十分之一,除非上下文另有明确规定。为简洁起见,每个范围中的值在本文中没有被单独地阐述,但是应理解,这些值中的每一个都在本文中提供并且可被具体地要求保护或放弃保护。还应理解,除非另有说明或者在其他情况下从上下文和/或本领域普通技术人员的理解中明显,则表示为范围的值可假定为给定范围内的任何子范围,其中子范围的端点以与该范围下限的单位的十分之一相同的准确度表示。

[0230] 在提供网站的情况下,URL地址作为非浏览器可执行的代码提供,括号中是相应网址的句点(period)。实际的网址不包含括号。

[0231] 另外,应理解,本公开内容的任何具体实施方案可明确地从任何一个或更多个权利要求中排除。在给出范围的情况下,该范围内的任何值可明确地从任何一个或更多个权利要求中排除。本公开内容的组合物和/或方法的任何实施方案、要素、特征、应用或方面可从任何一个或更多个权利要求中排除。为简洁起见,本文中未明确阐述其中排除了一个或更多个要素、特征、目的或方面的所有实施方案。

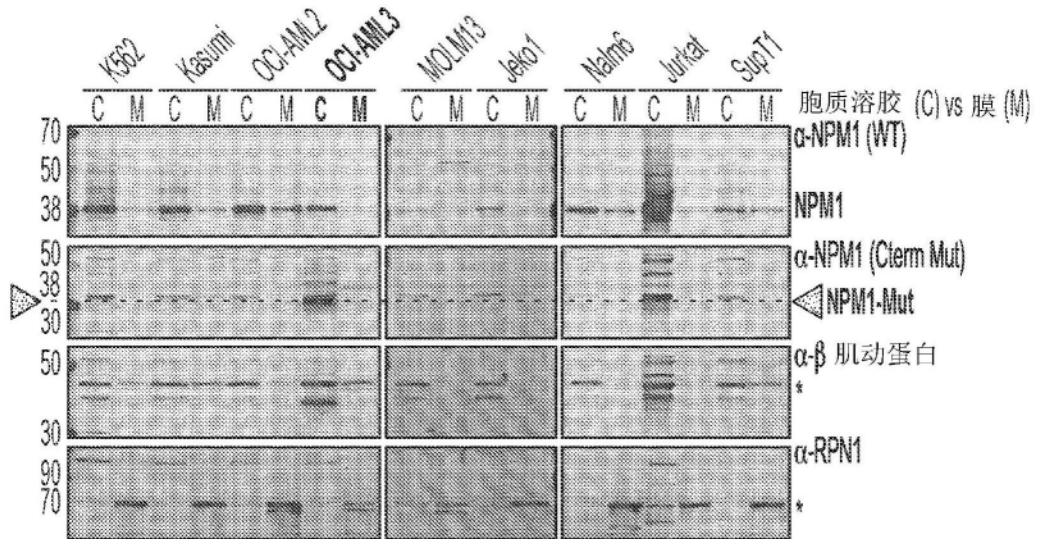


图1A

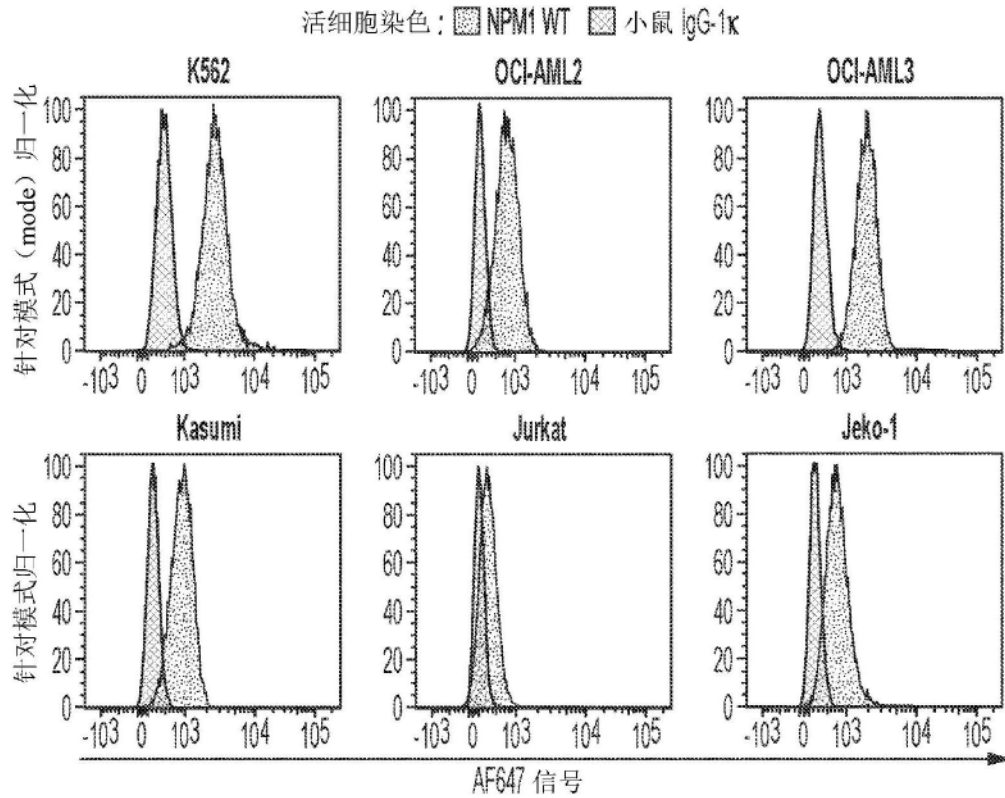


图1B

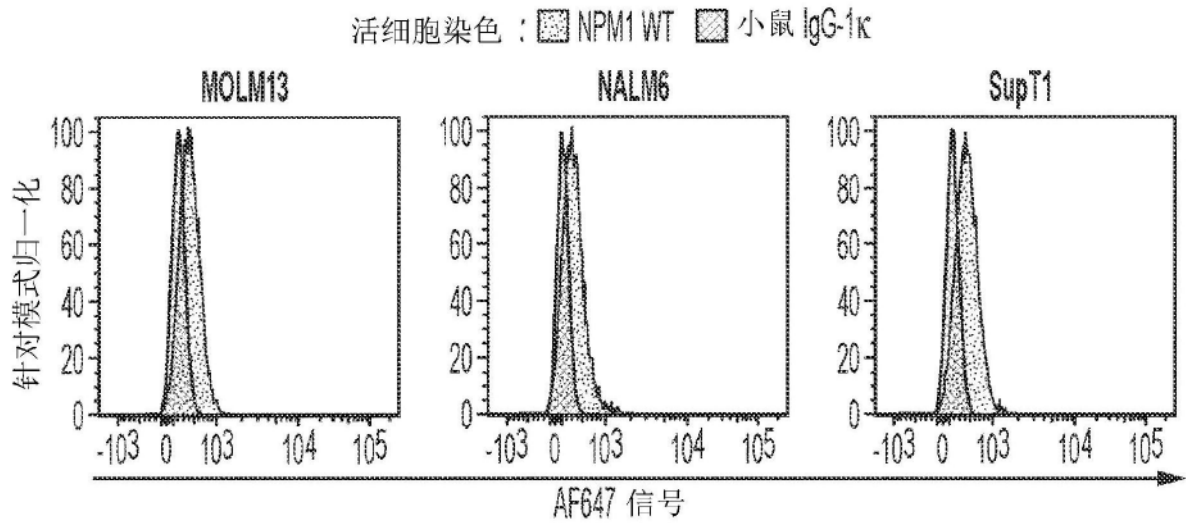


图1B(续)

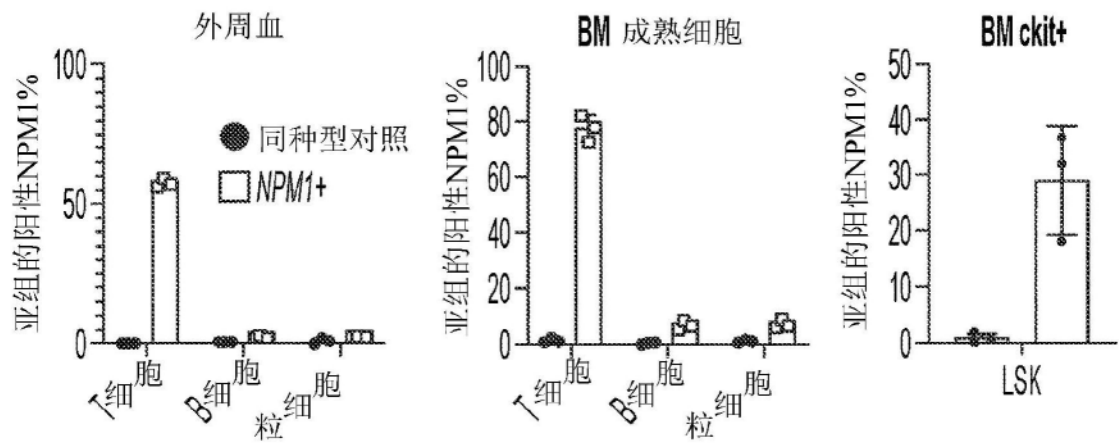


图1C

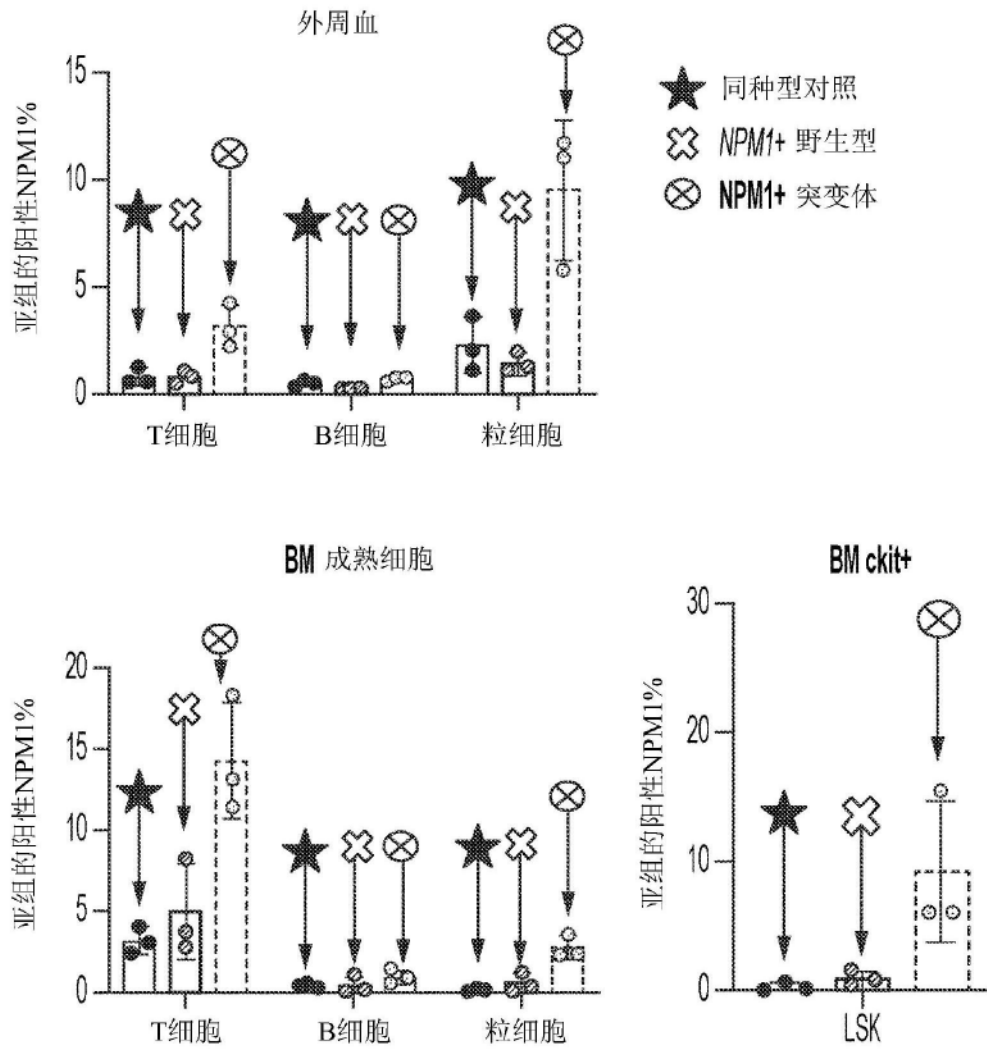


图1D

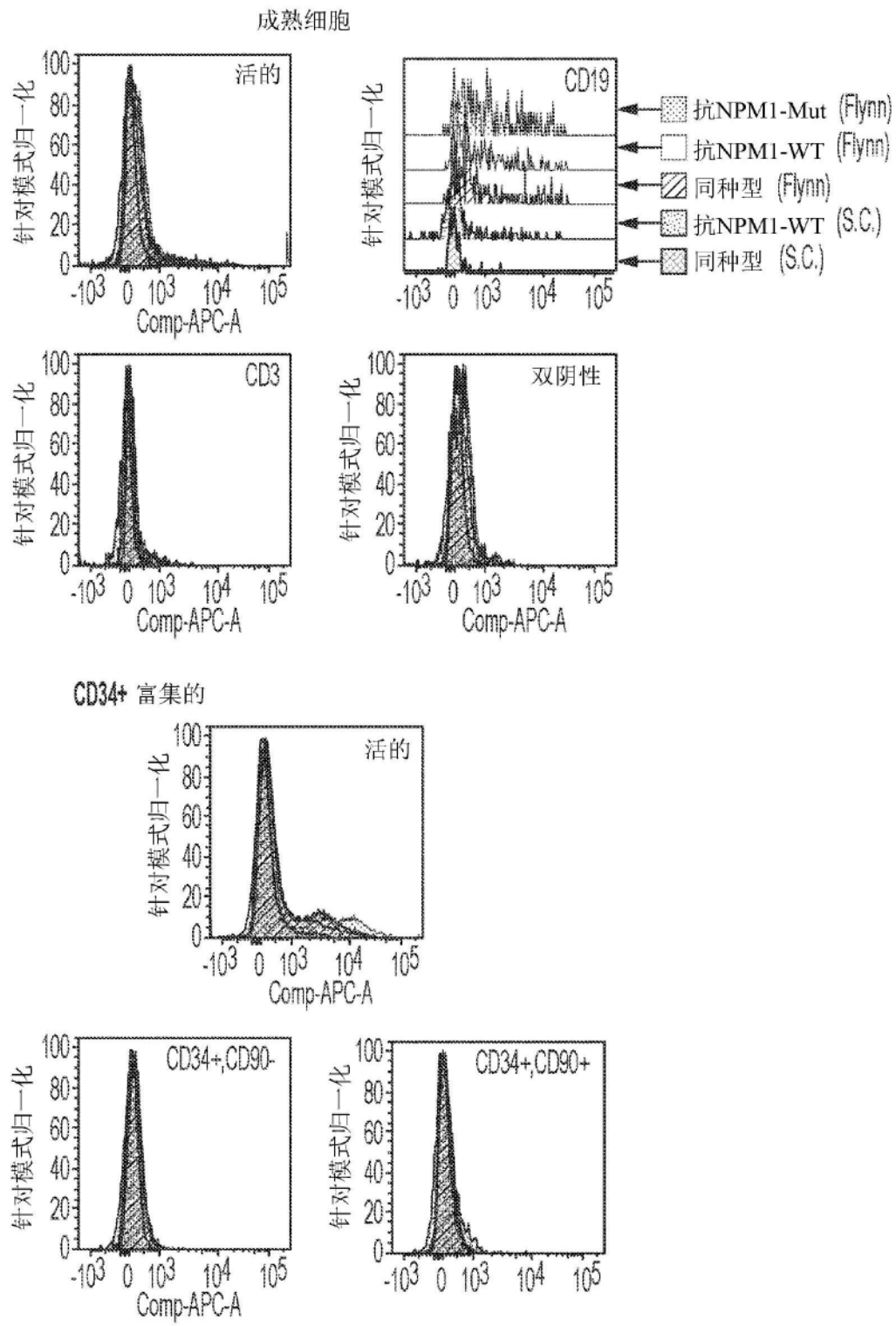


图1E

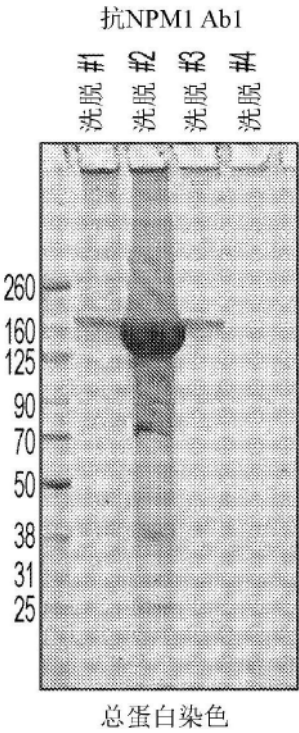


图2A

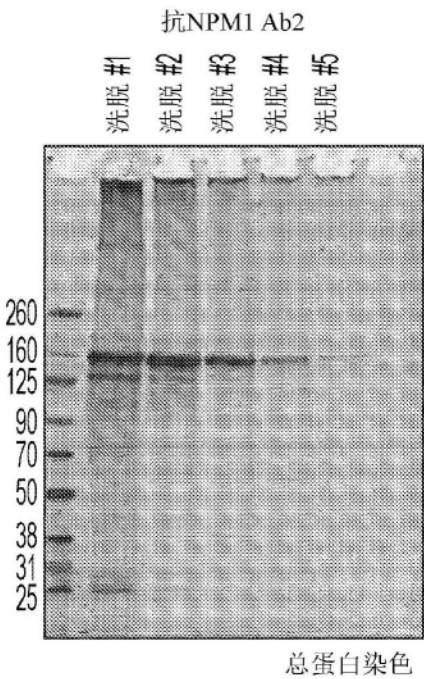


图2B

在将Ab+ZAP添加至OCI-AML3细胞之后24小时

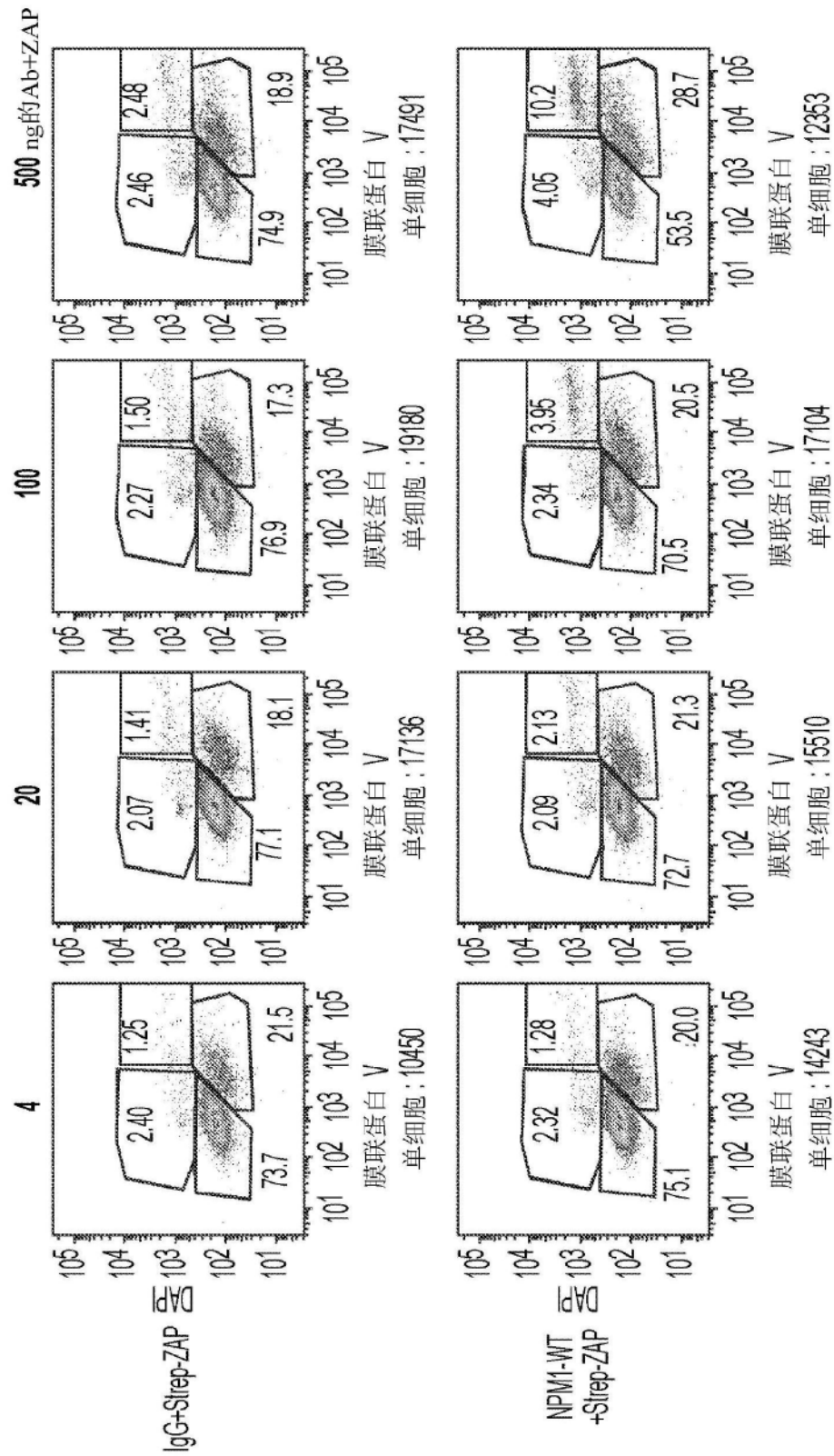


图3A

在将Ab+ZAP添加至OCL-AML3细胞之后48小时

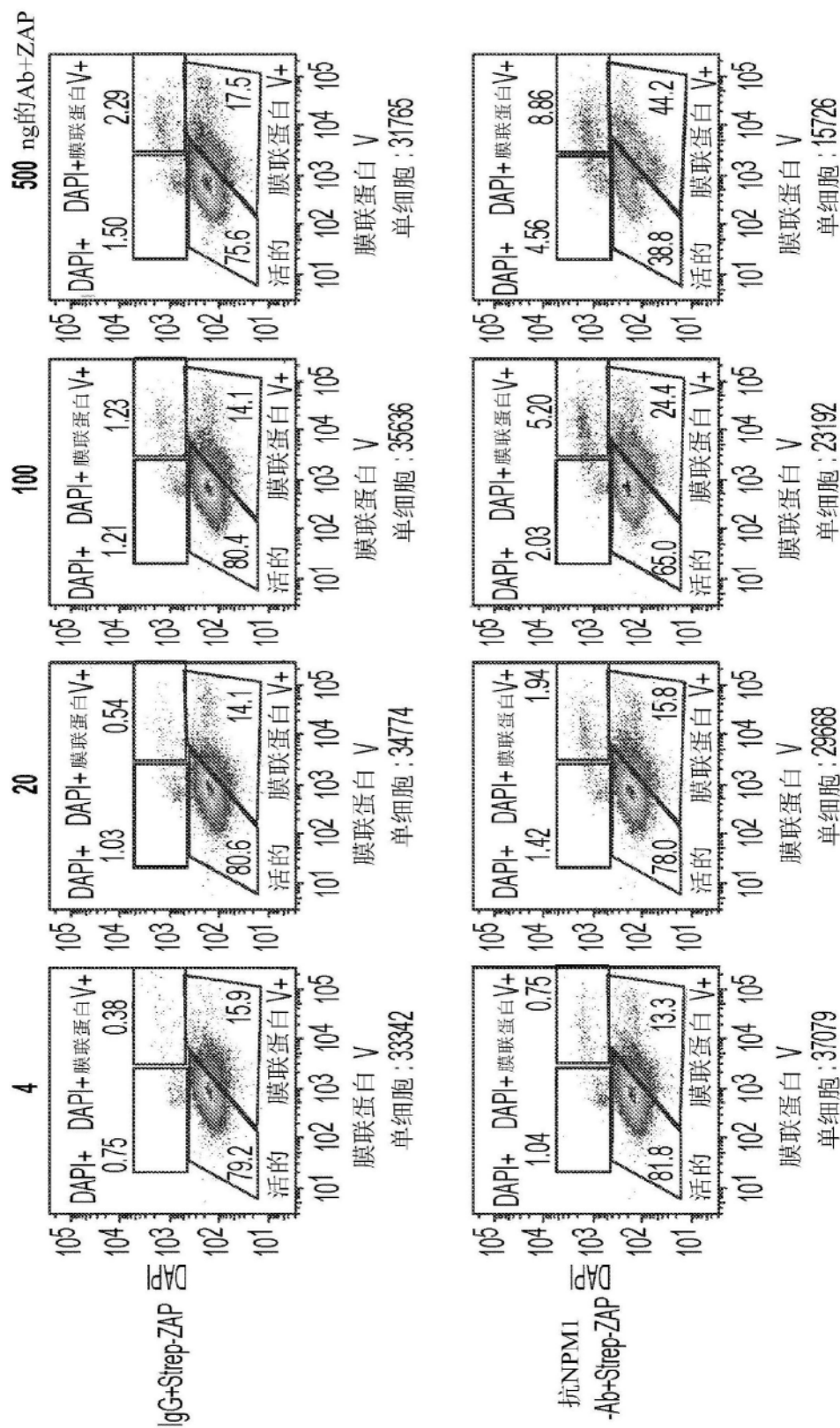


图3B

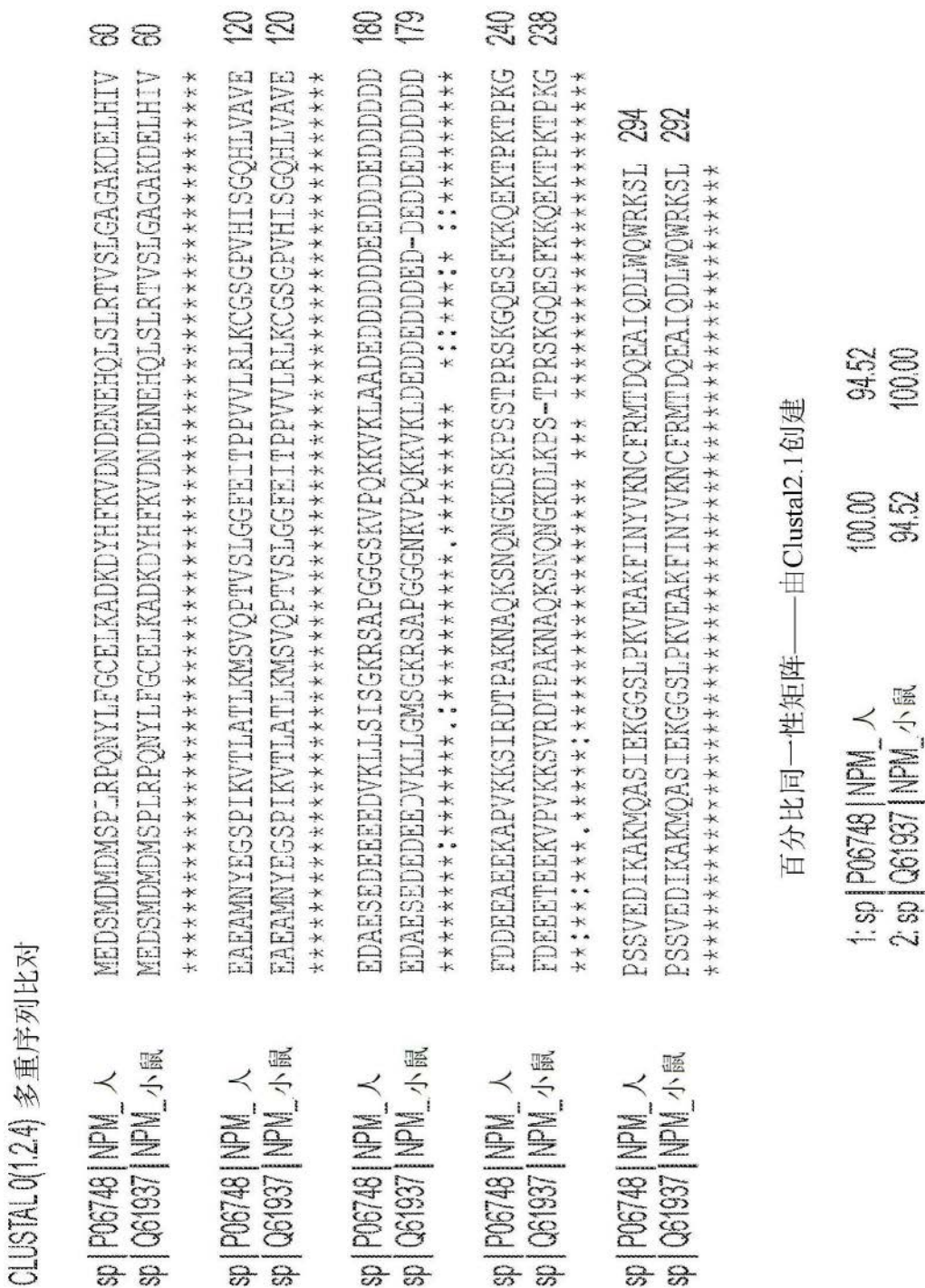


图4A

```

CLUSTAL O(1.2.4) 多重序列比对

t|F7AWJ2|F7AWJ2_MACMU MEDSMMDMSPLRPQNYLFGCELKADKDYHFKVDNDENEHQLSRTVSLGAGAKDELHIV 60
sp|P06748|NPM_人 MEDSMMDMSPLRPQNYLFGCELKADKDYHFKVDNDENEHQLSRTVSLGAGAKDELHIV 60
*****
t|F7AWJ2|F7AWJ2_MACMU EAEAMNYEGSPIKVTILATLKMSVQPTVSLGGFETPPVLRKCGSGPVIHISGQHLVAVE 120
sp|P06748|NPM_人 EAEAMNYEGSPIKVTILATLKMSVQPTVSLGGFETPPVLRKCGSGPVIHISGQHLVAVE 120
*****
t|F7AWJ2|F7AWJ2_MACMU EDAESEDEEEEDVKLLISIGKRSAFEGGSKVPQKKVKLADEDDDDDDDDDDDDDDDD 180
sp|P06748|NPM_人 EDAESEDEEEEDVKLLISIGKRSAFEGGSKVPQKKVKLADEDDDDDDDDDDDDDDDD 180
*****
t|F7AWJ2|F7AWJ2_MACMU FDDEEAEEKAPVKKSIRDTPAKNAQKSNQNGKDSKPSSTPRSKGQESFKKQETPKTPKG 240
sp|P06748|NPM_人 FDDEEAEEKAPVKKSIRDTPAKNAQKSNQNGKDSKPSSTPRSKGQESFKKQETPKTPKG 240
*****
t|F7AWJ2|F7AWJ2_MACMU PSSVEDIKAKMQASIEKGGSLPKVEAKFINYVNCFRMTDQELIQDLWQWRKSL 294
sp|P06748|NPM_人 PSSVEDIKAKMQASIEKGGSLPKVEAKFINYVNCFRMTDQELIQDLWQWRKSL 294
*****

          百分比同一性矩阵——由Clustal2.1创建

      1: tr |F7AWJ2|F7AWJ2_MACMU      100.00      99.66
      2: sp |P06748|NPM_人          99.66      100.00

```

图4B

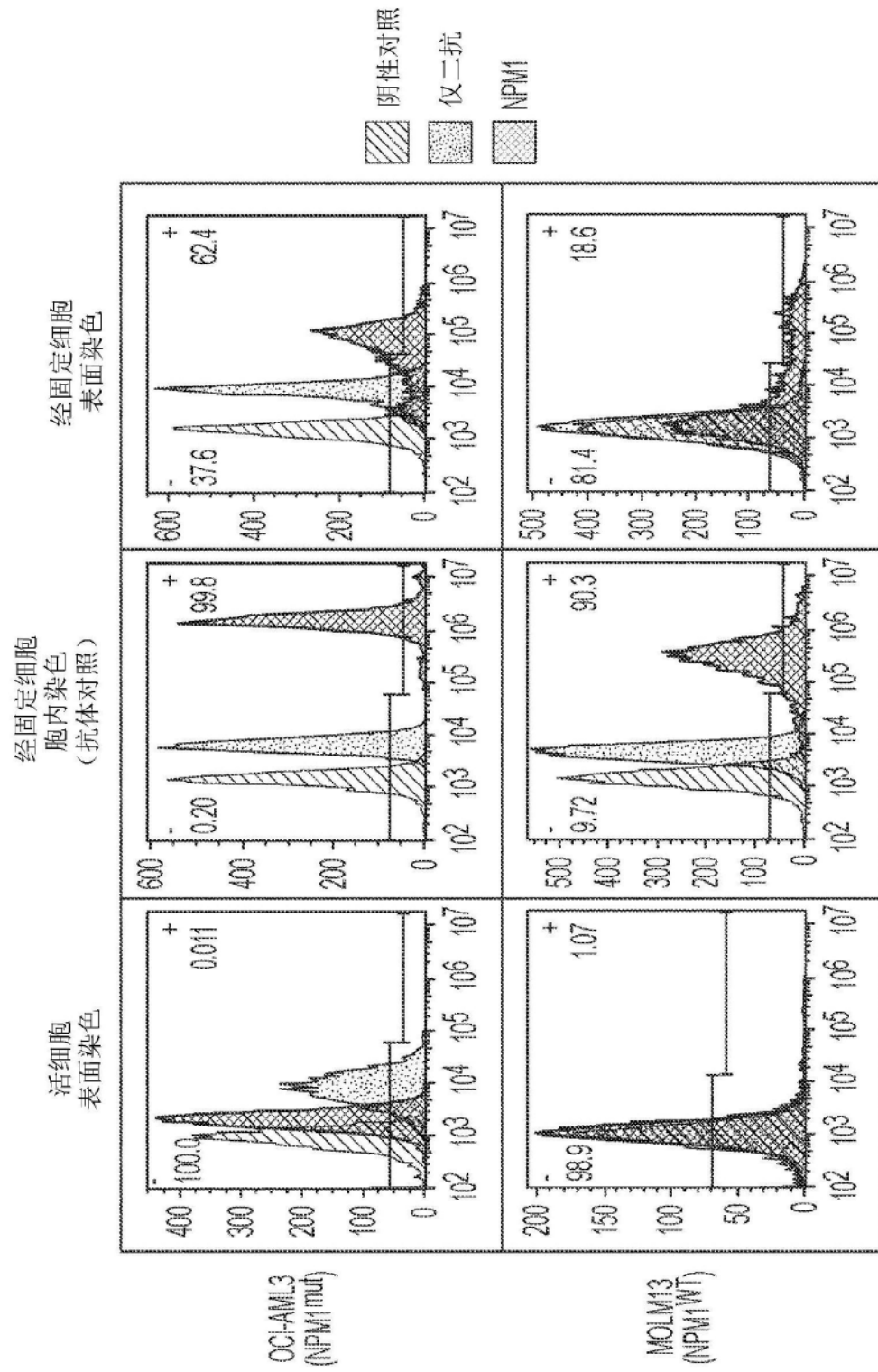


图5A

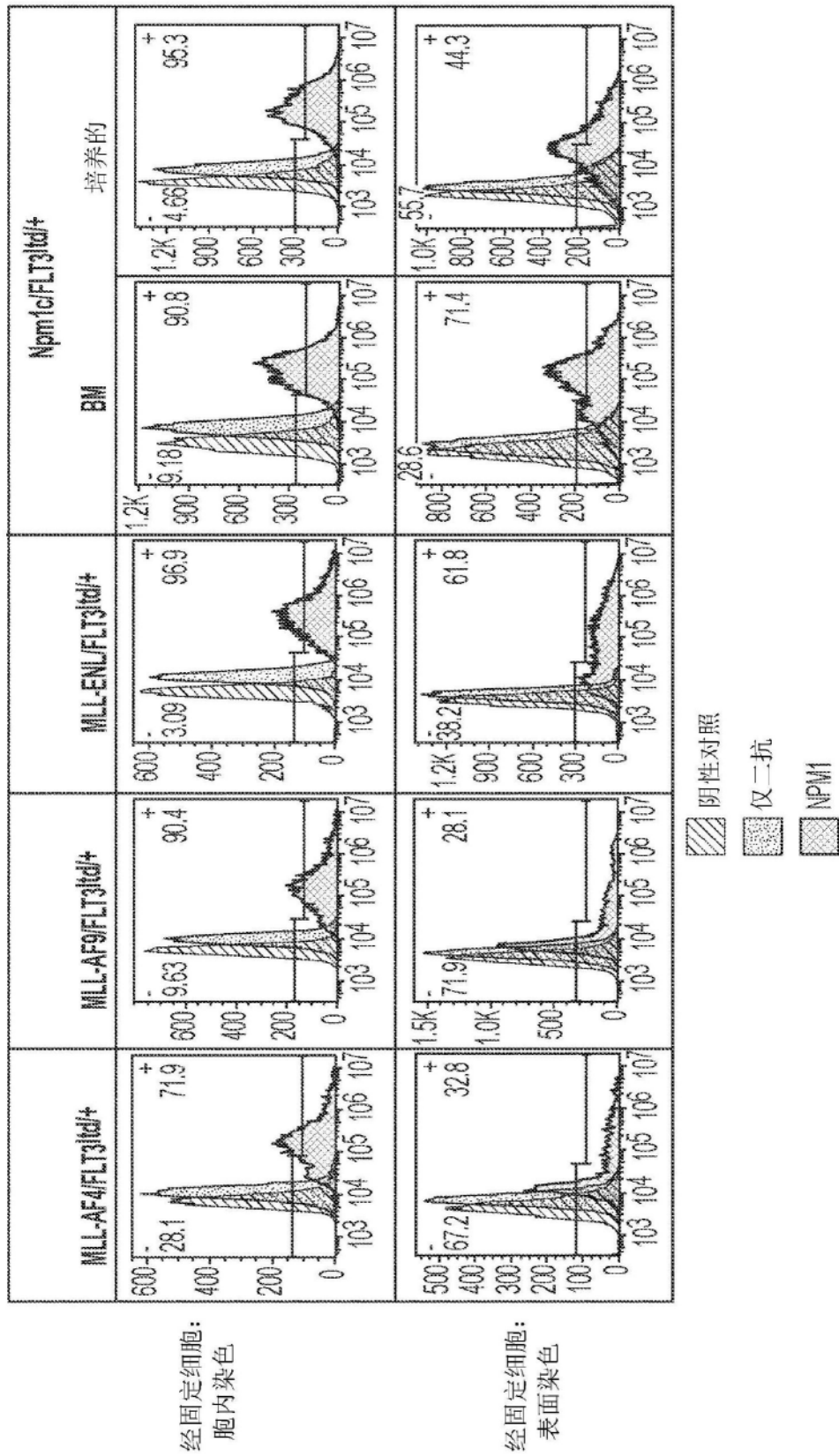


图5B

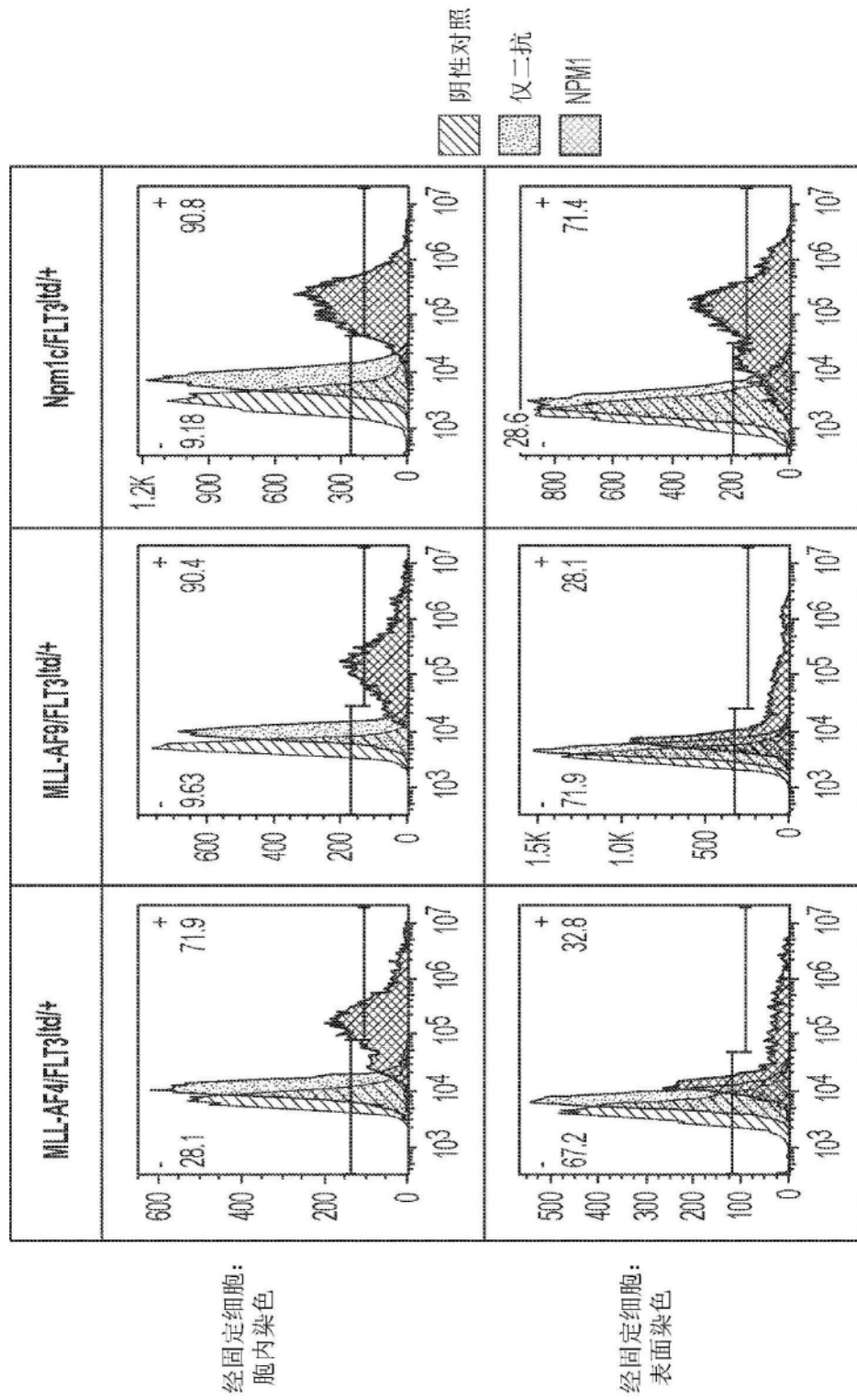


图5C

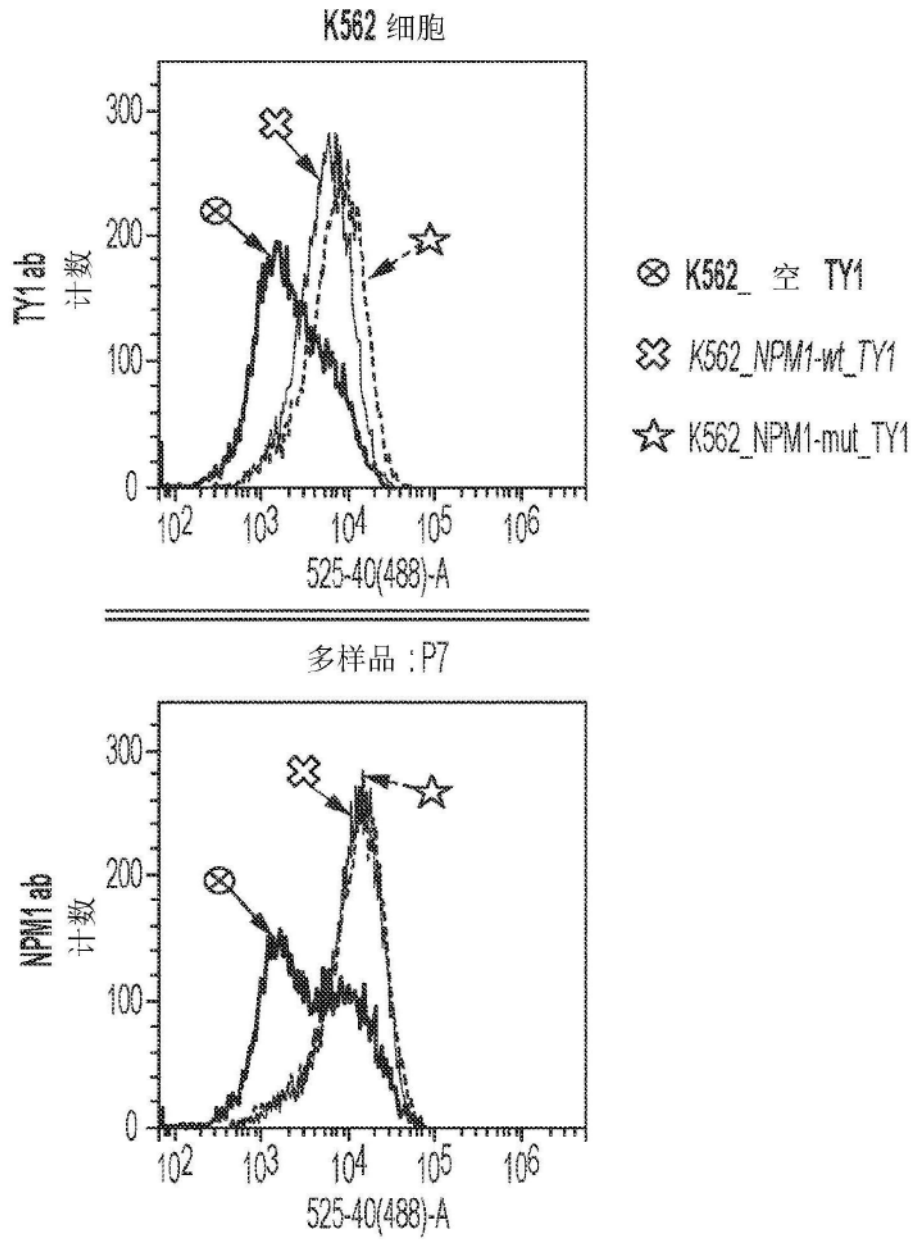


图6A

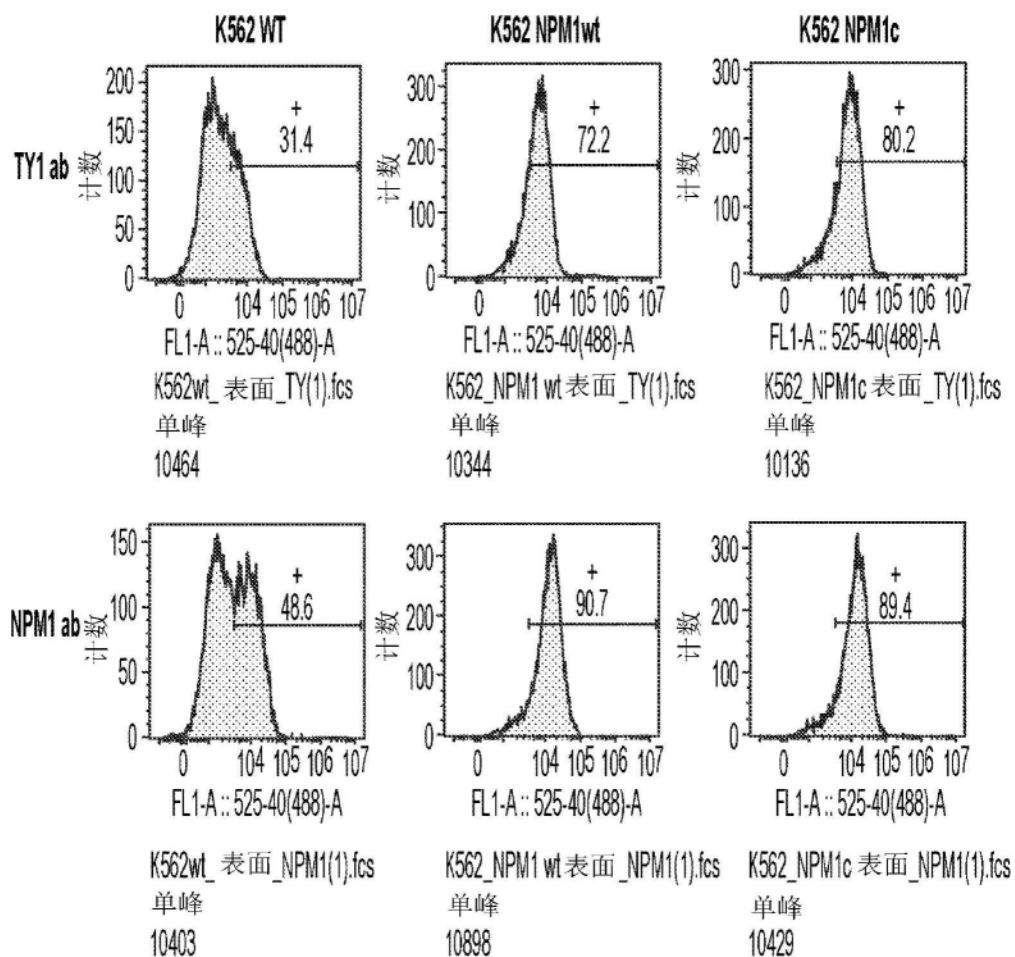


图6B

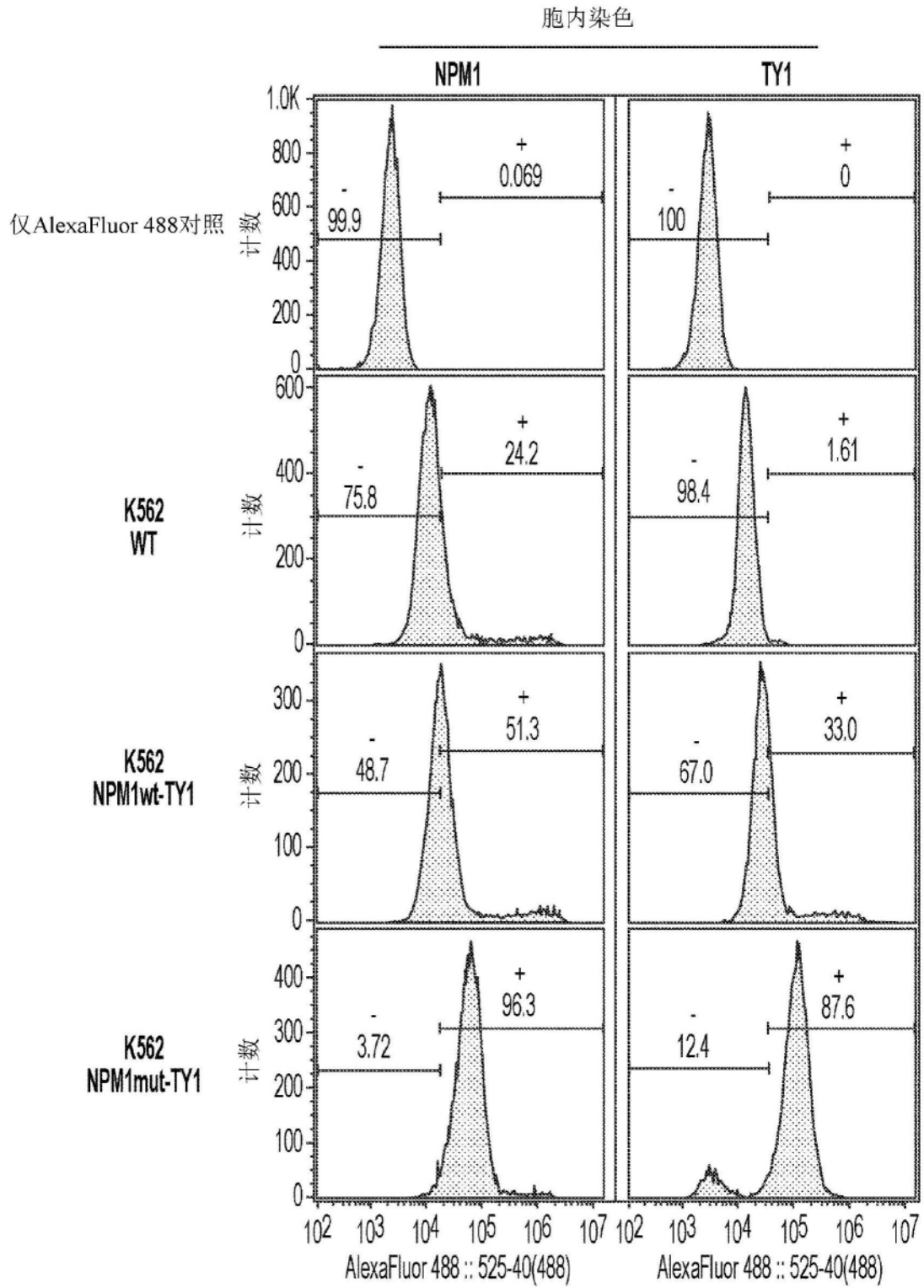


图6C

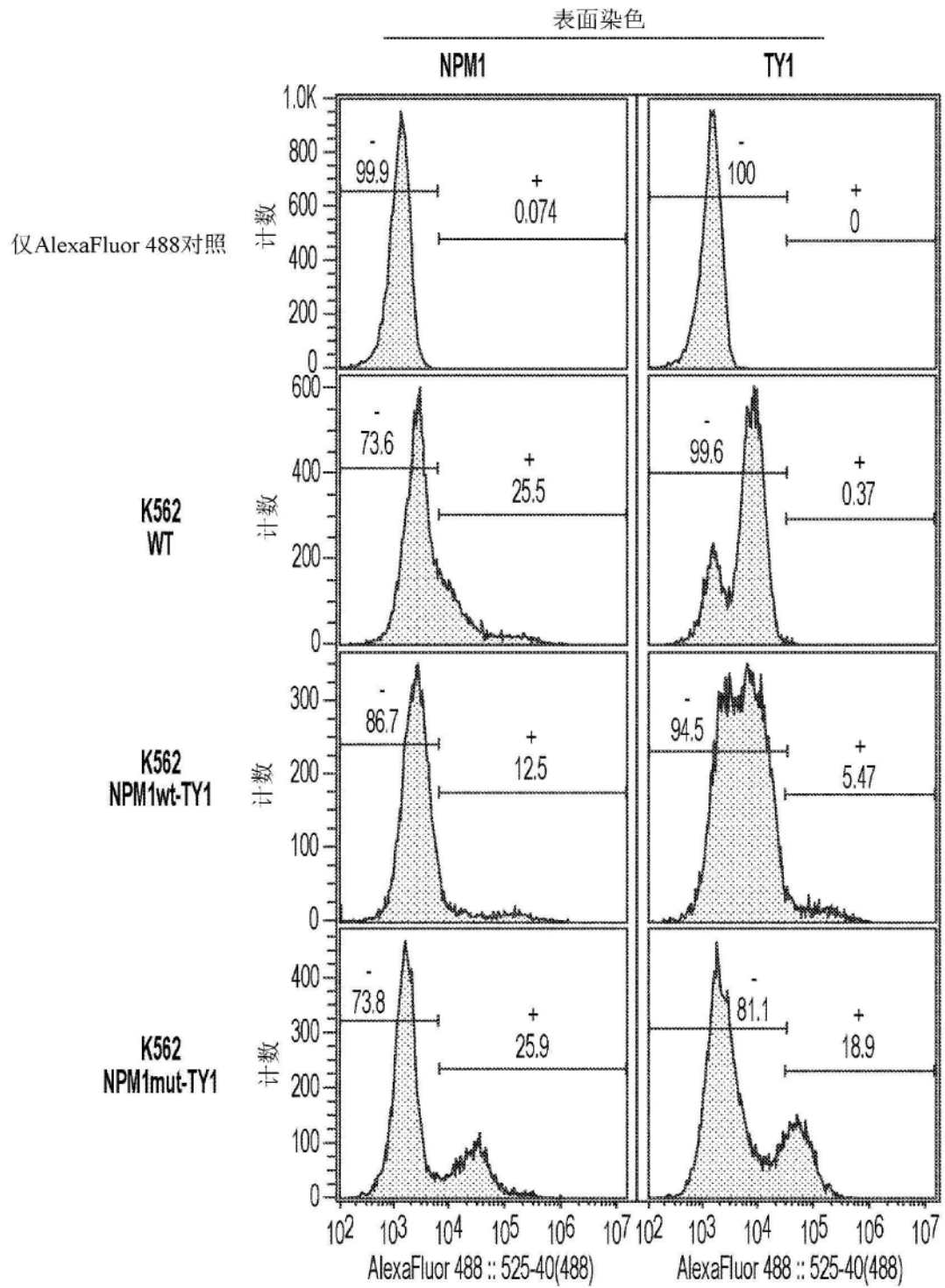


图6C续

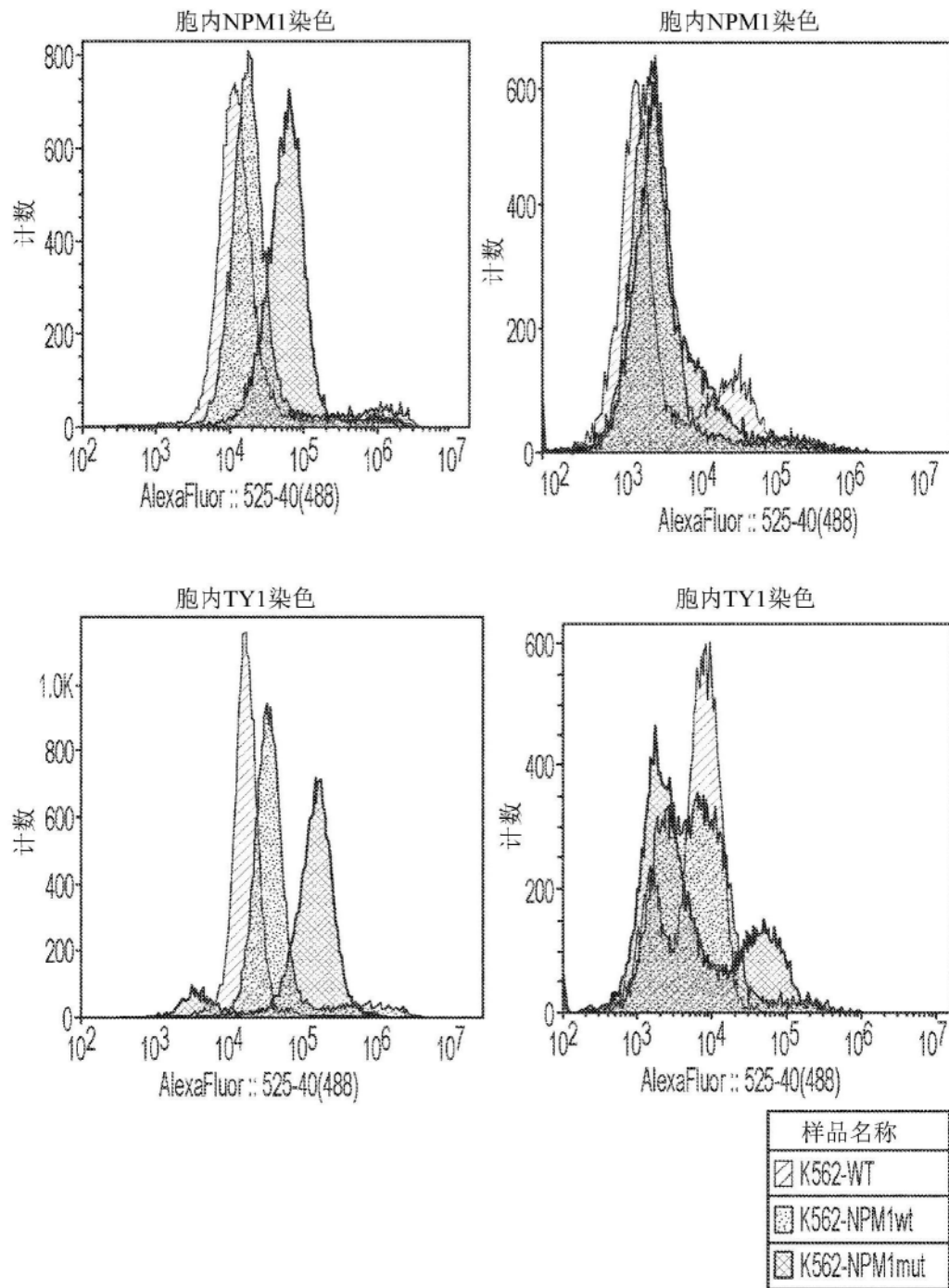


图6D

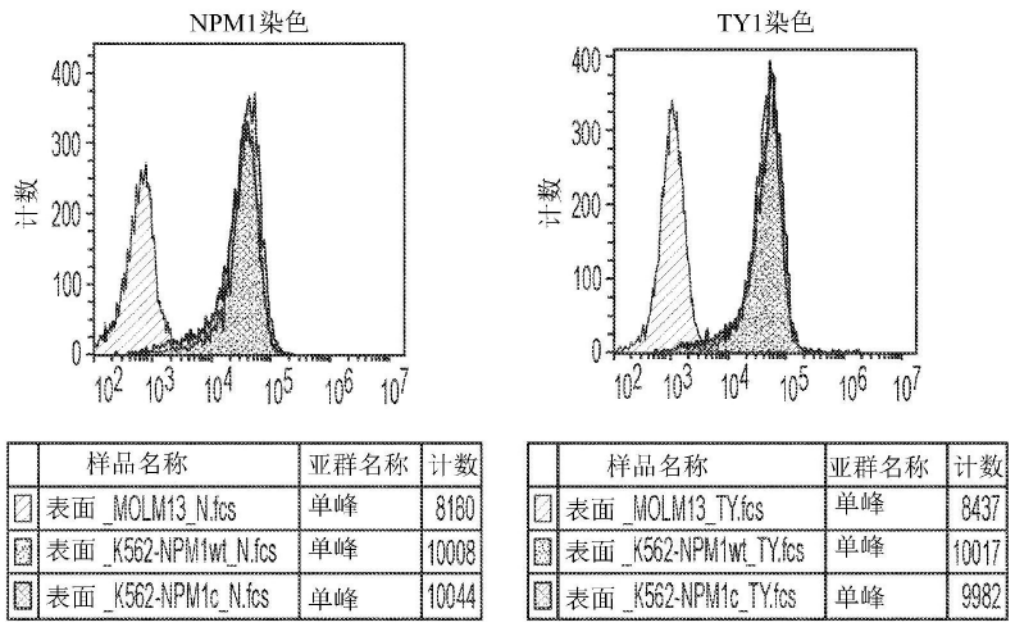


图6E

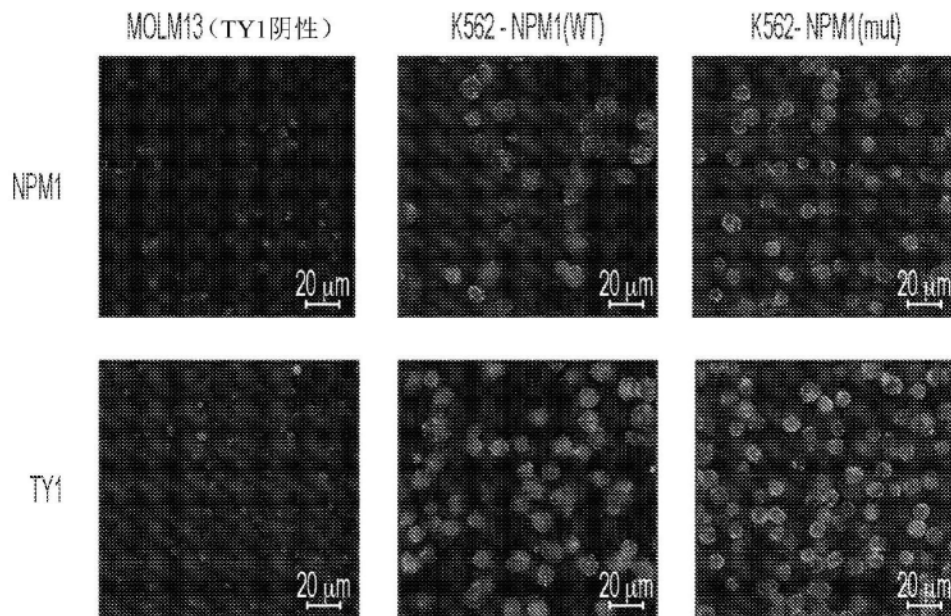


图6F

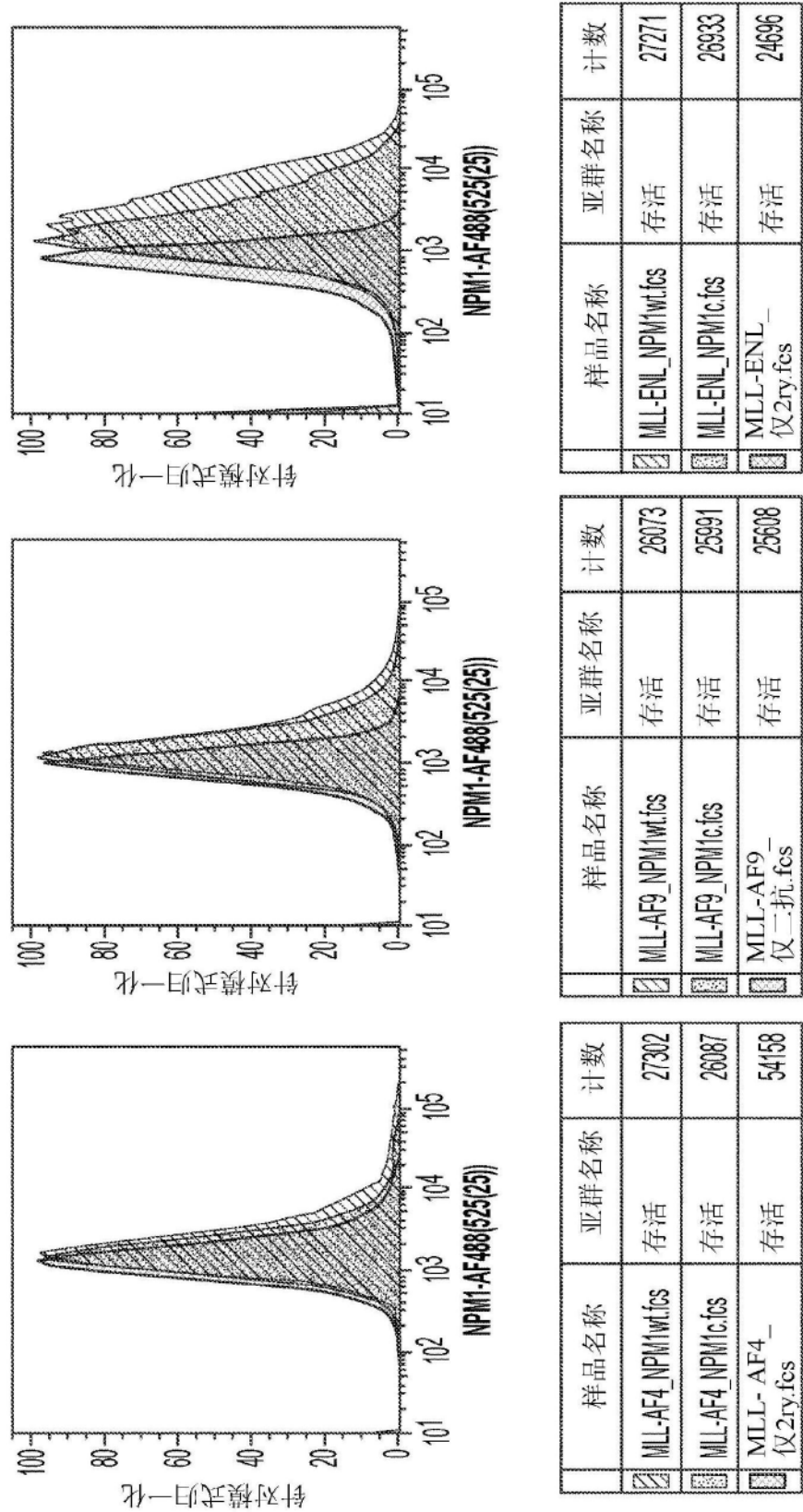
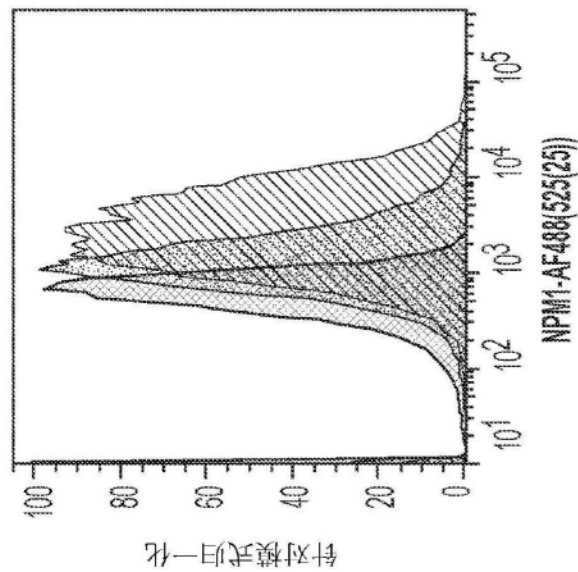
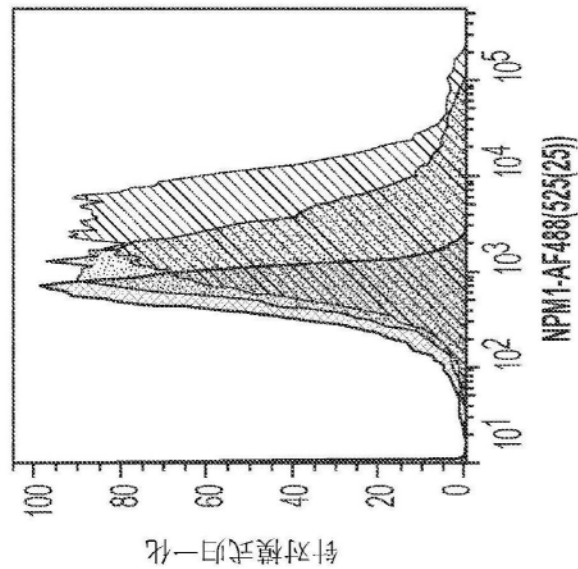


图7A



	样品名称	亚群名称	计数
	DFCM 8.1f NPM1wt.fcs	存活	21674
	DFCM 8.1f NPM1c.fcs	存活	21849
	DFCM 8.1f_仅2ry.fcs	存活	23101



	样品名称	亚群名称	计数
	DFCM 6.4c NPM1wt.fcs	存活	24061
	DFCM 6.4c NPM1c.fcs	存活	24538
	DFCM 6.4c_仅2ry.fcs	存活	24409

图7B

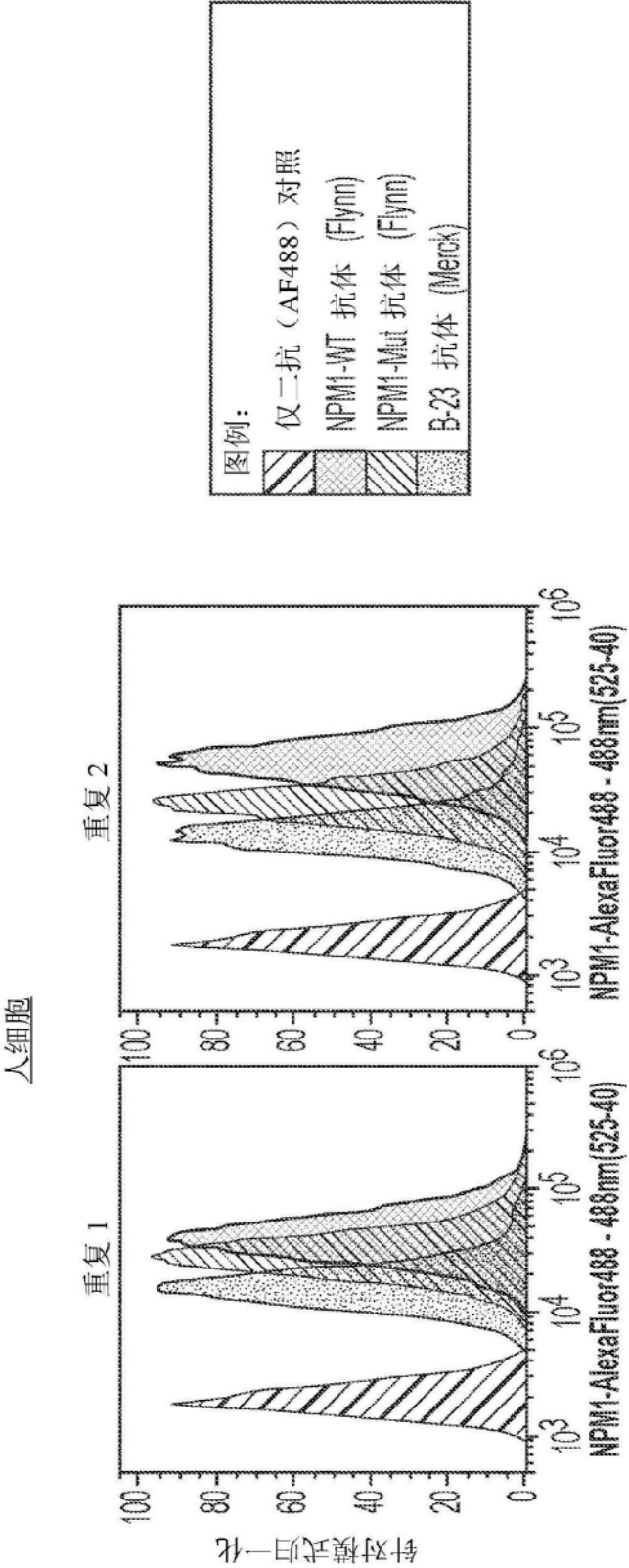


图8A

宿主骨髓细胞 (小鼠)

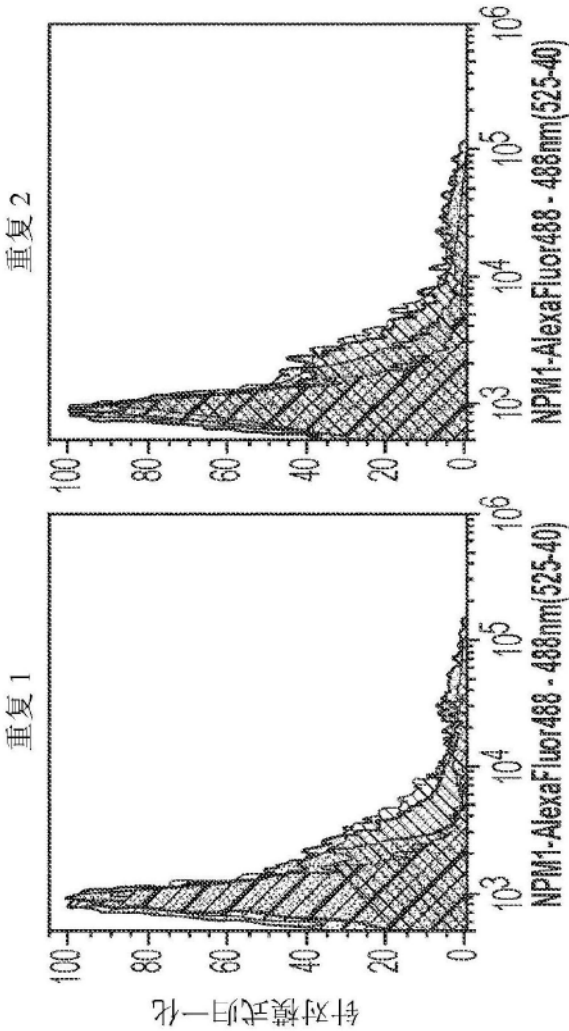


图8A续

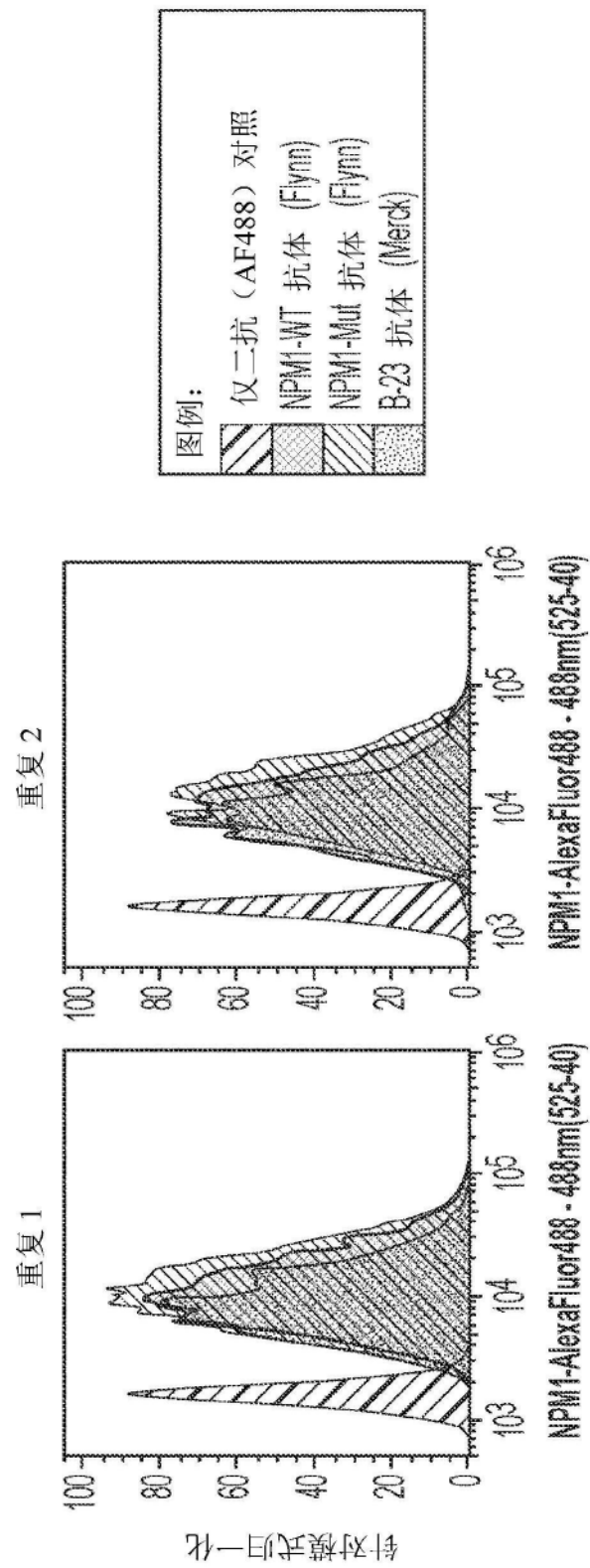


图8B

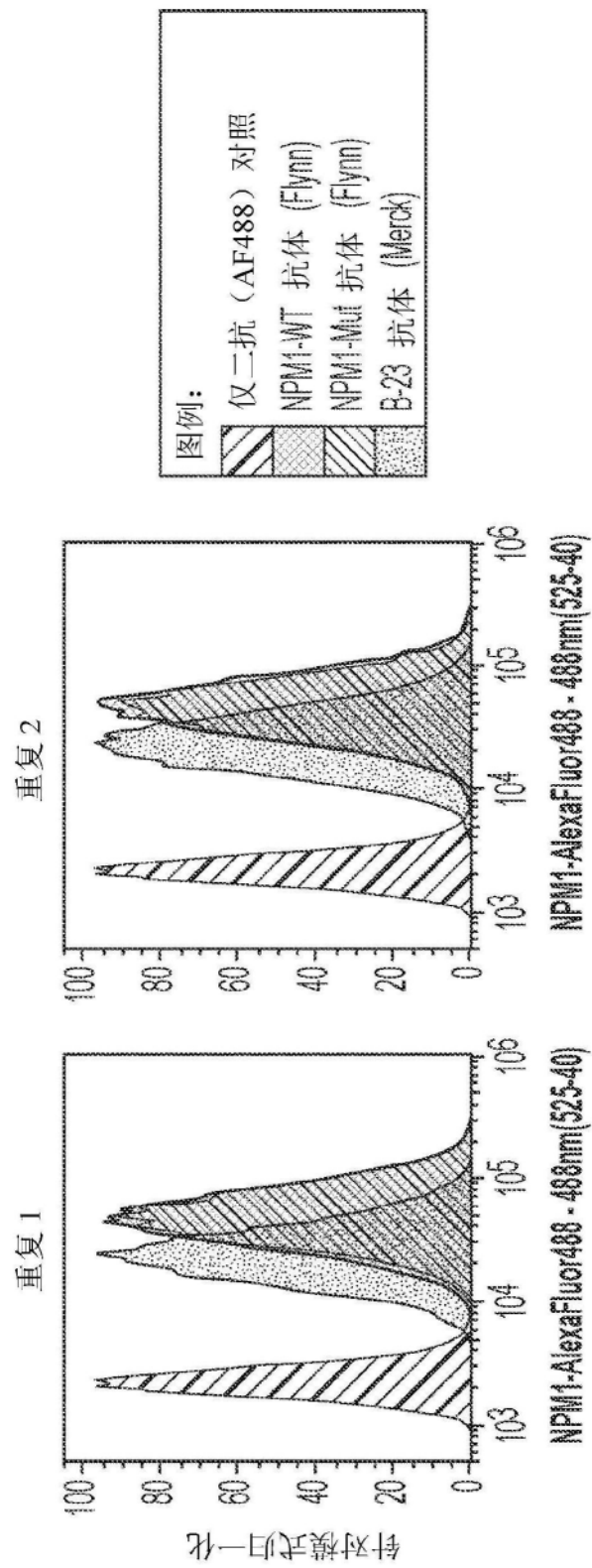


图8C

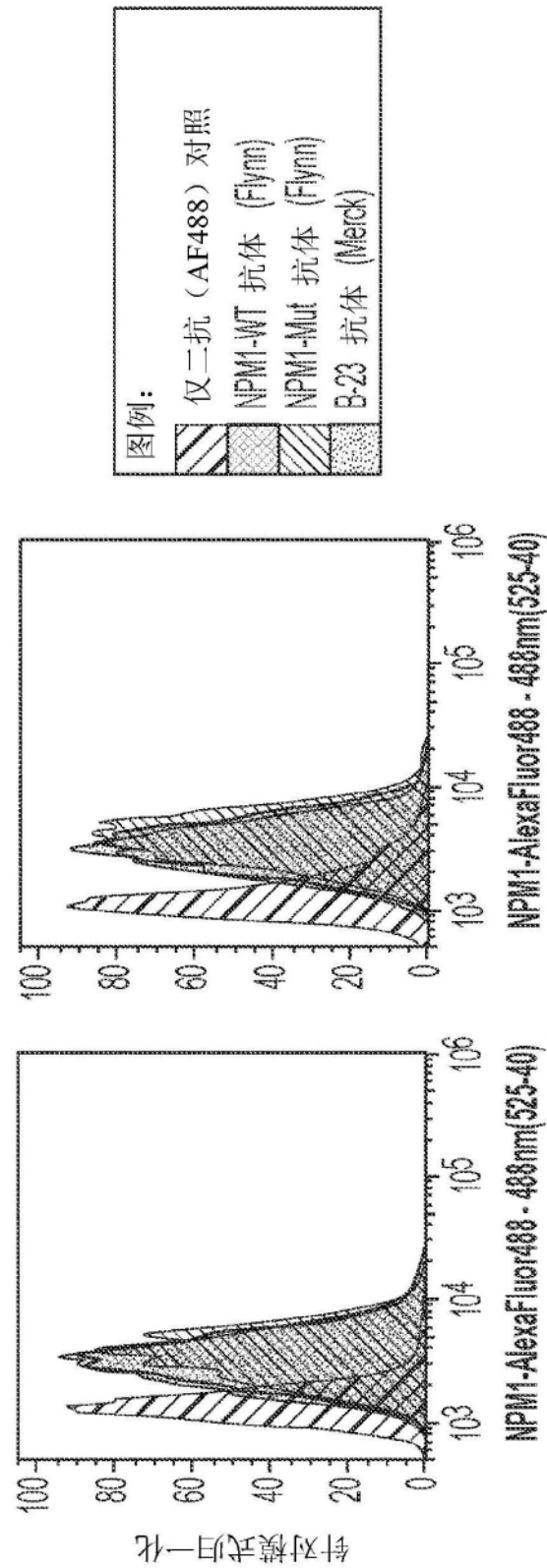


图8D

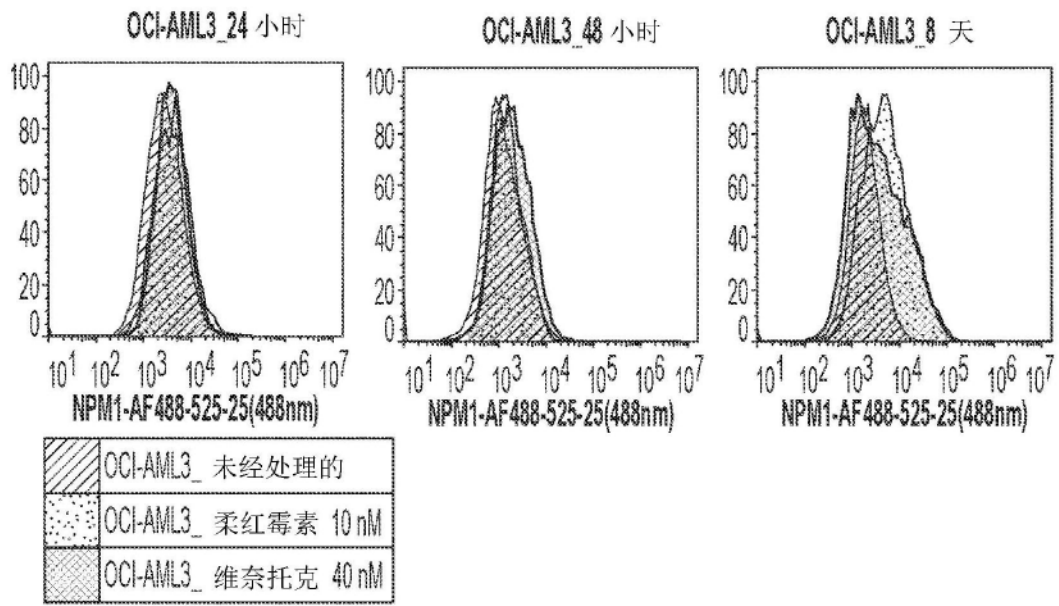


图9A

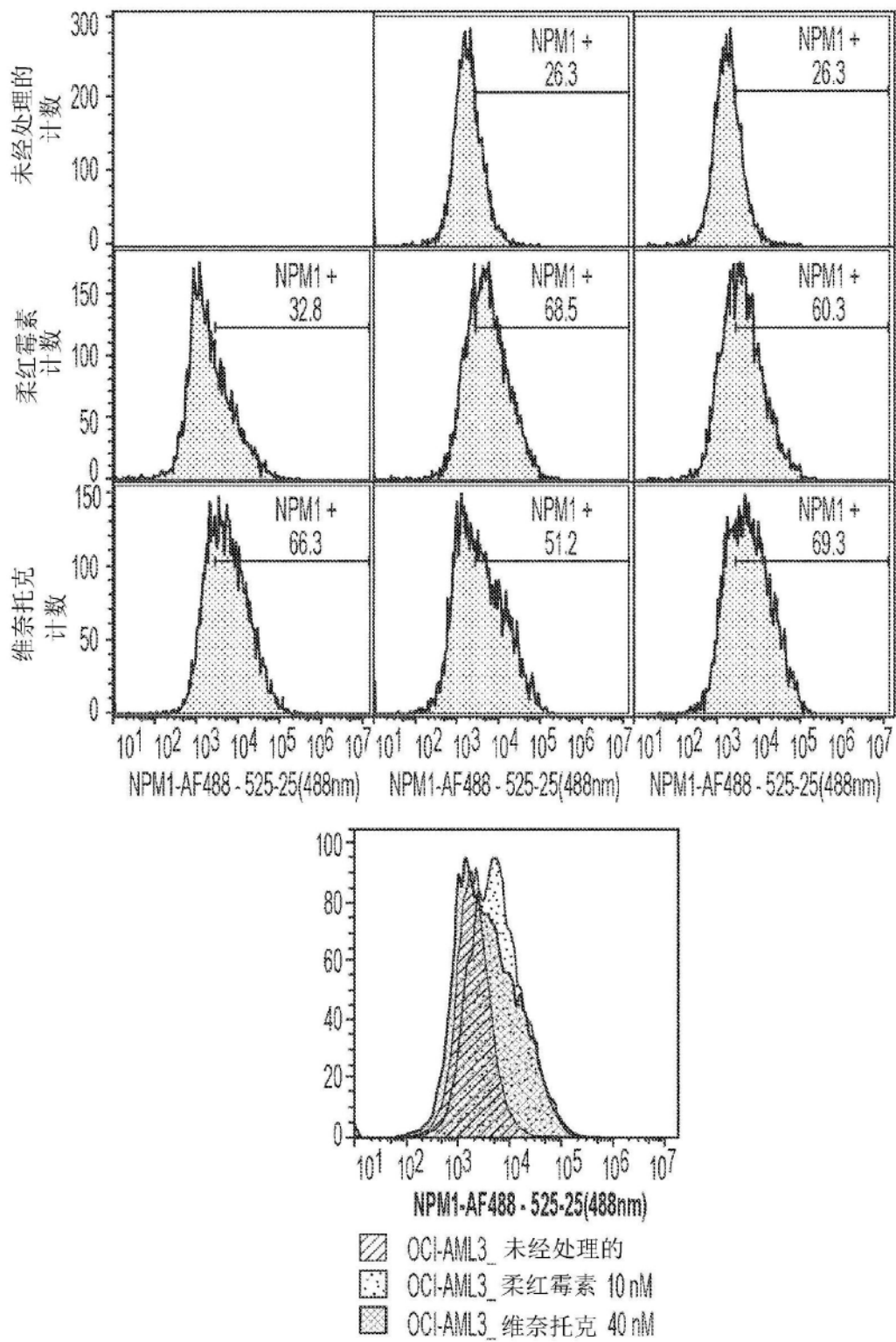


图9B

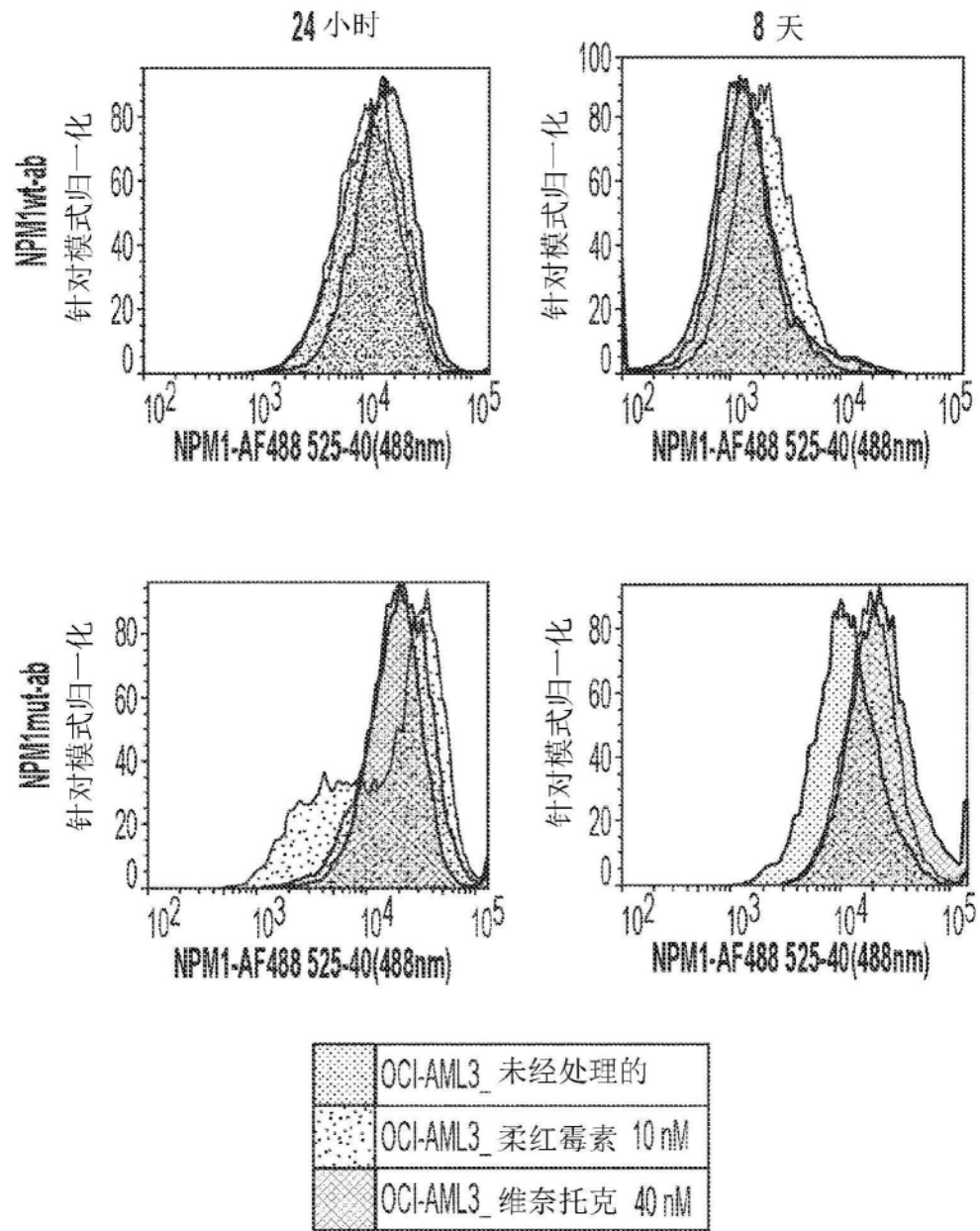


图9C

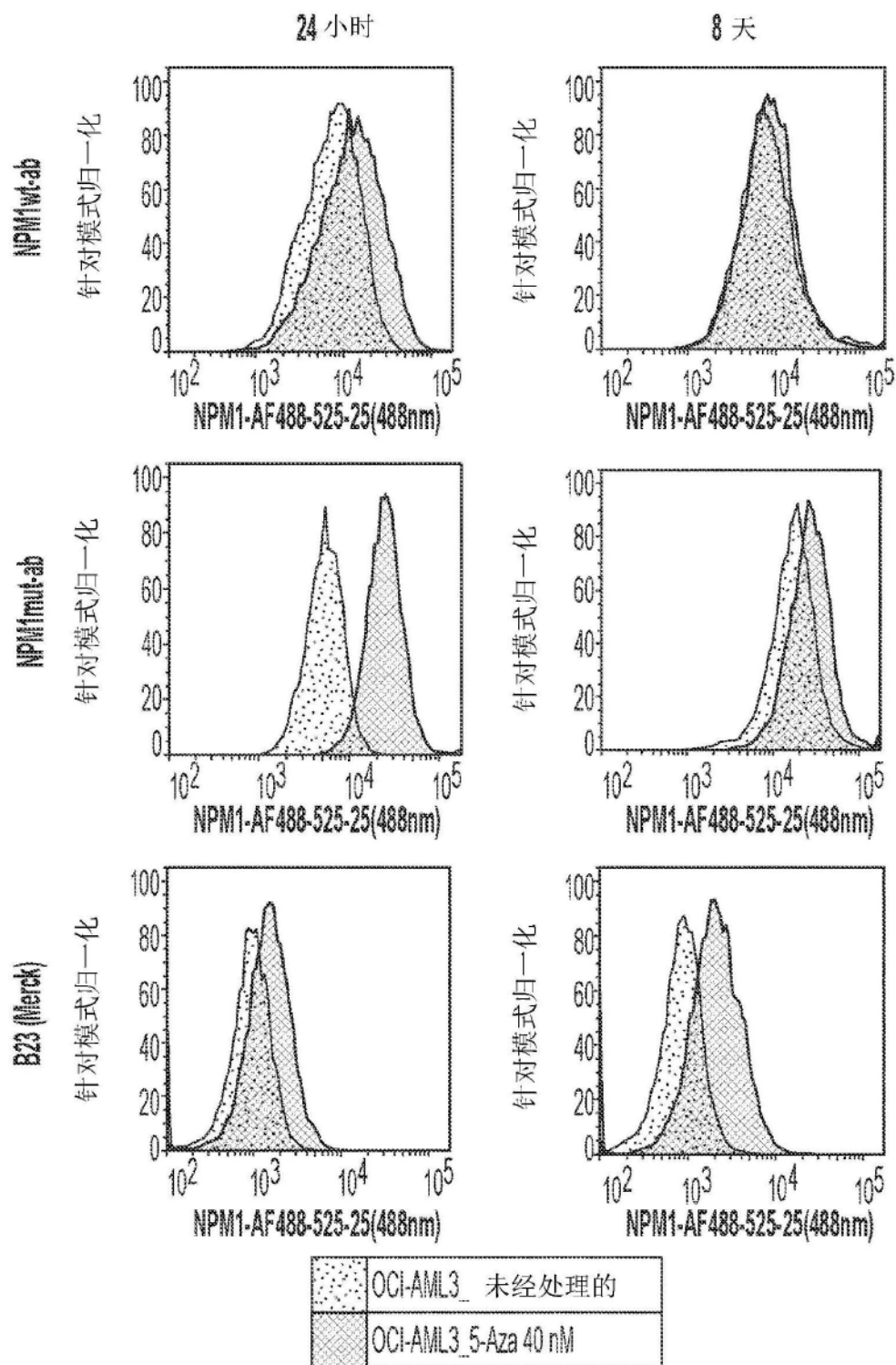


图9D

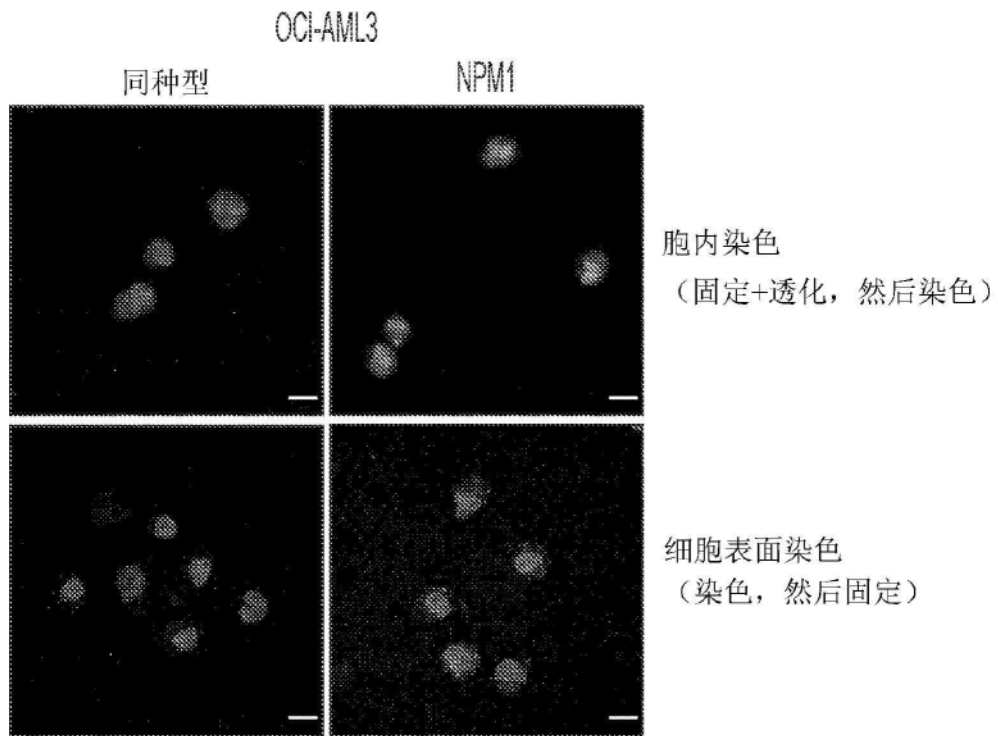


图10A

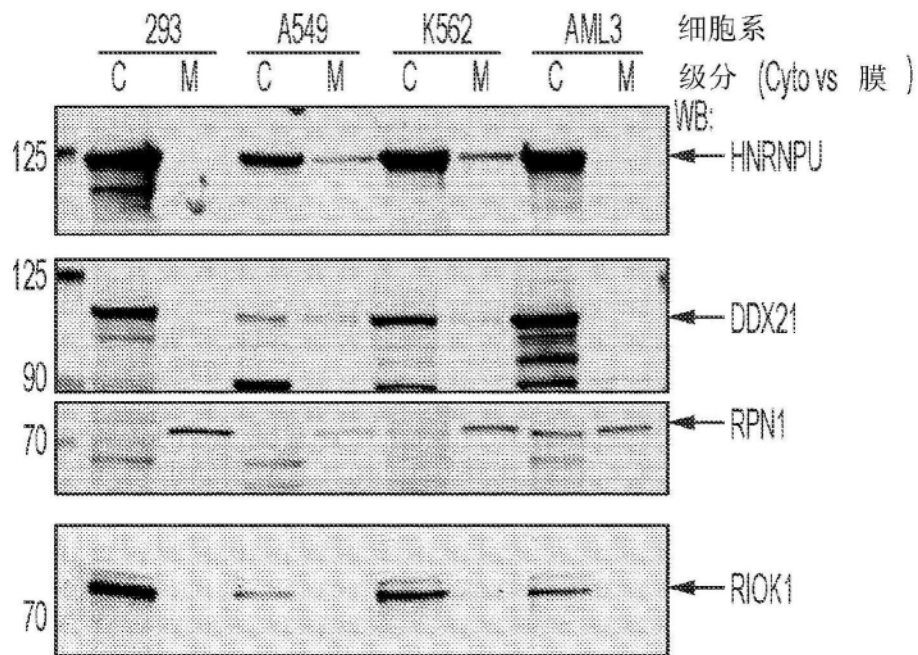


图10B

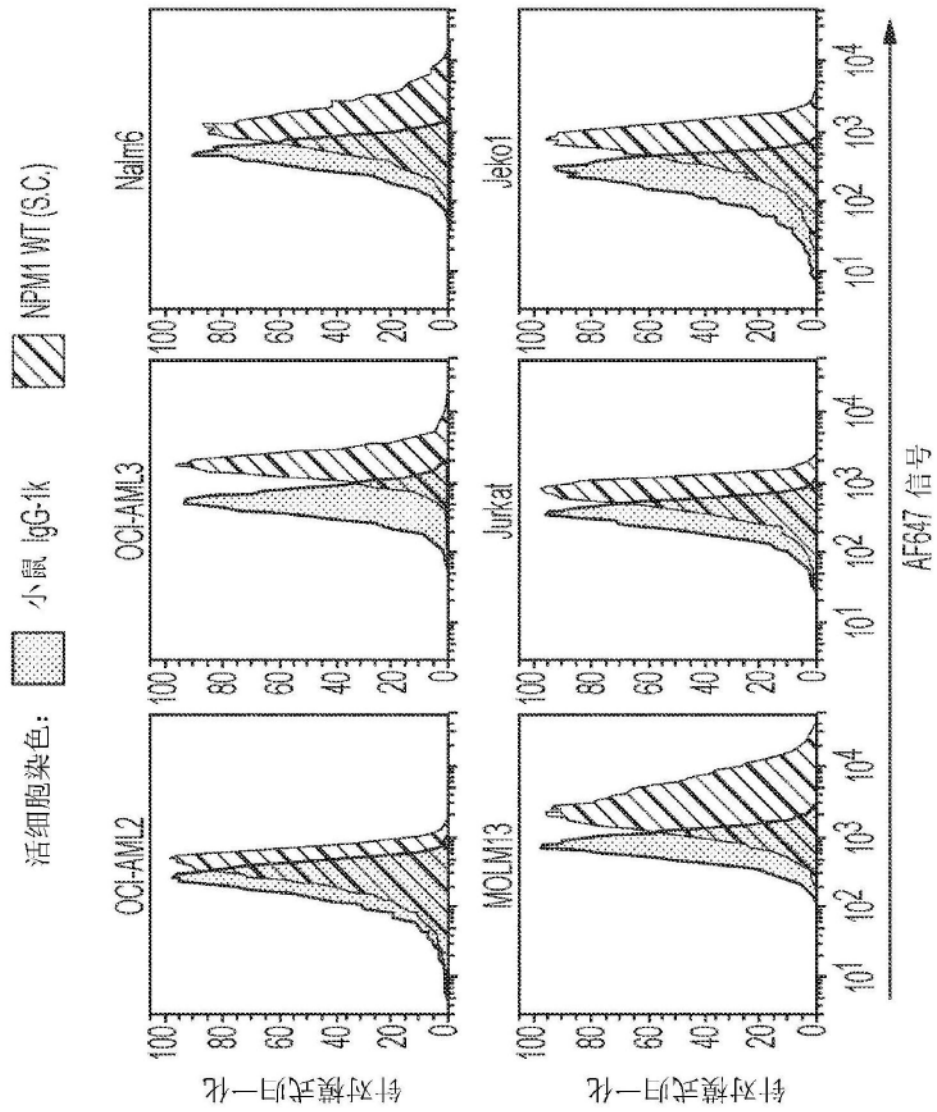


图11A

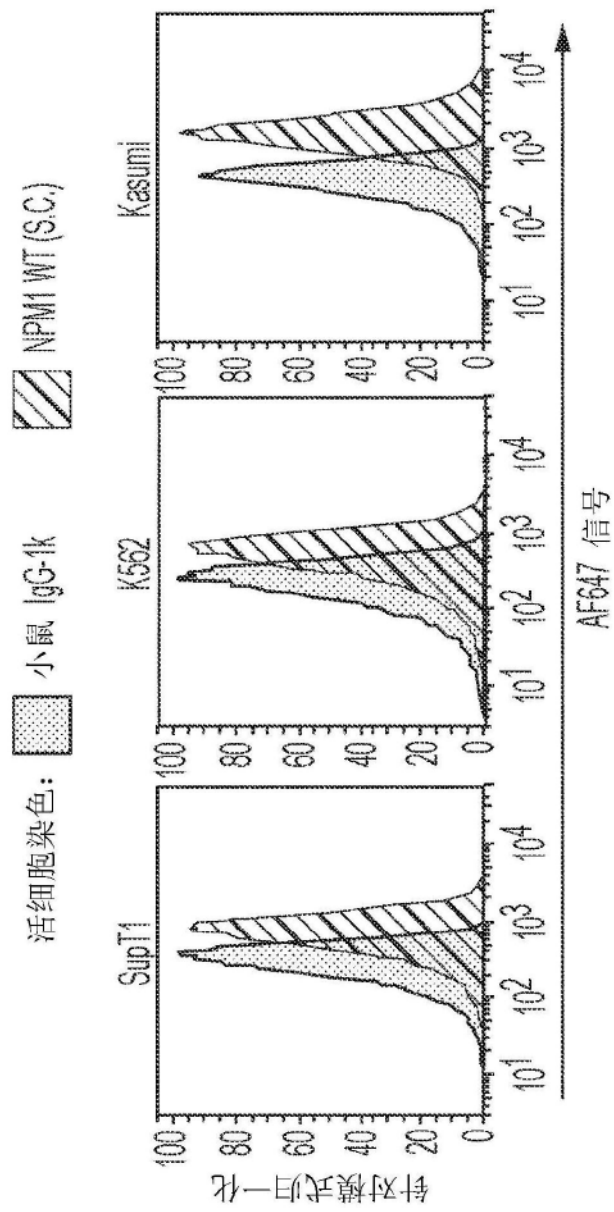


图11A续

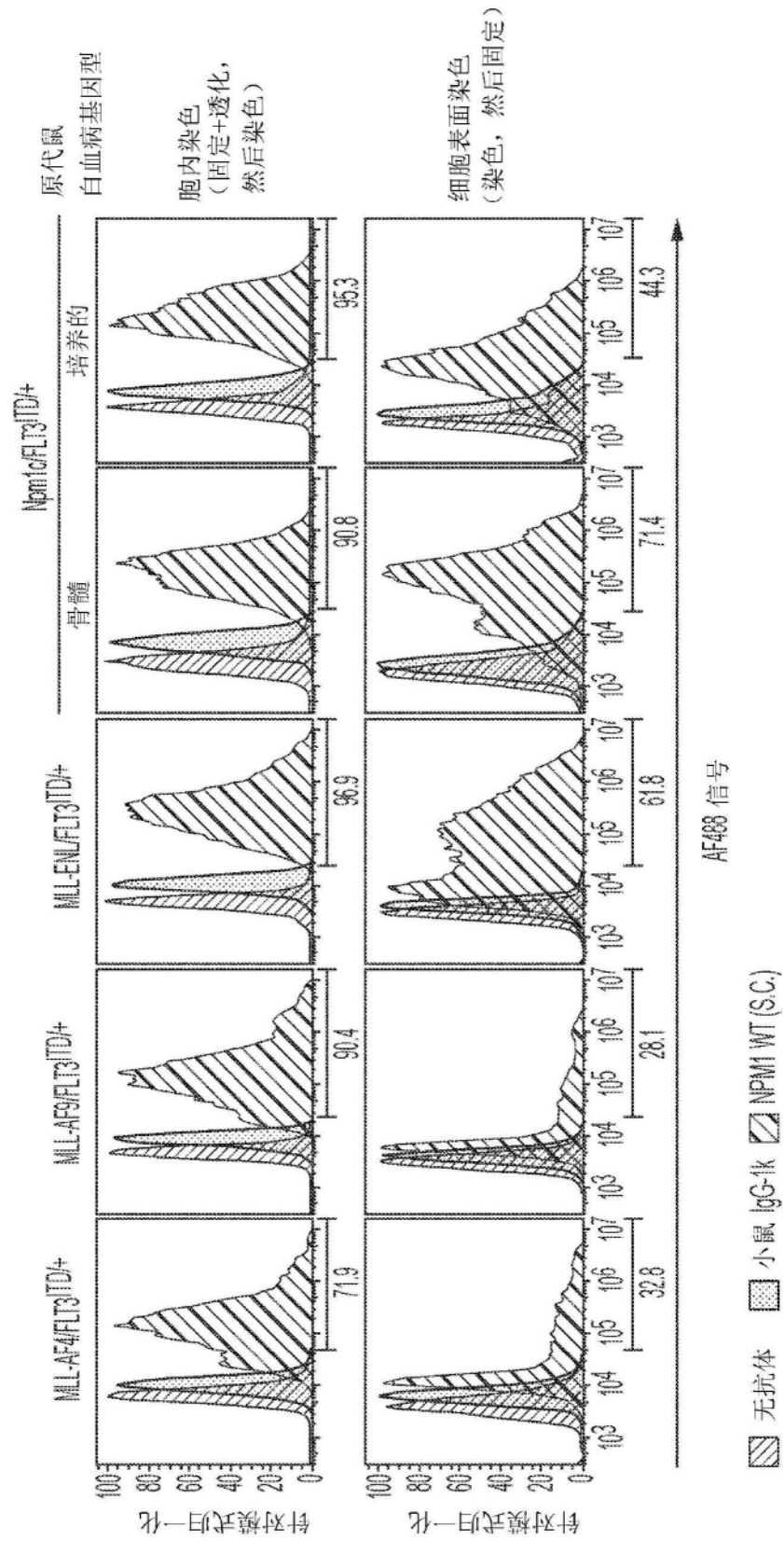


图11B

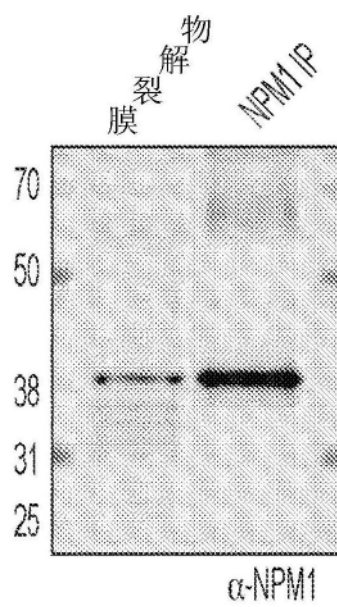


图12A

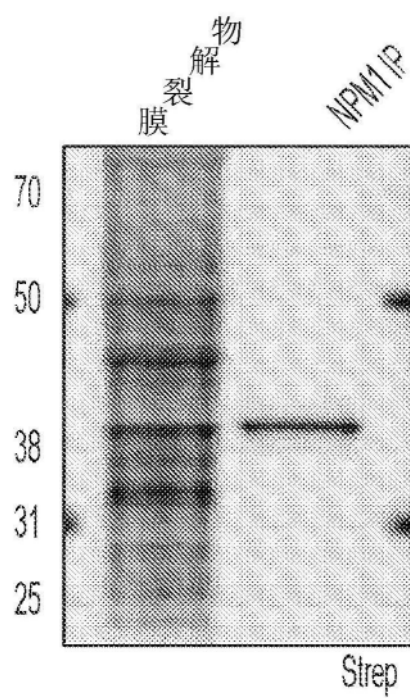


图12B

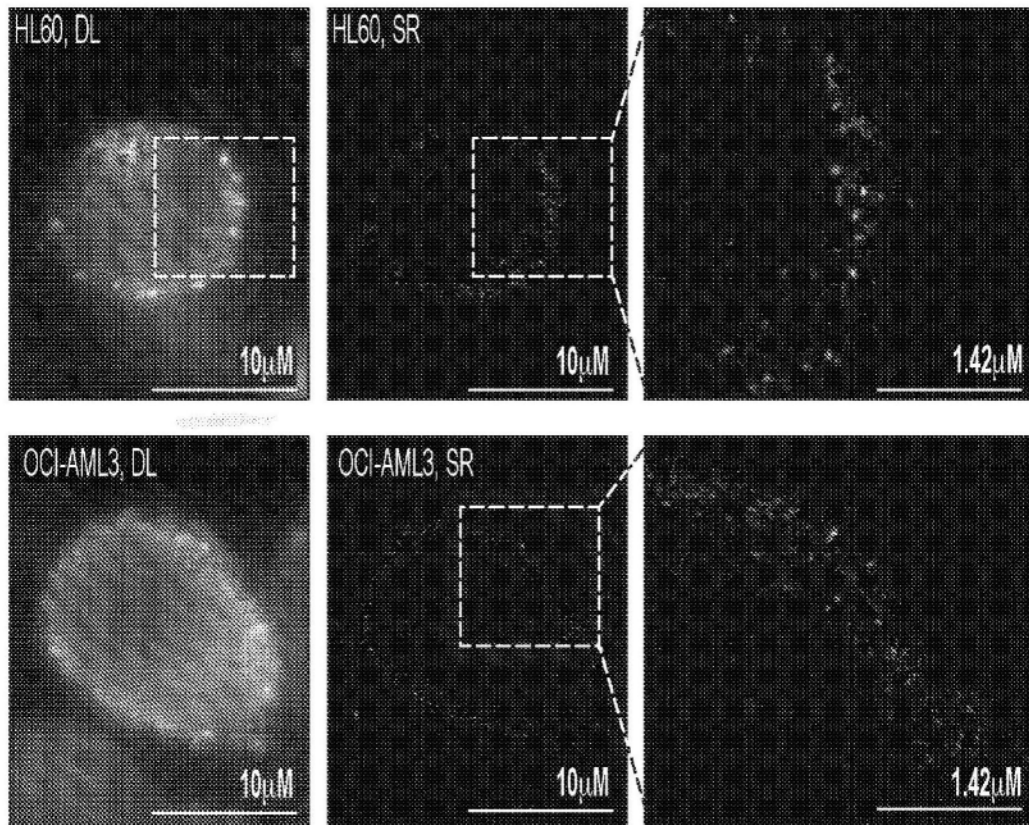


图13A

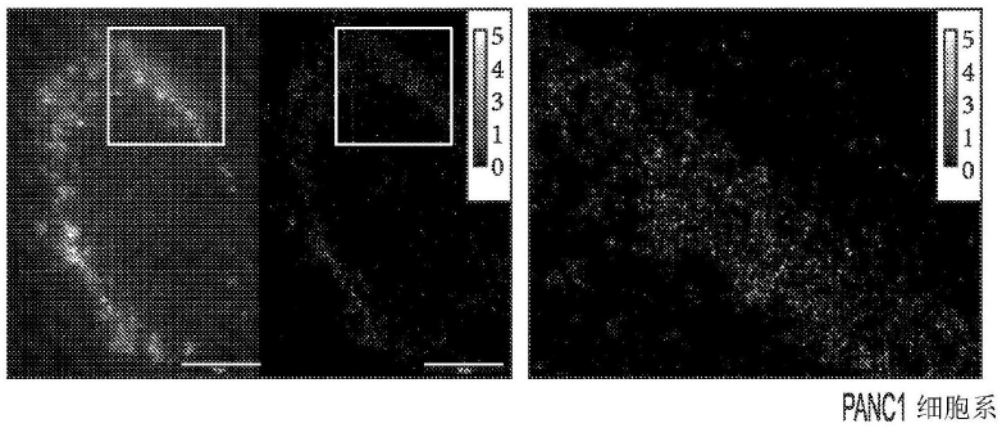


图13B

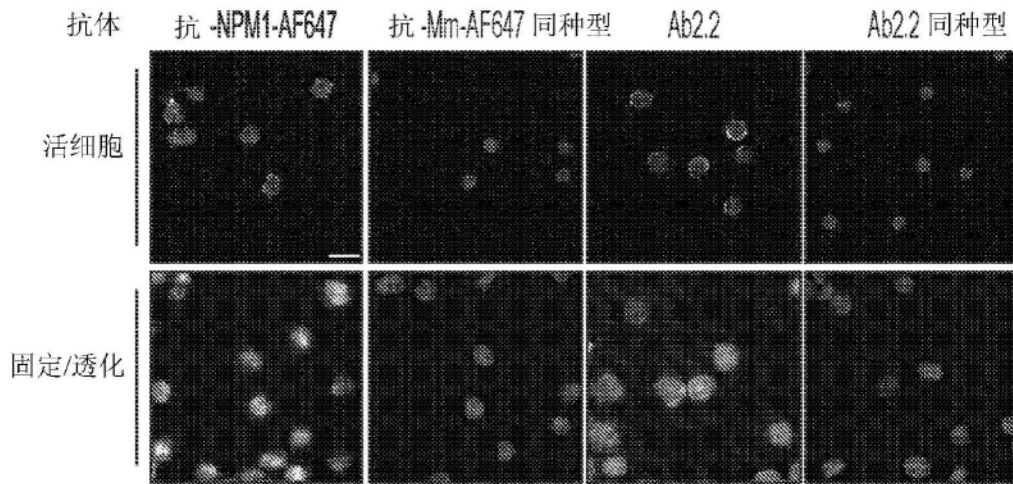


图14

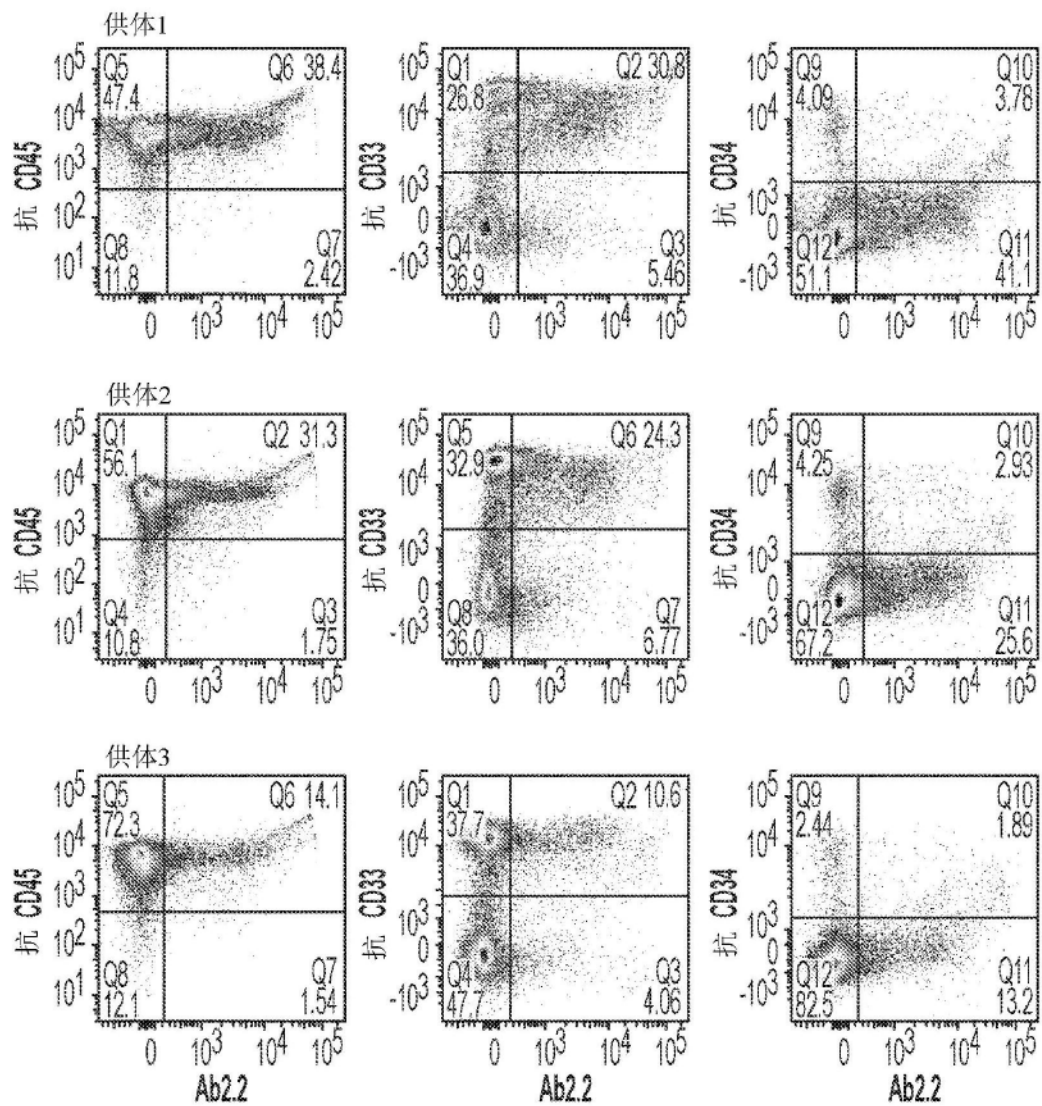


图15A

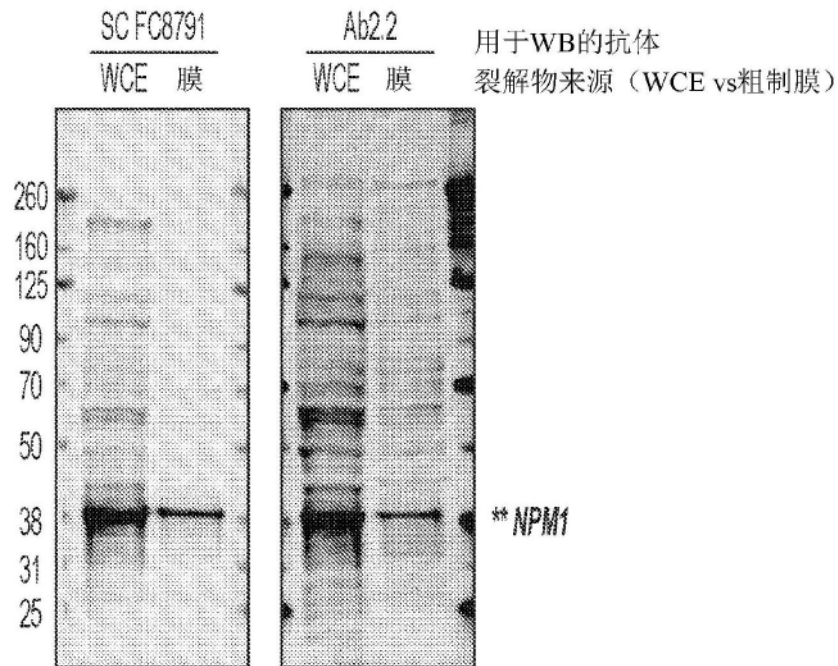


图15B

患者	进行活检的年份	一句话描述	状态
1	2017	MDS（基于细胞遗传学）转化为AML；在进行活检之前没有先前的治疗	死亡
2	2018	新诊断为APL	存活
3	2018	MDS（基于细胞遗传学）转化为AML；在进行活检之前没有先前的治疗	推定死亡
4	2016	复发性AML s/p 7+3, HiDAC和HSCT	死亡
5	2017	TKI难治性的CML转化为AML	死亡
6	2017	正在接受支持性护理的MF转化为AML	死亡
7	2017	伴有远程化疗的CLL与新的AML被认为与治疗有关	死亡
8	2018	正在接受aza的MDS转化为AML	存活
9	2019	CMML转化的AML；在Vyxeos失败之后进行活检	死亡
10	2015	新诊断为AML	存活
11	2016	对多种治疗难治性的AML；在下一步之前进行活检	死亡
12	2018	新诊断为AML	死亡

图16

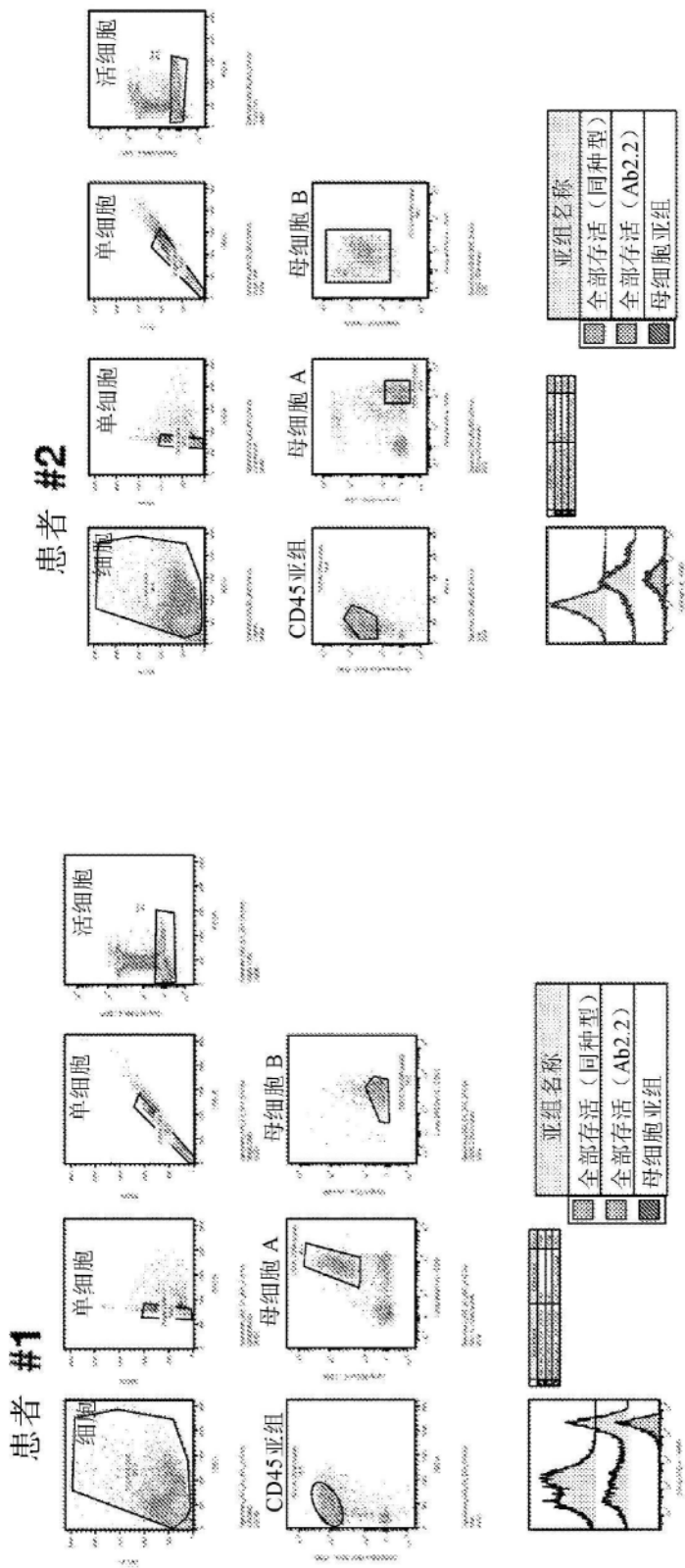


图17A

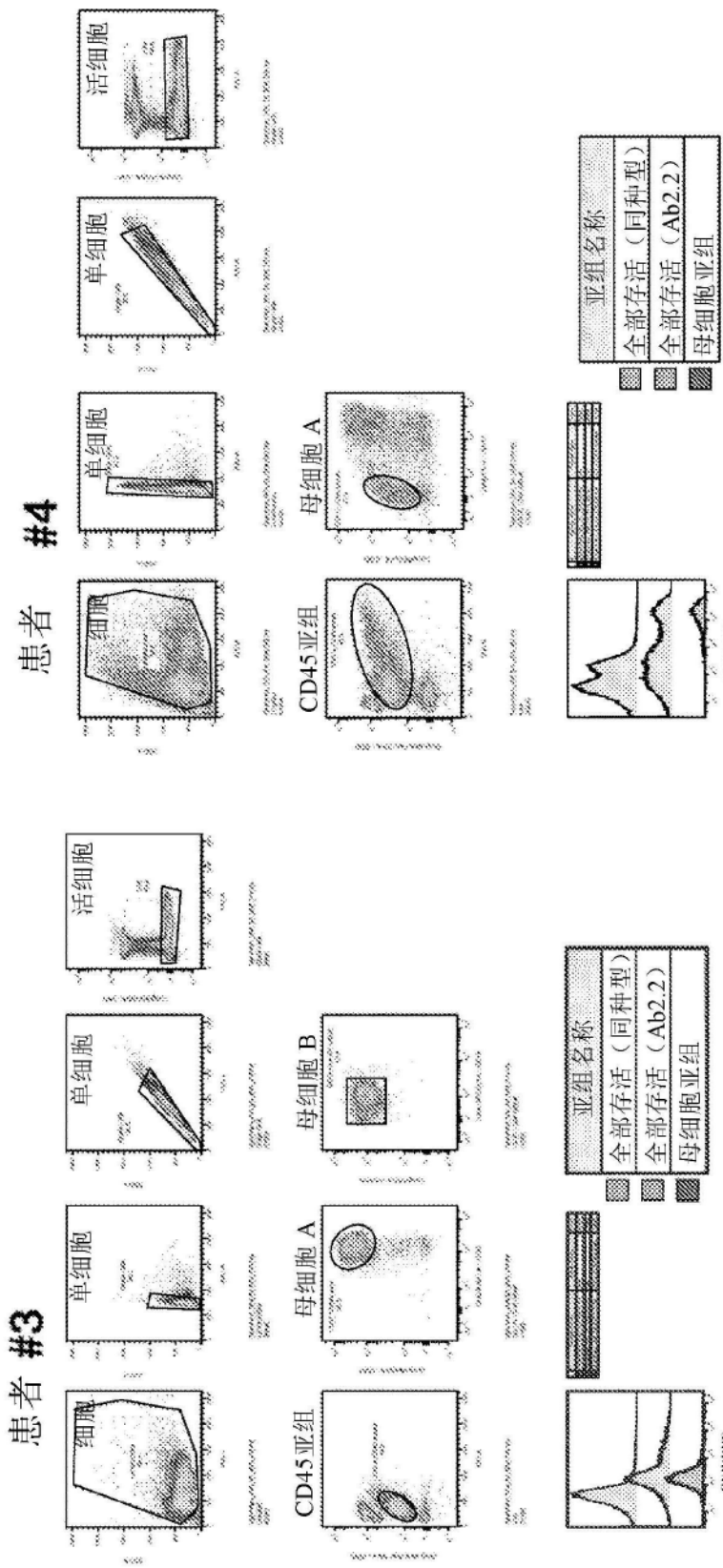


图17A续

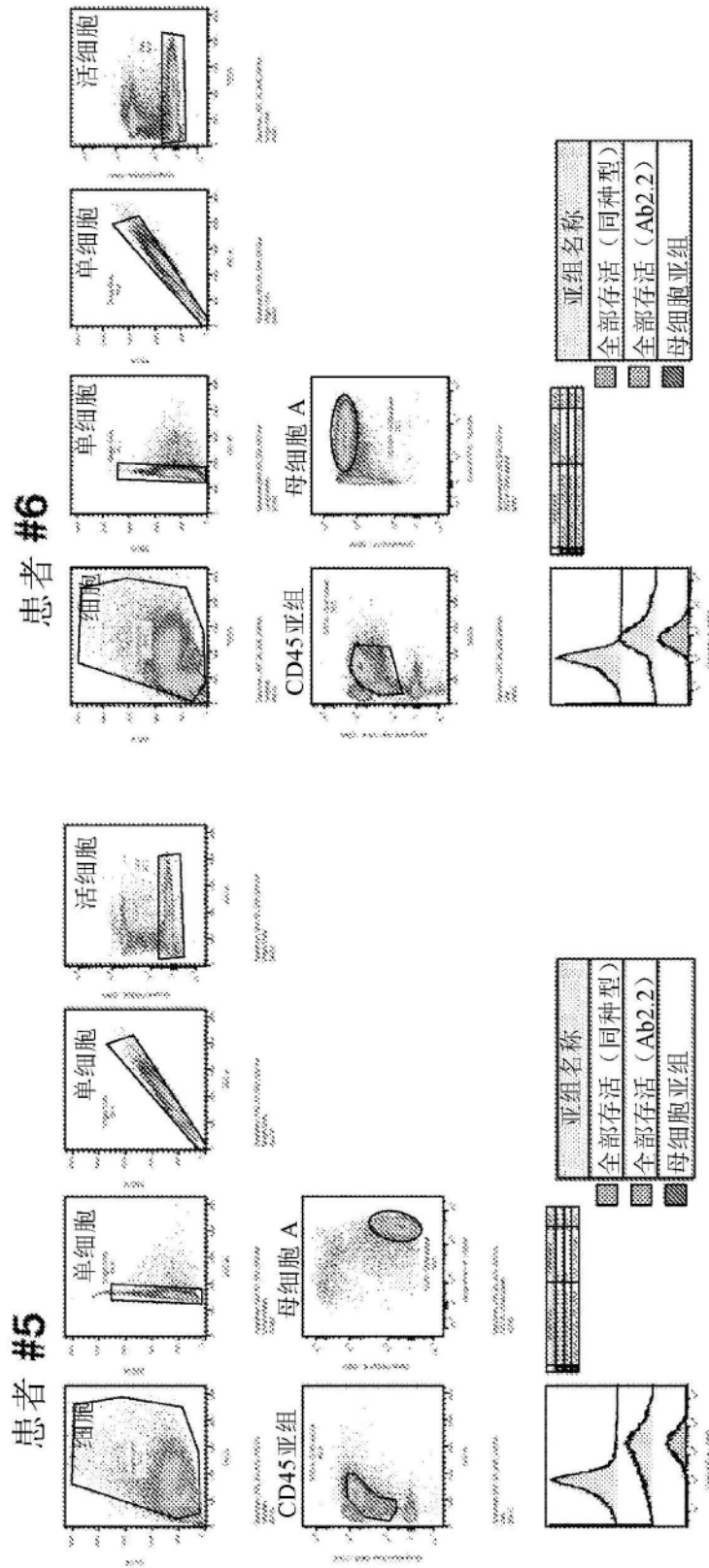


图17A续

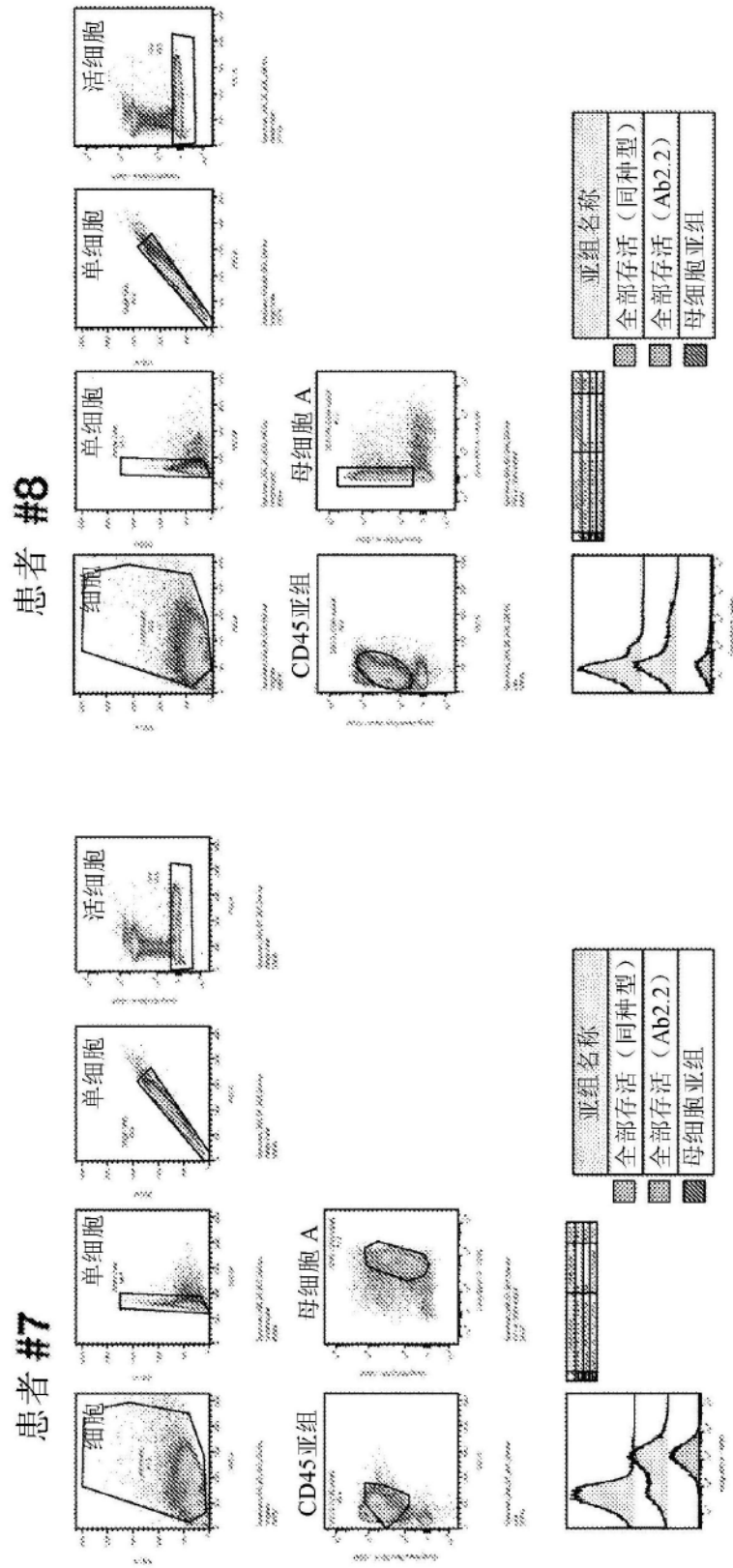


图17B

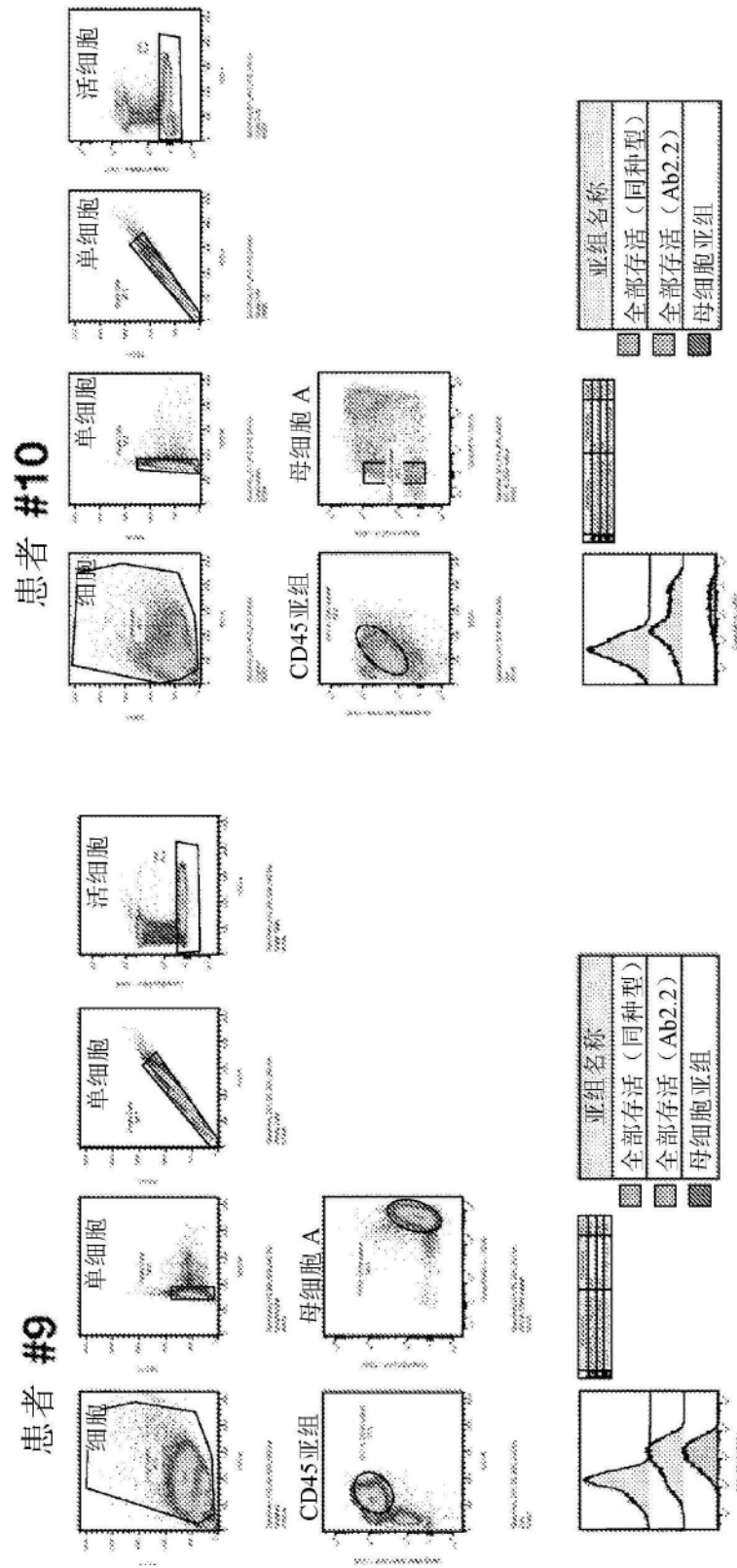


图17B续

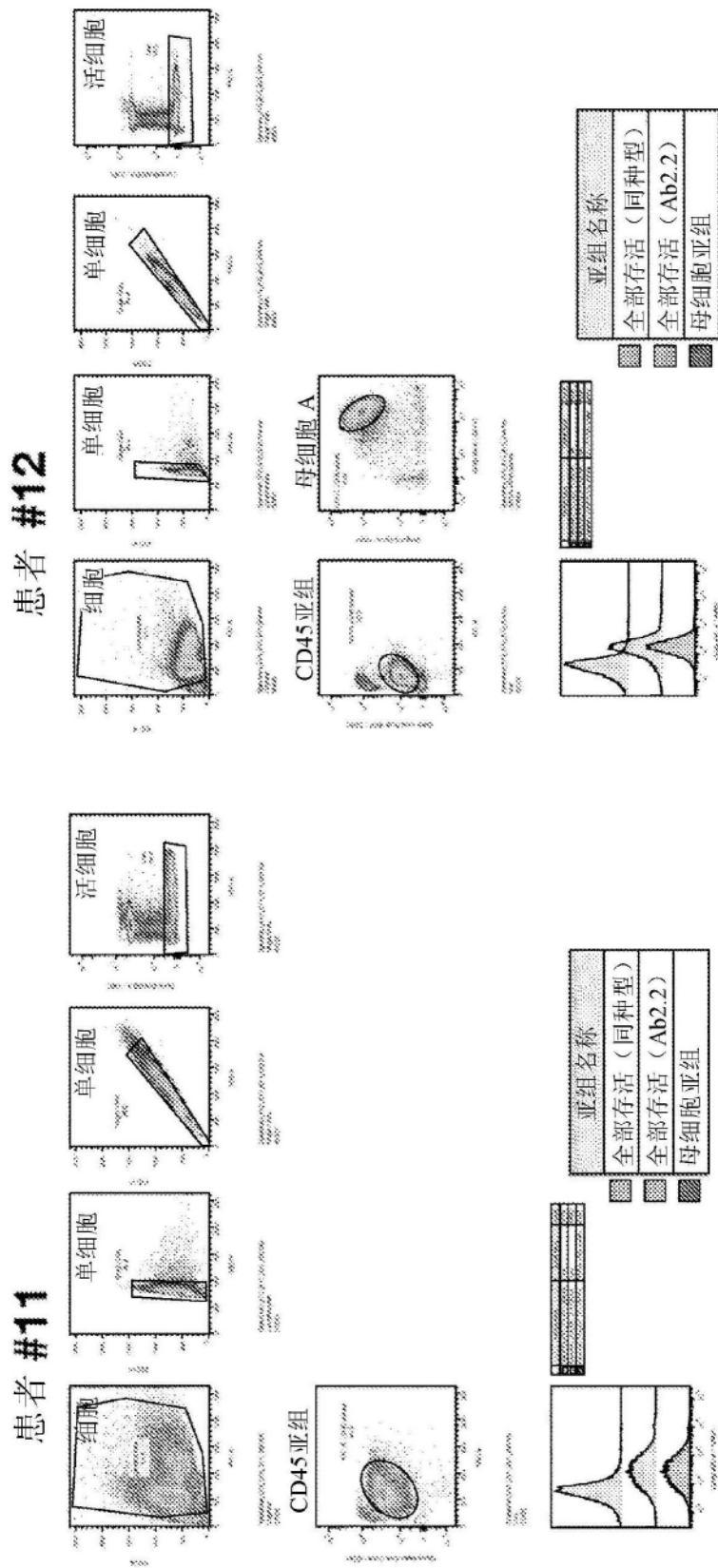


图17B续

Pt #	NPM1	FLT3 ITD	FLT3 TKD	亚型
1	未检出	未检出	未检出	CMML2转化为AML（没有针对CMML给予治疗）
2	未检出	未检出	未检出	AML
3	检出	未检出	未检出	AMML
4	未检出	未检出	未检出	AML
5	未检出	检出	未检出	MDS-AML转化
6	未检出	未检出	未检出	AML伴MDS相关变化
7	未检出	检出	未检出	未成熟的AML
8	未测试	未检出	未检出	AML
9	检出	未检出	未检出	AML伴MDS相关变化
10	未测试	未检出	未检出	急性单核细胞白血病
11	检出	未检出	未检出	急性髓单核细胞白血病
12	检出	检出	未检出	急性髓性白血病
13	未测试	检出	检出	AML、MDS相关的变化
14	未检出	检出	未检出	可能的BPDCN-完整结果待定
15	检出	检出	未检出	AML

图18

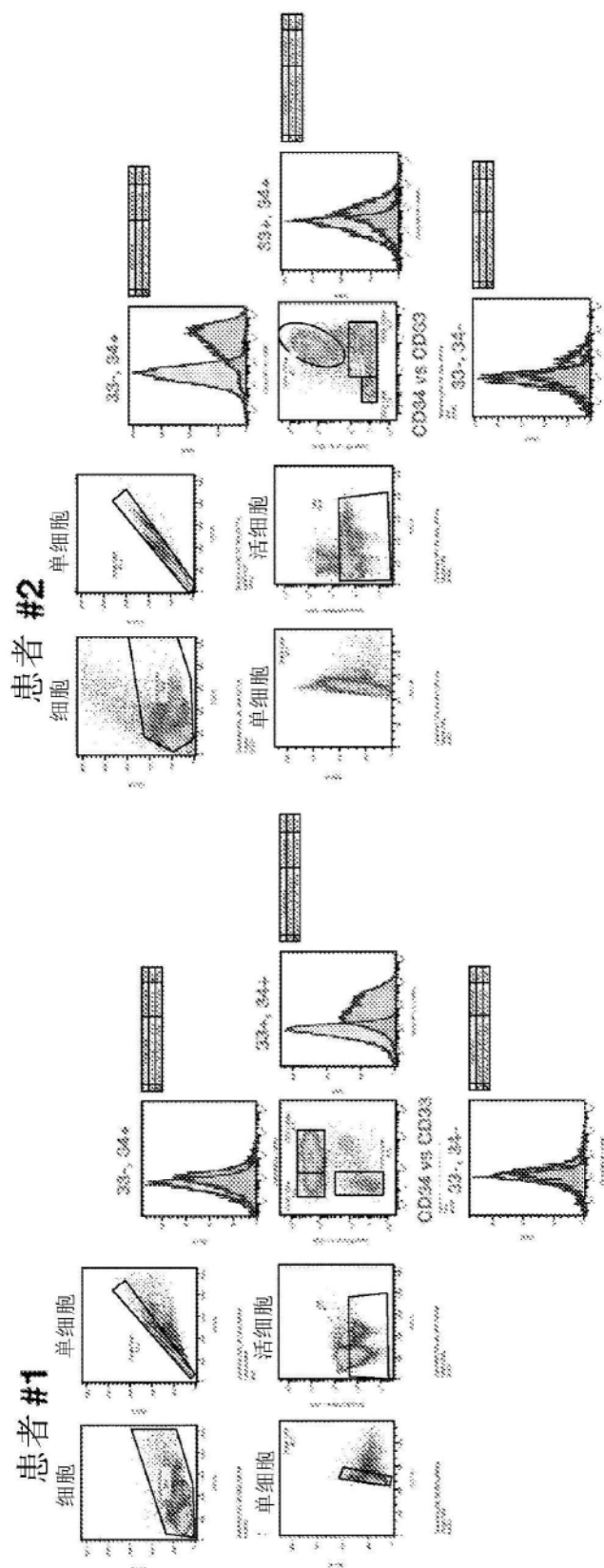


图19A

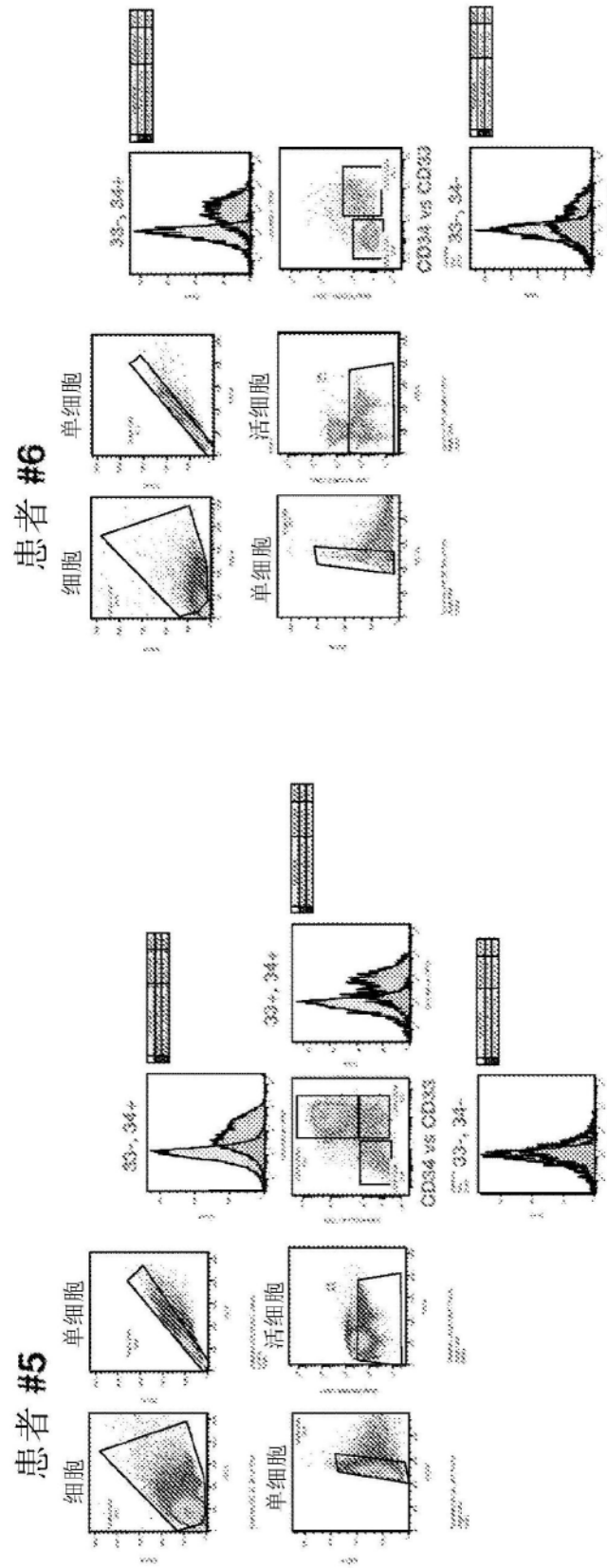


图19B

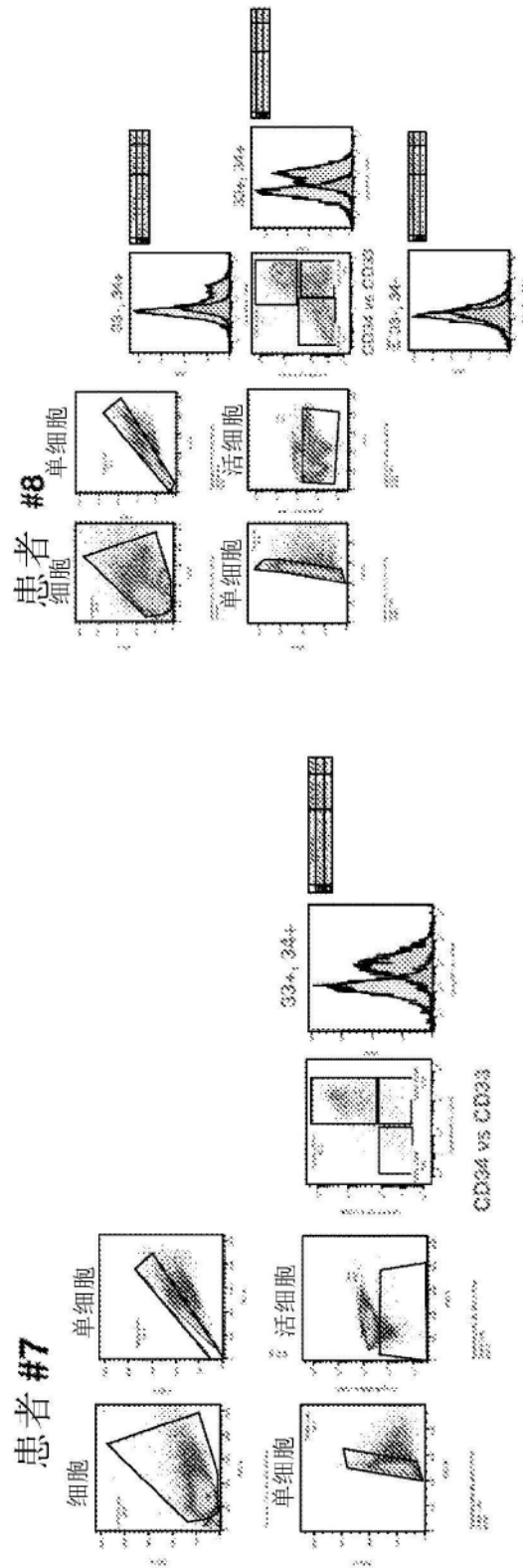


图19B续

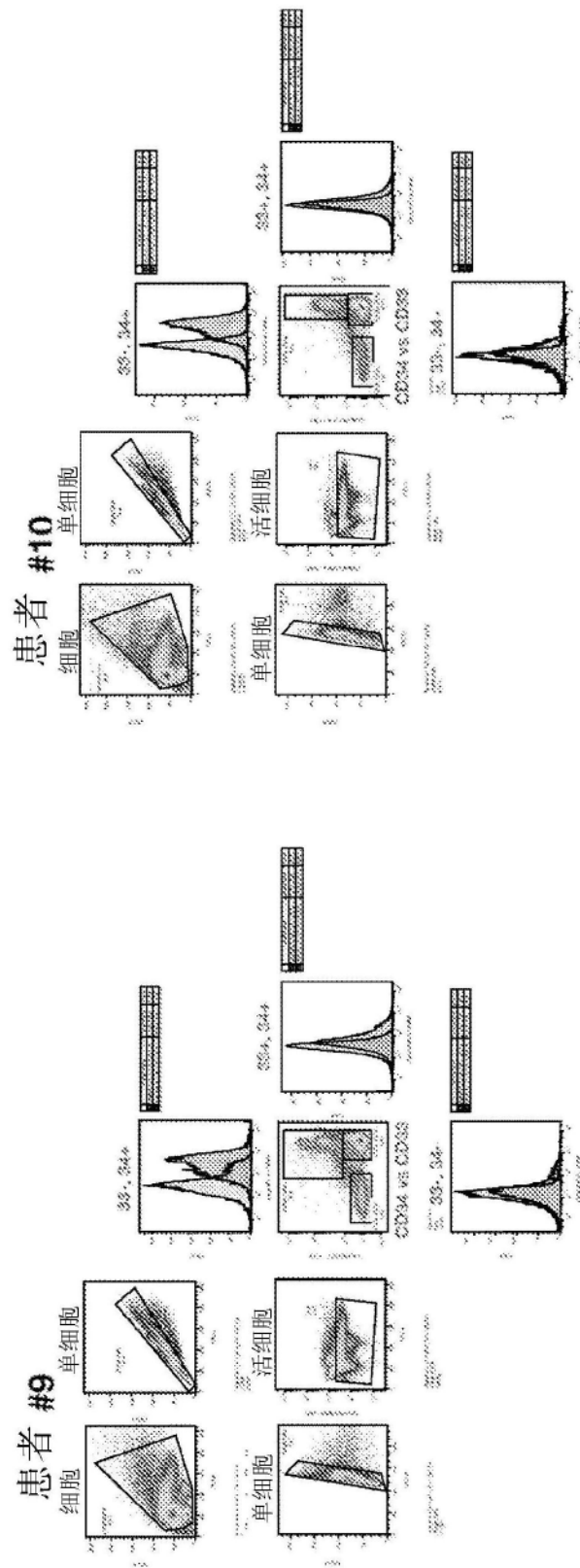


图19B续

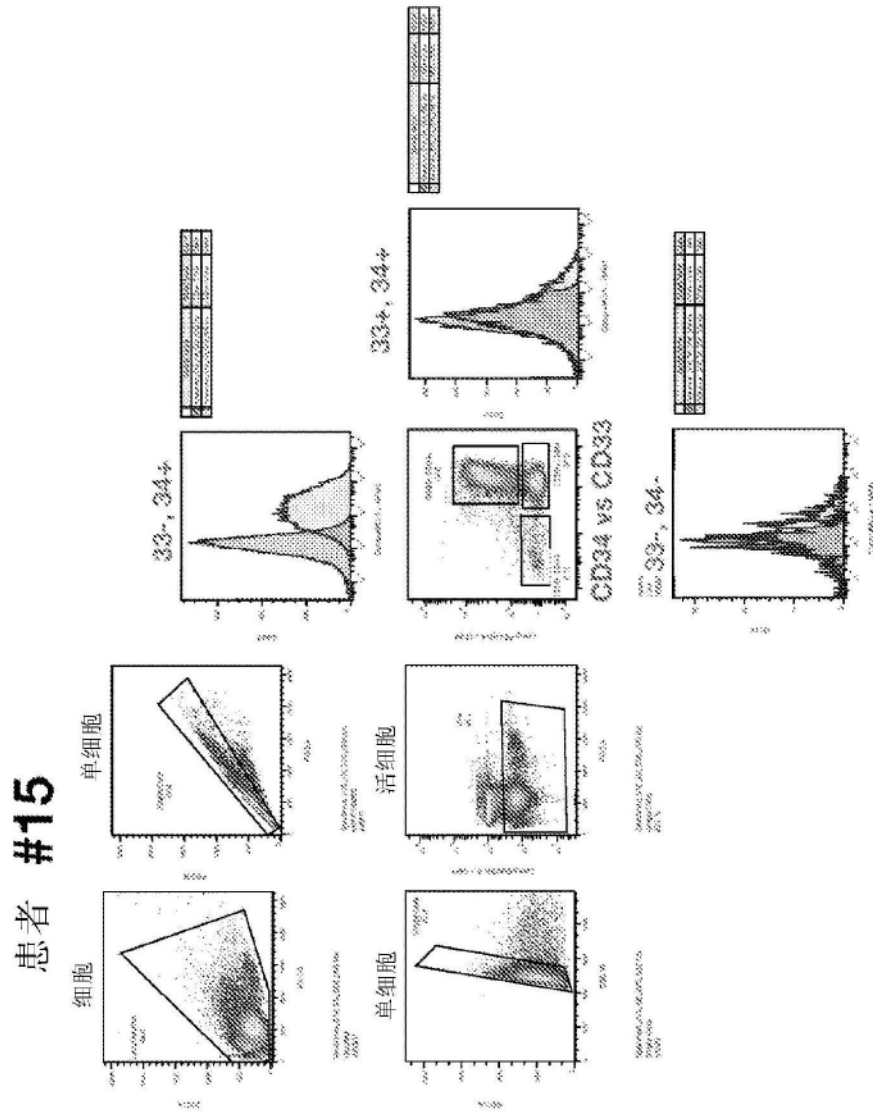


图19C续

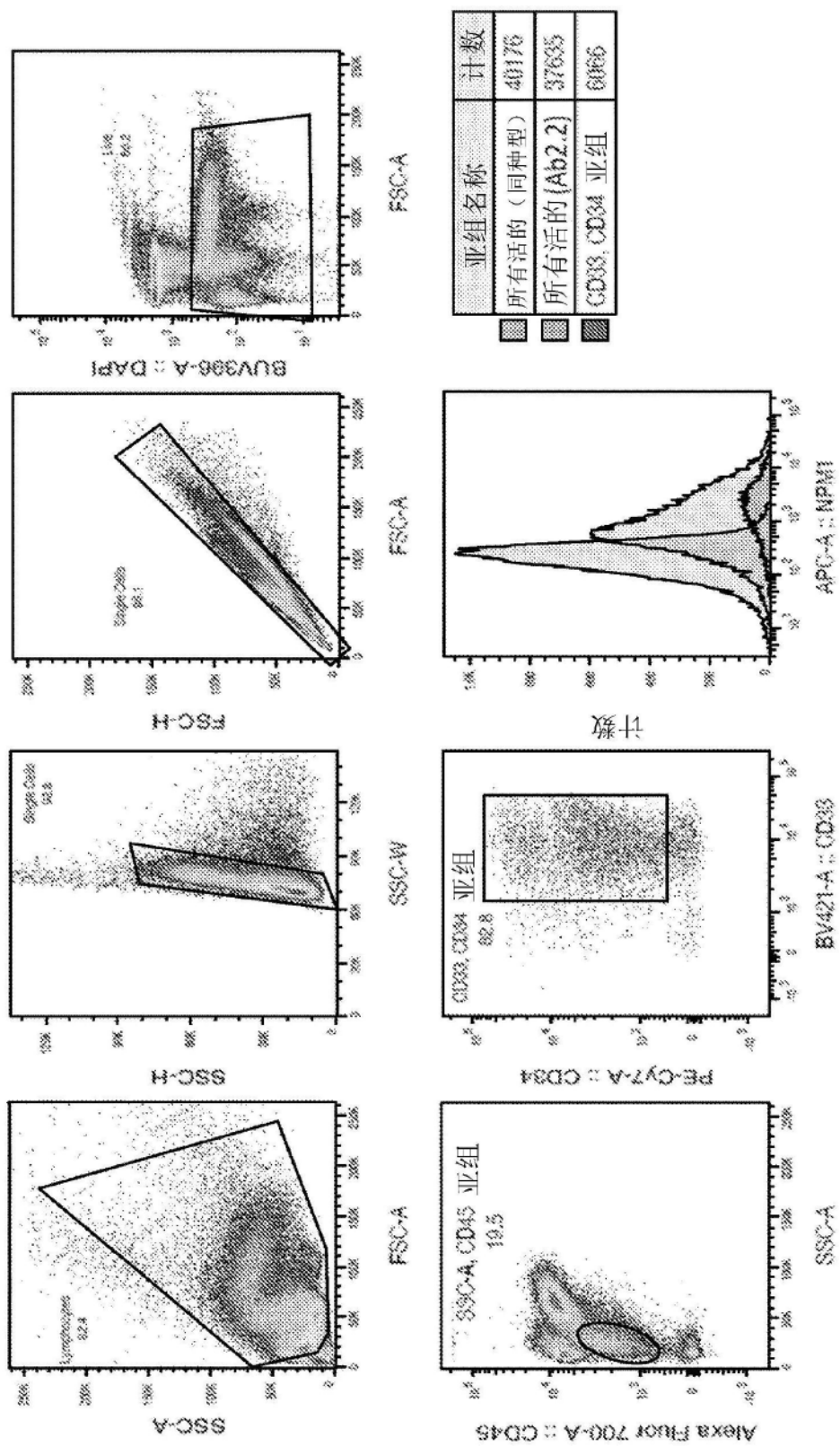


图19D

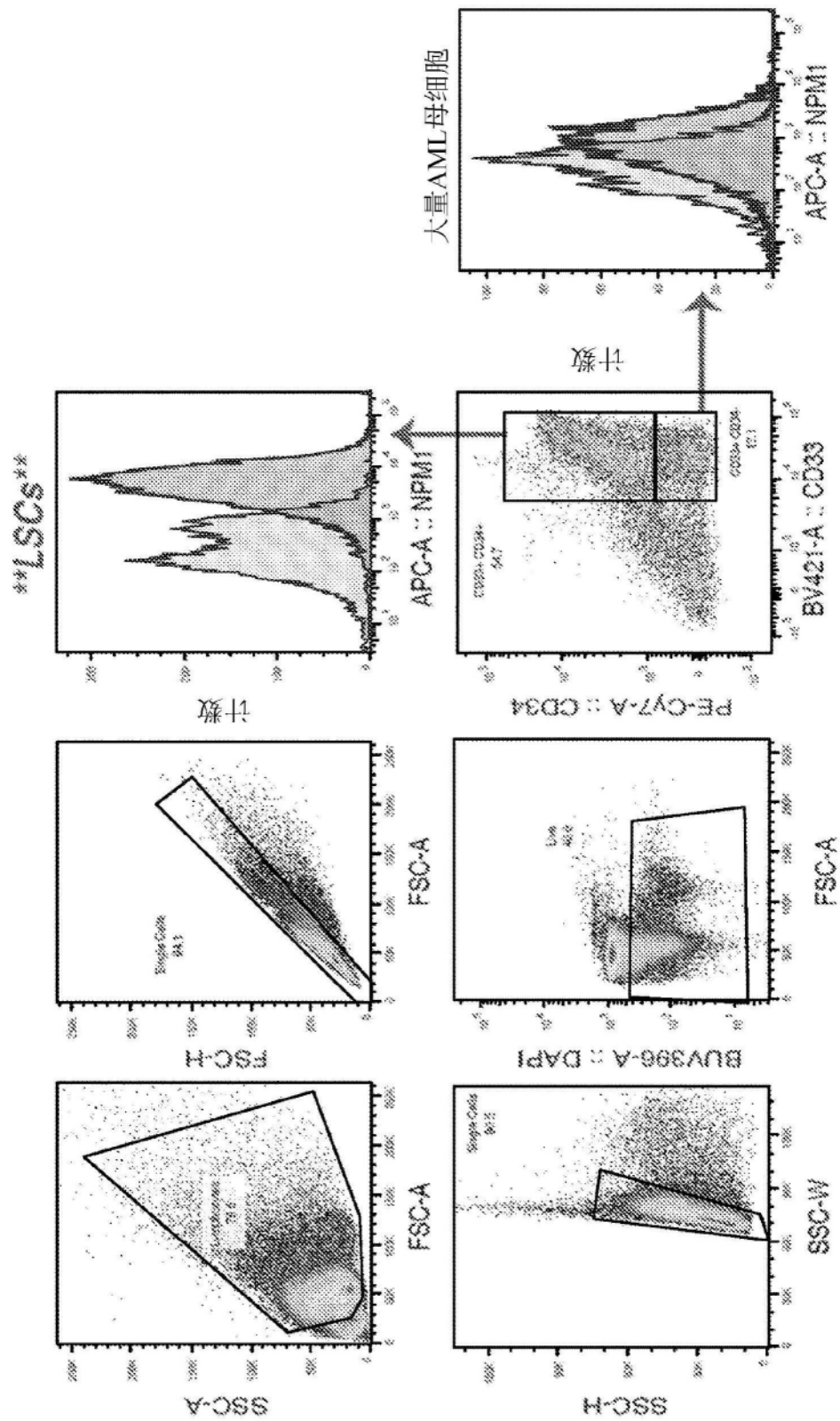


图19E

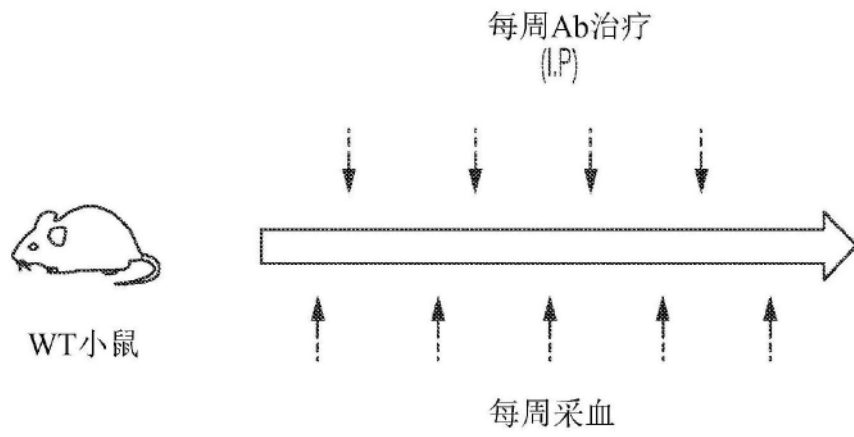


图20A

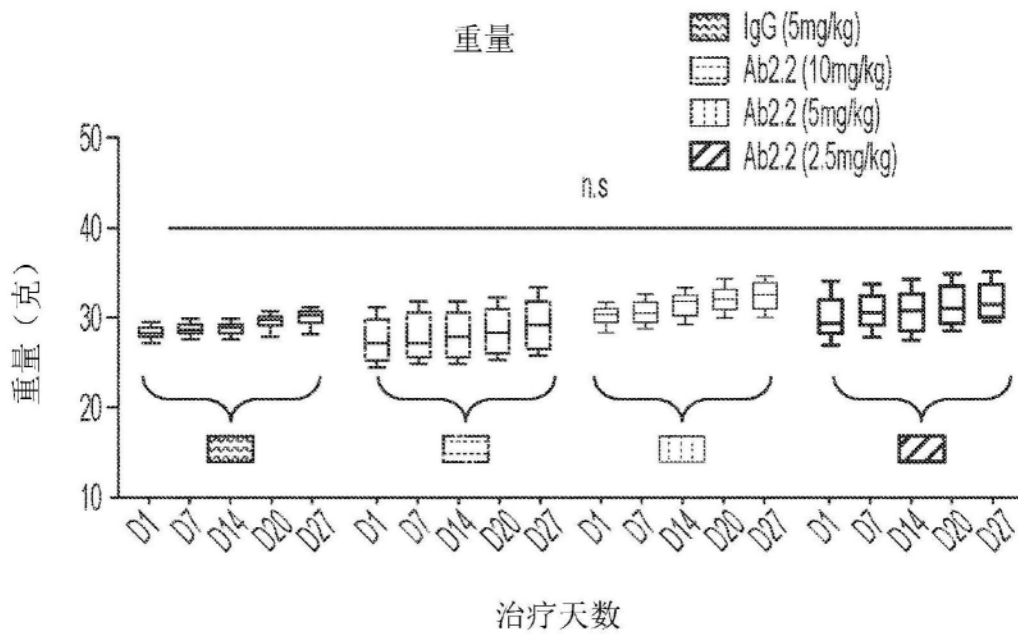


图20B

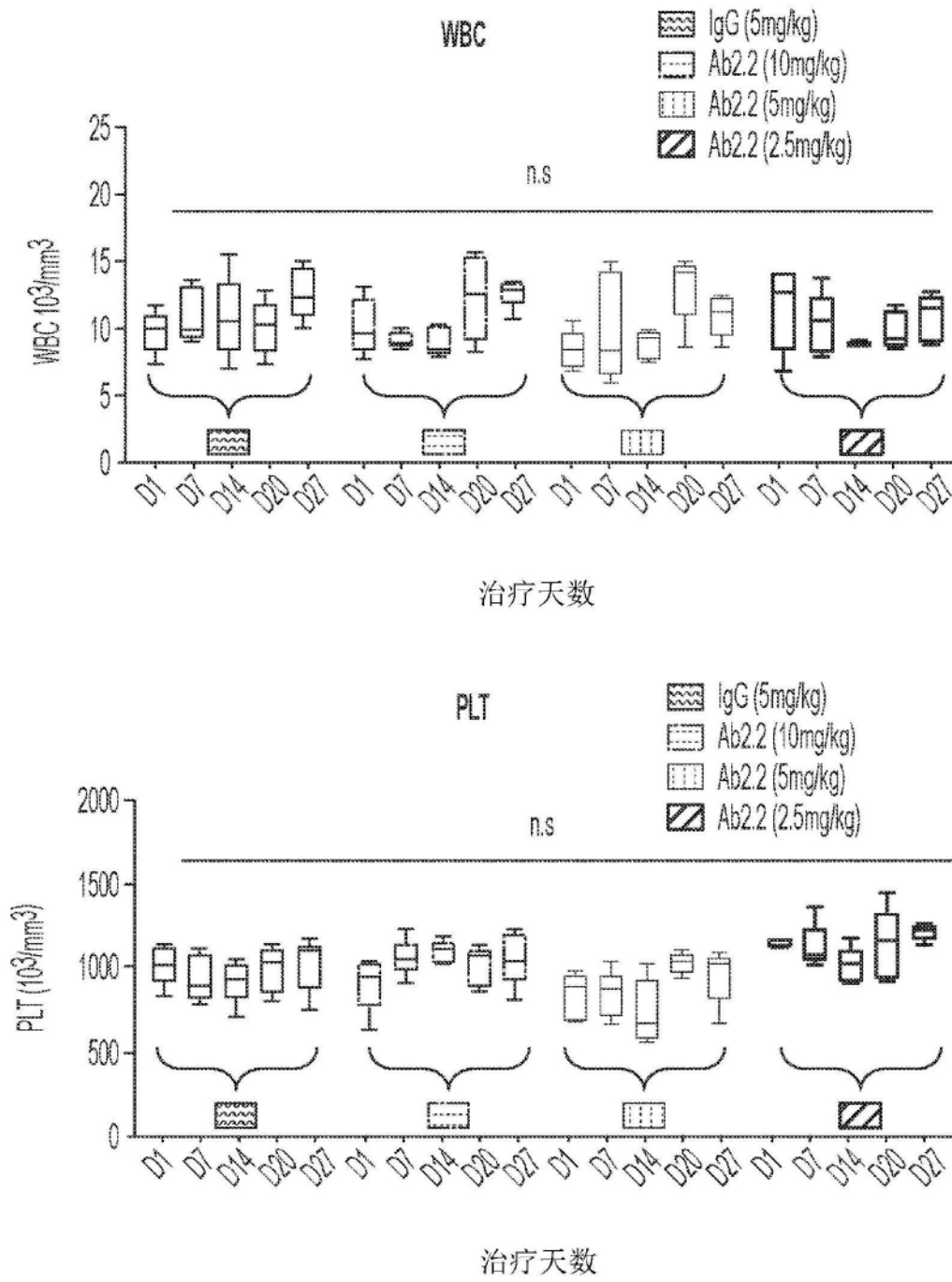


图20B续

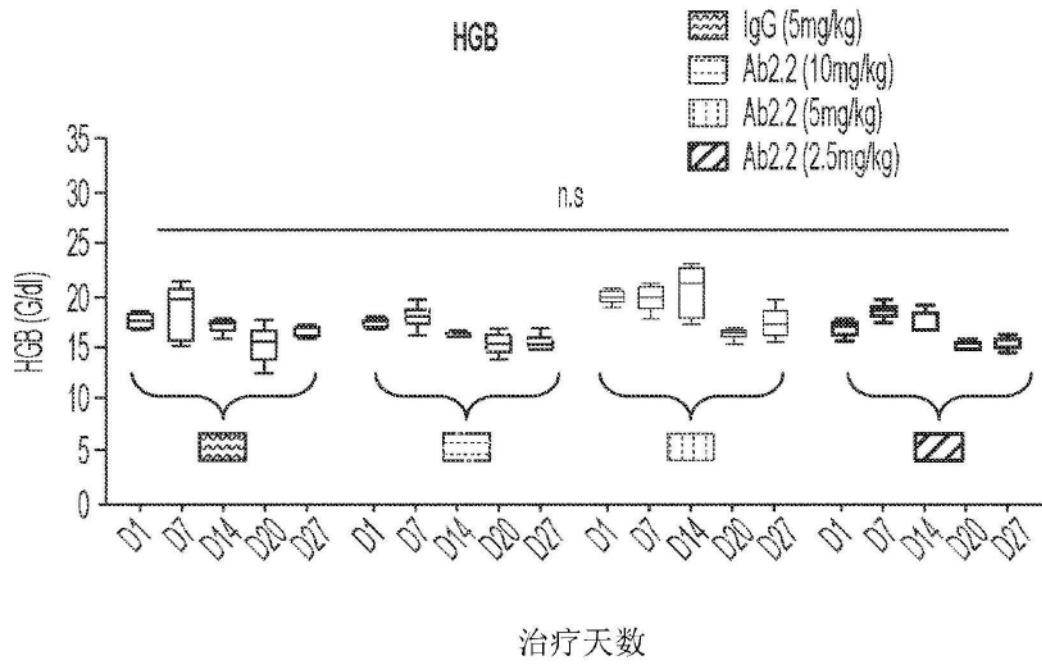


图20B续

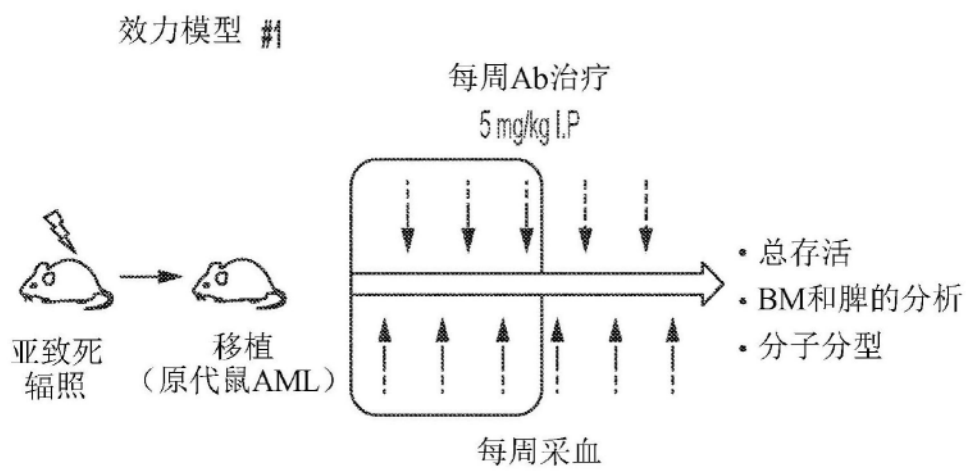


图21A

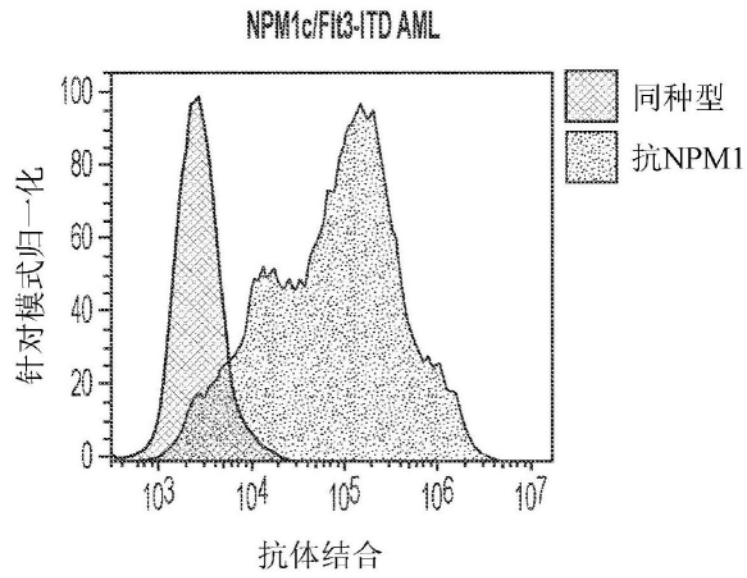


图21B

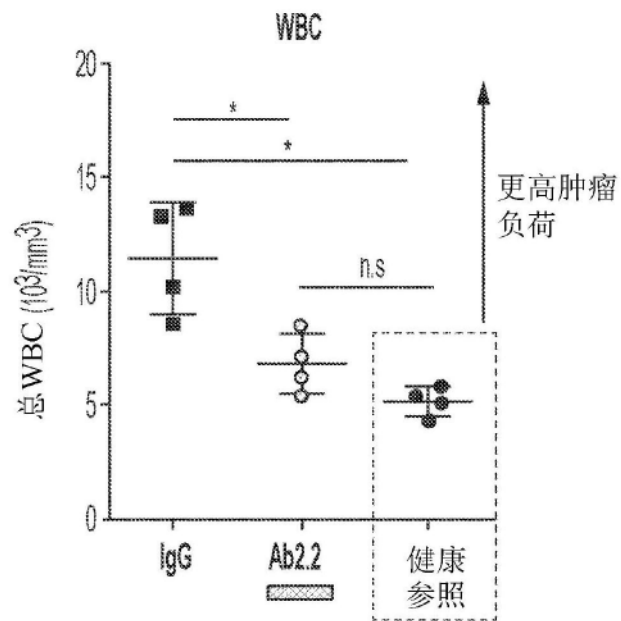


图21C

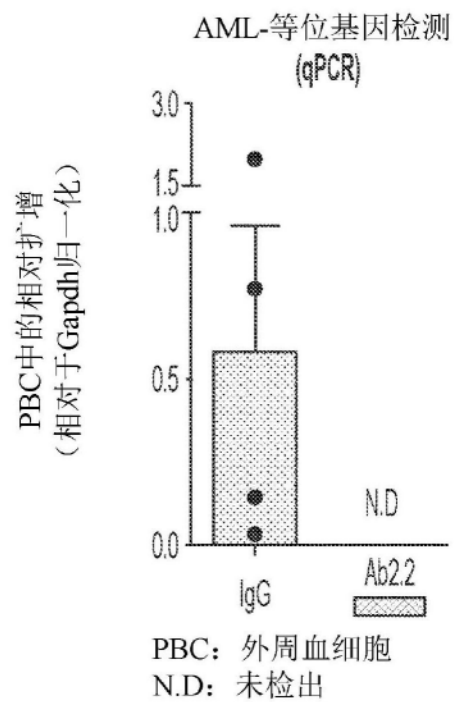


图21D

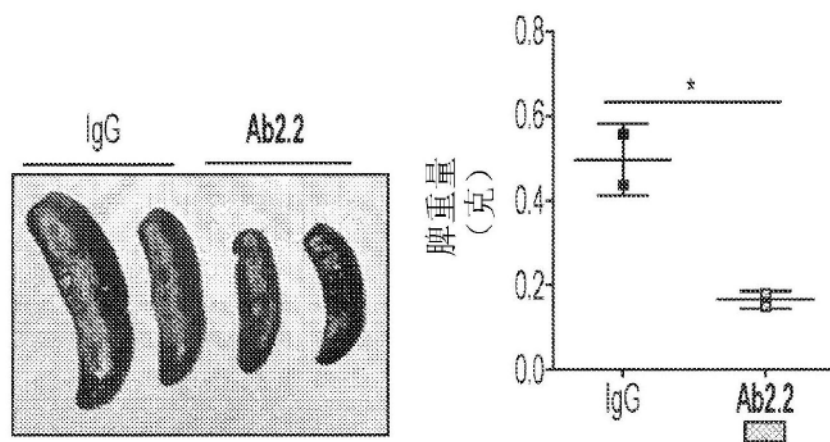


图21E

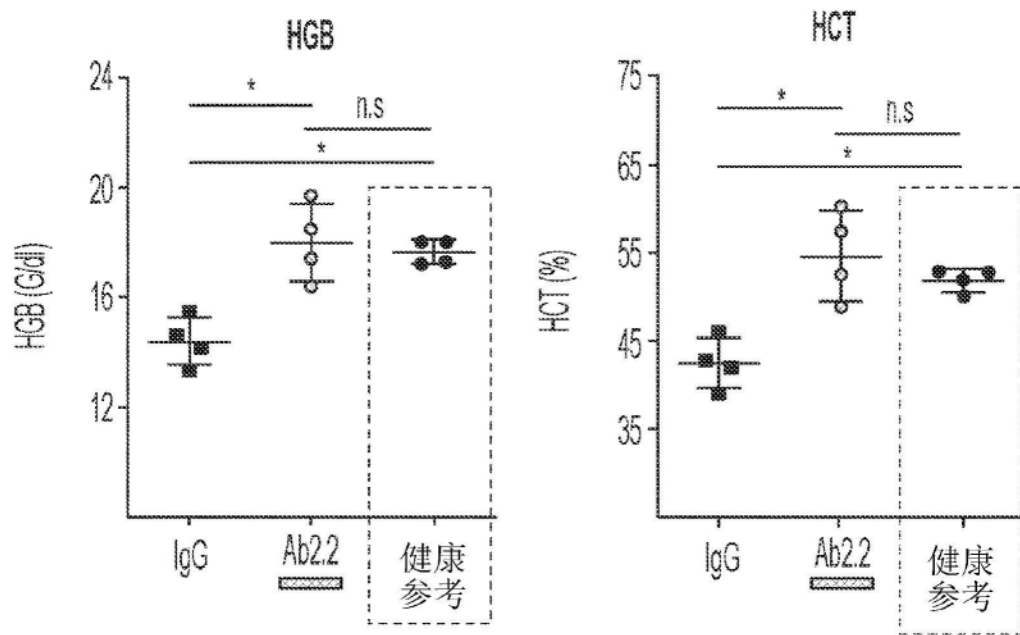


图21F

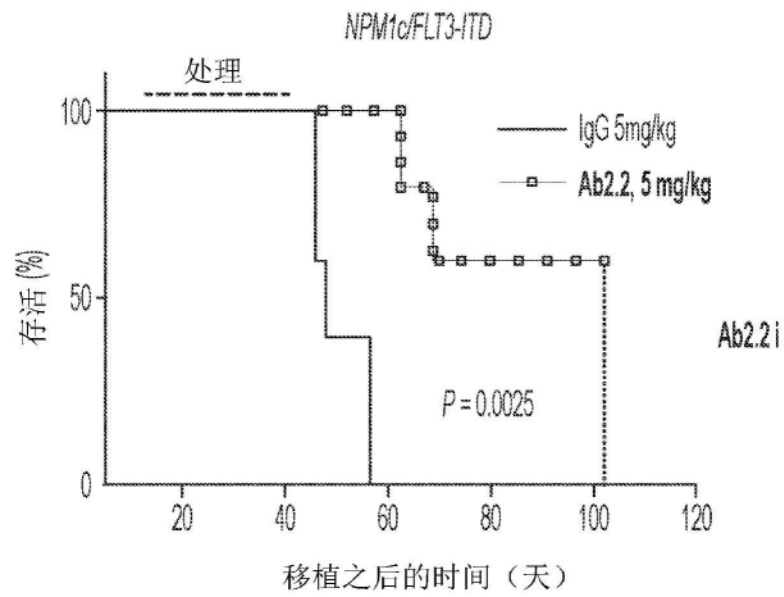


图21G

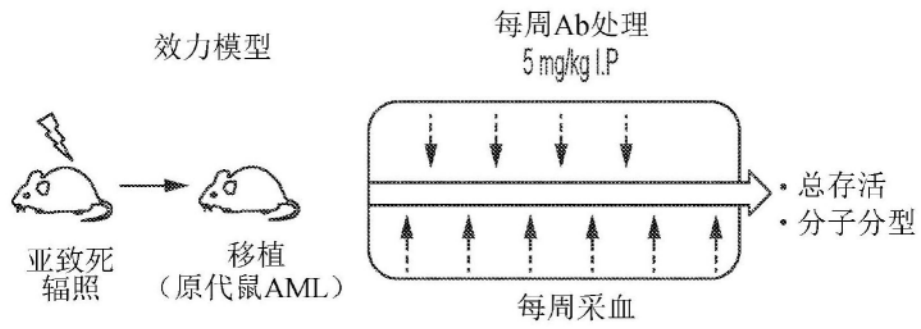


图22A

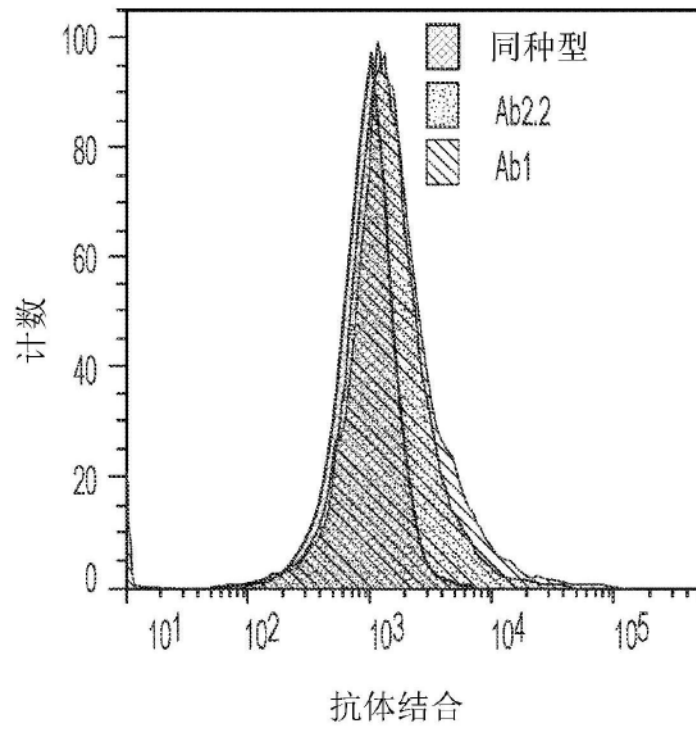


图22B

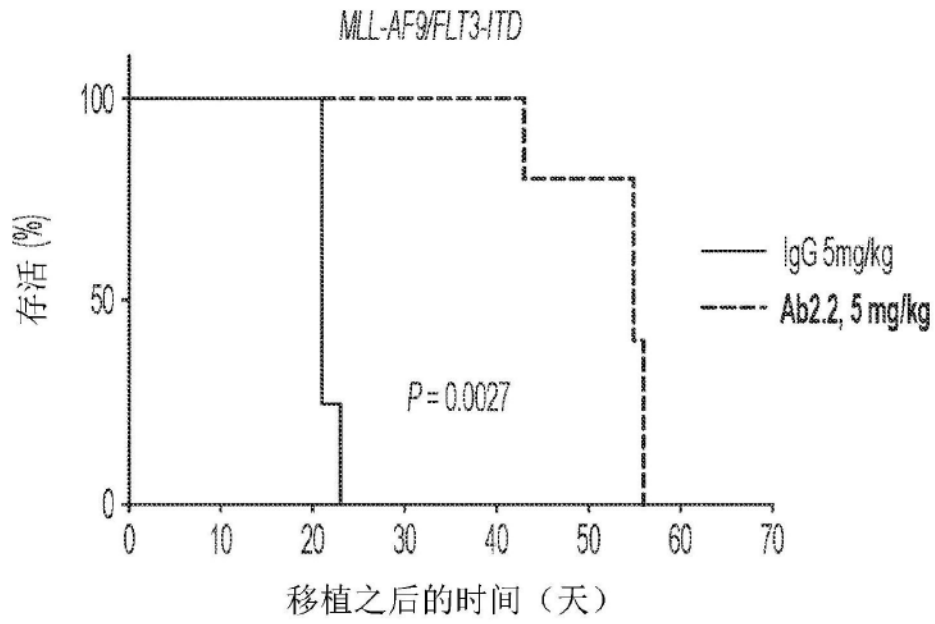


图22C

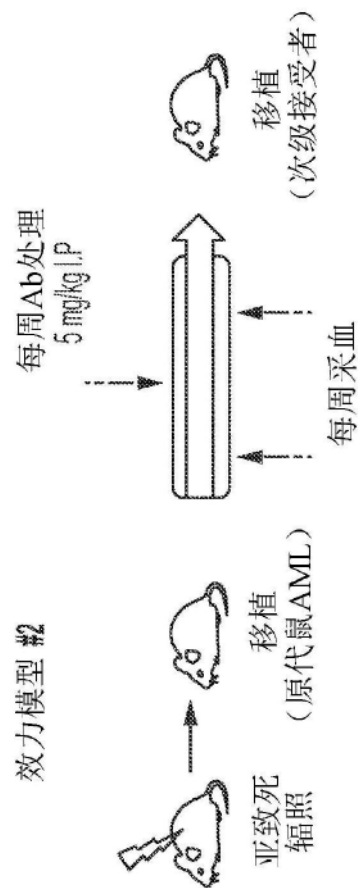


图23A

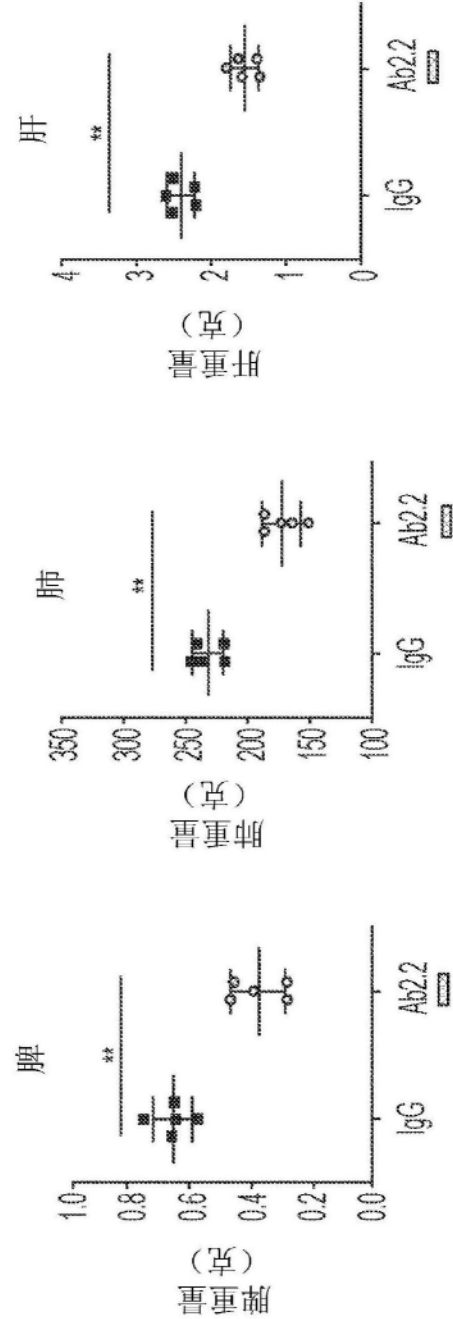


图23B

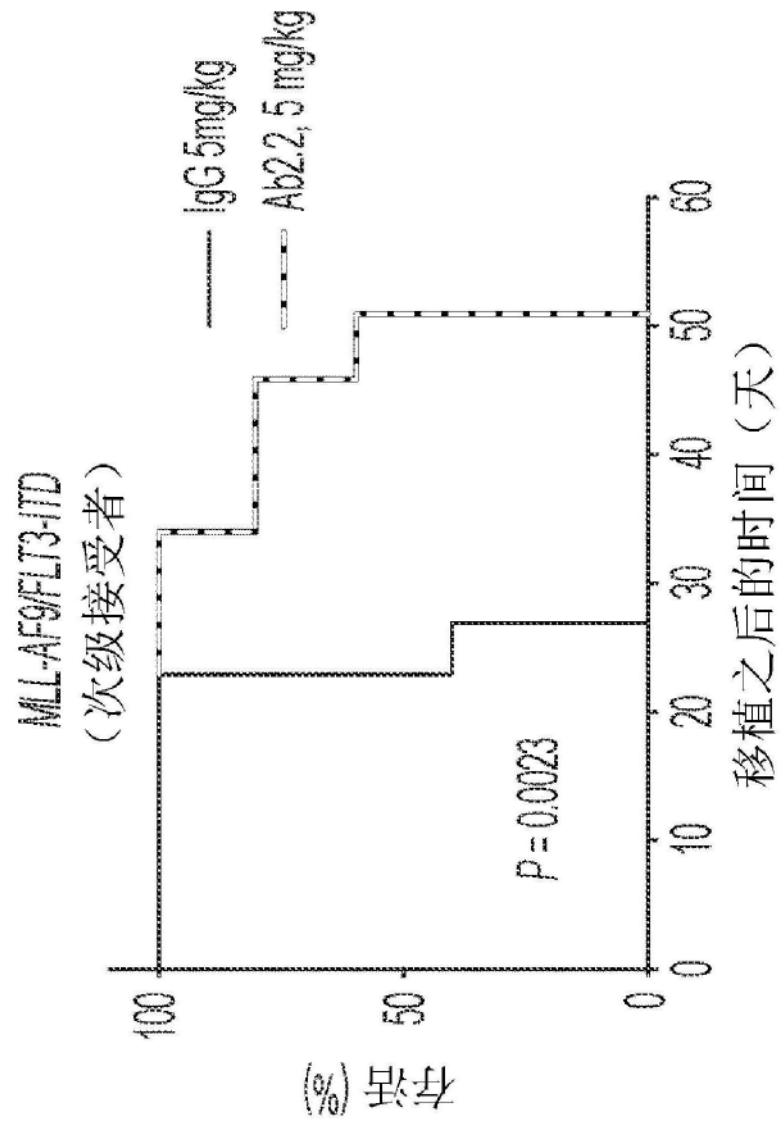


图23C

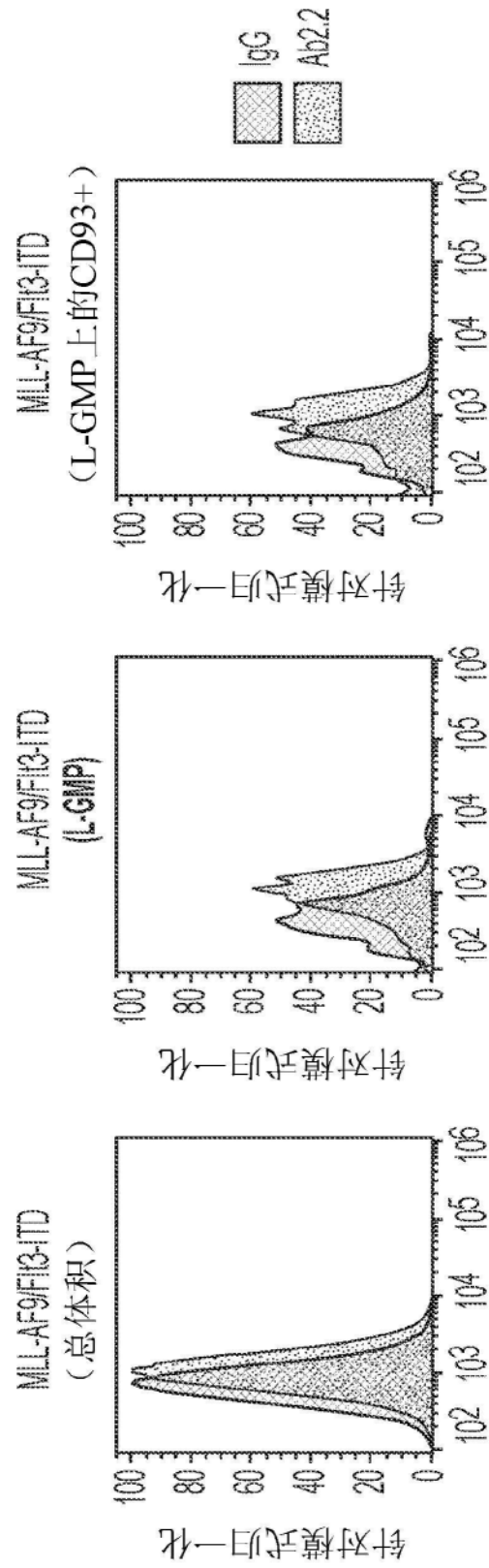


图23D

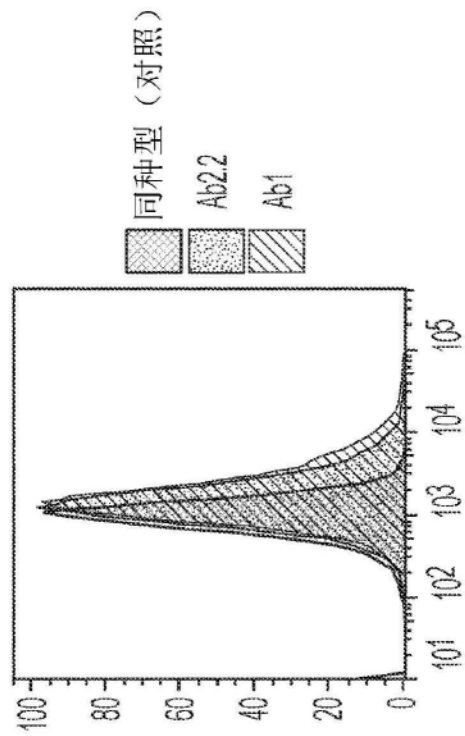


图23E

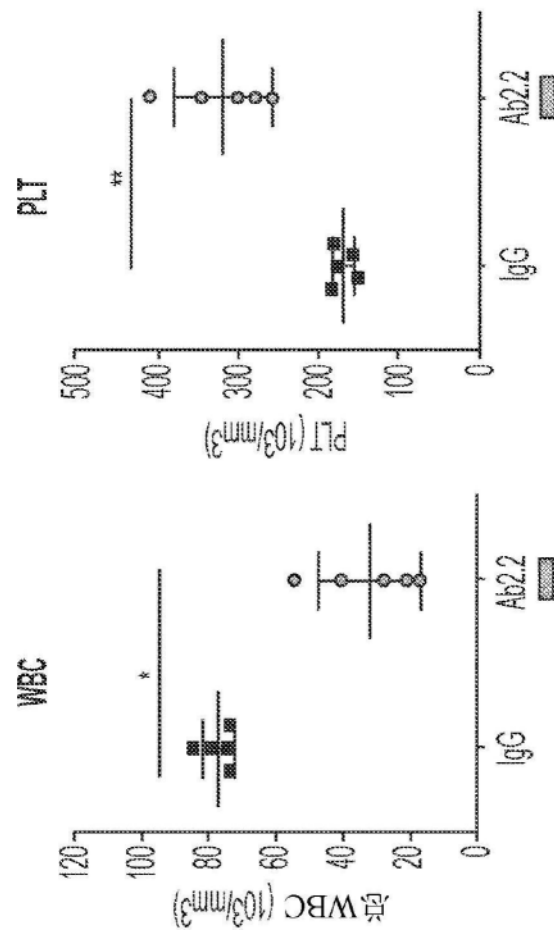


图23F

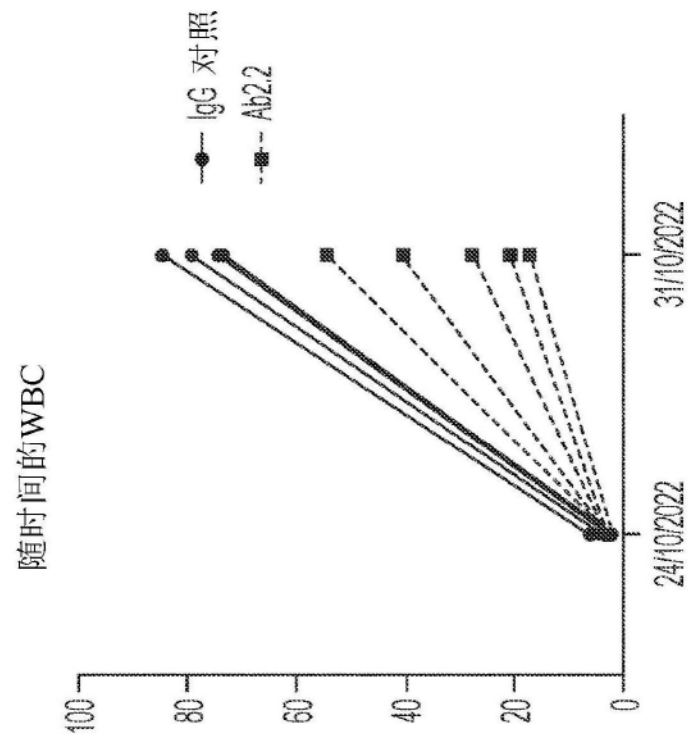


图23G

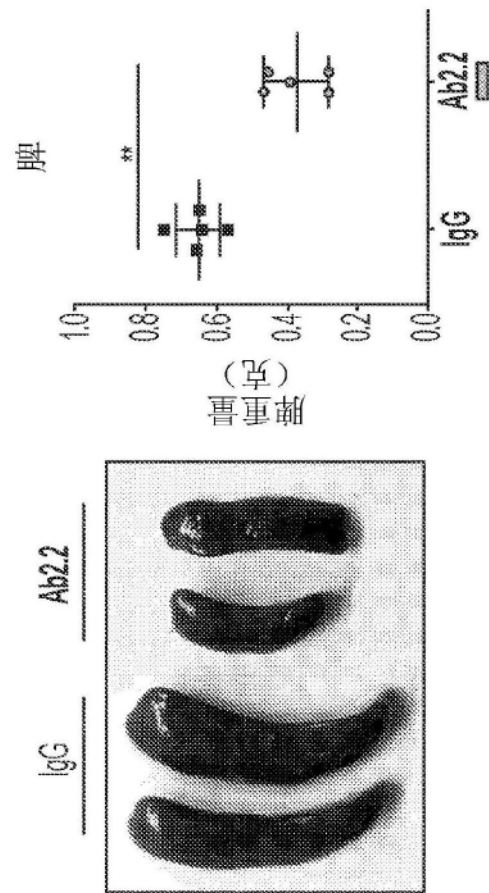


图23H

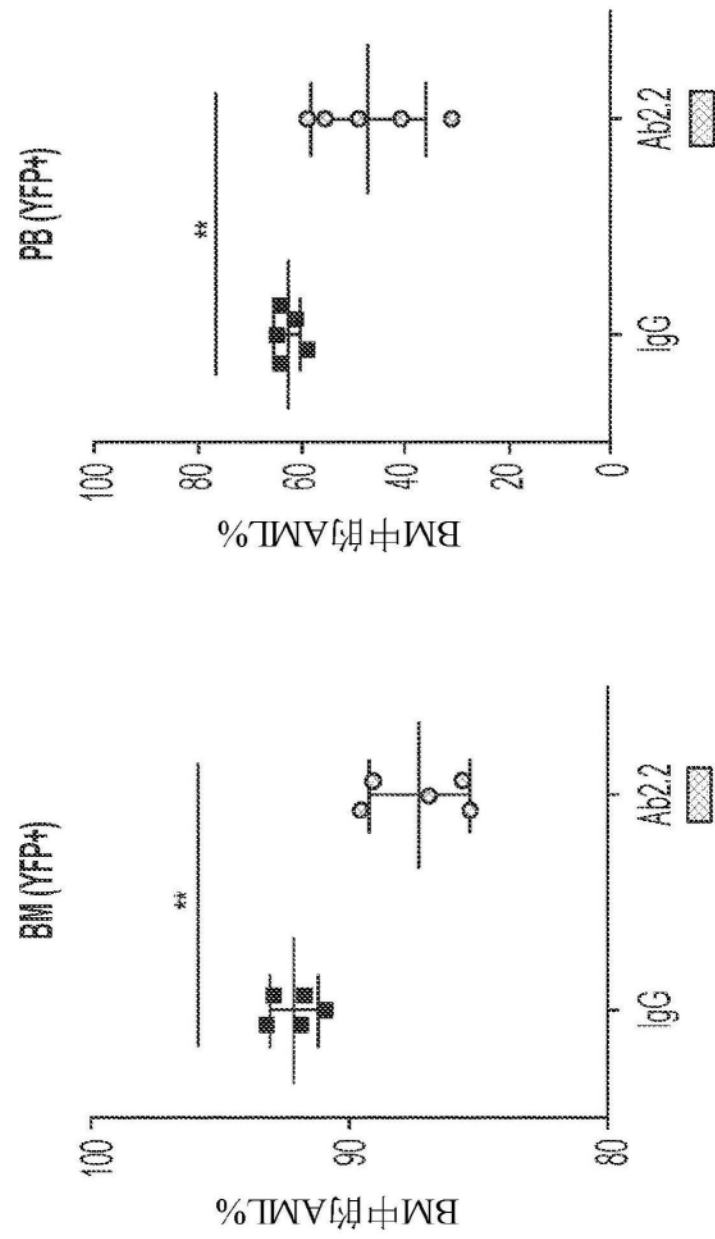


图23I

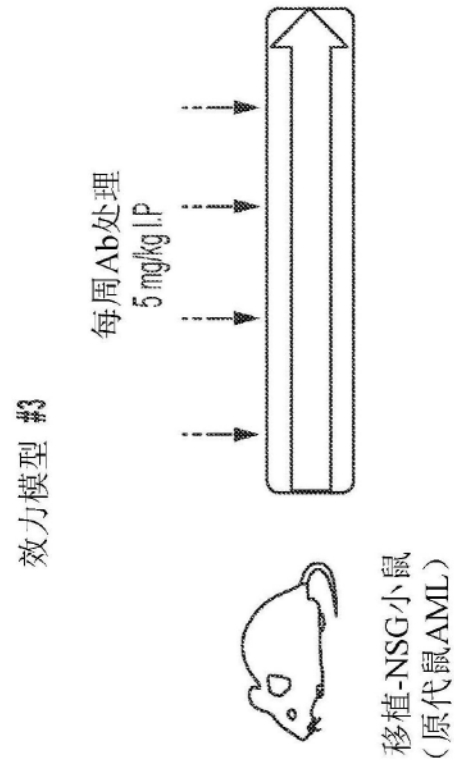


图24A

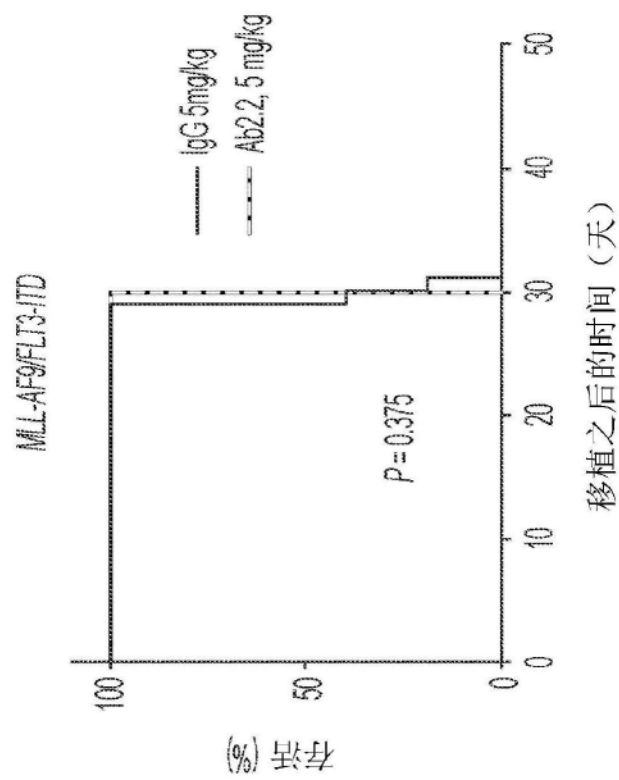


图24B

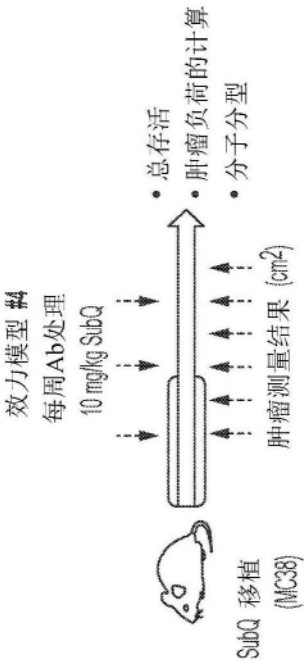


图25A

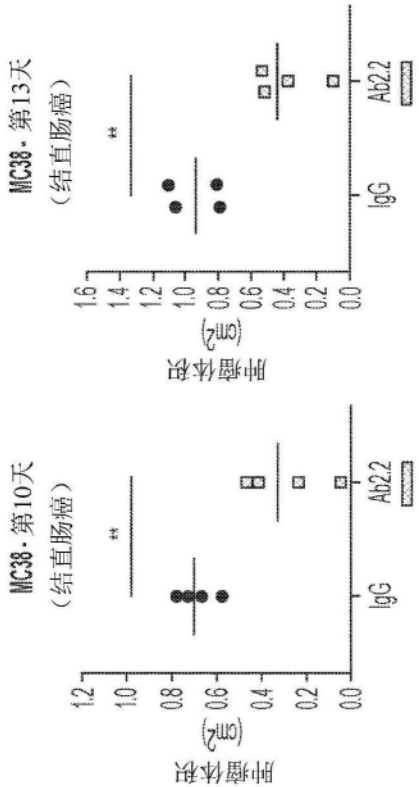


图25B

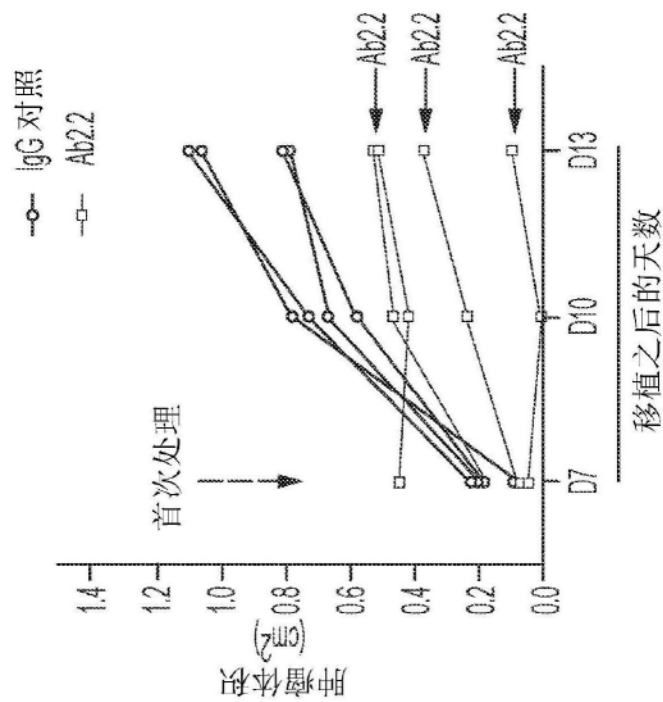


图25C

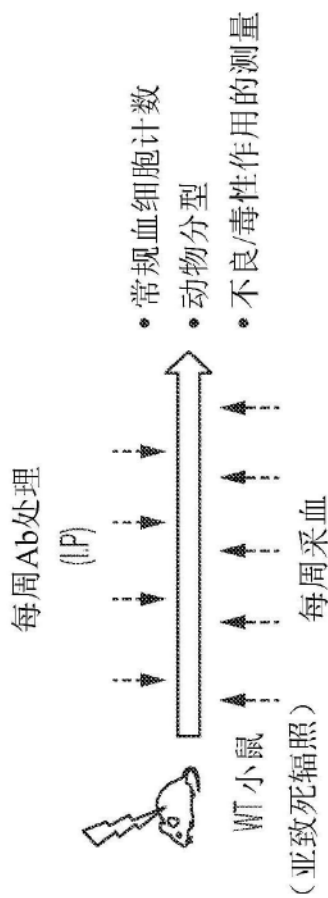


图26A

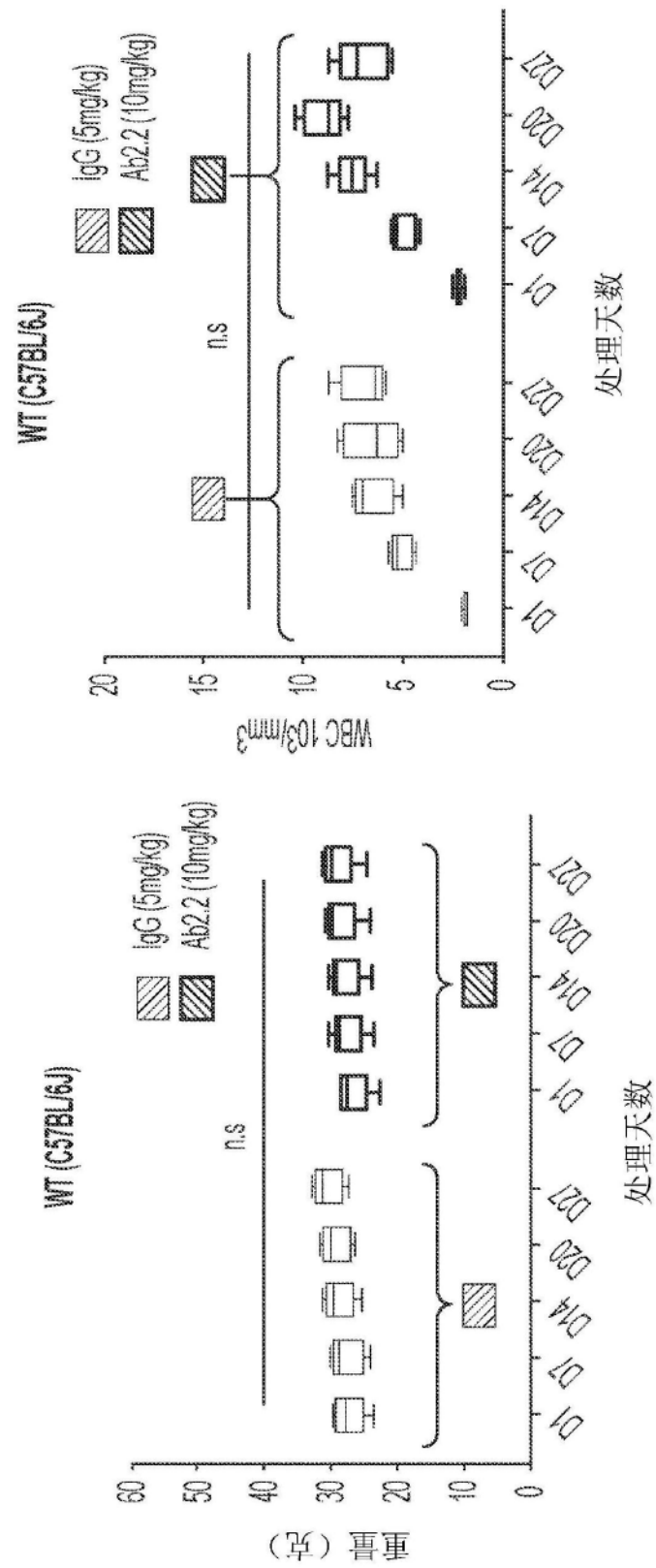


图26B

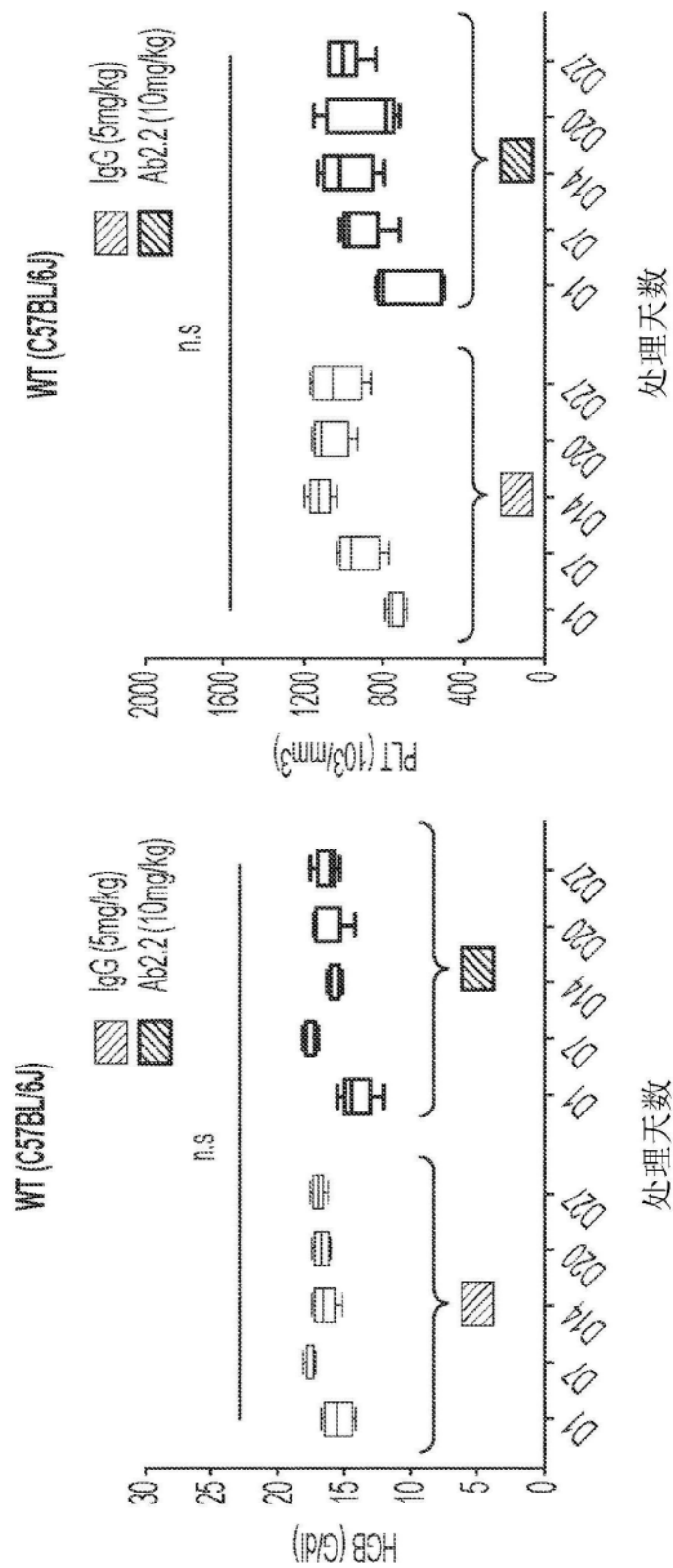


图26B续

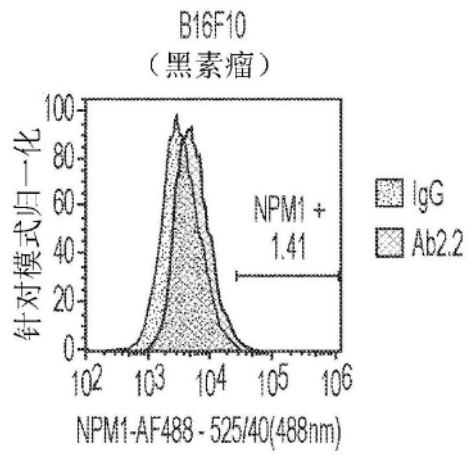


图27A

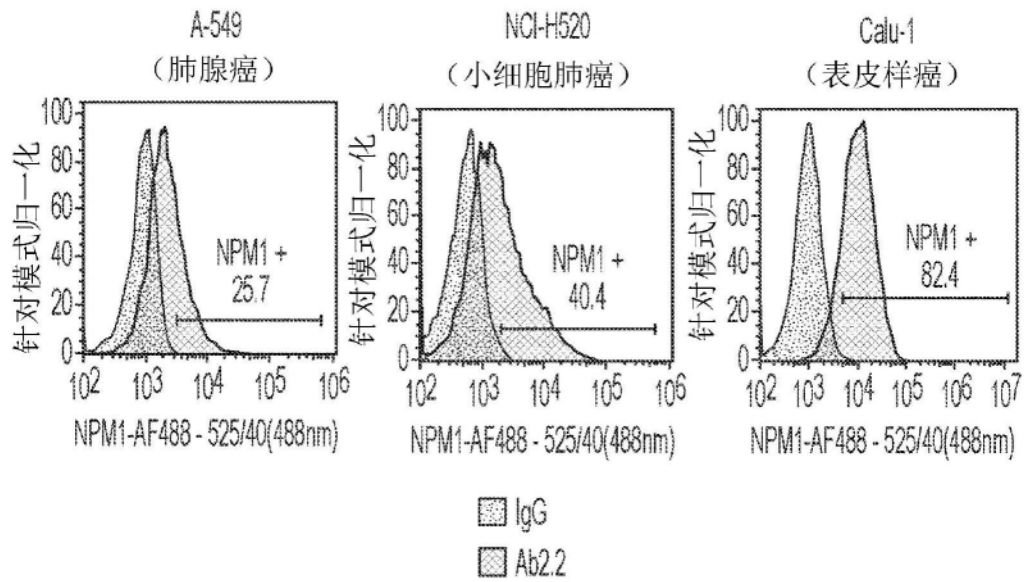


图27B

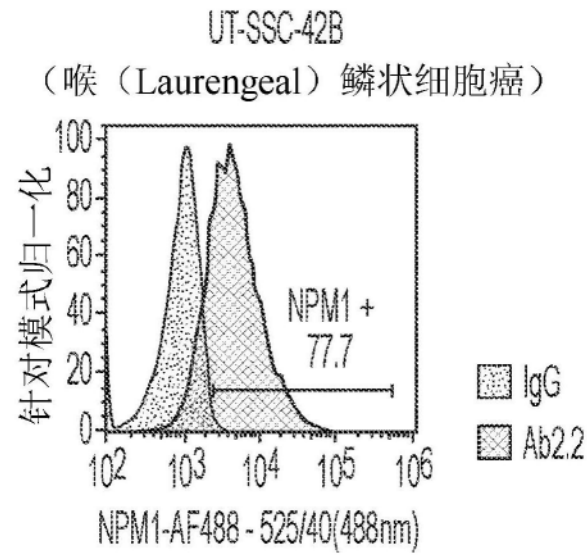


图27C

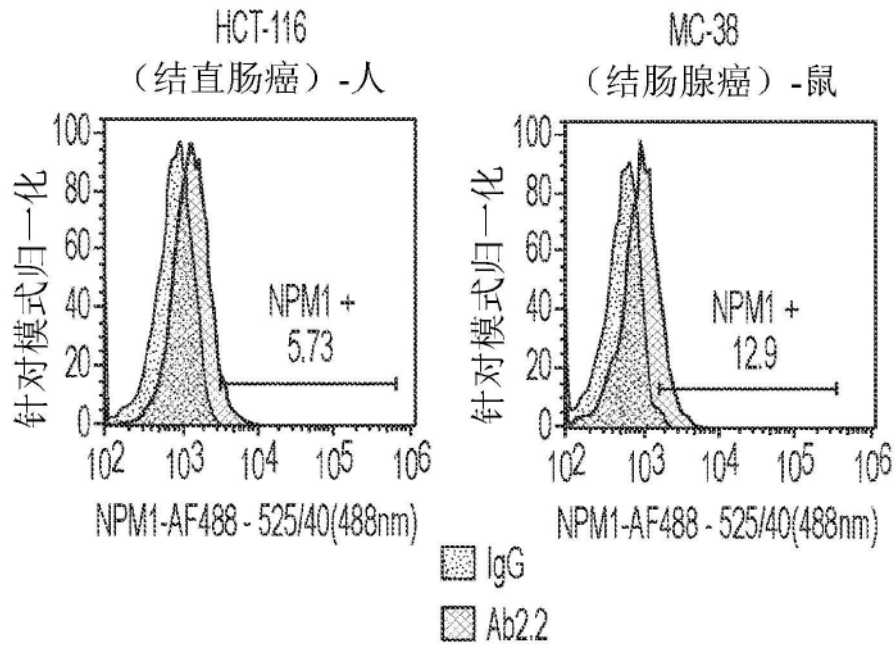


图27D

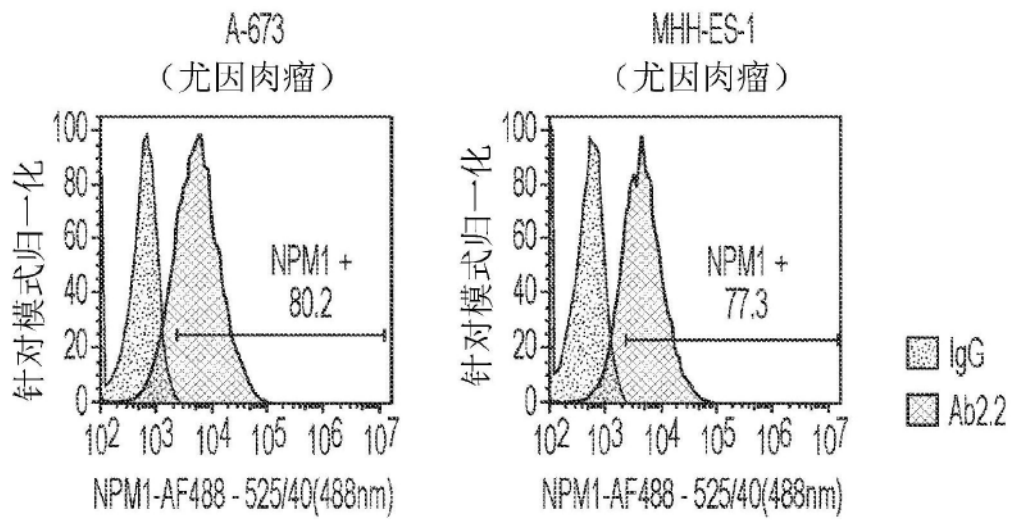


图27E

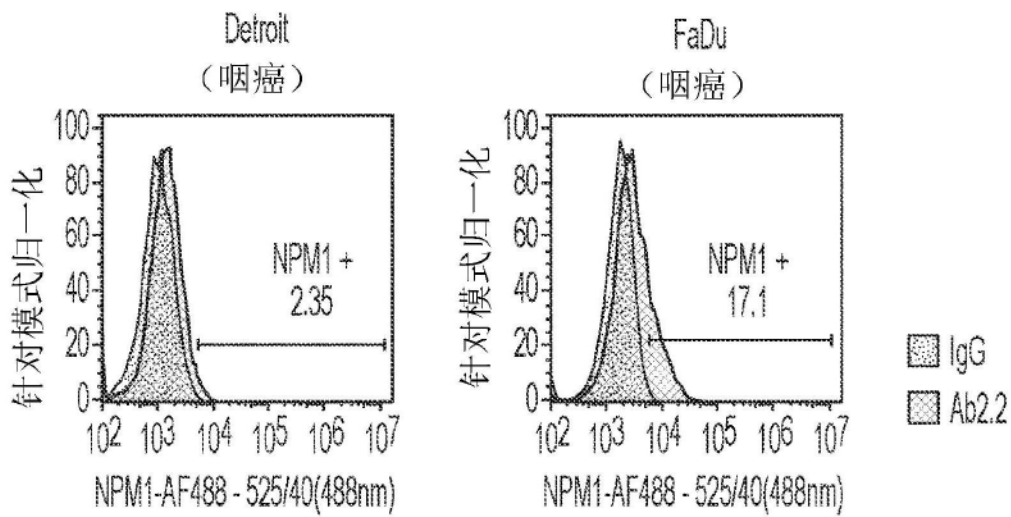


图27F

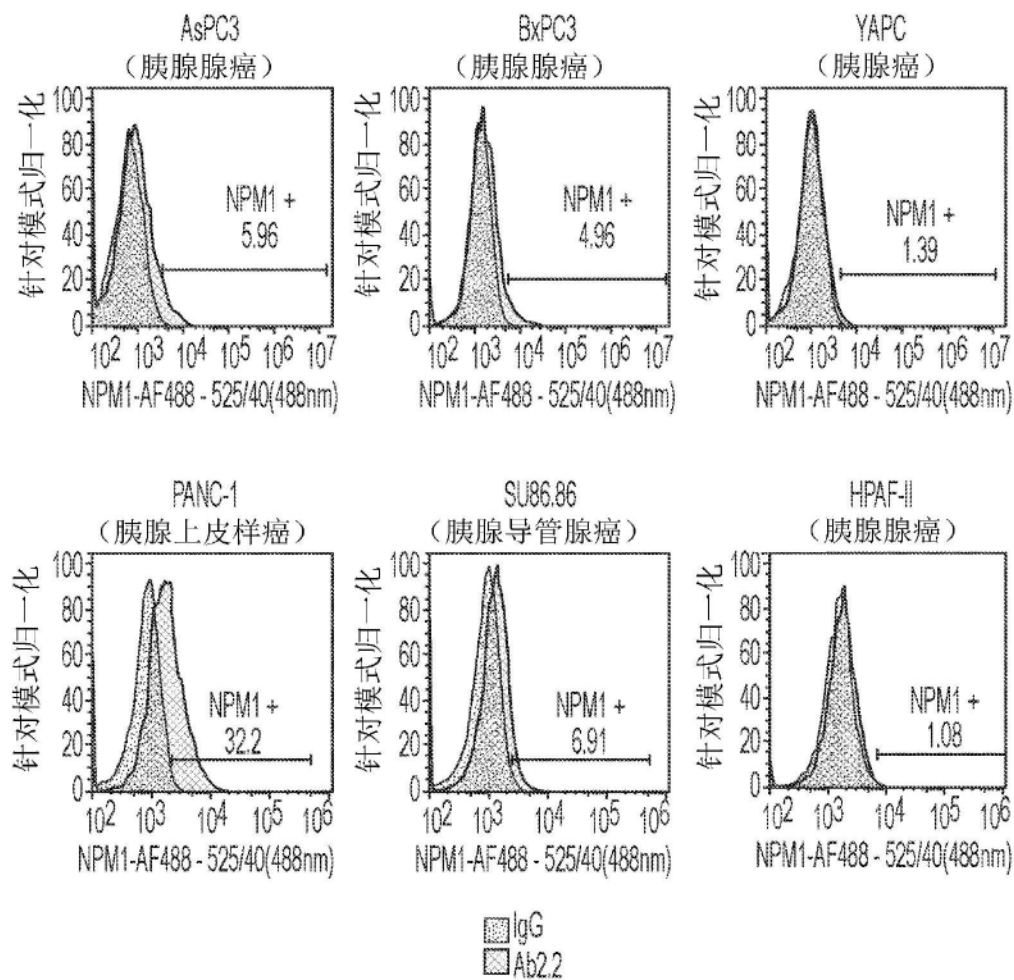


图27G

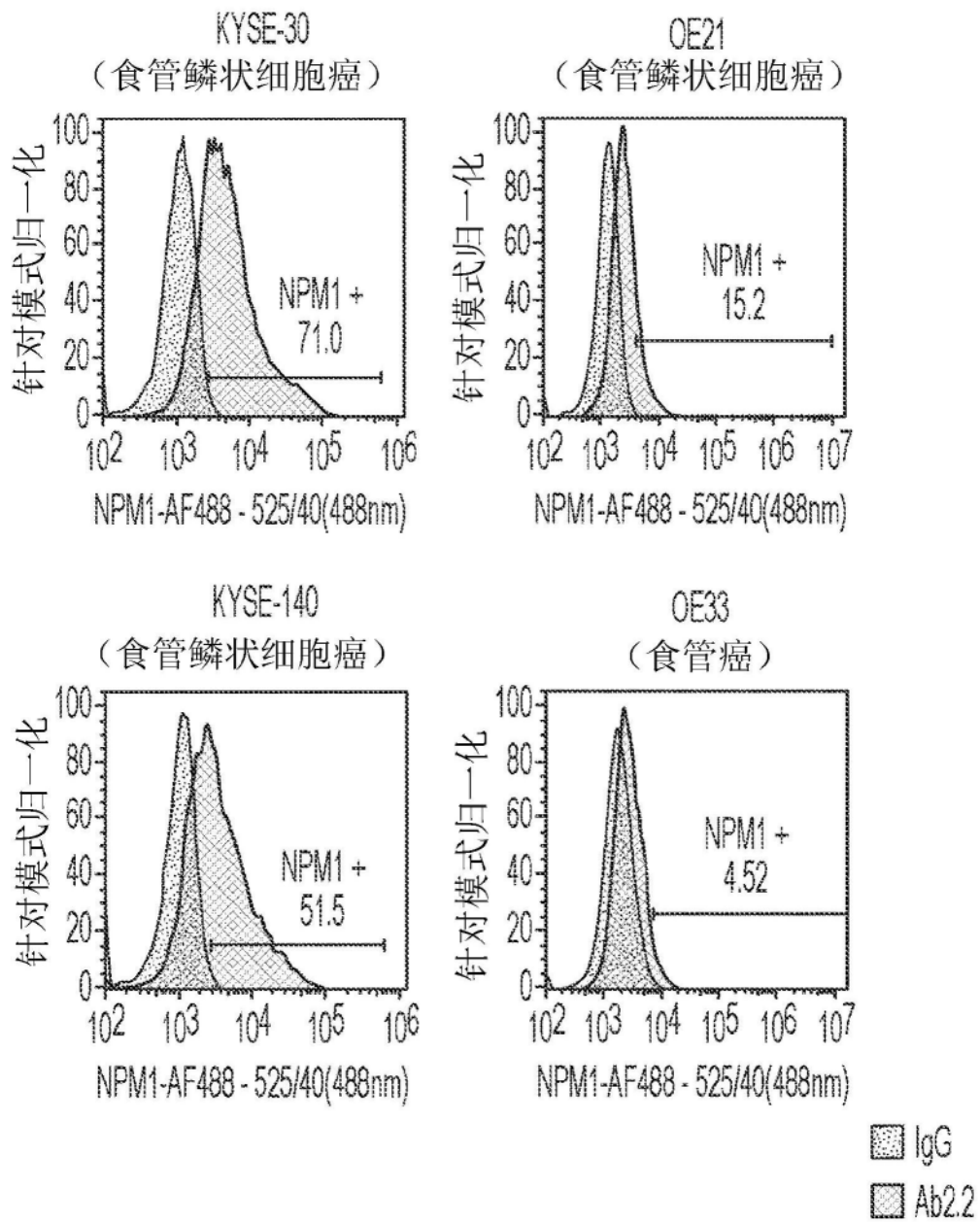


图27H

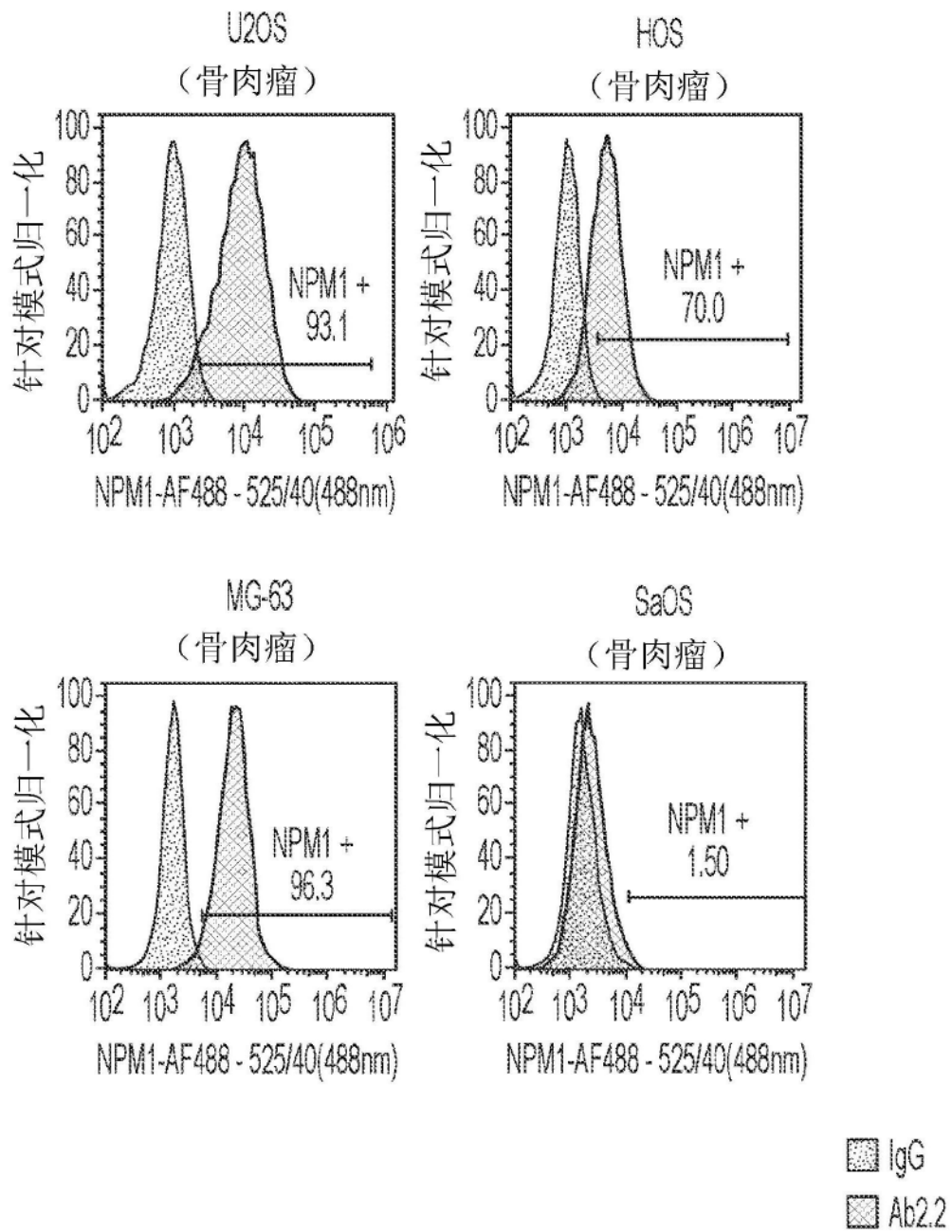


图27I

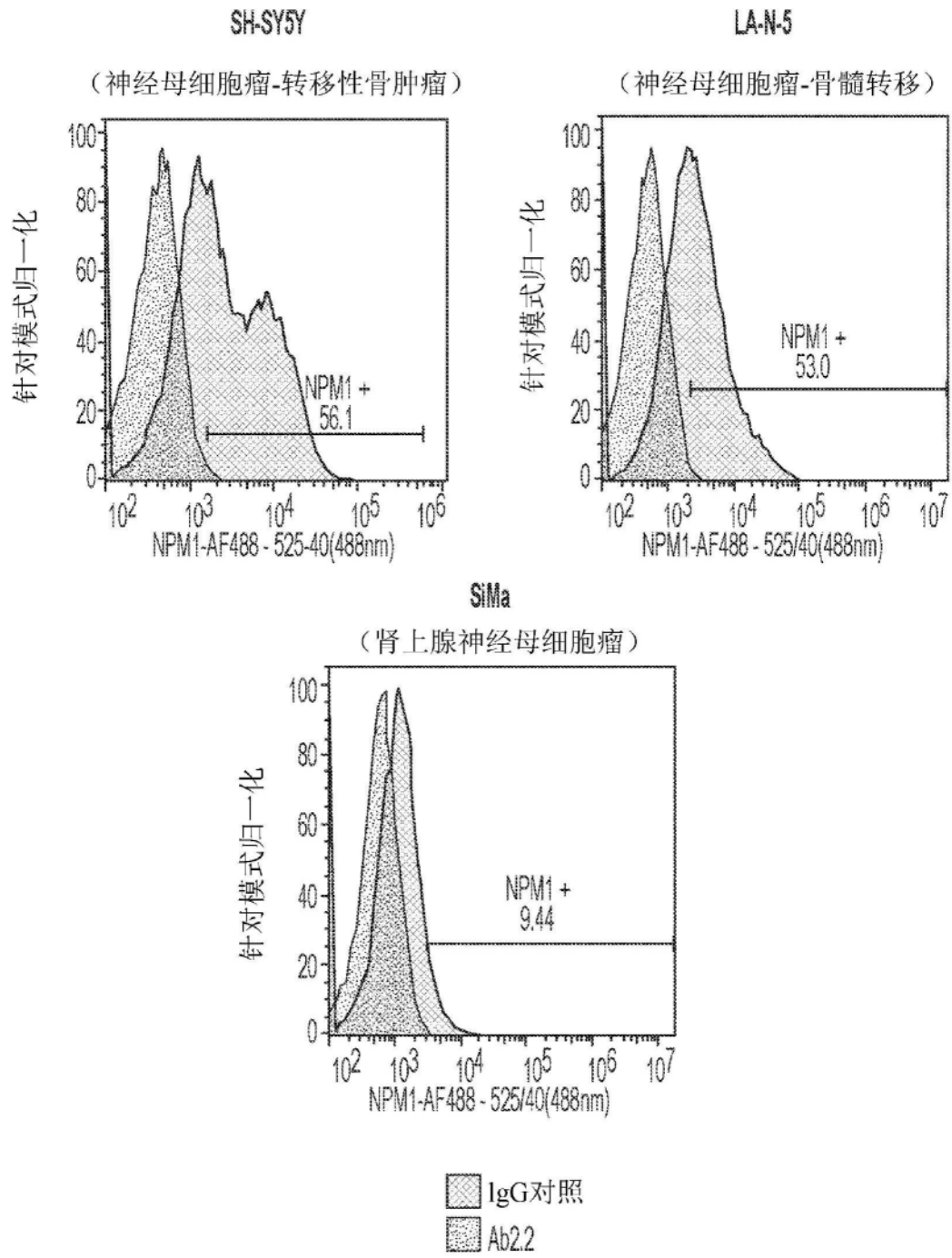


图27J

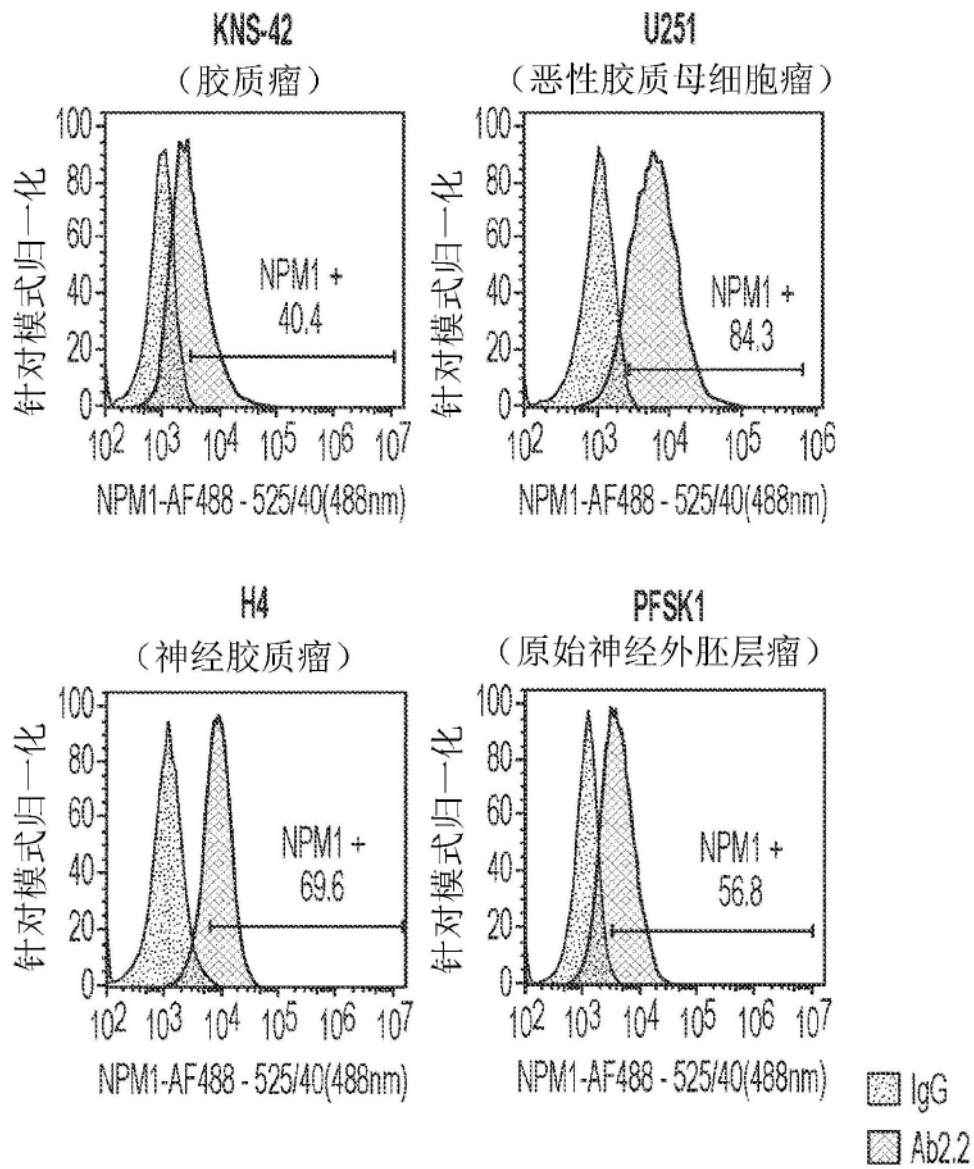


图27K

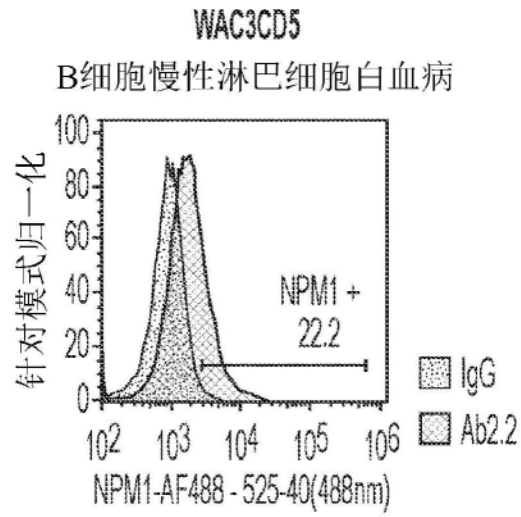


图27L

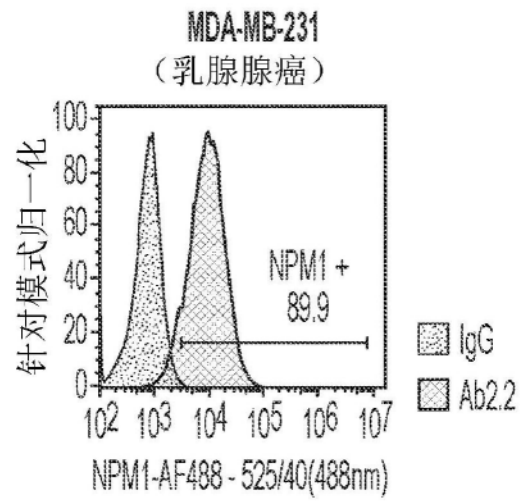


图27M

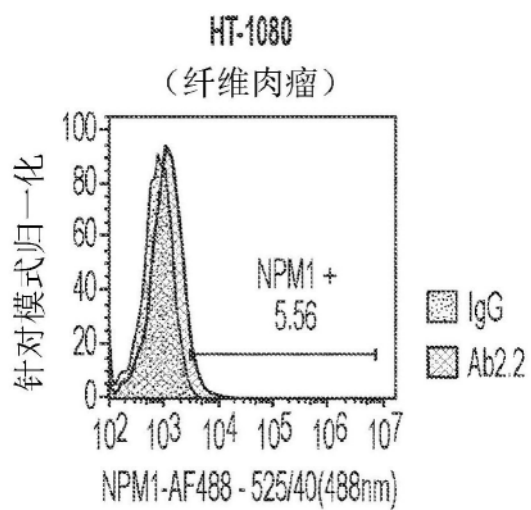


图27N

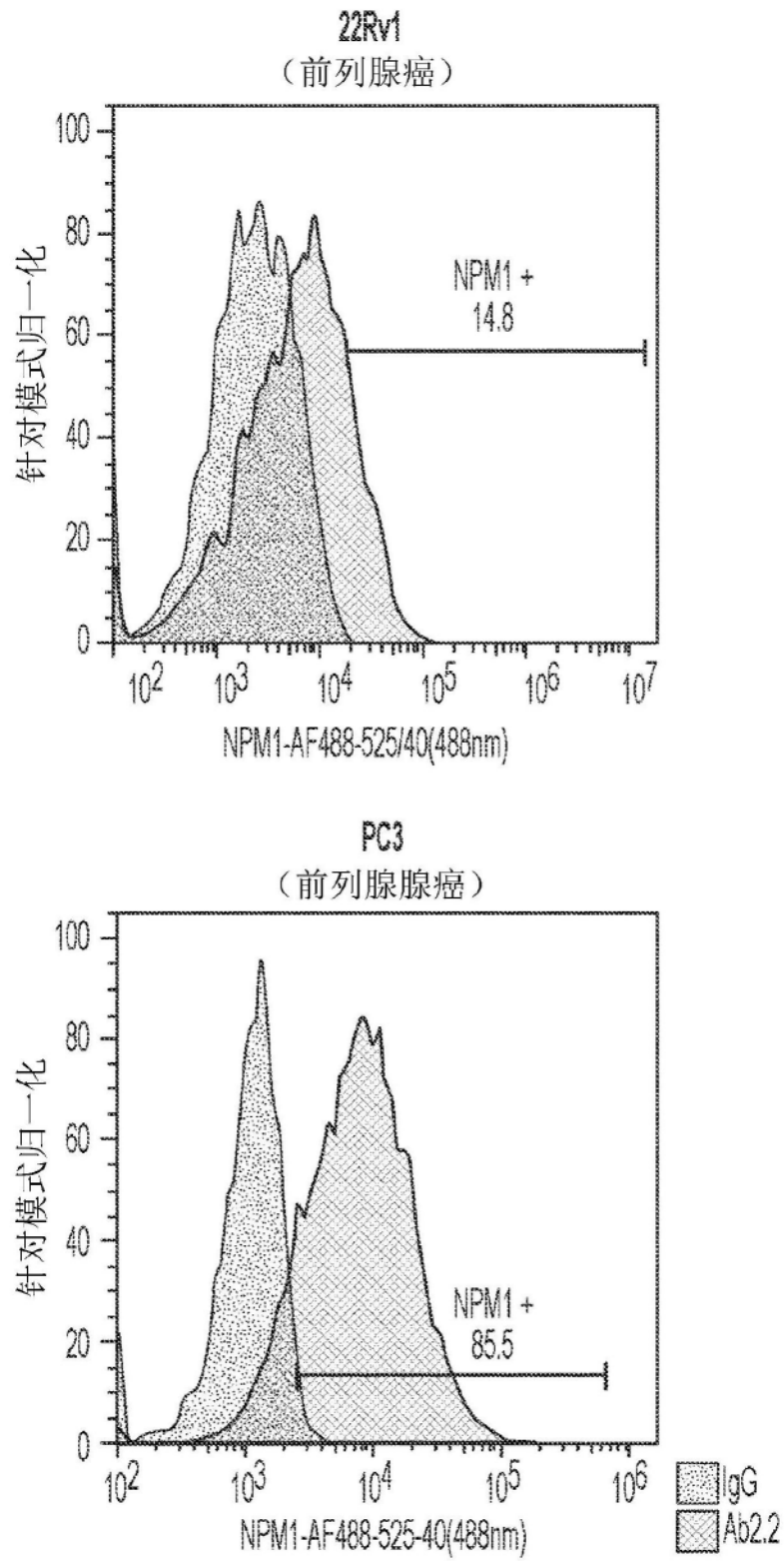


图270

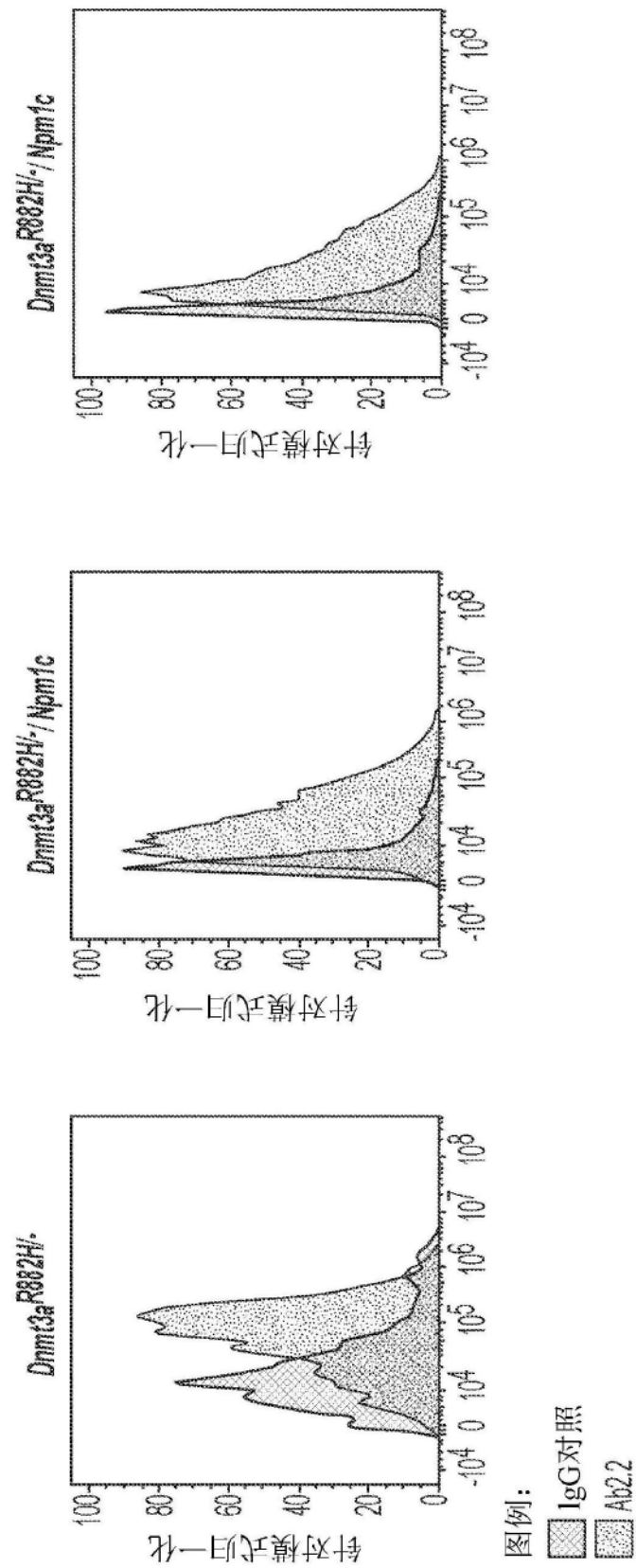


图28

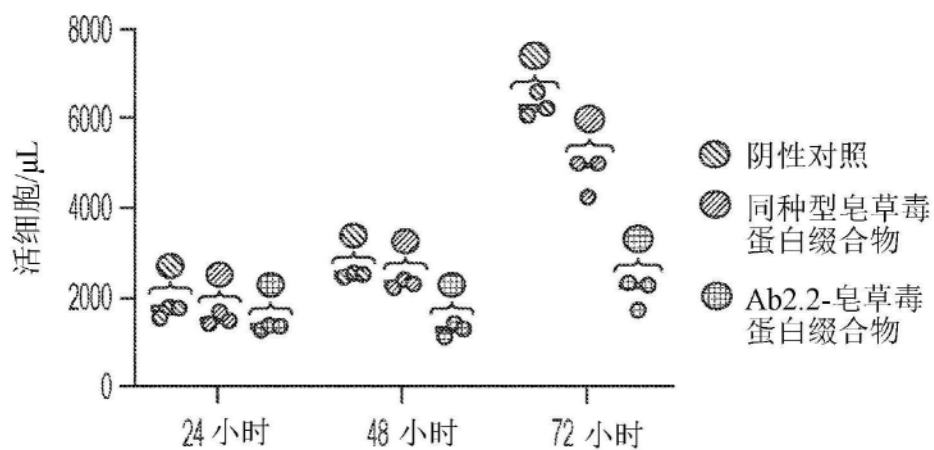


图29

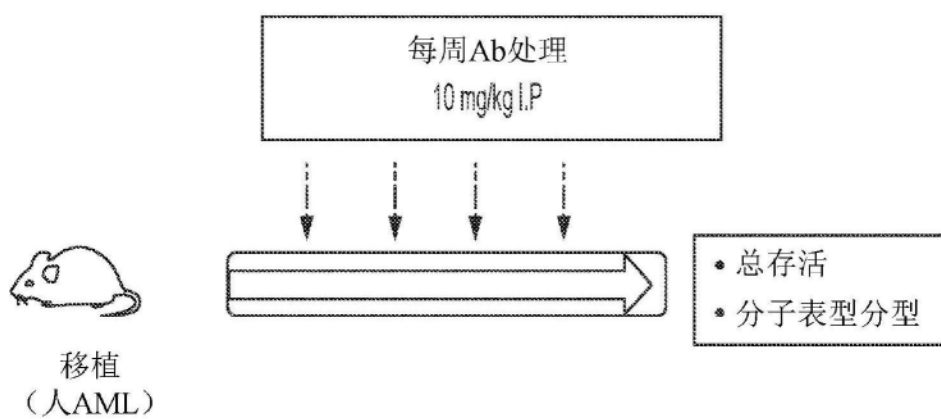


图30A

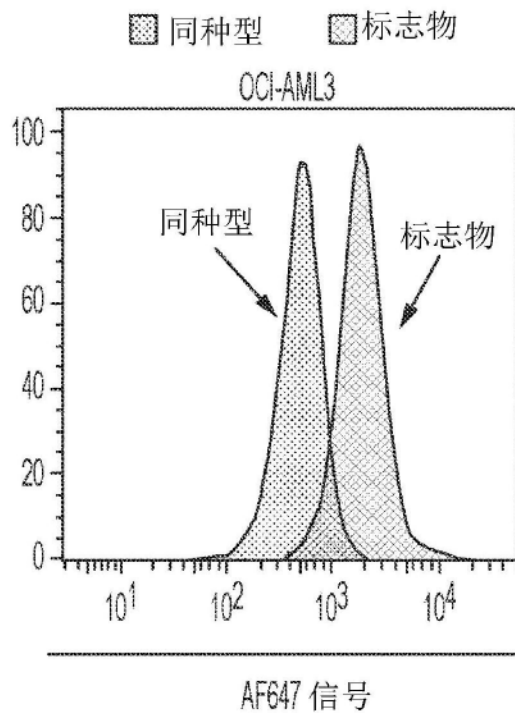


图30B

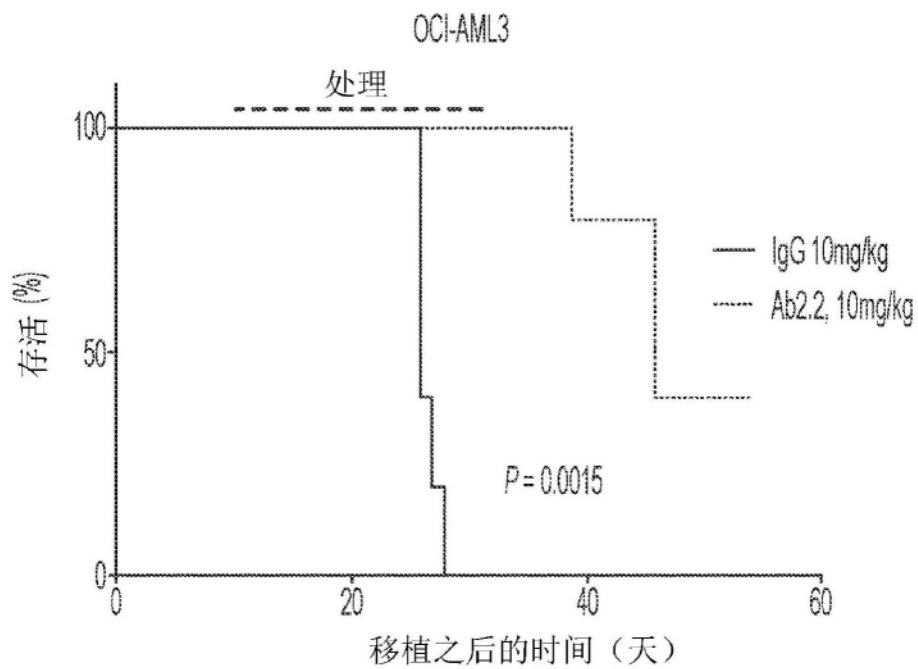


图30C

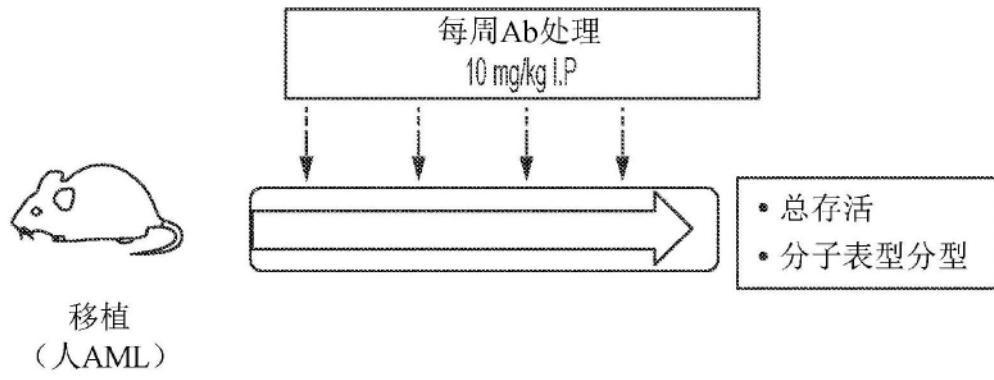


图31A

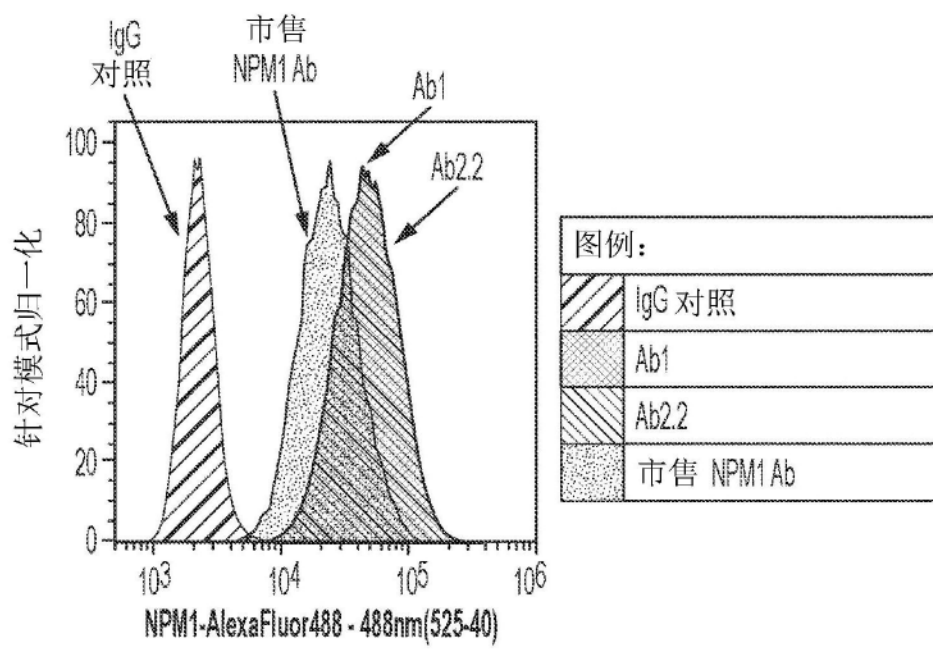


图31B

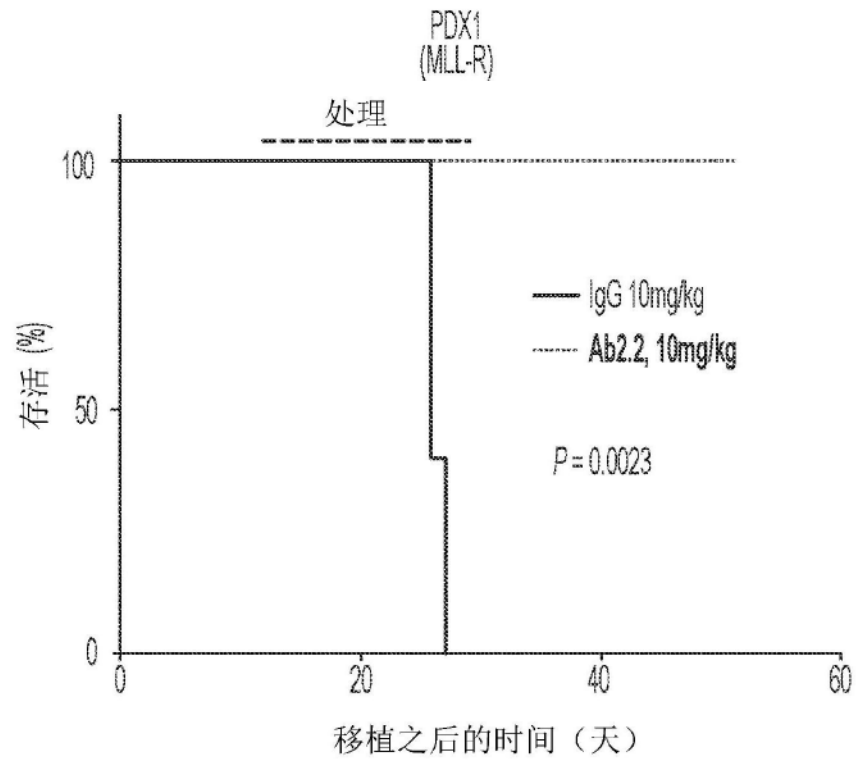


图31C

OCI-AML3细胞（针对BCL2i的抗性模型）

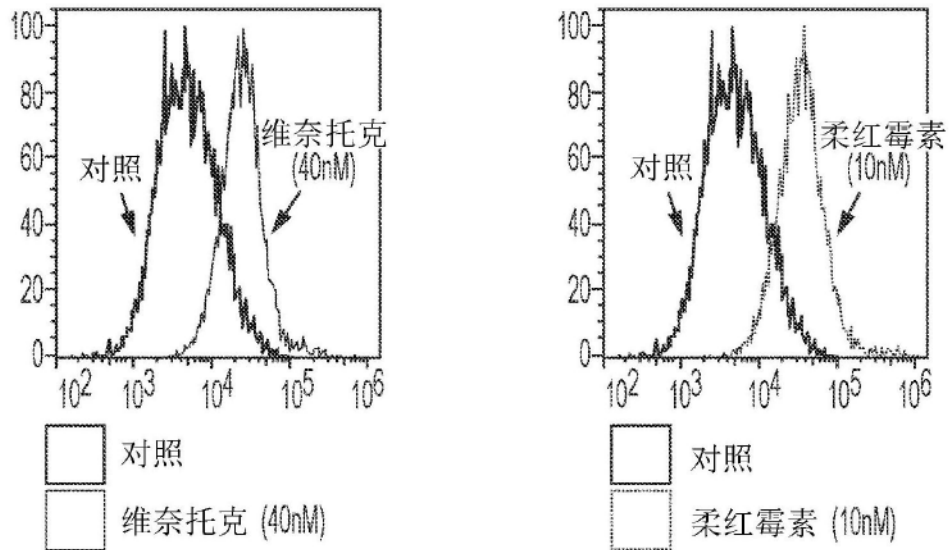


图32

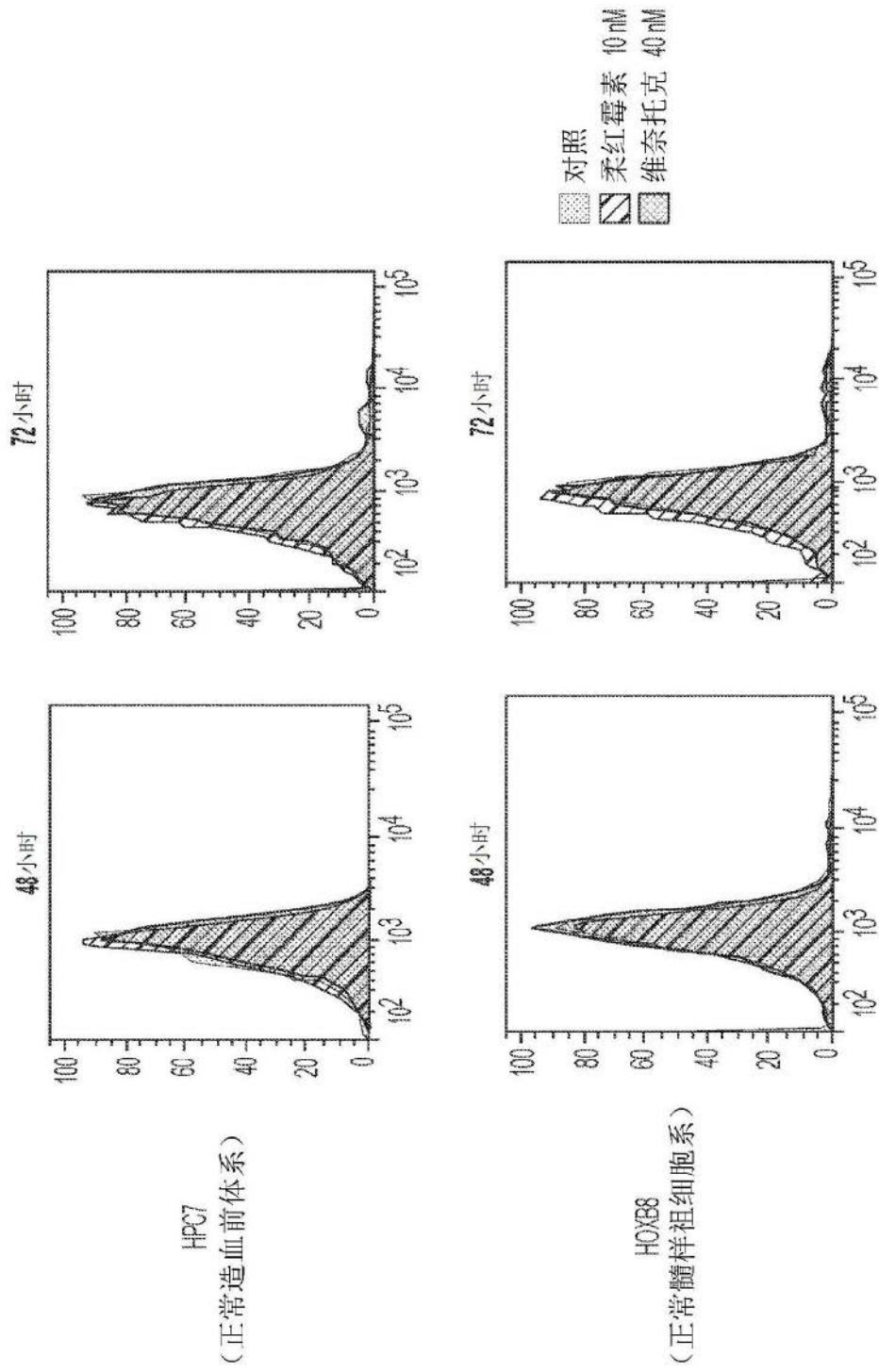


图33