



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0119146
(43) 공개일자 2024년08월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0789 (2010.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0647 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7024216
(22) 출원일자(국제) 2022년12월23일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년07월18일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/087829
(87) 국제공개번호 WO 2023/118608
국제공개일자 2023년06월29일
- (30) 우선권주장
21217465.0 2021년12월23일
유럽특허청(EPO)(EP)
- (71) 출원인
유니버시티트 바젤
스위스 4003 바젤 피터스그라벤 35
씨메이오 테라퓨틱스 아게
스위스 4051 바젤 애센보르슈타트 36
- (72) 발명자
올링거 스테파니
독일 81476 뮌헨 크로이츠호프슈트라쎄 31
예커 루카스
스위스 4125 리헨 외쎄르 바젤슈트라쎄 75
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
황의만, 황성필

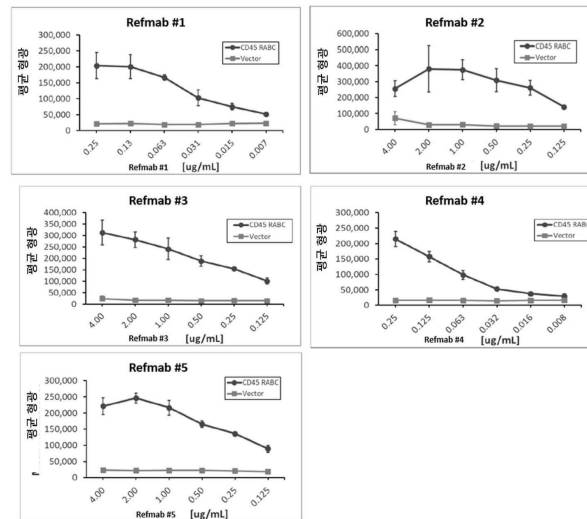
전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 세포 치료에 이용하기 위한 CD45의 식별 가능한 세포 표면 단백질 변이체

(57) 요약

본 개시 내용은 요법에 이용하기 위한, 조작된 또는 자연 발생적 돌연변이(들)를 가지나 기능적 표면 단백질인 식별 가능한 표면 단백질을 가지는 세포의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 요법, 특히 입양 세포 요법에 이용하기 위한, 식별 가능한 CD45 표면 단백질 변이체이나 기능적인 표면 단백질을 가지는 세포의 용도에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 14/70589 (2013.01)
C07K 16/289 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/77 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자

레포레 로살바

스위스 4051 바젤 슈나이더가쎄 21

마테-마로네 로미나

스위스 4125 리헨 임 니더홀츠보덴 53

까뮈 안나

스위스 4054 바젤 생거르가쎄 17

시노폴리 알레산드로

프랑스 68300 세인트-루이스 뒤희 두 소바쥬 17

두르진스카 이자벨라

스위스 4052 바젤 매그놀리엔파크 28

하이든 안나

스위스 8046 취리히 젤글리슈트라쎄 12

데보 안나

프랑스 68300 세인트-루이스 애비뉴 드 발레 92아

가라우드 사이먼

스위스 4053 바젤 마르가레텐슈트라쎄 49

명세서

청구범위

청구항 1

그것이 필요한 환자의 의학적 치료(medical treatment)에 사용하기 위한 CD45의 제 1 아이소폼(isoform)을 발현하는 인간 세포 또는 인간 세포의 집단(population)으로서, 상기 환자는 CD45의 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가지고,

상기에서 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 인간 세포는 하나 이상의 다형성(polymorphism) 또는 유전적으로 조작된 대립유전자(allele)를 가지는 유전체 DNA(genomic DNA)를 포함하며,

상기에서 상기 다형성의(polymorphic) 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 CD45의 상기 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가지는 환자의 유전체에 존재하지 않고, 및

상기에서 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 E230, Y232, N255, N257, E259, T264, N267, E269, N286, S287, D292, I328, T330, F331, D334, Y340, K352, E353, E360, E364, Y372 또는 Y373 위치에서 아미노산의 하나 이상의 치환(substitution)을 특징으로 하는, 인간 세포 또는 인간 세포의 집단.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기에서 상기 제 1 및 제 2 아이소폼은 실질적으로 기능적으로 동일하고, 바람직하게는 상기 제 1 및 제 2 아이소폼은 실질적으로 동일한 생물물리학적 특성을 가지고, 실질적으로 같은 안정성을 가지며, 실질적으로 같은 용해 온도(melting temperature)를 가지고, 실질적으로 같은 응집 경향(aggregation propensity)을 가지며 및/또는 실질적으로 같은 이량체(dimer) 형성 경향을 가지는, 인간 세포 또는 인간 세포의 집단.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기에서 상기 제 1 및 제 2 아이소폼은 CD45의 표적 단백질(target proteins)을 탈인산화하고, TCR 시그널링 캐스케이드(signaling cascade)를 활성화하며, 사이토카인(cytokine) 생산 증가 및/또는 T 세포의 증식 증가를 초래하는, 인간 세포 또는 인간 세포의 집단.

청구항 4

상기 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기에서 CD45의 상기 제 1 및 상기 제 2 아이소폼은 CD45의 타이로신 카이네이즈 Lck를 탈인산화하는, 인간 세포 또는 인간 세포의 집단.

청구항 5

상기 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기에서 상기 의학적 치료는 CD45의 상기 제 2 아이소폼을 발현하는 환자 세포를 특이적으로 고갈시키기 위해, CD45의 상기 제 2 아이소폼에 특이적으로 결합하는 항원-결합 부위(antigen-binding region)를 포함하는 치료적으로 유효한 양의 고갈제(depleting agent)와 조합하여, 치료적으로 유효한 양의 CD45의 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포 또는 세포의 집단을 상기 그것이 필요한 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 인간 세포 또는 인간 세포의 집단.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기에서 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 F331, K352 또는 E353 위치에서 아미노산의 하나 이상의 치환을 특징으로 하고, 및

상기에서 상기 고갈제는 하기로부터 선택된 항원-결합 부위를 포함하는, 인간 세포 또는 인간 세포의 집단:

a) 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 4, VHCDR2는 서열번호 5 및 VHCDR3는 서열번호 6인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 7, VLCDR2는 서열번호 8 및 VLCDR3는 서열번호 9인 항체 경쇄 가변 도메인

(VL),

더욱 바람직하게는 상기에서 상기 제 1 항원 결합 부위는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인을 포함하고; 또는

b) 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 4, VHCDR2는 서열번호 5 및 VHCDR3는 서열번호 6인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 60, VLCDR2는 서열번호 61 및 VLCDR3는 서열번호 9인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL),

더욱 바람직하게는 상기에서 상기 제 1 항원 결합 부위는 서열번호 58의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열번호 59의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기에서 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 K352 위치에서 아미노산 치환을 특징으로 하는, 인간 세포 또는 인간 세포의 집단.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기에서 서열번호 1의 K352 위치에서 아미노산의 상기 치환은 K352E, K352H, K352I, K352L, K352M, K352N, K352Q, K352S 및 K352T에서 선택되고, 바람직하게는 상기에서 상기 치환은 K352D, K352E 및 K352H이며, 및 더욱 바람직하게는 상기에서 상기 치환은 K352E인, 인간 세포 또는 인간 세포의 집단.

청구항 9

제 6항에 있어서, 상기에서 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 N286 위치에서 아미노산 치환을 특징으로 하며, 바람직하게는 상기에서 상기 치환은 N286D인, 인간 세포 또는 인간 세포의 집단.

청구항 10

제 6항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기에서 상기 고갈제는 하기에서 선택된 항원-결합 부위와 동일한 에피토프(epitope)에 결합하는, 인간 세포 또는 인간 세포의 집단:

a) 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 4, VHCDR2는 서열번호 5 및 VHCDR3는 서열번호 6인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 7, VLCDR2는 서열번호 8 및 VLCDR3는 서열번호 9인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL),

바람직하게는 상기에서 상기 제 1 항원 결합 부위는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인을 포함하고; 및

b) 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 4, VHCDR2는 서열번호 5 및 VHCDR3는 서열번호 6인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 60, VLCDR2는 서열번호 61 및 VLCDR3는 서열번호 9인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL),

바람직하게는 상기에서 상기 제 1 항원 결합 부위는 서열번호 58의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열번호 59의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

청구항 11

제 5항에 있어서, 상기에서 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 E230, Y232, N257, E259 또는 N286 위치에서 아미노산의 하나 이상의 치환을 특징으로 하며, 및

상기에서 상기 고갈제는 하기를 포함하는 항원-결합 부위를 포함하는, 인간 세포 또는 인간 세포의 집단:

3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 20, VHCDR2는 서열번호 21 및 VHCDR3는 서열번호 22인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 23, VLCDR2는 서열번호 24 및 VLCDR3는 서열번호 25인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL),

더욱 바람직하게는 상기에서 상기 제 1 항원 결합 부위는 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기에서 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 N257 위치에서 아미노산 치환을 특징으로 하는, 인간 세포 또는 인간 세포의 집단.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기에서 서열번호 1의 N257 위치에서 아미노산의 상기 치환은 N257E, N257K, N257R 또는 N257T 치환이고, 바람직하게는 상기에서 상기 치환은 N257R 치환인, 인간 세포 또는 인간 세포의 집단.

청구항 14

상기에서 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 E259 위치에서 아미노산 치환을 특징으로 하는, 인간 세포 또는 인간 세포의 집단.

청구항 15

제 11항에 있어서, 상기에서 서열번호 1의 N286 위치에서 아미노산의 상기 치환은 N286D 치환인, 인간 세포 또는 인간 세포의 집단.

청구항 16

제 14항에 있어서, 상기에서 서열번호 1의 E259 위치에서 아미노산의 상기 치환은 E259N, E259Q, E259V 또는 E259G 치환이고, 바람직하게는 상기에서 상기 치환은 E259V 치환인, 인간 세포 또는 인간 세포의 집단.

청구항 17

제 11항에 있어서, 상기에서 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 Y232 위치에서 아미노산 치환을 특징으로 하며, 바람직하게는 상기에서 상기 치환은 Y232C 치환인, 인간 세포 또는 인간 세포의 집단.

청구항 18

제 11항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기에서 상기 고갈제는 하기를 포함하는 항원-결합 부위와 동일한 에피토프에 결합하는 인간 세포 또는 인간 세포의 집단:

3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 4, VHCDR2는 서열번호 5 및 VHCDR3는 서열번호 6인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 7, VLCDR2는 서열번호 8 및 VLCDR3는 서열번호 9인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL),

더욱 바람직하게는 상기에서 상기 제 1 항원 결합 부위는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

청구항 19

제 5항에 있어서, 상기에서 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 N257 위치에서 아미노산 치환을 특징으로 하며, 및

상기에서 상기 고갈제는 하기를 포함하는 항원-결합 부위를 포함하는 인간 세포 또는 인간 세포의 집단:

3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 12, VHCDR2는 서열번호 13 및 VHCDR3는 서열번호 14인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 15, VLCDR2는 서열번호 16, VLCDR3은 서열번호 17인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL)

바람직하게는 상기에서 상기 제 1 항원 결합 부위는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

청구항 20

제 19항에 있어서, 상기에서 서열번호 1의 N257 위치에서 아미노산의 상기 치환은 N257E, N257K, N257R 또는 N257T 치환이고, 바람직하게는 상기에서 상기 치환은 N257R 치환인, 인간 세포 또는 인간 세포의 집단.

청구항 21

제 19항 또는 제 20항에 있어서, 상기에서 상기 고갈제는 하기를 포함하는 항원-결합 부위와 동일한 에피토프에 결합하는 인간 세포 또는 인간 세포의 집단:

3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 12, VHCDR2는 서열번호 13 및 VHCDR3는 서열번호 14인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 15, VLCDR2는 서열번호 16, VLCDR3은 서열번호 17인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL)

더욱 바람직하게는 상기에서 상기 제 1 항원 결합 부위 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

청구항 22

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기에서 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 E230, N257, E259, F331, K352 또는 E353 위치에서 아미노산의 하나 이상의 치환을 특징으로 하는, 인간 세포 또는 인간 세포의 집단.

청구항 23

제 22항에 있어서, 상기에서 상기 잔기 E230는 K로 치환되고, 및/또는 잔기 N257은 A, D, E, H, K, R, S, T 또는 V로 치환되며, 및/또는 잔기 E259는 G, H, K, N, R, T 또는 Q로 치환되고, 및/또는 T264는 D 또는 E로, 바람직하게는 D로 치환되며, 및/또는 N267은 A, H, L, S 또는 V로 치환되고, 및/또는 잔기 N286은 G, L 또는 R로 치환되며, 및/또는 E329는 A로 치환되고, 및/또는 잔기 F331은 A 또는 G로 치환되며, 및/또는 Y340은 A, G, N, Q 또는 S로 치환되고 및/또는 잔기 K352는 A, D, E, G, H, I, L, M, N, Q, S, T 또는 Y로 치환되며, 및/또는 잔기 E353은 A, H, I, K, L, S, T 또는 R로 치환되는 인간 세포 또는 인간 세포의 집단.

청구항 24

상기 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기에서 CD45의 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포는 상기 제 1 아이소폼을 암호화하는 핵산에 하나 이상의 자연 다형성 대립유전자(natural polymorphism allele)를 가지는 본래의 유전체 DNA (native genomic DNA)를 포함하는 대상으로부터 선택된 인간 세포 또는 인간 세포의 집단.

청구항 25

상기 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기에서 CD45의 상기 제 1 아이소폼은 유전자 편집(gene editing)에 의해, CD45의 상기 제 1 아이소폼을 암호화하는 핵산 서열을 생체의(ex vivo) 변형함으로써, 바람직하게는 하나 이상의 제 1 항원-결합 부위를 포함하는 제제(agent)의 결합에 관련된 표면 단백질 부위를 암호화하는 표적 서열 내에 위치-특이적 돌연변이(들)(site-specific mutations(s))을 유도할 수 있는 유전자 편집 효소를 인간 세포에 도입하여 얻는, 인간 세포 또는 인간 세포의 집단.

청구항 26

상기 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기에서 상기 의학적 치료(medical treatment)는 CD45의 상기 제 2 아이소폼을 발현하는 환자 세포를 특이적으로 고갈시키기 위해, 조혈 질환(hematopoietic disease)의 치료에서, 및 바람직하게는 바람직하게는 급성골수성백혈병(acute myeloid leukemia, AML), 골수이형성증후군(myelodysplastic syndrome, MDS), T-세포 비-호지킨 림프종(T-cell non-Hodgkin lymphomas, T-NHLs), 만성골수성백혈병 (CML), 털세포백혈병(hairy cell leukemias, HCL), T-세포 급성림프구성백혈병(T-cell acute lymphoblastic leukemia, T-ALL), 비-호지킨 림프종 (NHL) 또는 소포성 림프종(follicular lymphomas, FL)과 같은 악성 조혈 질환의 치료에서, 면역요법 후 정상적인 조혈(haematopoiesis)을 회복시키기 위해, 치료적으로 유효한 양의 CD45의 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 인간 세포 또는 인간 세포의 집단을 CD45의 상기 제 2 아이소폼에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 제 1 항원-결합 부위를 포함하는 고갈제의 치료적으로 유효한 양과 조합하여 상기 그것이 필요한 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 바람직하게는 조혈 줄기세포(hematopoietic stem cells)인, 인간 세포 또는 인간 세포의 집단.

청구항 27

제 5항 내지 제 25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기에서 상기 고갈제는 항체, 항체-약물 접합체(antibody-drug conjugate) 또는 면역 세포, 바람직하게는 상기 제 2 아이소폼에 특이적으로 결합하고 상기 제 1 아이소폼에는 결합하지 않거나 실질적으로 더 약하게 결합하는 제 1 항원-결합 부위를 포함하는 키메라항원수용체(chimeric antigen receptor, CAR)를 보유한(bearing) T-세포인, 인간 세포 또는 인간 세포의 집단.

청구항 28

제 1항 내지 제 27항 중 어느 한 항에서 정의된 인간 세포, 바람직하게는 조혈 줄기세포 또는 T-세포와 같은 면역 세포 및 바람직하게는 제 5항 내지 제 27항 중 어느 한 항에서 정의된 고갈제 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시 내용은 요법(therapy)에 이용하기 위한, 조작된(engineered) 또는 자연 발생적(naturally occurring) 돌연변이(들)을 가진 기능적 표면 단백질(surface protein)인 식별 가능한(discernible) 표면 단백질을 가지는 세포의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 요법, 특히 입양 세포(adoptive cell) 요법에 이용하기 위한, 식별 가능한 CD45 표면 단백질 변이체이나 기능적인 표면 단백질을 가지는 세포의 용도에 관한 것이다.

[0002] 재정 지원에 관한 설명서

[0003] 본 출원으로 이어지는 프로젝트는 유럽 연합의 Horizon 2020연구 및 혁신 프로그램 (보조금 승인 번호 818806)에 따라 유럽연구이사회(European Research Council, ERC)로부터 재정을 지원받았다.

배경 기술

[0004] 세포 기반 면역요법(immunotherapy)은 소분자 요법(small molecule therapy) 및 항체를 포함하는 제3차 항암 치료제와 같은 바이오의약품(biologics)에 기반한 치료(treatments)에 이어 의학의 제 3의 기둥(the third pillar)으로서 떠오르고 있다. 세포 요법(Cellular therapy)은 조혈 악성 질환을 치료하기 위해 종양학(oncology)에서 사용될 수 있으나, 또한 유전적 질병, 고형 장기(organ) 종양 및 자가면역 질환의 치료와 같은 다른 용도도 개발 중이다. 그러나, 세포 요법은 원치 않는 심각한 부작용과 관련될 수 있다. 실제로, 키메라항원수용체(CAR) T 세포를 이용한 암 면역요법이 특정 항원을 발현하는 악성 세포를 표적화하고 근절하였지만, 이는 종종 정상 및 악성 세포를 식별하지 못하여 정상 조혈 시스템의 파괴를 유도하였다. 종래의 단일 클론(monoclonal) 항체와 같은 항체-기반 요법, T 세포 관여자(T cell engager) (예를 들어, BiTE's)와 같은 다중특이적(multispecific) 항체 및 CAR 세포 (예를 들어, CAR T-세포, CAR NK 세포 또는 CAR 대식세포)와 같은 세포 요법을 포함하는 표적 요법들(Targeted therapies)은 표적 분자를 발현하는 모든 세포를 제거한다. 그러나 대부분의 암세포 표면 항원은 정상 조혈 또는 다른 세포와 공유된다. 따라서, 건강한 세포의 손상을 피하면서 종양을 포함하는 병적인 세포를 죽이기 위해 표적을 식별하는 것이 표적 요법의 주요한 도전이다 (Perna et al., Cancer Cell (2017) 32:506-519). 특히, 골수이형성증후군 (MDS), 급성골수성백혈병 (AML) 또는 모구형질세포

양수지세포종양 (BPDCN)와 같은 골수성 악성종양(myeloid malignancies)을 포함하는 골수성 질환들에서 CD117, CD33, 또는 CD123와 같은 세포 표면 항원은 정상 골수 전구세포(myeloid progenitors)와 공유된다. 따라서, MDS, AML 또는 PBDCN에 대한 CD117, CD33 또는 CD123 항원을 표적화하는 면역요법은 환자에서 악성 세포 (malignant cells) 뿐 아니라 정상 조혈 세포의 고갈과 관련될 수 있다 (Gill S. I. Best practice & Research Clinical Hematology, 2019). 이로 인해, mAbs, T 세포 관여자 또는 CAR T 를 포함하는 표적화된 면역요법은 부분적으로 진정한 질병-특이적 표면 항원이 없기 때문에 대부분 달성하기 어렵다 (Gill S. I. Best practice & Research Clinical Hematology, 2019).

[0005] CD33-CAR T 세포 전달에 의해 고갈된 정상 조혈작용(hematopoiesis)을 재생하기 위해, CD33 CAR T 세포 저항성 조혈 세포를 전체 CD33 유전자를 녹아웃하는 그런 방식으로 조작하고 있다 (Kim et al. 2018. Cell. 173:1439-53). 그러나, CD33은 이의 면역수용체 타이로신-기반 억제 모티프(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM) 신호 전달 도메인(signaling domain)을 통해 골수 세포에 구성적(constitutive) 억제 효과를 가진다. 따라서, CD33의 손실이 얼마나 잘 용인될 수 있는지 불분명하다 (Wiß et al. Glia (2021) 69:1393-1412). 환자에게 이식된 CD33-녹아웃 (CD33 KO) 조작된 세포는 장기적인 기능적 결함을 나타낼 수 있다 (W02018/160768, Kim et al. 2018. Cell. 173:1439-53, Borot et al. 2019. PNAS. 116:11978-87, Humbert et al. 2019. Leukemia. 33:762-808). 실제로, 장기적으로 관찰된 두 원숭이에서 CD33 KO 세포의 빈도가 감소되는 것이 보고되었다. 이는, 예를 들어, CD33 KO 장기간 재생 HSC (long-term repopulating HSC, LT-HSC)의 생착 감소를 통한 또는 경쟁적 열위(competitive disadvantage)를 통한 CD33 KO 세포의 기능적 손상을 나타낼 수 있다 (Kim et al. 2018. Cell. 173:1439-53). 또한, 불필요한 기능을 가진 세포 표면 항원의 수는 매우 제한되어 있으며, 상기 과잉 세포 표면 항원의 손실은 항원 음성 재발(antigen negative relapse)을 유도할 수 있다. CD19-음성 재발은 CD19-표적화 CAR T 요법을 받은 환자의 약 30%에서 관찰된다 (Orlando et al. 2018 Nat Med 24: 1504-6). CD19 및 CD123의 이중 표적화는 항원-손실 재발(antigen-loss relapses)을 예방할 수 있다 (Ruellla et al. 2016 J Clin Invest 126:3814-26).

[0006] 본 발명자들은 이전 특허 출원에서 표면 단백질 변이체에서 단일 아미노산 차이가 항원성을 변경하도록 조혈세포에 조작되고 특이적 및 선택적 항체에 의해 구별될 수 있음을 나타냈다 (W02017/186718, W02018/083071). 표적 단백질이 제거된 접근법 (KO 세포)과 달리, 이들 세포에서 표면 단백질 변이체는 이들의 정상 발현 및 기능을 유지하고 중요한 비-중복(non-redundant) 기능을 가진 표면 단백질을 표적화할 수 있다.

[0007] 단백질 타이로신 포스파테이즈 수용체 타입 C (protein tyrosine phosphatase receptor type C, PTPRC)라고도 불리는 CD45는 PTPRC 유전자에 의해 암호화되는 효소이다 (Kaplan et al., PNAS 87:7000-7004 (1990)). CD45는 단백질 타이로신 포스파테이즈 (phosphatase, PTP) 패밀리(family)의 구성원으로, 세포 성장, 분화, 분열 주기 (mitotic cycle) 및 종양원성 변형(oncogenic transformation)을 포함하는 다양한 세포 과정을 조절하는 시그널링(signaling) 분자를 포함한다. CD45는 세포의 도메인(extracellular domain), 단일 막관통 세그먼트(transmembrane segment), 및 두 탠덤 세포질내 촉매 도메인(tandem intracytoplasmic catalytic domains) 함유하므로 수용체 타입 PTP 패밀리에 속한다. CD45는 분화된 조혈세포 (예를 들어, 적혈구 제외)의 다양한 아이소폼에 존재하는 타입 I 막관통 단백질이다 (Holmes, Immunology 7:145-55 (2006)). CD45는 T- 및 B-세포 항원 수용체 시그널링의 조절자(regulator)로 알려졌다. 이의 세포의 도메인을 통해 항원 수용체 복합체(complex)의 요소(component)와의 직접적인 상호작용을 통해, 또는 이의 세포질 도메인을 통해 항원 수용체 시그널링에 필요한 Lck와 같은 다양한 Src 패밀리 카이네이즈 (Src family kinases, SFK)를 활성화함으로써 기능한다. CD45는 또한 JAK 카이네이즈를 억제하므로, 사이토카인 수용체 시그널링의 음성 조절자로서 기능한다.

[0008] CD45는 조혈 기원인 HSCs (조혈 줄기세포), 백혈구(leukocytes), 및 파골세포(osteoclasts)를 포함하는 조혈세포의 표면에 존재한다 (Shivtiel et al., J Exp Med 205:2381 (2008)). 인간에서 CD45 내의 결실 돌연변이 (deletion mutant)는 심각한 면역결핍(immunodeficiency)과 관련된다. 이는 주로 일반적으로 풍부하고 항원 반응(antigen response) 동안 SFK 활성을 조절하는데 필요한 T 세포에 CD45가 없기 때문이다. CD-45 결핍 (CD45^{-/-}) 마우스 골수는 정상 수의 조혈세포를 함유하나, 대부분의 원시(primitive) HSCs의 수가 감소하고, G-CSF에 반응하는 이들의 동원(mobilization)이 손상된다. 부분 적으로는, 이 결함이 HSC에 내재되어 있다; SFK 활성의 CD-45-매개 하향 조절 없이, 인테그린-매개 부착이 높으며 HSCs가 더욱 줄기세포 니치(stem cell niche)에 좀 더 남아있을 가능성이 많다. CD45^{-/-} HSCs는 또한 케모카인(chemokine) CXCL12/SDF-1에 대한 G-CSF-자극된 이동 및 호밍(homing)이 결핍되어, 이식 후 세포 생착에 음성적으로 영향을 미친다. 이들 결핍은 SFK 억제제 보충에 의해 회복될 수 있으며, 이는 이 역할이 주로 CD45에 의해 수행되는 것을 나타낸다. 마찬가지로, CD45^{-/-} 수여자

는 또한 정상 HSCs의 생착 및 후속 기동이 결핍되어, CD45의 줄기세포 니치 및 HSC에서의 역할을 나타낸다 (Shivtiel et al, J Exp Med 205:2381 (2008)). CD45가 예를 들어, HSCs 및 백혈구 상에서 발현되므로, 컨디셔닝 요법(conditioning therapies), 면역 재설정(immune reset), 및 질병의 치료를 위한 표적을 제시한다.

[0009] 본 개시 내용은 세포 표면 상에 노출되고 a) CD45의 기능이 변경되지 않거나 적어도 실질적으로 변경되지 않는, 즉, CD45의 변이체가 기능적으로 CD45의 야생형 버전과 구분되지 않는, 및 b) 항체 또는 CAR T 세포와 같은 모이어티가 CD45의 야생형 버전에 결합하나, CD45의 변경된 버전과는 실질적으로 감소된 또는 결합이 나타나지 않는, 즉, CD45의 변이체가 CD45의 야생형 버전과 면역학적으로 구별 가능한 방식으로 치환될 수 있는 CD45의 아미노산 잔기를 식별하는 것을 목표로 하였다. 아미노산 치환이 결합 모이어티의 에피토프의 일부, 또는 이에 가까운 경우, 임의의 표적 단백질에서 대부분의 단일 아미노산 치환은 모이어티의 결합에만 영향을 미칠 것이다. 또한 이해될 바와 같이, 결합 모이어티의 표적 항원에 대한 결합에 영향을 주지 않는 단일 아미노산 치환은 표적 항원의 기능성에도 영향을 줄 것이다. 따라서, 모이어티의 표적 항원에 대한 결합에 영향을 주면서 동시에 이의 기능에는 영향을 주지 않거나, 실질적으로 주지 않는 두 요구 조건을 만족하는 아미노산 치환을 식별하는 것은 매우 정교하고 예측 불가능한 일이다.

[0010] CD45는 모든 유핵 조혈세포에서 발현되므로, 광범위 스펙트럼(broad spectrum)의 치료 용도를 가진다. 자가반응성 림프구 (B 및 T 세포)가 활발하게 고갈되기 때문에, 이는 HSC 고갈 및 자가면역 질환을 포함한다. 항-CD45 요법은 또한 대부분의 표적화 요법의 항원-음성 재발(antigen-negative relapses)을 치료하는데 유용하다.

[0011] 여러 항-CD45 모이어티가 통상의 기술분야에 공지되어 있다. QA17A19 (Biolegend, #393411) 및 HI30 (Biolegend, #304001)은 시판되는(commmercially available) 마우스 항-인간 CD45 항체이다. Magenta Therapeutics의 다양한 항-CD45 항체가 개발중이며, 대부분 항체 약물 접합체(antibody drug conjugates)로 개발중이다 (예를 들어, WO2017219025, WO2020092654). BC8는 IchorBio의 시판되는 마우스 하이브리도마 항체이다 (#ICH1155). BC8 항체는 Actinium Pharmaceuticals에 의해 개발된 항-CD45 항체-동위원소 접합체의 기반이다 (WO2017155937, WO2019084258, WO2020159656). 다른 항-CD45 항체는 WO2016016442, WO2019115791 및 WO2020058495 (INSERM), WO2017009473 (UCB), WO2019129178 (Shanghai Baize Medical Laboratory), WO2020018580 (Fred Hutchinson) 및 WO2020170254 (Ramot At Tel Aviv University)에 개시된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 발명의 요약

[0013] 본 개시 내용의 목적 중 하나는 악성 종양(malignancy), 특히, 암, 혈액학상의 악성 종양(hematological malignancies), 및 골수성 질환의 치료를 위한 더 안전한 방법을 개발하는 것이다. 따라서, 본 발명자들은 정상 기능을 유지하거나 실질적으로 유지하면서 면역학적으로 식별되고, 아미노산 변경(change)은 단일 또는 다중 아미노산 또는 뉴클레오타이드(nucleotide) 변이로부터 비롯된 다양한 표면 단백질 CD45의 변이(variations)를 찾았다. 특히, 발명자들은 CD45의 합리적으로 설계된 및 자연 발생적인 CD45의 변이를 확인하였고, 이들 돌연변이가 이의 정상 발현 및 기능을 유지하면서 특정 항체에 대한 CD45의 항원성을 변경하고, 이의 세포내 도메인이 표적 단백질, 예를 들어, 타이로신 카이네이즈(tyrosine kinase) Lck의 탈인산화(dephosphorylation)를 매개하며 이의 세포외 부위가 면역시냅스(immunological synapse)에 간섭함으로써, 예를 들어, T- 및 B-세포 기능을 조절하는 것을 나타냈다. CD45는 또한 조혈 세포의 생체내 발달에 관련되며, 이는 예를 들어 인간화 마우스에서 시험될 수 있다. 마찬가지로, CD45의 구조는 특히 세포외 스페이서(extracellular spacer)로서 중요하다.

[0014] 본 개시 내용은 그것이 필요한 환자의 의학적 치료에 사용하기 위한 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 포유동물 세포 또는 세포의 집단에 관한 것으로, 상기 환자는 CD45의 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가지고 있으며, 상기에서 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 세포는 하나 이상의 다형성 또는 유전적으로 조작된 대립유전자를 가지는 유전체 DNA를 포함하고, 상기에서 상기 다형성 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 CD45의 상기 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가지는 환자의 유전체에 존재하지 않으며, 및 바람직하게는 상기에서 상기 제 1 및 제 2 아이소폼은 기능적이다. 대안적으로, 제 1 아이소폼은 RNA 편집을 통해 생성된다.

[0015] 특정 구현예에서, 본 개시 내용은 포유동물 세포 또는 세포의 집단, 바람직하게는 그것이 필요한 환자의 의학적 치료에 사용하기 위한 조혈 줄기세포(조혈 줄기세포)에 관한 것이며, 상기에서 상기 의학적 치료는 CD45의 상기 제 2 아이소폼을 발현하는 환자 세포를 특이적으로 고갈시키기 위해, 바람직하게는 조혈 질환, 바람직하게는 급

성골수성백혈병 (AML), 골수이형성증후군 (MDS), T-세포 비-호지킨 림프종(T-cell non-Hodgkin lymphomas, T-NHLs), 만성골수성백혈병 (CML), 털세포백혈병(hairy cell leukemias, HCL), T-세포 급성림프구성백혈병(T-cell acute lymphoblastic leukemia, T-ALL), 비-호지킨 림프종 (NHL) 또는 소포성 림프종(follicular lymphomas, FL)과 같은 악성 조혈 질환의 치료에서 면역요법 후에 정상 조혈작용을 회복하기 위해, 치료적으로 유효한 양의 CD45의 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포 또는 세포의 집단을 CD45의 상기 제 2 아이소폼에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 제 1 항원-결합 부위를 포함하는 치료적으로 유효한 양의 고갈제(depleting agent)와 조합하여 상기 그것이 필요한 환자에게 투여하는 것을 포함한다.

[0016] 다른 구현예에서 의학적 치료는 중증복합면역결핍증후군(severe combined immunodeficiency syndrome, SCID), 용혈빈혈(sickle cell disease, SCD), 베타-지중해 빈혈(beta-thalassemia), 판코니빈혈증(Fanconi anemia) 또는 블랙판-다이아몬드 빈혈(Diamond-Blackfan anemia)과 같은 조혈(hematopoietic) 또는 면역 시스템의 유전병(genetic disease)에서 조혈 또는 면역 기능의 회복에 관한 것이다.

[0017] 다른 구현예에서 의학적 치료는 조혈 및 면역 시스템에서 기원하지 않지만 변형된 조혈 세포(hematopoietic cells)의 사용에 의해 치료될 수 있는 유전병에서 정상 기능의 회복에 관한 것이다.

[0018] 다른 구현예에서 의학적 치료는 전신홍반루푸스(systemic lupus erythematosus, SLE), 전신경화증(systemic sclerosis, SSc) 또는 다발성 경화증(multiple sclerosis, MS)과 같은 자가면역 질환(autoimmune diseases)에서 정상 기능의 회복에 관한 것이다.

[0019] 또 다른 특정 구현예에서, 본 개시 내용은 그것이 필요한 환자의 의학적 치료에 사용하기 위한 포유동물 세포 또는 세포의 집단에 관한 것이며, 상기에서 상기 의학적 치료는 제 1 아이소폼을 발현하는 전달된 세포를 특이적으로 고갈시키기 위해 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 치료적으로 유효한 양의 상기 세포 또는 세포의 집단을 그것이 필요한 환자에게 상기 제 1 아이소폼에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 제 2 항원-결합 부위를 포함하는 치료적으로 유효한 양의 고갈제와 조합하여 투여하는 것을 포함하며, 바람직하게는 입양 세포 전달 요법에 사용하기 위해, 더욱 바람직하게는 급성골수성백혈병 (AML), 골수이형성증후군 (MDS), T-세포 비-호지킨 림프종 (T-cell non-Hodgkin lymphomas, T-NHLs), 만성골수성백혈병 (CML), 털세포백혈병(hairy cell leukemias, HCL), T-세포 급성림프구성백혈병(T-cell acute lymphoblastic leukemia, T-ALL), 비-호지킨 림프종 (NHL) 또는 소포성 림프종(follicular lymphomas, FL)과 같은 악성 조혈 질환의 치료를 위해, 다시 더욱 바람직하게는 이식에 기인한 이식편대숙주병과 같은 궁극적으로 심각한 부작용을 피하기 위해 상기에서 상기 고갈제가 상기 세포 또는 세포의 집단을 순차적으로 투여한다.

[0020] 또 다른 측면에서, 본 개시 내용은 포유동물 세포, 바람직하게는 상기한 바와 같은 조혈 줄기세포 또는 T-세포와 같은 면역세포 및 바람직하게는 고갈제 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0021] 본 개시 내용은 또한 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 세포를 받은 환자에서 심각한 부작용의 위험을 예방 또는 감소시키는데 사용하기 위한 고갈제에 관한 것이며, 상기에서 상기 환자의 본래의 세포는 CD45의 제 2 아이소폼을 발현하고, 상기에서 상기 고갈제는 CD45의 상기 제 1 아이소폼에 특이적으로 결합하나 CD45의 상기 제 2 아이소폼에 결합하지는 않는 하나 이상의 제 2 항원-결합 부위를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 고갈제는 CD45의 상기 제 2 아이소폼에 실질적으로 더 약하게 결합한다.

[0022] 본 개시 내용은 또한 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 세포를 받은 환자에서 심각한 부작용의 위험을 예방 또는 감소시키는데 사용하기 위한 고갈제에 관한 것으로, 상기에서 상기 환자의 본래의 세포는 CD45의 제 2 아이소폼을 발현하고, 상기에서 상기 고갈제는 CD45의 상기 제 1 아이소폼에 특이적으로 결합하나 CD45의 상기 제 2 아이소폼에 결합하지는 않는 하나 이상의 제 2 항원-결합 부위를 포함하며, 및 상기에서 상기 제 1 및 제 2 아이소폼은 실질적으로 기능적으로 동일하다. 특정 구현예에서, 상기 고갈제는 CD45의 상기 제 2 아이소폼에 실질적으로 더 약하게 결합한다.

[0023] 본 개시 내용은 또한 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 세포를 받은 환자에서 심각한 부작용의 위험을 예방 또는 감소시키는데 사용하기 위한 고갈제에 관한 것이며, 상기에서 상기 환자의 본래의 세포는 CD45의 제 2 아이소폼을 발현하고, 상기에서 상기 고갈제는 상기 CD5의 제 1 아이소폼에 특이적으로 결합하나 CD45의 상기 제 2 아이소폼에 결합하지는 않는 하나 이상의 제 2 항원-결합 부위를 포함하며, 및 상기에서 상기 제 1 및 제 2 아이소폼은 표적 단백질의 탈인산화(dephosphorylation)를 초래한다.

[0024] 본 개시 내용은 또한 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 세포를 받은 환자에서 심각한 부작용의 위험을 예방 또는

는 감소시키는데 사용하기 위한 고갈제에 관한 것으로, 상기에서 상기 환자의 본래의 세포는 CD45의 제 2 아이소폼을 발현하고, 상기에서 상기 고갈제는 CD45의 상기 제 1 아이소폼에 특이적으로 결합하나 CD45의 상기 제 2 아이소폼에 결합하지는 않는 하나 이상의 제 2 항원-결합 부위를 포함하며, 상기에서 상기 제 1 및 제 2 아이소폼은 타이로신 카이네이즈 LcK의 탈인산화를 초래한다.

[0025] 본 개시 내용은 또한 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 세포를 받은 환자에서 심각한 부작용의 위험을 예방 또는 감소시키는데 사용하기 위한 고갈제에 관한 것으로, 상기에서 상기 환자의 본래의 세포는 CD45의 제 2 아이소폼을 발현하고, 상기에서 상기 고갈제는 CD45의 상기 제 1 아이소폼에 특이적으로 결합하나 CD45의 상기 제 2 아이소폼에 결합하지는 않는 하나 이상의 제 2 항원-결합 부위를 포함하며, 상기에서 상기 제 1 및 제 2 아이소폼은 본질적으로 T 세포 기능 및/또는 B 세포 기능의 동일한 조절을 초래한다.

[0026] 본 개시 내용은 또한 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 세포를 받은 환자에서 심각한 부작용의 위험을 예방 또는 감소시키는데 사용하기 위한 고갈제에 관한 것으로, 상기에서 상기 환자의 본래 세포는 CD45의 제 2 아이소폼을 발현하고, 및 상기에서 상기 고갈제는 CD45의 상기 제 1 아이소폼에 특이적으로 결합하고 CD45의 상기 제 2 아이소폼에 결합하지 않는 하나 이상의 제 2 항원-결합 부위를 포함하며, 및 상기에서 제 1 및 제 2 아이소폼이 조혈 세포의 정상적인 분화를 초래한다.

[0027] 본 개시 내용은 또한 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 세포를 받은 환자에서 심각한 부작용의 위험을 예방 또는 감소시키는데 사용하기 위한 고갈제에 관한 것으로, 상기에서 상기 환자의 본래 세포는 CD45의 제 2 아이소폼을 발현하고, 및 상기에서 상기 고갈제는 CD45의 상기 제 1 아이소폼에 특이적으로 결합하고 CD45의 상기 제 2 아이소폼에 결합하지 않는 항원-결합 부위를 포함하며, 상기에서 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립 유전자는 서열번호 1의 E230, Y232, N255, N257, E259, T264, N267, E269, N286, S287, D292, I328, T330, F331, D334, Y340, K352, E353, E360, E364, Y372 또는 Y373 위치에서 아미노산의 하나 이상의 치환을, 바람직하게는 서열번호 1의 E230, N257, E259, F331, K352 또는 E353 위치에서 아미노산의 하나 이상의 치환을 특징으로 한다. 특정 구현예에서 상기 고갈제는 CD45의 상기 제 2 아이소폼에 실질적으로 더 약하게 결합한다.

[0028] 본 개시 내용은 또한 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 세포를 받은 환자에서 심각한 부작용의 위험을 예방 또는 감소시키는데 사용하기 위한 고갈제에 관한 것으로, 상기에서 상기 환자의 본래 세포는 CD45의 제 2 아이소폼을 발현하고, 및 상기에서 상기 고갈제는 CD45의 상기 제 1 아이소폼에 특이적으로 결합하고 CD45의 상기 제 2 아이소폼에 결합하지 않는 하나 이상의 제 2 항원-결합 부위를 포함하며, 상기에서 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 I328, N255, E360, E259, E364 및 E269 위치에서 아미노산의 하나 이상의 치환을 특징으로 한다. 이들 치환 중, 치환 I328V, N255G, E360G, E259G, E364K 및 E269G이 특히 바람직하다. 특정 구현예에서, 상기 고갈제는 CD45의 상기 제 2 아이소폼에 실질적으로 더 약하게 결합한다.

[0029] 본 개시 내용은 또한 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 세포를 받은 환자에서 심각한 부작용의 위험을 예방 또는 감소시키는데 사용하기 위한 고갈제에 관한 것으로, 상기에서 상기 환자의 본래 세포는 CD45의 제 2 아이소폼을 발현하고, 및 상기에서 상기 고갈제는 CD45의 상기 제 1 아이소폼에 특이적으로 결합하고 CD45의 상기 제 2 아이소폼에 결합하지 않는 하나 이상의 제 2 항원-결합 부위를 포함하며, 상기에서 잔기 E230는 K로 치환되고, 및/또는 잔기 N257은 A, D, E, H, K, R, S, T 또는 V로 치환되며, 및/또는 잔기 E259는 G, N, T 또는 Q로 치환되고, 및/또는 T264는 D 또는 E로, 바람직하게는 D로 치환되며, 및/또는 N267은 A, H, L, S 또는 V로 치환되고, 및/또는 잔기 N286은 G, L 또는 R로 치환되며, 및/또는 E329는 A로 치환되고, 및/또는 잔기 F331은 A 또는 G로 치환되며, 및/또는 Y340은 A, G, N, Q 또는 S로 치환되고, 및/또는 잔기 K352는 A, D, E, G, H, I, L, M, N, Q, S, T 또는 Y로 치환되며 및/또는 잔기 E353은 A, H, I, K, L, S, T 또는 R, 바람직하게는 A, I, K, L, S, T 또는 R로 치환된다.

[0030] 본 개시 내용은 또한 조혈 줄기세포 이식(hematopoietic stem cell transplants)의 생착(engraftment)을 개선하는 방법에 관한 것이다. 조혈 줄기세포 이식(조혈 줄기세포 transplantation, HSCT)에 앞선 컨디셔닝(Conditioning) (HSCs의 고갈)은 생착을 촉진하는데 사용된다. 실제로 컨디셔닝 효율(efficacy)은 생착 개선과 관련된다. 독성 컨디셔닝 회피는 본 개시 내용으로 달성할 수 있는 중요한 목표이다. 컨디셔닝을 위한 현재의 방법은 정맥 내 부설판(busulfan) 사용을 포함한다. 부설판은 원래 급성골수성백혈병 (AML)과 같은 혈액 질환(hematologic diseases)을 치료하기 위해 설계된 DNA 알킬화제(alkylating drug)이다. 그러나, 부설판은 불임(sterility), 일차 또는 이차 악성 종양(malignancy), 및 추가DML 급성 및 만성 독성(toxicity)을 포함하는 현저한 부작용의 위험을 수반한다.

[0031] 본 개시 내용은 또한 그것이 필요한 환자의 의학적 치료에 사용하기 위한 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 인

간 세포 또는 인간 세포의 집단에 관한 것으로, 상기 환자는 CD45의 제 2 아이소폼을 가지며,

- [0032] 상기에서 상기 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 인간 세포는 하나 이상의 다형성 또는 유전적으로 조작된 대립유전자를 가진 유전체 DNA를 포함하고,
- [0033] 상기에서 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 CD45의 상기 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가지는 환자의 유전체에 존재하지 않으며, 및
- [0034] 상기에서 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 E230, Y232, N255, N257, E259, T264, N267, E269, N286, S287, D292, I328, T330, F331, D334, Y340, K352, E353, E360, E364, Y372 또는 Y373 위치에서 아미노산의 하나 이상의 치환을 특징으로 한다. 바람직하게는 상기 제 1 및 상기 제 2 아이소폼은 실질적으로 기능적으로 동일하다.
- [0035] 특정 구현예에서, 상기 제 1 및 제 2 아이소폼은 CD45의 표적 단백질을 탈인산화하고, TCR 시그널링 캐스캐이드를 활성화하며, 사이토카인 생산의 증가를 유도하고 및/또는 T 세포의 증식의 증가를 유도한다.
- [0036] 특정 구현예에서, CD45의 상기 제 1 및 제 2 아이소폼은 타이로신 카이네이즈 Lck를 탈인산화한다.
- [0037] 특정 구현예에서, 상기 의학적 치료는 CD45의 상기 제 2 아이소폼을 발현하는 환자 세포를 특이적으로 고갈시키기 위해, CD45의 상기 제 2 아이소폼에 특이적으로 결합하는 항원-결합 부위를 포함하는 치료적으로 유효한 양의 고갈제(depleting agent)와 조합하여, 치료적으로 유효한 양의 CD45의 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포 또는 세포의 집단을 상기 그것이 필요한 환자에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0038] 특정 구현예에서, 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 F331, K352 또는 E353위치에서 아미노산의 하나 이상의 치환을 특징으로 한다. 특정 구현예에서, 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 K352 위치에서 아미노산 치환을 특징으로 한다. 특정 구현예에서, K352 위치에서 상기 치환은 K352E, K352H, K352I, K352L, K352M, K352N, K352Q, K352S 및 K352T, 바람직하게는 K352D, K352E 및 K352H로부터 선택되며, 더욱 바람직하게는 상기 치환은 K352E이다.
- [0039] 특정 구현예에서, 서열번호 1의 N286, F331, K352 또는 E353 위치에서의 아미노산의 치환과 함께 사용되는 고갈제는 하기로부터 선택된다:
- [0040] a) 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 4, VHCDR2는 서열번호 5 및 VHCDR3는 서열번호 6인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 7, VLCDR2는 서열번호 8 및 VLCDR3는 서열번호 9인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL),
- [0041] 더욱 바람직하게는 상기에서 상기 제 1 항원 결합 부위는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인을 포함하고; 및
- [0042] b) 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 4, VHCDR2는 서열번호 5 및 VHCDR3는 서열번호 6인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 60, VLCDR2는 서열번호 61 및 VLCDR3는 서열번호 9인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL),
- [0043] 더욱 바람직하게는 상기에서 상기 제 1 항원 결합 부위는 서열번호 58의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열번호 59의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0044] 특정 구현예에서, 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 E230, Y232, N257 또는 E259 위치에서 아미노산의 하나 이상의 치환을 특징으로 한다.
- [0045] 특정 구현예에서, 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 N257 위치에서 아미노산 치환을 특징으로 한다. 특정 구현예에서, N257 위치에서 상기 치환은 N257E, N257K, N257R 및 N257T로부터 선택되며, 바람직하게는 N257R이다. 특정 구현예에서, 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 2의 E259 위치에서 아미노산 치환을 특징으로 한다. 특정 구현예에서, E259 위치에서 상기 치환은 E259N, E259Q, E259V 및 E259G로부터 선택되며, 바람직하게는 E259V이다. 특정 구현예에서, 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 Y232 위치에서 아미노산 치환을 특징으로 하며, 바람직하게는 Y232C이

다.

- [0046] 특정 구현예에서, 서열번호 1의 위치 E230, Y232, N257 또는 E259에서 아미노산 치환과 함께 사용된 고갈제는 하기를 포함하는 항원-결합 부위이다:
- [0047] 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 20, VHCDR2는 서열번호 21 및 VHCDR3는 서열번호 22인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 23, VLCDR2는 서열번호 24 및 VLCDR3는 서열번호 25인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL),
- [0048] 더욱 바람직하게는 상기에서 상기 제 1 항원 결합 부위는 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0049] 특정 구현예에서, 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 N257위치에서 아미노산 치환을 특징으로 한다. 특정 구현예에서, 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 N257 위치에서 아미노산 치환을 특징으로 한다. 특정 구현예에서, N257 위치에서 상기 치환은 N257E, N257K, N257R 및 N257T로부터 선택되며, 바람직하게는 N257R이다.
- [0050] 특정 구현예에서, 서열번호 1의 N257위치에서의 아미노산의 치환과 함께 사용되는 고갈제는 하기를 포함하는 항원-결합 부위이다:
- [0051] a) 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 12, VHCDR2는 서열번호 13 및 VHCDR3는 서열번호 14인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및
- [0052] b) 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 15, VLCDR2는 서열번호 16, VLCDR3는 서열번호 17인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL)
- [0053] 바람직하게는 상기에서 상기 제 1 항원 결합 부위 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0054] 특정 구현예에서, 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 서열번호 1의 E230, N257, E259, F331, K352 또는 E353 위치에서 아미노산의 하나 이상의 치환을 특징으로 한다. 상기 치환은 CD45 변이체들로부터 선택될 수 있으며, 상기에서 상기 잔기 E230는 K로 치환되고, 및/또는 잔기 N257는 A, D, E, H, K, R, S, T 또는 V로 치환되며, 및/또는 잔기 E259는 G, H, K, N, R, T 또는 Q로 치환되고, 및/또는 T264는 D 또는 E, 바람직하게는 D로 치환되며, 및/또는 N267은 A, H, L, S 또는 V로 치환되고, 및/또는 잔기 N286은 G, L 또는 R로 치환되며, 및/또는 E329는 A로 치환되고, 및/또는 잔기 F331은 A 또는 G로 치환되며, 및 또는 Y340은 A, G, N, Q 또는 S로 치환되고 및/또는 잔기 K352는 A, D, E, G, H, I, L, M, N, Q, S, T 또는 Y로 치환되며 및/또는 잔기 E353은 A, H, I, K, L, S, T 또는 R로 치환된다.
- [0055] 본 개시 내용은 또한 본 발명에 개시된 바와 같이 인간 세포 또는 인간 세포의 집단에 관한 것으로, 상기에서 CD45의 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포는 상기 제 1 아이소폼을 암호화하는 핵산에 하나 이상의 자연 다형성 대립유전자를 가지는 본래의 유전체 DNA를 포함하는 대상으로부터 선택된다.
- [0056] 본 개시 내용은 또한 본 발명에 개시된 바와 같이 인간 세포 또는 인간 세포의 집단에 관한 것으로, 상기에서 CD45의 상기 제 1 아이소폼은 CD45의 상기 제 1 아이소폼을 암호화하는 핵산 서열을 유전자 편집으로 생체의 변형함으로써, 바람직하게는 인간 세포에 하나 이상의 제 1 항원-결합 부위를 포함하는 제제(agent)의 결합에 관련된 표면 단백질 부위를 암호화하는 표적 서열 내에 위치-특이적 돌연변이(들)(site-specific mutations(s))을 유도할 수 있는 유전자 편집 효소를 세포에 도입함으로써 얻는다.
- [0057] 본 개시 내용은 또한 본 발명에 개시된 바와 같이 인간 세포 또는 인간 세포의 집단에 관한 것으로, 상기에서 상기 의학적 치료는 CD45의 상기 제 2 아이소폼을 발현하는 환자 세포를 특이적으로 고갈시키기 위해, 바람직하게는 조혈 질환, 및 바람직하게는 급성골수성백혈병 (AML), 골수이형성증후군 (MDS), T-세포 비-호지킨 림프종 (T-cell non-Hodgkin lymphomas, T-NHLs), 만성골수성백혈병 (CML), 털세포백혈병(hairy cell leukemias, HCL), T-세포 급성림프구성백혈병(T-cell acute lymphoblastic leukemia, T-ALL), 비-호지킨 림프종 (NHL) 또는 소포성 림프종(follicular lymphomas, FL)과 같은 악성 조혈 질환의 치료에서 면역요법 후에 정상 조혈작용을 회복하기 위해, 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 치료적으로 유효한 양의 CD45의 상기 제 1 아이소폼을 발현

하는 상기 인간 세포 또는 인간 세포의 집단을 그것이 필요한 환자에게, CD45의 상기 제 2 아이소폼에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 제 1 항원-결합 부위를 포함하는 치료적으로 유효한 양의 고갈제와 조합하여 투여하는 것을 포함한다.

[0058] 본 개시 내용은 또한 본 발명에 개시된 바와 같이 인간 세포 또는 인간 세포의 집단에 관한 것으로, 상기에서 상기 고갈제는 항체, 항체-약물 접합체 또는 면역세포, 바람직하게는 상기 제 2 아이소폼에 특이적으로 결합하고 상기 제 1 아이소폼에 결합하지 않거나 실질적으로 더 약하게 결합하는 제 1 항원-결합 부위를 포함하는 키메라항원수용체(chimeric antigen receptor, CAR)를 보유한(bearing) T-세포이다.

[0059] 본 개시 내용은 또한 본 발명에 개시된 바와 같이 인간 세포, 바람직하게는 조혈 줄기세포 또는 T-세포와 같은 면역 세포, 및 바람직하게는 본 발명에 개시된 바와 같이 고갈제, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0060] 도 1은 인간 야생형 CD45 또는 빈 벡터를 형질전환시킨 DF-1 세포에 대한 항-CD45 항체의 결합을 나타낸다. 유세포 분석을 통해 각 항체의 연속 희석액을 면역반응성(immunoreactivity)에 대해 시험하였다. Mab 포맷(format)의 5개 항체는 모두 농도 의존적으로 인간 CD45 양성 세포에 결합한다. 빈 벡터로 형질전환시킨 세포는 항-CD45 항체의 어떠한 결합도 나타내지 않았다.

도 2는 인간 야생형 CD45 또는 빈 벡터를 형질전환시킨 DF-1 세포에 대한 항-CD45 Fab 단편의 결합을 나타낸다. 전장의 항체와 같이, Fab 단편 또한 인간 CD45에 농도 의존적으로 결합한다. 빈 벡터로 형질전환시킨 세포는 항-CD45 항체의 어떠한 결합도 나타내지 않았다.

도 3은 시험된 4개의 항체에 대한 인간 CD45 에 대한 알라닌(alanine) 스캔 결과를 나타낸다. 각 돌연변이 CD45 클론에 대해, 유세포 분석으로 결정된 평균 결합값이 발현의 함수(function of expression)로 표시(plot)되었다. 항체 결합에 중요한 것으로 확인된 CD45 Ala 변이체를 보유한 클론들은 원으로 표시한다. 이차 클론들, 즉, 초기에 설정된 임계값을 충족시키지 않았으나 이의 결합 활성이 감소하고 중요한 잔기에 가까워 돌연변이된 잔기가 항체 에피토프의 일부일 수 있음을 시사하는 클론들은 네모 표시한다.

도 4는 식별된 중요한 위치의 위치를 인간 CD45의 3D 구조 상에 개략적으로 나타낸다.

도 5는 Refmab #1에 대해 식별된, 즉, Refmab #1이 야생형 CD45에 비해 20% 미만(less than)의 결합을 나타내는 변이체에 대한 시험된 항체의 결합을 나타낸다.

도 6은 Refmab #2에 대해 식별된, 즉, Refmab #2가 야생형 CD45에 비해 20% 미만의 결합을 나타내는 변이체에 대한 시험된 항체의 결합을 나타낸다.

도 7은 Refmab #4에 대해 식별된, 즉, Refmab #4가 야생형 CD45에 비해 20% 미만의 결합을 나타내는 변이체에 대한 시험된 항체의 결합을 나타낸다.

도 8은 본 개시 내용의 선택된 변이체의 인-실리코 돌연변이 유발을 나타낸다. 바는 각 변이체 (x-축)에 대해 예측된 Provean 점수 (y-축)를 나타내며, 이는 단백질 서열 변이가 단백질 기능에 영향을 미칠 수 있는지 예측한다. 수평 점선은 기정 임계값(threshold) (-2.5)을 나타낸다. 예측된 점수가 임계값보다 약간 낮은 (-2.570) E259G를 제외한 모든 변이체는 중립(neutral)인 것으로 예측된다.

도 9는 다양한 염기 편집기 및 sgRNAs 농도를 이용한 CD45의 편집 효과를 나타낸다.

도 10은 염기 편집기를 이용하여 CD45 E259G를 발현하도록 조작된 인간 T 세포를 나타낸다. 그 뒤, 세포를 증가하는 농도의 항체-약물-접합체와 인큐베이션하여 편집되지 않은 세포의 선택적 고갈과 편집된 세포의 지속성이 유세포 분석으로 측정되었다 (A). 결과는 생어 시퀀싱(Sanger sequencing)으로 확인되었다 (B).

도 11은 변이체 F331del이 Refmab #1의 결합 손실을 야기하고, 세포는 여전히 Refmab #3과 반응성임을 나타낸다.

도 12는 야생형 CD45를 발현하는 세포가 Refmab #1-항체 약물 접합체에 의해 사멸되는 것을 나타낸다. 반면, CD45 녹아웃 세포뿐만 아니라 CD45 E259G 변이체를 발현하는 세포도 Refmab #1-항체 약물 접합체에 의한 사멸로부터 보호되었다.

도 13은 야생형 CD45를 녹아웃하고 세포를 변이체 CD45 아이소폼으로 형질전환한 실험 결과를 나타낸다. 단백질

의 CD45RO (야생형(wildtype)) 형태가 두 항체에 결합하지 않은 반면, CD45 변이체에 대한 Refmab #1에서 결합의 손실이 관찰되었다. 모든 변이체는 Refmab #3에 대한 결합이 유지되어, 전기천공된 세포에 의해 단백질이 발현된 것을 입증하였다. CD45 녹-아웃이 왼쪽 상단에 표시된다. 야생형 CD45는 중간 상단에 표시된다. 오른쪽 상단: Mut8 (22 aa 결실). 하단 (왼쪽부터 오른쪽) Mut9 (F331 결실), Mut12 (F331S) 및 Mut 13 (F331I).

도 14는 유전자-편집된 CD34+ 세포에서 CD45 발현을 나타낸다. 닷 플롯(Dot plots)은 유전자 편집 시약없이 (EP + RNP) 전기천공된 세포, RNP 복합체 단독 (EP + RNP) 또는 F331del HDR 주형 (EP + RNP + HDRT) 존재하에 전기천공된 세포의 염색 후에 얻은 데이터를 나타낸다.

도 15는 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)의 대표적인 크로마토그램 (패널 A) 및 재조합 정제된 인간 CD45 D1-D2 야생형 단백질의 SDS-PAGE (패널 B)를 나타낸다.

도 16은 AlphaLISA 분석을 이용하여 검출한 Tyr505의 위치에서의 Lck의 인산화를 나타낸다. 10.000-50.000 Jurkat 야생형 또는 Jurkat CD45 녹-아웃 세포들을 20분 동안 가 항-CD3 항체로 코팅된 플레이트에서 인큐베이션한 후 세포를 파쇄하고 인산화된 Lck를 검출하였다. 항-CD3 항체를 이용한 Jurkat 세포의 활성화는 CD45 활성화를 야기하고, 결국 Lck를 탈인산화한다. Jurkat CD45 녹-아웃 세포는 활성화시 Lck를 탈인산화할 수 없다. 도는 억셉터(acceptor) 신호 (수)를 나타내며 두 번의 기술적으로 반복된 실험이 포함된 한 생물학적 실험을 표시한다.

도 17은 DSF 및 Sypro Orange를 이용한 재조합 정제된 야생형 및 변이체 인간 CD45 D1-D2 단백질의 열적 언폴딩 곡선(thermal unfolding curve)을 나타낸다. 데이터는 상대적 형광 유닛 (relative fluorescence units, RFU, 상단) 및 온도에 대한 RFU의 1차 도함수(first derivative) ($d(RFU)/dT$, 하단)로써 표시된다

도 18은 DSF로 측정된 재조합 정제된 야생형 및 변이체 인간 CD45 D1-D2 단백질의 구조적(conformational)/열적 안정성 데이터를 나타낸다. A) 선정된 hCD45 D1-2 탈당된(deglycosylated) 야생형 및 변이체, 및 hCD45 D1-2 당화된 야생형에 대한 단백질이 변성되기 시작하는 온도인 개시 온도(onset temperature)를 도시한다. 점선은 hCD45 D1-2 탈당된 야생형에 대한 개시 온도를 나타낸다. B) hCD45 D1-2 탈당된 야생형 및 변이체 및 hCD45 D1-2 당화된 야생형의 용해 온도가 표시된다. 점선은 hCD45 D1-2 탈당된 야생형의 용해 온도를 나타낸다.

도 19는 유세포 분석으로 측정된 Refmab #1 및 Refmab #4의 wt 또는 변이체 CD45를 발현하는 DF-1세포에 대한 결합을 나타낸다. 데이터는 잔기 K352의 돌연변이가 Refmab #1의 결합 손실을 야기하고, 잔기 N257의 돌연변이가 Refmab #4의 결합 손실을 야기하는 것을 나타낸다.

도 20은 hCD45 D1-2 재조합, 정제 및 탈당된 야생형 및 변이체 CD45 D1-D2 단백질의 Refmab들에 대한 결합을 나타낸다. A) Refmab #1에 대한 %결합(%binding)이 도시된다. B) Refmab #2에 대한 %결합이 도시된다. C) Refmab #4에 대한 %결합이 도시된다. %결합은 hCD45 D1-2 변이체의 nm 이동(nm shift)을 hCD45 D1-2 wt의 nm 이동으로 나눠 계산된다. wt CD45 결합에 대한 항체 결합이 100%로 설정되었다. 이 계산을 위해, 결합(association)의 종료시 500 nM 피분석물(analyte) (hCD45 D1-2 변이체 및 wt)의 nm 이동이 사용되었다. 별표 표시된 것은 500 nM의 피분석물 (hCD45 D1-2 변이체 및 wt) 대신 50 nM의 nm 이동이 사용된 것에 대한 계산이다. ND는 측정되지 않음을 나타내고 NA는 분석되지 않음을 나타낸다.

도 21 및 22는 유세포 분석으로 측정된 Refmab #1 및 Refmab #4의 wt 또는 변이체 CD45를 발현하는 DF-1 세포에 대한 결합을 나타낸다. 데이터는 잔기 K352 및 E353의 돌연변이가 Refmab #1의 결합 손실을 야기하는 것을 나타낸다. 잔기 N257의 돌연변이는 Refmab #4의 결합 손실을 야기하고, 잔기 E259의 돌연변이는 Refmab #4의 강력한 결합 감소를 야기한다.

도 23은 염기 편집을 이용하여 CD45 K352E를 발현하도록 조작된 인간 CD34+ HSPCs를 나타낸다. A)는 ABE8e-NG를 이용한 염기 편집 및 B)는 ABE8e-SpRY 및 다양한 gRNAs를 이용한 염기 편집을 나타낸다. ABE8e 염기 편집기를 보다 바람직한 편집 창에 재위치 설정(Repositioning)하면 유세포 분석으로 측정한 편집 효율이 >30% 보호된(shielded) HSPCs로 증가하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

발명의 상세한 설명

면역요법은 암, 유전적 및 자가면역 질환의 치료에 유망한 방법이다. 종양 세포를 표적화하고 사멸시키기 위해 종양 항원에 대한(directed to) 항체 또는 조작된 면역 세포와 같은 면역 고갈제(Immunodepleting agent)가 환

자에게 투여된다. 그러나, 종양 표면 단백질은 조혈세포를 포함하는 정상 세포의 표면에서도 발현되기 때문에, 이 전략은 예를 들어, 조혈작용을 변화시킴으로써 환자에게 심각한 부작용을 유도할 수 있다. 환자에서 조혈작용을 회복시키기 위해, 조혈세포가 환자에게 순차적으로(subsequently) 이식될 수 있다. 그러나, 질병에 걸린 세포뿐만 아니라 새로 이식된 건강한 세포에 대한 고갈제의 결합은 최대 허용 용량(maximal tolerated dose)을 제한하거나 건강한 세포의 이식 전의 치료로만 사용을 제한할 수 있다. 대안적으로, 이식된 세포는 이에 의해 표적화되고 제거되지 않기 위해 상기 면역 고갈제에 대해 저항성일 필요가 있다. 따라서, 한 가지 접근 방법은 환자에서 정상 조혈작용을 회복하기 위해 그들의 기능은 유지하면서 면역요법에 사용된 상기 면역 고갈제에 저항성인 세포를 선택하는 것이다.

[0063] 본 발명자들은 특정 고갈제의 결합을 담당하는 표면 단백질 부위를 암호화하는 유전 서열에서 기능적 대립 유전자의 변이체를 식별하는 방법을 개발한다. 이러한 변이체는 자연 발생적(naturally occurring) 다형성 및/또는 설계된 및 조작된 변이체일 수 있다. 표면 단백질의 상이한 아이소폼들이 선택되거나 생성될 수 있다. 표면 단백질의 상기 다형성을 가지는 핵산(nucleic acid)에 의해 암호화된 상기 제 1 아이소폼은 특정 고갈제에 의해 인식되지 않는다. 이 변이체 대립유전자는 특히 표면 단백질의 기능을 변화시키지 않거나 실질적으로 변화시키지 않는다. 따라서, 상기 고갈제는 한(one) 아이소폼에 특이적으로 결합하고 다른(other) 아이소폼에는 결합하지 않는, 또는 실질적으로 결합하지 않는 데 사용될 수 있으며, 그렇게 함으로써 한 아이소폼을 발현하는 세포를 특이적으로 고갈시킨다. 예를 들어, 고갈제가 제 2 아이소폼에 특이적으로 결합하나, 제 1 아이소폼에는 결합하지 않으면, 상기 고갈제는 상기 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 특이적으로 고갈시킬 것이다. 또 다른 구현예에서, 상기 제 1 아이소폼은 제 2 제제에 의해 인식될 수 있고, 따라서 이 제 2 제제가 제 1 아이소폼을 발현하나 제 2 아이소폼은 발현하지 않는 세포를 특이적으로 고갈시키는데 사용될 수 있다. 하나 이상의 변이체 대립유전자에 의해 암호화된 표면 단백질의 제 1 아이소폼을 발현하는 세포는 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가지는 환자의 의학적 치료에 유리하게 사용되며, 특히, 제 2 또는 제 1 제제를 각각 사용하여 특이적으로 이식된 또는 환자 세포를 고갈시키기 위해 사용된다.

[0064] 표면 항원(surface antigen)에서 어느 돌연변이가 이러한 접근 방법에 사용될 수 있는지 예측하는 것이 불가능하다. 첫째, 돌연변이가 고갈제가 접근 가능한 표면 항원의 노출된 부분(stretch) 표면에 있어야 한다. 둘째, 고갈제는 표면 항원의 노출된 영역 상의 이 부분에 결합해야 한다. 셋째, 고갈제가 제 2 아이소폼으로부터 제 1 아이소폼을 구별할 수 있도록 결합이 충분히 영향을 받아야 한다. 다른 아이소폼에 대한 잔기 결합(Residual binding)이 최소화되거나, 완전히 없는 것이 더 좋다. 넷째, 돌연변이는 표면 항원의 기능에 영향을 미치지 않거나, 또는 아주 조금만 영향을 미쳐야 한다. 돌연변이된 아이소폼은 주어진 치료적 세팅에서 관용될 수 있는 정도 이상으로 이의 생물학적 기능을 수행해야 한다. 삼-차원 단백질 구조를 예측하기 위한 특정 도구가 존재하지만, 오직 실험적 시험만이 임의의 돌연변이의 유용성을 증명할 수 있다.

[0065] 고갈제

[0066] 본 개시 내용은 세포 상의 한 CD45의 아이소폼에 특이적으로 결합하고, 또 다른 CD45의 아이소폼에는 결합하지 않거나 실질적으로 더 약하게 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 제제에 관한 것이다. 본 발명에서는 그러한 제제를 **"고갈제"**라 지칭한다. CD45의 두 아이소폼은 기능적이다, 즉, CD45는 하나 이상의 관련 특성에 대해 기능적이다. 바람직하게 CD45의 두 아이소폼은 동일한 기능을 가진다, 즉, 이들은 기능적으로 구별할 수 없다.

[0067] 그러나 CD45의 두 아이소폼은 고갈제에 대한 결합에 대해 상이하다. 고갈제는 CD45의 아이소폼 중 하나에만 특이적으로 결합한다. 따라서 아이소폼은 기능적으로 동일하나 (또는 기능적으로 실질적으로 동일한), 면역학적으로 구별 가능한 것으로 설명될 수 있다.

[0068] 특정 구현예에서, CD45의 제 1 및 제 2 아이소폼은 실질적으로 동일한 생물물리학적 특성을 가진다. 특정 구현예에서, CD45의 제 1 및 제 2 아이소폼은 동일한 생물물리학적 특성을 가진다. 특정 구현예에서, CD45의 제 1 및 제 2 아이소폼은 실질적으로 같은 안정성(stability)을 가진다. 특정 구현예에서, CD45의 제 1 및 제 2 아이소폼은 같은 안정성을 가진다. 특정 구현예에서, CD45의 제 1 및 제 2 아이소폼은 실질적으로 같은 용해 온도를 가진다. 특정 구현예에서, CD45의 제 1 및 제 2 아이소폼은 같은 용해 온도를 가진다. 특정 구현예에서, CD45의 제 1 및 제 2 아이소폼은 실질적으로 같은 응집 경향을 가진다. 특정 구현예에서, CD45의 제 1 및 제 2 아이소폼은 같은 응집 경향을 가진다. 특정 구현예에서, CD45의 제 1 및 제 2 아이소폼은 실질적으로 같은 이량체 형성 경향을 가진다. 특정 구현예에서, CD45의 제 1 및 제 2 아이소폼은 같은 이량체 형성 경향을 가진다.

[0069] 제 1 아이소폼 및 CD45의 제 2 아이소폼은 다형성의 대립유전자일 수 있다. 바람직하게는, 제 1 아이소폼 및 CD45의 제 2 아이소폼은 자연 발생적 다형성의 대립유전자이다. 또한 바람직하게는, 제 1 아이소폼 및 CD45의

제 2 아이소폼은 단일염기 다형성 (single nucleotide polymorphism, SNP) 대립유전자이다.

- [0070] 제 1 아이소폼 및 CD45의 제 2 아이소폼은 유전적으로 조작된 대립유전자일 수 있다. 바람직하게는 제 1 아이소폼 및 CD45의 제 2 아이소폼은 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산이 상이하다. 가장 바람직하게는 CD45의 제 1 아이소폼 및 제 2 아이소폼은 1개의 아미노산이 상이하다.
- [0071] 제 2 아이소폼을 생성하기 위해 CD45에 도입될 돌연변이를 결정하는데 다양한 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 돌연변이가 무작위적으로 삽입되고, 그 후 생성된 변이체의 기능적 및 면역학적 스크리닝될 수 있다. 대안적으로 돌연변이는, 예를 들어, CD45의 이차 또는 삼차 단백질 구조의 분석에 의해 합리적으로 설계될 수 있다.
- [0072] 고갈제는 세포 상의 한 CD45의 아이소폼에 특이적으로 결합하고 또 다른 아이소폼에는 결합하지 않거나 실질적으로 약하게 결합하는 항원 결합 부위를 포함한다. 본 개시 내용의 고갈제는 2개의 주요한 카테고리로 나누어질 수 있다.
- [0073] 첫째, 고갈제는 항원 결합 부위를 포함하는 폴리펩타이드(polypeptide)일 수 있다. 상기 폴리펩타이드는 하나 이상의 폴리펩타이드 사슬(chains)로 구성될 수 있다. 바람직하게는 항원 결합 부위를 포함하는 상기 폴리펩타이드는 항체이다. 또한 항원 결합 부위를 포함하는 상기 폴리펩타이드는 항체 단편, 항체 약물 접합체, 또는 항체 또는 스캐폴드의 또 다른 변이체일 수 있다. 예시적인 항체 단편 및 스캐폴드는 단일 도메인 항체(single domain antibodies), 맥시바디(maxibodies), 미니바디(minibodies), 인트라바디(intrabodies), 디아바디(diabodies), 트리아바디(triabodies), 테트라바디(tetrabodies), v-NAR, igNAR, bis-scFv, 낙타과(camelid) 항체, 안키린(ankyrins), 센티린(centyrins), 도메인 항체, 리포칼린(lipocalins), 소분자 면역-제약(small modular immuno-pharmaceuticals), 막시바디(maxybodies), 프로테인 A(Protein A) 및 아필린(affilins)을 포함한다.
- [0074] 또한 상기 항원 결합 부위를 포함하는 폴리펩타이드는 이중특이적(bispecific), 이중 파라토프(biparatopic) 또는 다중특이적 항체일 수 있다. 또한 이러한 분자는 추가적인 기능적 도메인을 함유할 수 있다. 예를 들어, 항원 결합 부위를 포함하는 상기 폴리펩타이드는 T 세포 관여자, 예를 들어, BiTE일 수 있다. 또한 항원 결합 부위를 포함하는 상기 폴리펩타이드는 사이토카인 또는 케모카인, 독소 또는 세포 표면 수용체의 세포의 도메인에 융합될 수 있다.
- [0075] 대안적으로, 고갈제는 항원 결합 부위를 포함하는 세포일 수 있다. 예를 들어, 고갈제는 키메라항원수용체(CAR)일 수 있다. 본 개시 내용의 특정 구현예에서, 항원 결합 부위를 포함하는 상기 세포는 CAR T-세포, CAR NK 세포 또는 CAR 대식세포이다. 본 개시 내용의 바람직한 구현예에서 항원 결합 부위를 포함하는 상기 세포는 CAR T-세포이다. 본 개시 내용의 또 다른 바람직한 구현예에서 항원 결합 부위를 포함하는 상기 세포는 CAR를 포함하는 일차 T 세포이다.
- [0076] 고갈제는 CD45의 한(one) 아이소폼에 특이적으로 결합하나, 제 2 아이소폼에는 결합하지 않으므로, 한 아이소폼을 발현하는 세포를 특이적으로 고갈시킨다.
- [0077] 특정 구현예에서, 본 개시 내용은 CD45의 제 2 아이소폼에 특이적으로 결합하고 제 1 아이소폼에는 결합하지 않는 제 1 항원 결합 부위를 포함하는 제제에 관한 것이다. 다른 구현예에서, 본 개시 내용은 또한 CD45의 제 1 아이소폼에는 특이적으로 결합하고 제 2 아이소폼에는 결합하지 않는 제 2 항원 결합 부위를 포함하는 제제에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 상기 제제는 CD45의 상기 제 2 아이소폼에 실질적으로 더 약하게 결합한다.
- [0078] CD45의 제 1 및 제 2 아이소폼은 단 하나의 아미노산 치환에 의해 서로 상이할 수 있다. 또한 제 1 및 제 2 아이소폼 간의 상기 하나의 아미노산 차이는 자연 발생적 단일염기 다형성과 같은 단일염기 다형성의 존재에 의한 결과일 수 있다. 또한 CD45의 제 1 및 제 2 아이소폼은 둘, 셋 또는 셋 이상과 같은 하나 이상의 아미노산이 서로 상이할 수 있다. 또한 CD45의 제 1 및 제 2 아이소폼은 아이소폼들 중 하나가 다른 아이소폼과 비교하여 하나, 둘, 셋 또는 셋 이상의 아미노산의 삽입(insertion)을 가지는 점에서 서로 상이할 수 있다. 또한 CD45의 제 1 및 제 2 아이소폼은 아이소폼들 중 하나가 다른 아이소폼과 비교하여 하나, 둘, 셋 또는 셋 이상의 아미노산 결실을 가지는 점에서 서로 상이할 수 있다. 또한 두 아이소폼은 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실의 조합에 의해 서로 상이할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 상기 고갈제는 항체 또는 항원-결합 단편(antigen-binding fragment)이다. CD45의 두 아이소폼이 하나 이상의 아미노산이 상이한 경우, 변경된 아미노산은 서로 인접할 수 있고, 즉, 바로 옆의 아미노산일 수 있으며, 또는 이들은 따로 떨어져 있을 수 있다.
- [0079] 본 발명에서 사용된 바와 같이 용어 "**항체**"는 면역 글로불린(immunoglobulin) 분자 및 면역 글로불린 분자의 면역학적으로 활성인 부분, 즉, 항원에 면역 특이적으로(immunospecifically) 결합하는 항원 결합 부위(antigen

binding site)를 함유하는 분자를 지칭한다. 따라서, 용어 항체는 항체 분자뿐만 아니라 항체 단편 및 항체의 변이체 (유도체(derivative) 포함)도 포함한다.

[0080] 설치류(rodents) 및 영장류(primates)의 천연 항체에서, 두 중쇄는 이황화 결합(disulfide bond)에 의해 서로 연결되고, 및 각 중쇄는 이황화 결합에 의해 경쇄와 연결된다. 람다 (λ) 및 카파 (κ)의 두 가지 유형의 경쇄가 있다. 항체 분자의 기능적 활성을 결정하는 다섯 가지 주요 중쇄 클래스 (또는 아이소타입)이 있다: IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE. 각 사슬은 특정(distinct) 서열 도메인을 포함한다. 일반적인 IgG 항체에서, 경쇄는 두 도메인, 가변 도메인 (VL) 및 불변 도메인 (CL)을 포함한다. 중쇄는 네 도메인, 가변 도메인 (VH) 및 세 불변 도메인 (CH1, CH2 및 CH3, 총괄적으로 CH로 지칭됨)을 포함한다. 경쇄 (VL) 및 중쇄 (VH)의 가변 부위(variable regions)는 항원에 대한 결합 인식 및 특이성(specificity)을 결정한다. 경쇄 (VL) 및 중쇄 (VH)의 불변 부위 도메인은 항체 사슬 조합(antibody chain association), 분비, 태반-수송 이동성(trans-placental mobility), 보체 결합(complement binding), 및 Fc 수용체 (FcR)에 대한 결합과 같은 중요한 생물학적 특성을 부여한다.

[0081] Fv 단편은 면역 글로불린의 Fab 단편의 N-말단 부분이며 하나의 경쇄 및 하나의 중쇄 가변 부위의 가변 부분으로 구성된다. 항체의 특이성은 항체 결합 부위(antibody combining site) 및 항원 결정기(antigenic determinant) 간의 구조적 상보성(complementarity)에 있다. 항체 결합 부위는 주로 초가변(hypervariable) 또는 상보성결정영역 (complementarity determining regions, CDRs)의 잔기로 구성된다. 종종, 비-초가변(non-hypervariable) 또는 프레임워크 영역 (framework regions, FR)의 잔기가 항체 결합 부위에 참여하거나, 전체 도메인 구조에 영향을 미쳐서 결합 부위에 영향을 미칠 수 있다. 상보성결정영역 또는 CDRs는 본래의 면역 글로불린 결합 부위의 천연(natural) Fv 영역의 결합 친화도 및 특이성을 함께 한정하는 아미노산 서열을 지칭한다. 면역 글로불린의 경쇄 및 중쇄는 각각 L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 및 H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3로 지정된 각각 3개의 CDRs를 가진다. 따라서, 항원-결합 부위는 일반적으로 각각의 중쇄 및 경쇄 V 영역으로부터 설정된 CDRs를 포함하는 6개의 CDRs를 포함한다. 프레임워크 영역 (FRs)는 CDRs 사이에 삽입된 아미노산 서열을 지칭한다. 따라서, 경쇄 및 중쇄의 가변 부위는 일반적으로 하기 순서의 4개의 프레임워크 영역 및 3개의 CDRs를 포함한다: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

[0082] 항체 가변 도메인에서 잔기는 통상적으로 Kabat et al에 의해 고안된 시스템에 따라 번호가 매겨진다. 이 시스템은 Kabat et al., 1987, in Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (Kabat et al., 1992, 이 후 "Kabat et al.")에 제시된다. 이 넘버링 시스템이 본 명세서에서 사용된다. Kabat 잔기 지정(Kabat residue designation)은 서열번호 서열에서 아미노산 잔기의 순차적(linear) 넘버링(numbering)에 항상 직접적으로 일치하지 않는다. 실제 순차적 아미노산 서열은 기본 가변 도메인 구조의 프레임워크 또는 상보성결정영역 (CDR)이든지 구조적 요소의 단축, 또는 삽입에 해당하는 엄격한 Kabat 넘버링보다 더 적거나 추가적인 아미노산을 함유할 수 있다. 항체의 서열에서 상동성(homology) 잔기를 "표준"Kabat 넘버링된 서열과 정렬함으로써 잔기의 적절한 Kabat 넘버링이 주어진 항체에 대해 결정될 수 있다. Kabat 넘버링 시스템에 따르면 중쇄 가변 도메인의 CDRs는 잔기 31-35 (H-CDR1), 잔기 50-65 (H-CDR2) 및 잔기 95-102 (H-CDR3)에 위치한다. Kabat 넘버링 시스템에 따르면 경쇄 가변 도메인의 CDRs는 잔기 24-34 (L-CDR1), 잔기 50-56 (L-CDR2) 및 잔기 89-97 (L-CDR3)에 위치한다.

[0083] 구체적인 구현예에서, 본 발명에서 제공된 항체는 항체 단편, 및 더욱 특히 본 발명에 개시된 항체의 항원-결합 도메인을 포함하는 임의의 단백질이다. 또한 항원-결합 도메인은 또 다른 단백질 스캐폴드 항체 단편에 통합될 수 있고, 스캐폴드는 Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂, 디아바디(diabodies), 단일 도메인 항체(single domain antibodies), 맥시바디(maxibodies), 미니바디(minibodies), 인트라바디(intrabodies), 디아바디(diabodies), 트리아바디(triabodies), 테트라바디(tetrabodies), v-NAR, igNAR, bis-scFv, 낙타과(camelid) 항체, 안키린(ankyrins), 센티린(centyrins), 도메인 항체, 리포칼린(lipocalins), 소분자 면역-제약(small modular immuno-pharmaceuticals), 막시바디(maxybodies), 프로테인 A(Protein A) 및 아필린(affilins)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0084] 본 발명에서 사용된 바와 같이, "항원 결합 부위" 또는 "항체의 항원-결합 단편"은 항체의 부분, 즉, 특정 항원에 대해 항원-결합능(antigen-binding capacity)을 나타내는 항체, 아마도 본래의 이의 형태의 구조의 일부에 해당하는 분자를 의미하며; 이러한 단편은 특히 해당하는 4-사슬 항체의 항원-결합 특이성과 비교하여 동일하거나 실질적으로 동일한 상기 항원에 대한 항원-결합 특이성을 나타낸다. 항원-결합능은 항체 및 표적 단편 간의 친화도 측정에 의해 결정될 수 있다. 또한 이 항원-결합 부위는 "기능적 단편"으로 지정될 수 있다.

[0085] 개시 내용의 제제는 항체 및 이의 단편을 포함하나, 항체의 항원에 결합하는 능력을 모방하는 항원에 결합하는

능력을 가지는 인공(artificial) 단백질도 포함하며, 또한 본 발명에서 항원-결합 항체 미메틱(mimetic)이라고 칭한다. 항원-결합 항체 미메틱(mimetics)은 항원에 특이적으로 결합하나, 구조적으로 항체와 관련되지 않은 유기 화합물이다. 이들은 보통 약 3 내지 20 kDa의 몰 질량(molar mass)을 가지는 인공 펩타이드 또는 소단백질이다.

[0086] 문구 "항원을 인식하는 항원 결합 부위" 및 "항원에 대해 특이성을 가지는 항원 결합 부위"는 본 발명에서 용어 "항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위"와 상호교환적으로 사용된다. 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "특이성"은 항체와 같은 항원 결합 부위를 포함하는 제제의 항원에 대해 제시된 에피토프에 검출가능하게 결합하는 능력을 지칭한다.

[0087] "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합하는"은 약 10^{-8} M (KD) 또는 이보다 더 강한 1가 친화도(monovalent affinity)로 결합하는 것을 포함한다. 바람직하게는, 결합은 결합 친화도가 10^{-8} M (KD) 내지 10^{-12} M (KD), 임의로 10^{-8} M (KD) 내지 10^{-10} M (KD), 특히 10^{-8} M (KD) 이상인 경우 특이적인 것으로 간주된다. 친화도는 통상의 기술자에게 공지된 다양한 방법으로 결정될 수 있다. 이 방법들은 표면 플라즈몬 공명 (surface plasmon resonance, SPR), 생물층 간섭법 (biolayer interferometry, BLI), 미세규모 열영동 (microscale thermophoresis, MST) 및 스캐차드플롯(Scatchard plot)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 결합 도메인이 표적과 특이적으로 반응하거나 결합하는지는 그 중에서도 상기 결합 도메인의 표적 단백질 또는 항원과의 반응은 상기 결합 도메인의 표적 단백질 외의 단백질 또는 항원과의 반응과 비교함으로써 쉽게 시험될 수 있다.

[0088] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "에피토프(epitope)"는 항체 또는 항원 결합 부위가 결합하는 항원의 부분을 의미한다. 단백질 항원의 에피토프는 구조적 에피토프(conformational 에피토프) 및 선형 에피토프(linear 에피토프)의 두 가지 카테고리로 나눌 수 있다. 구조적 에피토프는 항원의 아미노산 서열의 불연속적인 구획에 해당한다. 선형 에피토프는 항원의 아미노산의 연속적인 서열에 해당한다.

[0089] 또 다른 측면에서, 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체와 같은 이중특이적 또는 다중특이적 분자가 본 발명에 추가로 개시된다. 예를 들어, 항체는 유도체화(derivatized)되거나 또 다른 기능적 분자, 예를 들어 또 다른 펩타이드 또는 단백질 (예를 들어, 또 다른 항체 또는 수용체에 대한 리간드)와 연결되어 둘 이상의 상이한 결합부위 또는 표적 분자에 결합하는 이중특이적 분자를 생성할 수 있다. 실제로 항체는 유도체화되거나 하나 이상의 다른 기능적 분자와 연결되어 둘 이상의 상이한 결합 부위 및/또는 표적 분자에 결합하는 다중-특이적 분자(multi-specific molecules)를 생성할 수 있으며; 또한 이러한 다중-특이적 분자는 본 발명에서 사용된 바와 같이 용어 "이중특이적 분자", "이중특이적 항체", "이중파라토프 분자", "이중파라토프 항체", "다중특이적 분자" 및 "다중특이적 항체"에 포함되는 것으로 의도된다. 이중특이적 분자를 생성하기 위해, 개시 내용의 항체가 또 다른 항체, 항체 단편, 펩타이드 또는 결합 미메틱, 사이토킨, 케모카인, 독소 또는 수용체 세포의 도메인(receptor extracellular domain)과 같은 하나 이상의 다른 결합 분자에 (예를 들어, 화학적 커플링, 유전적 융합, 이황화 결합, 비공유 결합 등에 의해) 기능적으로 연결되어 이중특이적 분자를 초래할 수 있다. 본 개시 내용에서 고려되는 특정한 이중특이적 및 다중특이적 분자는 이중특이적 T 세포 관여자와 같은 T 세포 관여자, 예를 들어, BiTE이다.

[0090] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 특정 CD45의 아이소폼에 결합하지 않거나 실질적으로 더 약하게 결합하는 제제는 상기 특정 아이소폼을 발현하는 세포에 결합할 수 없는 제제를 포함한다. 실험적 시험을 위해 상기 제제는 형광 마커로 표지될 수 있거나 상기 제제에 대한 이차 항체로 검출될 수 있고, 상기 형광 마커 또는 상기 이차 항체를 나타내는 세포의 백분율은 FACS 분석으로 결정된다. 일반적으로 시험은 재조합 표적 단백질, 즉, CD45를 발현하는 세포주에서 수행된다. 표적 단백질은 전체로서(in its entirety) 발현될 수 있다. 대안적으로, 절단된 버전이 사용될 수 있으며, 상기에서 상기 절단된 버전은 최소한도로 세포외도메인(extra cellular domain) 또는 각각의 항체 에피토프를 함유하는 세포외 도메인의 부위를 포함할 필요가 있다. 변이체 아이소폼의 발현을 모니터링하기 위해, 세포는 한 제제는 변이체가 도입된 에피토프에 결합하고, 제 2 제제는 제 1 제제에 의해 결합된 것과 상이한 에피토프에 결합하는 두 제제로 동시에 염색될 수 있다. 두 번째 에피토프는 변경되지 않고 유지되므로 이 염색은 발현 대조군(control)으로 역할을 한다. 비-결합 대조군으로서, 관심 단백질을 발현하지 않는 세포가 사용된다. 최대 결합 대조군으로서, 관심 단백질을 정상적으로 발현하지 않는 세포를 야생형 아이소폼으로 형질전환시켰다. 상이한 세포주는 상이한 발현 수준을 가지나, 발현은 프로모터(promoters)와 같은 내생적(endogenous) 대조 요소(element)를 통해 제어된다. 또한 이러한 세포주는 고갈제제의 작용 방식(mode-of-action), 상이한 작용 방식에 대한 효과적인 보호(shielding) 연구, 세포 독성 및 세포 독성으로부터의 보호/저항성 시험 또는 조작된(engineered) 수용체의 기능 시험에 사용될 수 있다. 웨스턴 블롯, ELISA 또는 FACS가 시

그넨링(signaling) 분자의 인산화 분석에 사용될 수 있다. 유전자 발현 변화의 분석은 정상 기능과 비교하여 유전자 발현을 분석하는 기능을 한다. 또한 세포는 다른 접근 방법들, 예를 들어, 상동인도복구(homology directed repair, HDR), 염기 편집(base editing) 또는 프라임 편집(prime editing)을 통한 특정 변이체의 편집 가능성을 입증하는데 사용될 수 있다.

[0091] 상기 제제의 결합은 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 세포의 고갈을 초래할 수 있다. 다양한 기전이 세포 고갈을 초래할 수 있다. 항체 의존적 세포 독성(Antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC)은 표적 단백질에 대한 제제의 결합 및 NK 세포에 의해 발현된 FcR에 의해 결합된 제제 상의 Fc 부분을 통한 NK 세포의 활성화에 기인한다. 면역 글로불린의 Fc 부분은 면역 글로불린 중쇄의 C-말단 부위를 지칭한다. Fc 부분은 야생형이거나 조작될 수 있다. 강화된, 조작된 Fc 부분의 돌연변이는 통상의 기술분야에 널리 공지되어 있다. 특정 치료 상황의 경우, 항체의 효과기 기능(effector function) 유도 능력을 감소시키거나 무효화하기 위해 야생형 IgG Fc 부위와 같은 항체의 야생형 Fc 부위의 하나 이상의 또는 모든 Fc 수용체들에 대한 정상 결합 및/또는 C1q와 같은 보체 성분(complement component)에 대한 결합을 감소시키거나 무효화시키는 것이 바람직하다. 예를 들어, 하나 이상의 또는 모든 FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa와 같은 Fcγ 수용체에 대한 항체의 Fc 부위의 결합을 감소시키거나 무효화시키는 것이 바람직할 수 있다. 효과기 기능은 하기 중 하나 이상을 포함하나, 이에 한정되지 않는다: 보체-의존적 세포독성(complement dependent cytotoxicity, CDC), 항체-의존적 세포-매개 세포독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC), 항체-의존적 포식작용(antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCP), 사이토카인 분비(cytokine secretion), 항원-제시 세포(antigen-presenting cells)에 의한 면역 복합체-매개 항원 흡수, NK 세포에 대한 결합, 대식세포에 대한 결합, 단핵구(monocytes)에 대한 결합, 다형핵 세포(polymorphonuclear cells)에 대한 결합, 아포토시스(apoptosis)를 유도하는 직접적인 시그넨링(signaling), 표적-결합된(target-bound) 항체의 가교(crosslinking), 수지상세포(dendritic cell) 성숙, 또는 T 세포 프라임링(priming). 또한 상기 제제의 결합은 천연 수용체 리간드의 결합의 차단(blocking)을 초래함으로써 세포-매개 고갈없이 세포 사멸 및 아포토시스를 초래할 수 있다.

[0092] 일반적으로 Fc 수용체 및/또는 C1q에 대한 Fc 부위(Fc region)의 감소된 또는 무효화된 결합은 IgG1 Fc 부위, 더욱 특히 인간 IgG1 Fc 부위와 같은 야생형 Fc 부위를 돌연변이시켜, 상기 야생형의 변이체 또는 조작된 Fc 부위, 예를 들어, 인간 IgG1 Fc 부위 변이체를 초래함으로써 달성된다. 감소된 결합을 초래하는 치환은 유용할 수 있다. Fc 부위의 Fc 수용체에 대한 결합 특성을 감소시키거나 무효화하기 위해, 비-보존적 아미노산 치환, 즉, 한 아미노산을 상이한 구조 및/또는 화학적 특성 및/또는 전하를 가지는 또 다른 아미노산으로 대체하는 것이 바람직하다.

[0093] 본 개시 내용의 특정 구현예에서 항체의 Fc 부위는 LALA 또는 PG-LALA 돌연변이, 즉, L234A, L235A 및 P329G 돌연변이 또는 PA-LALA 돌연변이를 포함하는(carrying) 불변 부위, 즉, L234A, L235A 및 P329A 돌연변이, 또는 AEASS, 즉, L234A, L235A 및 P329A 돌연변이 또는 L234A, L235E, G237A, A330S 및 P331S 돌연변이를 가지는 불변 부위를 가지는 IgG1 아이소타입이다. 통상의 기술자는 원하는 효과를 얻기 위해 Fc 부위를 조작하는 가능성을 알고 있을 것이다.

[0094] 대리 ADCC 분석(Surrogate ADCC assay)은 실험 부분에 기재된 바와 같이 ADCC를 매개하는 제제의 효능(potency)을 정량하기 위한 업계 표준을 차지한다. 조작된 Jurkat 리포터 세포는 NFAT-반응성 루시퍼레이스 유전자 및 인간 FcγRIIIa와 같은 Fc 수용체를 포함한다(carry). Fc 수용체의 항체에 대한 결합은 수용체 클러스터링(clustering)을 통해 NFAT를 유도하고, 따라서 루시퍼레이스 신호가 초래된다. 결합이 없으면 클러스터링이 루시퍼레이스 신호를 초래하지 않는다. 표적 단백질이 없거나(예를 들어, HEK 또는 DF-1 세포 또는 CD45-결핍 되도록 조작된 TF-1, KG-1, KASUMI-1, K562 또는 Jurkat(예를 들어, CD45 녹-아웃된 Jurkat 세포와 같은 CD45 녹-아웃 또는 인간 T-세포 암 세포)와 같은 인간 조혈 암 세포), 야생형 단백질(예를 들어, DF-1-CD45의 HEK-CD45, 또는 TF-1, KG-1, KASUMI-1 또는 Jurkat 세포주) 또는 개별 변이체(예를 들어, CD45 변이체)를 발현하는 세포는 시험 제제(예를 들어, 항체 Refmac # 1)와 인큐베이션되고 ADCC 리포터 세포와 혼합되었다. 그 후 ADCC 신호를 정량하기 위해 루시퍼레이스를 측정하였다. 루시퍼레이스 발광 신호를 HEK-CD45, DF-1-CD45 또는 해당 골수 또는 T-세포 암 세포주에서 관찰된 최대 신호로 정규화하였다. ADCC는 ADCC Reporter Assay(Promega, Cat.No. G7015)로 측정하였다.

[0095] 본 개시 내용에 따라 다른 가능한 작용방식도 가능하다. 이는 CD45의 리간드의 항체-매개 대체(antibody-mediated displacement), 또는 항체 약물 접합체(antibody drug conjugate)와 공조한 항체 내재화(antibody internalization)를 포함한다. 표적 세포를 고갈시키는 다른 방법은 T 세포 관여자 분자의 사용을 통한 것이다. 예를 들어, 항체 Refmac # 1 유래 CD45 결합 부위 및 CD3 (OKT3) 결합 부위를 사용하는 이중특이적 T 세포 관여

자가 사용될 수 있다. ADCC 분석에 사용된 동일한 표적 세포가 사용된다. 일차 인간 T 세포 및 이중특이적 T 세포 관여자가 추가된다. FACS로 CD69 상향 조절 및/또는 사이토카인 방출의 빈도를 결정함으로써 인간 T 세포의 활성화가 정량화되었다.

[0096] 본 개시 내용에 따른 고갈제는 하나의 CD45의 아이소폼에 특이적으로 결합하고 상기 아이소폼을 발현하는 세포의 고갈을 가능하게 한다.

[0097] 더욱 바람직하게는, 구체적인 구현예에서, 본 개시 내용에 따른 상기 고갈제는 특히 본 발명에 개시된 바와 같은 사용 방법에서, CD45의 제 1 아이소폼에 결합하지 않거나 실질적으로 더 약하게 결합하나, CD45의 제 2 아이소폼에는 특이적으로 결합하여 CD45의 상기 제 2 아이소폼을 발현하는 상기 세포의 고갈을 가능하게 한다. 특히, CD45의 제 1 아이소폼에 결합하지 않거나 실질적으로 더 약하게 결합하나, 환자의 세포에서 발현된 CD45의 제 2 아이소폼에는 특이적으로 결합하는 상기 고갈제가 환자의 세포를 고갈시키고, 상기 환자에서 조혈작용을 회복시키기 위해 이식한 CD45의 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 조혈 줄기세포 또는 이들의 자손(progeny)은 고갈시키지 않는데 사용된다.

[0098] 또 다른 구체적인 구현예에서, 본 개시 내용에 따른 상기 고갈제는 특히 본 발명에 개시된 바와 같은 사용 방법에서, CD45의 제 2 아이소폼에 결합하지 않거나 실질적으로 약하게 결합하나, CD45의 제 1 아이소폼에는 특이적으로 결합하고, CD45의 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 세포의 고갈을 가능하게 한다. 특히, CD45의 제 2 아이소폼에 결합하지 않거나 실질적으로 더 약하게 결합하나, 이식된 세포에서 발현된 CD45의 제 1 아이소폼에는 특이적으로 결합하는 상기 고갈제는 이식에 기인한 이식편대숙주병과 같은 궁극적으로 심각한 부작용을 피하기 위해 이식된 세포를 특이적으로 고갈시키는데 사용된다.

[0099] 특정 CD45의 아이소폼을 발현하는 세포의 선택적 고갈은 보체-의존적 세포독성 (complement-dependent cytotoxicity, CDC), 항체-의존적 세포독성 (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) 또는 항체-의존적 포식작용 (antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCP)에 의한 제한 없이 달성될 수 있다.

[0100] 특정 구현예에서, 항원 결합 부위는 약물 또는 독소와 같은 이펙터 화합물(effector compound)과 결합(coupled)된다. 본 발명에서는 그러한 접합체(conjugates)를 "**면역접합체(immunoconjugates)**", "**항체-약물 접합체(antibody-drug conjugates)**" 또는 "**ADCs**"라고 지칭한다. 세포독소(cytotoxin) 또는 세포독성제(cytotoxic agent)는 세포에 유해한 (예를 들어, 사멸하는) 임의의 체제를 포함한다. 예는 탁솔(taxol), 사이토칼라신 B(cytochalasin B), 그라미시딘 D(gramicidin D), 에티듐 브로마이드(ethidium bromide), 에메틴(emetine), 미토마이신(mitomycin), 에토포사이드(etoposide), 테노포사이드(tenoposide), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 콜히친(colchicin), 독소루비신(doxorubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 디하이드록시 안트라신 디온(dihydroxy anthracin dione), 미토산트론(mitoxantrone), 미트라마이신(mithramycin), 액티노마이신 D(actinomycin D), 1-데하이드로테스토스테론(1-dehydrotestosterone), 글루코코르티코이드(glucocorticoids), 프로카인(procaine), 테트라카인(tetracaine), 리도카인(lidocaine), 프로프라놀롤(propranolol), 마이탄시노이드(maytansinoids), 칼리케아미신(calicheamicins), 인돌리노벤조디아제핀(indolinobenzodiazepines), 피롤로벤조디아제핀(pyrolobenzodiazepines), 피리디노벤조디아제핀(pyridinobenzodiazepines), 캄토테신(camptothecins), 토포테칸(topotecan), 이리노테칸(irinotecan), 벨로테칸(belotecan), 데루스테칸(deruxtecan), 알파-아마니틴(alpha-amanitin), 마이크로시스틴(microcystins), 아우리스타틴(auristatins) 및 푸로마이신(puromycin) 및 이들의 유사체(analogs) 또는 상동체(homologs)를 포함한다.

[0101] 또 다른 특정 구현예에서, 상기 고갈제는 키메라항원수용체 (CAR)와 같은 항원 수용체를 보유하는 면역 세포이다. 예를 들어, Myburgh et al. Leukemia (2020) 34: 2688-703 참조. 상기 면역 세포는 이의 세포 표면에 항원 수용체라고도 불리는 재조합 항원 결합 부위를 발현할 수 있다. "**재조합(recombinant)**"은 본래 상태의 세포에 의해 암호화되지 않는, 즉, 이종성(heterologous), 비-내생적인 항원 결합 부위를 의미한다. 따라서 재조합 항원 결합 부위의 발현은 새로운 항원 특이성을 면역 세포에 도입하여, 세포가 이전에 인식하지 않은 항원을 인식하고 결합하도록 하는 것으로 볼 수 있다. 항원 수용체는 임의의 유용한 공급원(source)으로부터 분리될 수 있다. 본 개시 내용의 특정 구현예에서 항원 결합 부위를 포함하는 상기 세포는 CAR T-세포, CAR NK 세포, CAR Treg 또는 CAR 대식세포이다. 본 개시 내용의 바람직한 구현예에서 항원 결합 부위를 포함하는 상기 세포는 CAR T-세포이다. 본 개시 내용의 또 다른 바람직한 구현예에서 항원 결합 부위를 포함하는 상기 세포는 CAR를 포함하는 일차 T 세포이다.

[0102] 특정 구현예에서, 상기 재조합 항원 수용체는 키메라항원수용체 (CAR)이다. CAR는 TCR 컴플렉스의 시그널링

(signaling) 도메인에 연결된, 일반적으로 항체로부터 유래된 항원-결합 부위를 포함하는 융합 단백질이다. 적합한 항원-결합 부위가 선택되면 CAR는 T-세포 또는 NK 세포와 같은 면역세포를 표적 항원에 대해 유도하는데 사용될 수 있다.

[0103] 일반적으로 CAR의 항원-결합 부위는 항체로부터 유래된 scFv (단일 사슬 가변 단편(single chain variable fragment))에 기반한다. 세포의 항체-결합 부위(extracellular antibody-binding region)인 N-말단 외에, CAR는 일반적으로 막관통 (transmembrane, TM) 도메인, 세포내 시그널링(signaling) 도메인 (예를 들어, TCR 컴플렉스의 CD3 분자의 제타 사슬 유래 시그널링 도메인 (CD3 ζ 또는 등가물) 및 임의로 CAR를 발현하는 세포의 시그널링 또는 기능성을 보조할 수 있는 하나 이상의 공동-촉진성(co-stimulatory) 도메인을 발현하는 면역 효과기 세포(immune effector cell)의 원형질막으로부터 항원-결합 부위를 떨어뜨리기 위한 스페이서로서 기능하는 힌지(hinge) 도메인을 포함할 수 있다. CD28, OX-40 (CD134), CD27, ICOS 및 4-1BB (CD137)을 포함하는 공동-촉진성 분자 유래 시그널링 도메인은 CAR 변형된 면역 세포의 생존을 향상시키고 증식을 증가시키기 위해 단독으로 (2 세대) 또는 조합되어 (3 세대) 추가될 수 있다.

[0104] 통상의 기술자는 본 개시 내용에 따라 사용될 면역세포를 재유도(redirect)하기 위한 상기한 바와 같은 적절한 항원 결합 부위를 선택할 수 있다. 특정 구현예에서, 본 개시 내용의 방법에서 사용하기 위한 면역 세포는 재유도된 T-세포, 예를 들어, 재유도된 CD8+ T-세포 또는 재유도된 CD4+ T-세포 또는 재유도된 NK 세포이다.

[0105] 재조합 항원 결합 부위를 발현하도록 면역 세포를 유전적으로 변형할 수 있는 방법은 통상의 기술 분야에 널리 공지되어 있다. 항원 수용체를 암호화하는 핵산 분자는 예를 들어, 벡터, 또는 임의의 다른 적합한 핵산 컨스트럭트의 형태로, 또는 유전자 편집(genome editing) 기술을 이용하여 핵산 분자를 유전체에 삽입함으로써 세포로 도입될 수 있다. 벡터, 및 이에 필요한 요소는 통상의 기술 분야에 널리 공지되어 있다. 항원 결합 부위를 암호화하는 핵산 분자가 통상의 기술 분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들어, PCR을 이용한 분자 클로닝을 이용하여 생성될 수 있다. 항원 결합 부위 서열은 위치-특이적 돌연변이와 같은 일반적으로 사용되는 방법을 이용하여 변형될 수 있다.

[0106] **CD45**

[0107] CD45 (UniProt: P08575; 단백질 타이로신 포스파테이즈 수용체 타입 C, PTPRC, LCA, B220 또는 LY5라고도 알려진)는 단백질 타이로신 포스파테이즈 (phosphatase, PTP) 패밀리(family)의 구성원으로, 세포 성장, 분화, 분열 주기(mitotic cycle) 및 종양원성 변형(oncogenic transformation)을 포함하는 다양한 세포 과정을 조절하는 시그널링 분자를 포함한다.

[0108] 인간 CD45는 하기의 아미노산 서열을 가진다 (서열번호 1):

[0109] MTMYLWLKLLAFGFAFLDTEVFVTGQSPTPSPTGLTTAKMPVPLSSDPLPHTTTAFSPA

[0110] STFERENDFSETTTLSLSPDNTSTQVSPDSLNDNAFNTTGVSSVQTPHLPHTADSQTTPSA

[0111] GTDTQTFSGSAANAKLNPTPGSNAISDVPGERSTASTFPTDPVSPLTTLSLAHSSAAL

[0112] PARTSNTTITANTSDAYLNASETTTLSPSGSAVISTTTIATTPSKPTCDEKYANITVDYL

[0113] YNKETKLFTAKLVNENVECGNNTCTNNEVHNLTECKNASVSI SHNSCTAPDKTLILDVP

[0114] PGVEKFQLHDCTQVEKADTTICLKWKNIETFTCDTQNIYRFQCGNMIFDNKEIKLENLE

[0115] PEHEYKCDSEILYNNHKFTNASKI IKTDFGSPGEPQI IFCRSEAAHQGVITWNPQRSFH

[0116] NFTLCYIKETEKDCLNLDKNLIKDYDLQNLKPYTKYVLSLHAYII AKVQRNGSAAMCHFTT

[0117] KSAPPSQVWNMTVSMTSDNSMHVKCRPPDRNGPHERYHLEVEAGNTLVRNESHKNCDFR

[0118] VKDLQYSTDYTFKAYFHNGDYPGEPFILHHSTSYNSKALIAFLAFLIIVTSIALLVLYK

[0119] IYDLHKKRSCNLDEQELVERDDEKQLMNVEPIHADILLETYKRKIADEGRFLAEFQSI

[0120] PRVFSKFPIKEARKPFNQKNRYVDILPYDYNRVELSEINGDAGSNYINASYIDGFKEPR

[0121] KYIAAQGRDETVDDFWRMIWEQKATVIMVTRCEEGRNKAIEYWPSMEEGTRAFGDVV

[0122] VKINQHKRCPDYIIQKLNI VNKKEKATGREVTHIQFTSWPDHGVDPEDPHLLKLRRRVNA

[0123] FSNFFSGPIVVHCSAGVGRTGTYIGIDAMLEGLEAENKVDVYGVVVKLRRQRCLMVQVEA
 [0124] QYILIHQALVEYNQFGETEVNLSLHPYLHNMKKRDPPESESPLEAEFQRLPSYRSWRTQ
 [0125] HIGNQEENKSKNRNSNIPYDYNRVPLKHELEMSKESEHDSDESSDDSDSEEPSKYINA
 [0126] SFIMSYWKPEVMIAAQGPLKETIGDFWQMIFQRKVKVIVMLTELKHGDQEIACQYWGEKG
 [0127] QTYGDIIEVDLKDTSSTYTLRVFELRHSKRKDSRTVYQYQYTNWSVEQLPAEPKELISM
 [0128] IQVVKQKLPQKNSSEGNKHHKSTPLLHICRDGSQQTGIFCALLNLESAETEEVVDIFQV
 [0129] VKALRKARPGMVSTFEQYQFLYDVIASTYPAQNGQVKNNHQEDKIEFDNEVDKVKQDAN
 [0130] CVNPLGAPEKLPEAKEQAEGSEPTSGTEGPEHSVNGPASPALNQGS

[0131] 특정 구현예에서, 상기 표면 단백질은 CD45이다. 다른 구현예에서 상기 표면 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 CD45이다. 다른 구현예에서 상기 표면 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 CD45이다.

[0132] 특정 구현예에서 본 개시 내용은 그것이 필요한 환자의 의학적 치료에 사용하기 위한 표면 단백질 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 포유동물 세포 또는 세포의 집단에 관한 것이며, 상기 환자는 상기 표면 단백질의 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가지고, 상기에서 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포는 하나 이상의 다형성 또는 유전적으로 조작된 대립유전자를 가지는 유전체 DNA를 포함하며, 상기에서 상기 다형성 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 상기 표면 단백질의 상기 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가진 환자의 유전체에 존재하지 않고, 바람직하게는 상기에서 상기 제 1 및 제 2 아이소폼은 기능적이다. 바람직하게는, 상기 포유동물 세포는 인간 세포이다.

[0133] 특정 구현예에서 본 개시 내용은 그것이 필요한 환자의 의학적 치료에 사용하기 위한 표면 단백질 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 포유동물 세포 또는 세포의 집단에 관한 것이며, 상기 환자는 상기 표면 단백질의 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가지고, 상기에서 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포는 하나 이상의 다형성 또는 유전적으로 조작된 대립유전자를 가지는 유전체 DNA를 포함하며, 상기에서 상기 다형성 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 상기 표면 단백질의 상기 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가진 환자의 유전체에 존재하지 않고, 상기에서 상기 제 1 및 제 2 아이소폼은 기능적이다. 바람직하게는, 상기 포유동물 세포는 인간 세포이다.

[0134] 특정 구현예에서 본 개시 내용은 그것이 필요한 환자의 의학적 치료에 사용하기 위한 표면 단백질 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 포유동물 세포 또는 세포의 집단에 관한 것이며, 상기 환자는 상기 표면 단백질의 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가지고, 상기에서 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포는 하나 이상의 다형성 또는 유전적으로 조작된 대립유전자를 가지는 유전체 DNA를 포함하며, 상기에서 상기 다형성 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 상기 표면 단백질의 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가진 환자의 유전체에 존재하지 않고, 상기에서 상기 제 1 및 제 2 아이소폼은 실질적으로 기능적이다. 바람직하게는, 상기 포유동물 세포는 인간 세포이다.

[0135] CD45에 대한 여러 기능이 보고되었다. 특정 구현예에서, 본 개시 내용은 CD45의 제 1 및 제 2 아이소폼에 관한 것이며, 상기에서 두 아이소폼은 기능적이다. 특정 구현예에서, 본 개시 내용은 CD45의 제 1 및 제 2 아이소폼에 관한 것이며, 상기에서 두 아이소폼은 기능적으로 구별할 수 없다(indistinguishable). 본 발명에서, "**기능적으로 구별할 수 없는(functionally indistinguishable)**"은 현저한 손상(impairment)없이 세포 내에서 동일한 기능을 동등하게 수행할 수 있는 CD45의 제 1 및 제 2 아이소폼을 지칭한다. 다시 말해, 제 1 및 제 2 아이소폼은 기능적으로 주로 구별할 수 없다. 약간의 기능적 손상이 허용 가능하다. 바람직한 구현예에서, CD45의 상기 제 1 아이소폼은 기능성을 유지하고, 현저한 손상없이 세포 내의 해당 야생형 아이소폼과 동일한 기능을 수행하는 능력을 보유한다.

[0136] CD45의 한 기능은 면역학적 시냅스(immunological synapse)에 내포(inclusion)됨으로써, T-세포 수용체 관여(engagement) 및 T-세포 활성화를 방지하는 것이다. 따라서, 특정 구현예에서 본 개시 내용은 그것이 필요한 환자의 의학적 치료에 사용하기 위한 표면 단백질 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 포유동물 세포 또는 세포의 집단에 관한 것이며, 상기 환자는 상기 표면 단백질의 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가지고, 상기에서 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포는 하나 이상의 다형성 또는 유전적으로 조작된 대립유전자를 가지는 유전

체 DNA를 포함하며, 상기에서 상기 다형성 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 상기 표면 단백질의 상기 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가진 환자의 유전체에 존재하지 않고, 상기에서 상기 제 1 및 제 2 아이소폼이 면역시냅스에 포함되면 T-세포 수용체 관여(engagement)를 방지한다. 바람직하게는, 상기 포유동물 세포는 인간 세포이다.

[0137] CD45의 한 기능은 표적 단백질의 탈인산화(dephosphorylation)이다. 따라서, 특정 구현예에서 본 개시 내용은 그것이 필요한 환자의 의학적 치료에 사용하기 위한 표면 단백질 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 포유동물 세포 또는 세포의 집단에 관한 것이며, 상기 환자는 상기 표면 단백질의 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가지고, 상기에서 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포는 하나 이상의 다형성 또는 유전적으로 조작된 대립유전자를 가지는 유전체 DNA를 포함하며, 상기에서 상기 다형성 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 상기 표적 단백질의 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가진 환자의 유전체에 존재하지 않고, 상기에서 상기 제 1 및 제 2 아이소폼은 CD45의 표적 단백질을 탈인산화한다. 바람직하게는 상기 포유동물 세포는 인간 세포이다.

[0138] CD45의 한 기능은 타이로신 카이네이즈(tyrosine kinase) Lck의 탈인산화이다. 따라서, 특정 구현예에서 본 개시 내용은 그것이 필요한 환자의 의학적 치료에 사용하기 위한 표면 단백질 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 포유동물 세포 또는 세포의 집단에 관한 것이며, 상기 환자는 상기 표면 단백질의 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가지고, 상기에서 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포는 하나 이상의 다형성 또는 유전적으로 조작된 대립유전자를 가지는 유전체 DNA를 포함하며, 상기에서 상기 다형성 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 상기 표면 단백질의 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가진 환자의 유전체에 존재하지 않고, 상기에서 상기 제 1 및 제 2 아이소폼은 타이로신 카이네이즈 Lck를 탈인산화한다. Lck (UniProt: P06239)는 단백질 타이로신 카이네이즈(protein tyrosine kinases, PTKs)의 Src 패밀리의 구성원이다. Lck는 발달중인 T-세포의 선별 및 성숙에 중요한 시그널링 분자이다. 바람직하게는 상기 포유동물 세포는 인간 세포이다.

[0139] CD45의 한 기능은 Y505 위치에서 타이로신 카이네이즈 Lck의 탈인산화이다. 따라서, 특정 구현예에서 본 개시 내용은 그것이 필요한 환자의 의학적 치료에 사용하기 위한 표면 단백질 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 포유동물 세포 또는 세포의 집단에 관한 것이며, 상기 환자는 상기 표면 단백질의 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가지고, 상기에서 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포는 하나 이상의 다형성 또는 유전적으로 조작된 대립유전자를 가지는 유전체 DNA를 포함하며, 상기에서 상기 다형성 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 상기 표면 단백질의 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가진 환자의 유전체에 존재하지 않고, 상기에서 상기 제 1 및 제 2 아이소폼은 타이로신 카이네이즈 Lck의 Y505 위치를 탈인산화한다. 바람직하게는 상기 포유동물 세포는 인간 세포이다.

[0140] CD45의 한 기능은 면역학적 시냅스에서 배재함으로써, TCR 시그널링 캐스케이드의 활성화를 허용하는 것이다. 따라서, 특정 구현예에서 본 개시 내용은 그것이 필요한 환자의 의학적 치료에 사용하기 위한 표면 단백질 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 포유동물 세포 또는 세포의 집단에 관한 것이며, 상기 환자는 상기 표면 단백질의 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가지고, 상기에서 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포는 하나 이상의 다형성 또는 유전적으로 조작된 대립유전자를 가지는 유전체 DNA를 포함하며, 상기에서 상기 다형성 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 상기 표면 단백질의 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가진 환자의 유전체에 존재하지 않고, 상기에서 상기 제 1 및 상기 제 2 아이소폼은 TCR 시그널링 캐스케이드를 활성화시킨다. 바람직하게는 상기 포유동물 세포는 인간 세포이다.

[0141] CD45의 한 기능은 사이토카인 생산의 증가이다. 따라서, 특정 구현예에서 본 개시 내용은 그것이 필요한 환자의 의학적 치료에 사용하기 위한 표면 단백질 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 포유동물 세포 또는 세포의 집단에 관한 것이며, 상기 환자는 상기 표면 단백질의 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가지고, 상기에서 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포는 하나 이상의 다형성 또는 유전적으로 조작된 대립유전자를 가지는 유전체 DNA를 포함하며, 상기에서 상기 다형성 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 상기 표면 단백질의 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가진 환자의 유전체에 존재하지 않고, 상기에서 상기 제 1 및 상기 제 2 아이소폼은 사이토카인 생산을 증가시킨다. 바람직하게는 상기 포유동물 세포는 인간 세포이다.

[0142] CD45의 한 기능은 T 세포의 증식의 증가이다. 따라서, 특정 구현예에서 본 개시 내용은 그것이 필요한 환자의 의학적 치료에 사용하기 위한 표면 단백질 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 포유동물 세포 또는 세포의 집단에 관한 것이며, 상기 환자는 상기 표면 단백질의 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가지고, 상기에서 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포는 하나 이상의 다형성 또는 유전적으로 조작된 대립유전자를 가지는 유전체 DNA를 포함하며, 상기에서 상기 다형성 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 상기 표면 단백질의 제 2 아이소폼을

발현하는 세포를 가진 환자의 유전체에 존재하지 않고, 상기에서 상기 제 1 및 상기 제 2 아이소폼은 T 세포의 증식을 증가시킨다. 바람직하게는 상기 포유동물 세포는 인간 세포이다.

[0143] CD45의 한 기능은 조혈 세포의 정상적인 분화이다. 이는 예를 들어, 인간화된 마우스에서, 예를 들어, 조작된 HSCs를 인간화된 마우스에 이식함으로써 시험될 수 있다. 따라서, 특정 구현예에서 본 개시 내용은 그것이 필요한 환자의 의학적 치료에 사용하기 위한 표면 단백질 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 포유동물 세포 또는 세포의 집단에 관한 것이며, 상기 환자는 상기 표면 단백질의 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가지고, 상기에서 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포는 하나 이상의 다형성 또는 유전적으로 조작된 대립유전자를 가지는 유전체 DNA를 포함하며, 상기에서 상기 다형성 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 상기 표면 단백질의 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가진 환자의 유전체에 존재하지 않고, 상기에서 상기 제 1 및 상기 제 2 아이소폼은 조혈 세포의 정상적인 분화를 유도한다. 바람직하게는 상기 포유동물 세포는 인간 세포이다.

[0144] 본 개시 내용에 따라, 본 개시 내용의 방법 및 조성물 내에 추가적인 CD45의 변이체 또는 아이소폼을 조합하는 것 또한 가능하다. 이러한 아이소폼은 예를 들어, 이중 돌연변이를 포함할 수 있다. 또한 이러한 아이소폼은 예를 들어, 단일 또는 이중 돌연변이를 포함할 수 있다. 또한 본 개시 내용의 방법 및 조성물은 CD45 녹아웃(knock out), 예를 들어 영구적(permanent) 녹아웃 또는 일시적(temporarily) 녹아웃(예를 들어, CRISPRoff를 통한)을 포함하는(carrying) 세포와 조합될 수 있다. 또한 본 개시 내용의 방법 및 조성물은 종양 반응을 향상시키기 위해 고형 종양에서 골수세포의 고갈에 사용될 수 있다.

[0145] 또한 본 개시 내용의 방법 및 조성물은, 특히 상기 표면 단백질이 CD117, CD123, DLL-1, CD33, CD7, CLEC12A, CD44, Flt, CD300F, EVI2B, TPO 및 이들의 조합과 같은 다른 표적이 녹아웃된 CD45인 경우 세포 조합(combination)과 조합될 수 있다.

[0146] 또한 본 개시 내용의 방법 및 조성물은 CD45의 제 1 아이소폼, 및 CD117 변이체, CD123 변이체, DLL-1 변이체, CD33 변이체, CD7 변이체, CLEC12A (CD371) 변이체, CD44 변이체 Flt (CD135) 변이체, CD300F 변이체, EVI2B 변이체, TPO 변이체 및 이들의 임의의 조합과 같은 다른 표면 단백질 변이체를 발현하는 세포를 포함할 수 있다.

[0147] CD45의 다형성

[0148] 본 개시 내용에 따른 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 세포는 상기 CD45 아이소폼을 암호화하는 핵산에서 하나 이상의 다형성의 대립유전자를 가진 유전체 DNA를 포함한다. 특히, 상기 다형성은 상기 제 2 아이소폼에 비교하여 특정 제제의 결합에 관련된 하나 이상의 돌연변이를 유도한다.

[0149] 상기 다형성은 바람직하게는 제 1 제제의 결합에 관련된 CD45의 표면 단백질 부위를 암호화하는 핵산 서열 내에 있으며, 바람직하게는 CD45의 세포외 부분, 특히 용매-노출된 이차 구조 요소(solvent-exposed secondary structure element)에 위치한다. 더욱 특히, 상기 다형성은 제 1 제제의 결합에 관련된 하나 이상의 특정 아미노산 잔기를 암호화하는 핵산 서열 내에 있다. 상기 다형성은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15 또는 20 개 이상의 뉴클레오타이드의 결실, 치환, 삽입, 또한 이들의 조합과 같은 돌연변이일 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 다형성은 단일염기 다형성이다.

[0150] 용어 "아이소폼"은 같은 단백질의 또 다른 변이체와 하나 이상의 아미노산 차이가 상이한 단백질의 변이체를 지칭한다. 본 개시 내용의 문맥에서 그러한 차이는 단일 아미노산의 치환일 수 있으나, 그러한 차이는 또한 이중, 삼중 또는 다중 아미노산 치환, 또는 삽입 또는 결실일 수 있다. 또한 자연 발생적(naturally occurring) SNP는 아이소폼이다.

[0151] 또한 두 아이소폼의 서열 차이가 유전적으로 도입될 수 있다. 또한 여기서 서열 차이는 바람직하게는 제 1 제제의 결합에 관련된 CD45 부위를 암호화하는 핵산 서열 내에 있으며, 바람직하게는 상기 표면 단백질의 세포외 부분, 특히 용매-노출된 이차 구조 요소에 위치한다. 더욱 특히, 상기 서열 차이는 제 1 제제의 결합에 관련된 하나 이상의 특정 아미노산 잔기를 암호화하는 핵산 서열 내에 있다. 상기 서열 차이는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15 또는 20개 이상의 뉴클레오타이드의 결실, 치환, 삽입, 또한 이들의 조합과 같은 돌연변이일 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 서열 차이는 단일 점 돌연변이(single point mutation)이다.

[0152] 본 개시 내용은 잔기 E230, N255, N257, E259, T264, N267, E269, N286, S287, D292, I328, E329, T330, F331, D334, Y340, K352, E353, E360, E364, Y372 또는 Y373의 치환을 포함하는 특정한 다형성을 포함하는 CD45에서의 다형성을 제공한다. 특정 구현예에서, 본 개시 내용은 잔기 E230, N257, E259, F331, K352 또는 E353의 치환을 포함하는 특정한 다형성을 포함하는 다형성을 포함하는 CD45에서의 다형성을 제공한다. 특정 바

람직한 다형성은 잔기 E230의 치환을 포함하며, 상기에서 E230는 K로 치환된다. 다른 바람직한 다형성은 잔기 N257의 치환을 포함하며, 상기에서 N257는 D, E, H, K, R, S, T 또는 V로 치환된다. 다른 바람직한 다형성은 잔기 F331의 치환을 포함하며, 상기에서 F331는 G로 치환된다. 다른 바람직한 다형성은 잔기 K352의 치환을 포함하며, 상기에서 K352는 H, I, L, M, N, Q, S 또는 T로 치환된다. 다른 바람직한 다형성은 E353의 치환을 포함하며, 상기에서 E353는 K 또는 R로 치환된다.

[0153] 특정 구현예에서 본 개시 내용은 변이체 CD45 폴리펩타이드에 관한 것이며, 상기에서 상기 변이체 CD45 폴리펩타이드는 야생형 인간 CD45의 E230, N257, E259, T264, N267, N286, S287, D292, I328, T330, F331, D334, Y340, K352, E353, Y372 및 Y373로부터 선택되는 아미노산에 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 바람직한 구현예에서 상기 돌연변이는 E230, N257, E259, T264, N267, N286, S287, D292, I328, T330, F331, D334, Y340, K352, E353, Y372 및 Y373로부터 선택된다.

[0154] 아미노산이 통상의 기술자에게 익숙한 3-글자 코드 또는 1-글자 코드로 지정될 수 있음이 이해될 것이다.

[0155] 표 1은 20개의 자연 발생적 아미노산을 나타낸다.

표 1

[0156]

아미노산	3문자 코드(Three letter code)	1 문자 코드
알라닌(alanine)	Ala	A
아르지닌(arginine)	Arg	R
아스파라긴(asparagine)	Asn	N
아스파르트산(aspartic acid)	Asp	D
시스테인(cysteine)	Cys	C
글루탐산(glutamic acid)	Glu	E
글루타민(glutamine)	Gln	Q
글라이신(glycine)	Gly	G
히스티딘(histidine)	His	H
아이소루신(isoleucine)	Ile	I
류틴(leucine)	Leu	L
라이신(lysine)	Lys	K
메티오닌(methionine)	Met	M
페닐알라닌(phenylalanine)	Phe	F
프롤린(proline)	Pro	P
세린(serine)	Ser	S
트레오닌(threonine)	Thr	T
트립토판(tryptophan)	Trp	W
타이로신(tyrosine)	Tyr	Y
발린(valine)	Val	V

[0157] 본 개시 내용의 실험에서 특정 잔기의 특정 변이체가 식별되었다. 실용적인 이유로 모든 가능한 변이체를 시험하는 것은 불가능하다. 그러나 식별된 변이체가 유사한 아미노산 잔기로 치환될 수 있음이 이해될 것이다. 예를 들어, 같은 효과를 가질 것으로 예상할 수 있으면, 아미노산이 또 다른 아미노산으로 대체될 수 있다. 마찬가지로 하전된(charged) 아미노산이 또 다른 하전된 아미노산으로 대체될 수 있다. 한 예로서, D 및 E 모두 산성 아미노산이기 때문에, T264E는 T264D와 동등할 것으로 예상된다.

[0158] 자연 다형성(Natural polymorphism)

[0159] 특정 구현예에서, 본 개시 내용에 따른 상기 세포는 상기 아이소폼을 암호화하는 핵산에 하나 이상의 자연 다형성 대립유전자, 바람직하게는 단일염기 다형성 (SNP)를 가진 본래의 유전체 DNA를 포함하는 대상으로부터 선택된다.

[0160] 특정 구현예에서, 세포는 바람직하게는 항-CD45 제제 결합과 관련된 CD45 부위를 암호화하는 핵산 서열에 하나 이상의 자연 다형성 대립유전자, 특히, SNP를 가지는 본래의 유전체 DNA를 포함하는 대상으로부터 선택되고, 바람직하게는 상기 표면 단백질의 세포외 부분, 더욱 바람직하게는 용매-노출된 이차 구조 요소에 위치한다.

[0161] 특정한 자연 발생적 SNPs는 문헌에 기술되어 있다. 이들 천연 SNPs는 또 다른 CD45의 아이소폼으로부터 이러한 SNP를 식별할 수 있는 각각의 결합제(binding agent)와 함께 본 개시 내용의 핵심 내에서 사용될 수 있다.

[0162] 인간 CD45의 일부 자연 발생적 SNPs를 표 2에 표시된다. 자연 발생 SNP의 목록은 하기에서도 찾을 수 있다:
https://gnomad.broadinstitute.org/gene/ENSG00000081237?dataset=gnomad_r2_1

표 2

야생형	위치	돌연변이	rsIDs
Thr	262	Ile	rs1298769494
Asn	284	Asp	rs199673441
Ile	294	Leu	rs2230606
Ile	326	Val	rs41314039
Glu	327	Lys	rs2274367
Thr	330	Ile	rs148025707
Asn	349	Ser	rs79141749
Asp	431	Asn	rs140403368
Leu	439	Leu	rs375608198
Lys	479	Glu	rs61749266
Arg	509	Cys	rs746951007
Leu	526	Leu	rs148497366
Asp	536	Asn	rs144856406
Arg	538	His	rs140422357
Asp	558	Asn	rs760244730
Glu	562	Asp	rs774053060

[0163]

[0164] 유전자 편집(Gene editing)

[0165] 또 다른 특정 구현예에서, 본 개시 내용에 따른 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포는 유전자 편집, 환자의 본래의 유전체 DNA에서 상기 표면 단백질을 암호화하는 서열을 변경(change)함으로써 의해 얻는다.

[0166] 표면 단백질의 아미노산의 삽입, 결실 및/또는 치환을 초래하는 상기 다형성을 유도하기 위해 세포는 유전자 편집 시스템을 세포에 도입함으로써 유전적으로 조작될 수 있다. 상기 유전자 편집 양상(modality)은 상기한 바와 같이 제 1 체제 결합에 관련된 표면 단백질 부위를 암호화하는 표적 서열로 본 발명에서 명명된 핵산 서열을 표적화한다. 특히, 상기 표면 단백질이 CD45인 경우, 상기 유전자 편집 양상은 서열번호 1의 E230, Y232, N255, N257, E259, T264, N267, E269, N286, S287, D292, I328, T330, F331, D334, Y340, K352, E353, E360, E364, Y372 또는 Y373 위치에 있는 하나 이상의 아미노산 잔기를 암호화하는 핵산을 표적화한다. 바람직하게는 아미노산 잔기 E230는 K로 치환되며, 및/또는 잔기 Y232는 C로 치환되고, 및/또는 잔기 N257는 A, D, E, H, K, R, S, T 또는 V로 치환되며, 및/또는 잔기 E259는 H, K, N, V, G, R, T 또는 Q로 치환되고, 및/또는 잔기 T264는 D 또는 E로 치환되며, 및/또는 잔기 N267는 A, H, L, S 또는 V로 치환되고, 및/또는 잔기 N286는 D, G, L 또는 R로 치환되며, 및/또는 잔기 E329는 A로 치환되고, 및/또는 잔기 F331은 A 또는 G로 치환되며, 및/또는 잔기 Y340은 A, G, N, Q 또는 S로 치환되고, 및/또는 잔기 K352는 A, D, E, G, H, I, L, M, N, Q, S, T 또는 Y로 치환되며, 및/또는 잔기 E353은 A, H, I, K, L, S, T 또는 R로 치환된다. 유전자 편집 효소는 서열-특이적 뉴클레아제(sequence-specific nucleases), 염기 편집기(base editors), 프라임 편집기(prime editors) 또는 CRISPR-

트랜스포존(CRISPR-transposon) 기반 시스템일 수 있다..

- [0167] 용어 "**뉴클레아제(nuclease)**"는 핵산 (DNA 또는 RNA) 분자, 바람직하게는 DNA 분자의 뉴클레오타이드 사이의 포스포디에스터(phosphodiester) 결합의 가수분해 (절단)를 촉매할 수 있는 야생형 또는 변이체 효소를 지칭한다. "**절단(cleavage)**"이란 이중-가닥 절단(double-strand break) 또는 단일-가닥 절단(single-strand break) 경우를 의미한다.
- [0168] 용어 "**서열-특이적 뉴클레아제**"는 서열-특이적 방식으로 핵산을 절단하는 뉴클레아제를 지칭한다. 메가뉴클레아제(Meganucleases), TAL-뉴클레아제 (TALEN), 징크-핑거 뉴클레아제 (ZFN), 또는 CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas 시스템 및 아르고너트(Argonaute)와 같은 RNA/DNA 가이드 엔도뉴클레아제(RNA/DNA guided endonucleases)와 같은 다른 유형의 위치-특이적 뉴클레아제가 사용될 수 있다 (Review in Li et al., Nature Signal transduction and targeted Therapy, 5, 2020; Guha et al., Computational and Structural Biotechnology Journal, 2017, 15, 146-160).
- [0169] 본 개시 내용에 따르면, 뉴클레아제는 표적 서열 내에 DNA 절단을 생성하고, 상기 표적 서열은 상기한 바와 같이 제 1 제제 결합에 관련된 표면 단백질 부위를 암호화한다. 특정 구현예에서, 본 발명자들은 상기한 바와 같이 제 1 제제에 의해 인식되는 표면 단백질 부위를 암호화하는 표적 서열 내에서 절단을 유도하기 위해 CRISPR 시스템을 사용한다.
- [0170] "**표적 서열**"이란, 상기한 바와 같이 제 1 제제 결합과 관련된 CD45 상의 부위를 암호화하는 서열의 일부 및/또는 제 1 제제 결합과 관련된 CD45 상의 상기 부위에 인접한 서열, 특히 제 1 제제 결합과 관련된 CD45 상의 상기 부위에 인접한 최대 50개의 뉴클레오타이드의 하나 이상의 (하나 또는 둘) 서열, 바람직하게는 상기 제제 결합 부위에 인접한 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6 또는 5 개의 뉴클레오타이드를 표적화하는 것을 의미한다.
- [0171] CRISPR 시스템은 둘 이상의 요소, Cas 단백질 (CRISPR-연관 단백질(CRISPR-associated protein)) 및 가이드 RNA(guide RNA)를 포함한다. 가이드 RNA는 단일 가이드 RNA 또는 이중(dual) 가이드 RNA일 수 있다. Cas 단백질은 인식을 가이드하는 가이드 RNA 서열을 사용하여 표적 서열에 상보적인 DNA에 이중-가닥 절단을 생성하는 DNA 엔도뉴클레아제이다. 단일 가닥 절단을 생성하는 Cas 시스템은 오직 하나의 뉴클레아제 도메인을 필요로 한다. 이중 가닥 절단을 생성하는 Cas 시스템은 두 개의 뉴클레아제 도메인을 필요로 한다. Cas 단백질은 HNH 뉴클레아제 도메인 및 RuvC-유사 뉴클레아제 도메인과 같은 두 개의 활성 절단 부위(active cutting site)를 포함할 수 있다.
- [0172] 또한 Cas 단백질이란 조작된 엔도뉴클레아제, 표적 핵산 서열을 절단할 수 있는 Cas 9의 상동체(homologue) 또는 동원체(orthologue)를 의미한다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 이중-가닥 절단 또는 단일-가닥 절단에 해당할 수 있는 핵산 표적 서열에 절단을 유도할 수 있다. Cas 단백질 변이체는 자연에 자연적으로 존재하지 않는 Cas 엔도뉴클레아제일 수 있으며, 단백질 조작 또는 무작위 돌연변이 유발(mutagenesis)에 의해 얻을 수 있다. Cas 단백질은 통상의 기술 분야에 공지된 Cas 단백질 중 한 유형일 수 있다. Cas 단백질의 비제한적인 예는 Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (Csn1 및 Csx12로도 알려진), SaCas9, Cas12, Cas12a (Cpf1), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cnrr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, CsxM, Csx 10, Cs 16, CsaX, Csx3, Cs 1, Csx15, Csf1, Csf2, Cs0, Csf4, 상동체(homologs), 이의 동원체(orthologs), 또는 이의 변형된 버전을 포함한다. 바람직하게는 Cas 단백질은 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) Cas 9 단백질이다.
- [0173] 상기 표적 서열 내에 DNA 절단을 특이적으로 유도하기 위해 Cas는 표적 서열에 대한 상보적 서열, 특히 본 개시 내용에 따르면 상기한 바와 같이 제제에 의해 인식되는 표면 단백질 부위를 암호화하는 표적 서열의 일부의 상보적인 서열을 포함하도록 설계된 가이드 RNA (gRNA)와 접촉한다.
- [0174] 본 발명에서 사용된 바와 같이, "**가이드(guide) RNA**", "**gRNA**", "**sgRNA**" 또는 "**단일 가이드(single guide) RNA**"는 표적 핵산에 대한 gRNA/Cas 복합체(complex)를 특이적 표적화 또는 호밍(homing)을 촉진하는 핵산을 지칭한다.
- [0175] 특히, gRNA는 전사촉진 crRNA (transactivating crRNA, tracrRNA) 및 crRNA를 포함하는 RNA를 지칭한다. 바람직하게는, 상기 가이드 RNA는 개별적으로 사용되거나 함께 융합되어 단일 가이드 RNA를 생성할 수 있는 crRNA 및 tracrRNA에 해당한다. 표적 서열과 쌍을 이루는 상보적 서열은 Cas를 모집하여 표적 서열에 결합하고 DNA를 절단한다.
- [0176] 본 개시 내용에 따르면, 상기 부위를 표적화할 수 있도록 crRNA는 상기한 바와 같이 제제에 의해 인식되는 표면

단백질 부위를 암호화하는 표적 서열의 일부에 대한 상보적 서열을 포함하기 위해 조작된다. 바람직한 구현예에서 sgRNA는 상기 결합체의 결합 부위를 표적화하는데 사용된다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 가이드 RNA는 통상의 기술자에게 공지된 화학적 변형을 함유한다.

- [0177] 특정 구현예에서, crRNA는 표적 서열에 상보적인 5 내지 50개의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 15 내지 30개의 뉴클레오타이드, 더욱 바람직하게는 20개의 뉴클레오타이드의 서열을 포함한다. 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "**상보적(complementary sequence) 서열**"은 표준 낮은 엄격한 조건(standard low stringent conditions) 하에서 폴리뉴클레오타이드의 또 다른 부분에 혼성화(hybridize)할 수 있는 폴리뉴클레오타이드의 서열 부분 (예를 들어, crRNA 또는 tracrRNA의 부분)을 지칭한다. 우선적으로, 서열은 가닥 간의 Watson-Crick 염기쌍, 즉, 아데닌 및 티민 (A-T) 뉴클레오타이드 및 구아닌 및 시토신 (G-C) 뉴클레오타이드 간의 고유한 염기쌍에 의존한 두 핵산 가닥 간의 상보성에 따라 서로 상보적이다. 상기 gRNA는 본 개시 내용을 고려하여 통상의 기술자에게 공지된 임의의 방법으로 설계될 수 있다.
- [0178] 본 개시 내용에 따른 상기 표적 서열은 제 1 제제 결합과 관련된 CD45 상의 표면 단백질 부위를 암호화하고, 바람직하게는 CD45의 세포외 부위, 더욱 바람직하게는 상기 제 2 아이소폼에 비해 세포외 루프(extracellular loop)에 위치하며, 다시 더욱 바람직하게는 제제 결합에 관련된 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0179] 바람직한 구현예에서, 표면 단백질이 CD45인 경우, 상기 기술된 바와 같이 상기 표적 서열은 항-CD45 제제와 같은 제 1 제제의 결합과 관련된 CD45 부위를 암호화한다. 바람직하게는 상기 표적 서열은 서열번호 1의 E230, Y232, N255, N257, E259, T264, N267, E269, N286, S287, D292, I328, T330, F331, D334, Y340, K352, E353, E360, E364, Y372 또는 Y373 위치에 있는 하나 이상의 잔기를 암호화한다.
- [0180] 개시 내용에 따라 뉴클레아제에 의해 도입되는 DNA 가닥 절단은 종종 상동 지정 복구 (homology-directed repair, HDR)를 통해 절단 위치 주변의 DNA의 적은(small) 삽입 및/또는 결실 또는 대체를 초래하는 비-상동말 단접합(non-homologous end joining, NHEJ)을 통해 절단 위치에 DNA의 돌연변이를 초래할 수 있다.
- [0181] 바람직한 구현예에서, CD45의 아이소폼을 암호화하는 핵산 내의 상기 다형성은 DNA 절단 및 본 발명에서 HDR 주형으로 명명된 외인성(exogenous) 뉴클레오타이드 서열의 도입 후 HDR 수선(repair)을 통해 유도된다.
- [0182] HDR 주형은 표적 서열의 5' 및 3' 부위에 각각 상동성인 서열의 제 1 및 제 2 부분 및 다형성을 포함하는 중간 서열 부분을 포함한다. 표적 서열의 절단 후, 상동성 재조합 사건이 표적 서열 및 HDR 주형을 함유하는 유전체(genome) 간에 달성되며, 표적 서열을 함유하는 유전체(genomic) 서열은 외인성 서열로 대체된다.
- [0183] 바람직하게는, 20 bp 이상의(at least), 바람직하게는 30 bp이상의(more than), 더욱 바람직하게는 50 bp 이상의 및 가장 바람직하게는 200 bp 미만의 상동 서열이 사용된다. 상동 서열은 dsDNA 또는 ssDNA 일 수 있다. 바람직하게는 상동 서열은 ds DNA이다. 실제로, 공유된 DNA 상동성은 절단 위치의 플랭킹(flancking) 상류 및 하류 부위에 위치하고, 도입될 외인성 서열은 두 암(arms) 사이에 위치해야 한다. 플랭킹 서열은 대칭적(symmetrical) 또는 비대칭적(asymmetrical)일 수 있다. 표적 핵산의 두 가닥, 즉, 플러스 가닥 또는 마이너스 가닥이 표적화될 수 있다. 임의로, PAM 서열이 사용될 수 있으며, 이는 HDR을 개선하기 위해 침묵될(silenced) 수 있다.
- [0184] 바람직한 구현예에서, 본 개시 내용에 따른 세포는 상기 세포에 상기한 바와 같이 상기 제 1 제제에 의해 인식되는 CD45 상의 부위를 암호화하는 서열 및 HDR 주형을 표적화하는 상기 위치-특이적 뉴클레아제를 도입함으로써 유전적으로 조작된다.
- [0185] 또 다른 특정 구현예에서, 상기 유전자 편집 효소는 Komor et al., Nature 533, 420-424, 및 in Rees HA, Liu DR. Nat Rev Genet. 2018;19: 770-788에 기재된 바와 같은 DNA 기반 편집기, 또는 Anzalone et al. Nature, 2019, 576: 149-157, Matsoukas et al., Front Genet. (2020) 11: 528, Chen et al. Cell (2021) 184: 5635-52, Koblan et al, Nat Biotechnol (2021) 39: 1414-25 및 Kantor A. et al. Int. J. Mol. Sci. 2020, 21(6240)에 기재된 바와 같은 프라임 편집기다. 염기 편집기 또는 프라임 편집기가 표적 서열의 특정 위치에 돌연변이를 도입하는데 사용될 수 있다.
- [0186] 본 개시 내용에 따르면, 염기 편집기 또는 프라임 편집기는 제1 제제 결합과 관련된 CD45 상의 부위를 암호화하는 서열을 서열-특이적 표적화함으로써 표적 서열 내에 돌연변이를 생성한다.
- [0187] 특히, 상기 염기 편집기 또는 프라임 편집기는 CRISPR 염기 또는 프라임 편집기다. 상기 CRISPR 염기 또는 프라임 편집기는 촉매적으로 불활성인 서열 특이적 뉴클레아제로서 비활성 Cas 단백질 (dead Cas protein, dCas)을

포함할 수 있다. 또한 이는 돌연변이된 뉴클레아제 도메인을 가지는 Cas9를 포함할 수 있다. dCas는 엔도뉴클레아제(endonucleolytic) 활성이 결여된 변형된 Cas 뉴클레아제를 지칭한다. 뉴클레아제 활성은 Cas 단백질의 HNH 및/또는 RuvC-유사 촉매 도메인에서의 하나 이상의 돌연변이 및/또는 하나 이상의 결실에 의해 dCas 단백질에서 억제 또는 방지될 수 있다. 그 결과로 발생한 dCas 단백질은 뉴클레아제 활성이 결여되나, 특정 표적 서열에 높은 특이성 및 효율로 가이드 RNA (gRNA)-DNA 복합체에 결합한다. 특정 구현예에서, 상기 dCas는 Cas의 한 촉매 도메인이 억제 또는 방지된 니케이즈(nickase)일 수 있다.

[0188] 상기한 바와 같이 상기 표적 서열에 특이적으로 결합하기 위해 상기 염기 편집기는 표적 핵산 서열의 상보적 서열을 포함하도록 설계된 가이드 RNA (gRNA)와 복합체를 형성한다.

[0189] 상기 gRNA는 본 개시 내용을 고려하여 통상의 기술자에게 공지된 임의의 방법으로 설계될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 gRNA는 상기한 바와 같이 상기 제 1 체제에 의해 인식되는 CD45 상의 부위를 암호화하는 서열을 표적화할 수 있다.

[0190] 비 제한적인 예로서 상기 염기 편집기는 비활성 Cas 단백질, 특히, Cas 니케이즈에 융합된 뉴클레오타이드 디아미네이즈 도메인(nucleotide deaminase domain)이다. 상기 뉴클레오타이드 디아미네이즈는 아데노신 디아미네이즈(adenosine deaminase) 또는 시티딘 디아미네이즈(cytidine deaminase)일 수 있다. 상기 뉴클레오타이드 디아미네이즈는 자연 또는 조작된 디아미네이즈일 수 있다.

[0191] 특정 구현예에서, 상기 염기 편집기는 하기로 구성되는 군으로부터 선택된 비제한적인 예일 수 있다: BE1, BE2, BE3, BE4, HF-BE3, Sa-BE3, Sa-BE4, BE4-Gam, saBE4-Gam, YE1-BE3, EE-BE3, YE2-BE3, YEE-BE3, VQR-BE3, VRER-BE3, SaKKH-BE3, cas12a-BE, Target-AID, Target-AID-NG, xBE3, eA3A-BE3, A3A-BE3, BE-PLUS, TAM, CRIPS-X, ABE7.9, ABE7.10, ABE7.10* xABE, ABESa, ABEmax, ABE8e, VQR-ABE, VRER-ABE 및 SaKKH-ABE.

[0192] 상기 프라임 편집기는 상기한 바와 같은 촉매적으로 불활성인 서열 특이적 뉴클레아제, 특히, Cas 니케이즈 및 촉매적으로 활성인 조작된 역전사효소 (reverse transcriptase, RT) 효소의 융합으로 구성된다. 상기 융합 단백질은 상기한 바와 같이 표적 서열에 상보적인 서열을 함유하고, 특히, 표면 단백질이 CD45인 경우, 표 13에 기재된 서열 중 하나를 포함하는 프라임 편집 가이드 (pegRNA) 및 또한 DNA 상의 프라이머 결합 위치 부위에 결합하는 서열을 포함하는 추가적인 서열과 조합되어 사용된다. 특정 구현예에서, 상기 역전사효소 효소는 말로니 쥐 백혈병 바이러스(Maloney murine leukemia virus) RT 효소 및 이의 변이체이다. 상기 프라임 편집기는 PE1, PE2, PE3 및 PE3b로 구성되는 군으로부터 선택된 비제한적인 예, 또는 Chen et al. Cell (2021) 184: 5635-52 또는 Koblan et al, Nat Biotechnol (2021) 39: 1414-25에 기재된 임의의 프라임 편집기일 수 있다.

[0193] **항-CD45 제제(agents)**

[0194] 여러 항-CD45 모이어티가 통상의 기술분야에 공지되어 있으며, 이들 중 일부는 현재 개발중이다. QA17A19 (Biolegend, #393411) 및 HI30 (Biolegend, #304001)은 시판되는(commmercially available) 마우스 항-인간 CD45 항체이다. Magenta의 다양한 항-CD45 항체가 개발중이며, 대부분 항체 약물 접합체(antibody drug conjugates)로 개발중이다 (예를 들어, W02017219025, W02020092654). BC8는 IchorBio의 시판되는 마우스 하이브리도마 항체이다 (#ICH1155). BC8 항체는 Actinium Pharmaceuticals에 의해 개발된 항-CD45 항체-동위원소 접합체의 기반이다 (W02017155937, W02019084258, W02020159656). 다른 항-CD45 항체는 W02016016442, W02019115791 및 W02020058495 (INSERM), W02017009473 (UCB), W02019129178 (Shanghai Baize Medical Laboratory), W02020018580 (Fred Hutchinson) 및 W02020170254 (Ramot At Tel Aviv University)에 개시된다. 이들 및 다른 항-CD45 모이어티는 본 개시 내용의 문맥에서 사용될 수 있다. 또한 본 개시 내용에서 여러 항-CD45 항체가 전장의 항체 포맷, 및 Fab 포맷으로 생성되었다. 세부 사항은 실시예 1에 제공된다.

[0195] 특정 구현예에서, 상기 기술된 바와 같이 CD45의 상기 제 2 아이소폼에는 결합하고, CD45의 상기 제 1 아이소폼에는 결합하지 않거나 실질적으로 더 약하게 결합하는 상기 고갈제는 서열번호 1의 아미노산 E230, Y232, N255, N257, E259, T264, N267, E269, N286, S287, D292, I328, T330, F331, D334, Y340, K352, E353, E360, E364, Y372 및/또는 Y373를 포함하는 에피토프에 특이적으로 결합한다. 더욱 바람직하게는, 상기 고갈제는 서열번호 1의 아미노산 N286, F331, K352 및/또는 E353을 포함하는 에피토프에 특이적으로 결합한다. 다른 바람직한 구현예에서 상기 고갈제는 서열번호 1의 아미노산 E230, Y232, N257 및/또는 E259를 포함하는 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0196] 바람직한 구현예에서, 상기 항-CD45 제제는 하기의 항원 결합 부위를 포함한다:

[0197] a) 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 4, VHCDR2는 서열번호

호 5 및 VHCDR3는 서열번호 6인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및

- [0198] b) 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 7, VLCDR2는 서열번호 8 및 VLCDR3는 서열번호 9인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL).
- [0199] 바람직한 구현예에서, 상기 항-CD45 제제는 하기의 항원 결합 부위를 포함한다:
- [0200] a) 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 4, VHCDR2는 서열번호 5 및 VHCDR3는 서열번호 6인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및
- [0201] b) 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 60, VLCDR2는 서열번호 61 및 VLCDR3는 서열번호 9인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL).
- [0202] 바람직한 구현예에서, 상기 항-CD45 제제는 하기를 포함하는 항체로부터 유래하고 이의 결합 특이성이 유지된 항원 결합 부위를 포함한다:
- [0203] a) 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 4, VHCDR2는 서열번호 5 및 VHCDR3는 서열번호 6인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및
- [0204] b) 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 7, VLCDR2는 서열번호 8 및 VLCDR3는 서열번호 9인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL).
- [0205] 바람직한 구현예에서, 상기 항-CD45 제제는 하기를 포함하는 항체로부터 유래하고 이의 결합 특이성이 유지된 항원 결합 부위를 포함한다:
- [0206] a) 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 4, VHCDR2는 서열번호 5 및 VHCDR3는 서열번호 6인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및
- [0207] b) 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 60, VLCDR2는 서열번호 61 및 VLCDR3는 서열번호 9인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL).
- [0208] 바람직한 구현예에서, 상기 항-CD45 제제는 하기를 포함하는 항체로부터 유래하고 이와 결합하는 항원 결합 부위를 포함한다:
- [0209] a) 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 4, VHCDR2는 서열번호 5 및 VHCDR3는 서열번호 6인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및
- [0210] b) 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 7, VLCDR2는 서열번호 8 및 VLCDR3는 서열번호 9인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL).
- [0211] 바람직한 구현예에서, 상기 항-CD45 제제는 하기를 포함하는 항체로부터 유래하고 이와 결합하는 항원 결합 부위를 포함한다:
- [0212] a) 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 4, VHCDR2는 서열번호 5 및 VHCDR3는 서열번호 6인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및
- [0213] b) 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 60, VLCDR2는 서열번호 61 및 VLCDR3는 서열번호 9인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL).
- [0214] 또 다른 바람직한 구현예에서, 상기 항-CD45 제제는 하기를 포함하는 항원 결합 부위를 포함한다:
- [0215] a) 서열번호 2의 가변 중쇄(variable heavy chain)를 포함하는 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및
- [0216] b) 서열번호 3의 가변 경쇄를 포함하는 항체 경쇄 가변 도메인 (VL).
- [0217] 또 다른 바람직한 구현예에서, 상기 항-CD45 제제는 하기를 포함하는 항원 결합 부위를 포함한다:
- [0218] a) 서열번호 58의 가변 중쇄를 포함하는 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및
- [0219] b) 서열번호 59의 가변 경쇄를 포함하는 항체 경쇄 가변 도메인 (VL).
- [0220] 또 다른 바람직한 구현예에서, 상기 항-CD45 제제는 하기를 포함하는 항원 결합 부위를 포함한다:
- [0221] a) 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 12, VHCDR2는 서열번호

호 13 및 VHCDR3는 서열번호 14인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및

- [0222] b) 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 15, VLCDR2는 서열번호 16 및 VLCDR3는 서열번호 17인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL).
- [0223] 또 다른 바람직한 구현예에서, 상기 항-CD45 제제는 하기를 포함하는 항원 결합 부위를 포함한다:
- [0224] a) 서열번호 10의 가변 중쇄를 포함하는 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및
- [0225] b) 서열번호 11의 가변 경쇄를 포함하는 항체 경쇄 가변 도메인 (VL).
- [0226] 또 다른 바람직한 구현예에서, 상기 항-CD45 제제는 하기를 포함하는 항원 결합 부위를 포함한다:
- [0227] a) 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 20, VHCDR2는 서열번호 21 및 VHCDR3는 서열번호 22인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및
- [0228] b) 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 23, VLCDR2는 서열번호 24 및 VLCDR3는 서열번호 25인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL).
- [0229] 또 다른 바람직한 구현예에서, 상기 항-CD45 제제는 하기를 포함하는 항원 결합 부위를 포함한다:
- [0230] a) 서열번호 18의 가변 중쇄를 포함하는 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및
- [0231] b) 서열번호 19의 가변 경쇄를 포함하는 항체 경쇄 가변 도메인 (VL).
- [0232] 또 다른 바람직한 구현예에서, 상기 항-CD45 제제는 Refmab #1, Refmab #2, Refmab #3, Refmab #4 및 Refmab #5로부터 선택된 항체이다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 상기 항-CD45 제제는 QA17A19 (Biolegend, #393411), BC8 (IchorBio; #ICH1155), AbA (WO2020092654A1, SEQ ID NO 1 & 5), HI30 (Biolegend, #304001) 및 2D1 (R&D Systems, #MAB1430)로부터 선택된 항체이다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 상기 항-CD45 제제는 QA17A19 (Biolegend, #393411), BC8 (IchorBio; #ICH1155), AbA (WO2020092654A1, SEQ ID NO 1 & 5), HI30 (Biolegend, #304001) 및 2D1 (R&D Systems, #MAB1430)로부터 선택되는 항체의 CDR을 포함하는 항체이다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 상기 항-CD45 제제는 CD45에 결합하기 위해 QA17A19 (Biolegend, #393411), BC8 (IchorBio; #ICH1155), AbA (WO2020092654A1, SEQ ID NO 1 & 5), HI30 (Biolegend, #304001) 및 2D1 (R&D Systems, #MAB1430)로부터 선택되는 항체와 경쟁하는 항체이다.
- [0233] 특정 바람직한 구현예에서, 상기 고갈제는 QA17A19 (Biolegend, #393411; Refmab #1)이거나 이로부터 유래되며, 상기에서 상기 고갈제는 CD45의 한 아이소폼에 결합하나 CD45의 두 번째 아이소폼에는 결합하지 않거나 실질적으로 약하게 결합하고, 상기에서 상기 아이소폼 중 하나는 야생형 CD45이고 다른 아이소폼은 다음 중 하나 이상의 CD45의 아미노산 잔기에 돌연변이를 가진다: F331, K352 및 E353. 바람직하게는 상기 돌연변이는 다음 중 하나 이상을 포함한다: F331G, K352H, K352E, K352D, K352I, K352L, K352M, K352N, K352Q, K352S, K352T, E353K 또는 E353R.
- [0234] 특정 바람직한 구현예에서, 상기 고갈제는 AbA (WO2020092654A1, SEQ ID NO 1 & 5; Refmab #2)이거나 이로부터 유래되고, 상기에서 상기 고갈제는 CD45의 한 아이소폼에 결합하나, CD45의 두 번째 아이소폼에는 결합하지 않거나 실질적으로 약하게 결합하며, 상기에서 상기 아이소폼 중 하나는 야생형 CD45이고, 다른 아이소폼은 CD45의 아미노산 잔기 N257에 돌연변이를 가진다. 바람직하게는 상기 돌연변이는 N257D, N257E, N257K, N257R 또는 N257T이다.
- [0235] 특정 바람직한 구현예에서, 상기 고갈제 BC8 (IchorBio; #ICH1155; Refmab #4)이거나 이로부터 유래되고, 상기에서 상기 고갈제는 CD45의 한 아이소폼에 결합하나, CD45의 두 번째 아이소폼에는 결합하지 않거나 실질적으로 약하게 결합하며, 상기에서 상기 아이소폼 중 하나는 야생형 CD45이고, 다른 아이소폼은 다음 중 하나 이상의 CD45의 아미노산 잔기에 돌연변이를 가진다: E230, N257, E259, T264, N267, N286, S287, D292, F331, D334, Y340, K352, E353 및 Y373. 바람직하게는 상기 돌연변이는 다음 중 하나 이상을 포함한다: E230K, N257T, N257H, N257R, N257S, N257V, E259G, E259N 또는 E259Q.
- [0236] 항-CD45 항체의 항원-결합 부위가 상기 정의된 바와 같은 이들의 결합 특성에 대해 추가로 스크리닝되거나 최적화되는 것이 추가로 고려된다. 특히, 이의 상기 항원 결합 부위가 본 발명에서 제공된 단일 클론 항체의 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 CDR의 아미노산 서열에서 1, 2, 3, 4, 5, 6개, 또는 그 이상의 변경을 가질 수 있음이 고려된다. 항원 결합 부위의 경쇄 또는 중쇄 가변 부위의 VJ 또는 VDJ 부위의 CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5, 또

는 CDR6의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 위치에 있는 아미노산은 보존된(conserved) 또는 비-보존된(non-conserved) 아미노산으로 삽입, 결실, 또는 치환될 수 있음이 고려된다. 치환되거나 치환을 구성(constitute)하는 이러한 아미노산은 상기에 기술되어 있다.

- [0237] 일부 구현예에서, 아미노산 차이는 보존적 치환(conservative 치환), 즉, 한 아미노산이 유사한 화학적 또는 물리적 특성 (크기, 전하 또는 극성)을 가지는 또 다른 아미노산으로의 치환이며, 이러한 치환은 일반적으로 CD45 단백질의 생화학적, 생물물리학적 및/또는 생물학적 특성에 악영향을 주지 않는다. 특히, 치환은 항체와 CD45 항원의 상호작용을 방해하지 않는다. 상기 보존적 치환(들)은 바람직하게 하기의 5가지 그룹 중 하나 내에서 선택된다: 그룹 1-작은 지방족(small aliphatic), 비-극성(non-polar) 또는 약한 극성 잔기들 (A, S, T, P, G); 그룹 2-극성, 음전하 잔기 및 이들의 아마이드(amides) (D, N, E, Q); 그룹 3-극성, 양전하 잔기 (H, R, K); 그룹 4-큰 지방족, 비극성 잔기 (M, L, I, V, C); 및 그룹 5-큰, 방향족(aromatic) 잔기 (F, Y, W).
- [0238] 더 특정한 구현예에서, 상기 제 1 항원-결합 부위는 서열번호 2, 10, 18 및 58로부터 선택된 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열번호 3, 11, 19 및 59로부터 선택된 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0239] 또한 상기 정의된 아미노산 서열 중 어느 하나와 90% 이상, 예를 들어, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 가지는 이의 상기 제 1 항원 결합 부위도 본 개시 내용의 일부이며, 일반적으로 제 1 항원 결합 부위는 서열번호 2, 10, 18 및 58로부터 선택되는 아미노산 서열 중 어느 하나로 구성되는 중쇄 및/또는 서열번호 3, 11, 19 및 59로부터 선택된 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인으로 구성되는 상기 제 1 항원 결합 부위와 적어도 동등하거나 더 높은 결합 활성을 가진다.
- [0240] 특정 구현예에서, 상기 항-CD45 제제는 CD45, 예를 들어, 본 발명에 기술된 바와 같은 항-CD45의 하나의 항원-결합 부위에 대한 하나 이상의 제 1 결합 특이성 및 제 2 표적 에피토프 또는 표적 항원에 대한 제 2 결합 특이성을 포함하는 이중특이적 CD45 항체일 수 있다.
- [0241] 본 개시 내용에 따르면, 상기 항-CD45 제제는 CD45를 표적화하는 CAR, 상기한 바와 같은 항원 결합 부위를 포함하는 상기 항원 수용체와 같은 CD45를 표적화하는 항원 수용체를 보유한 면역 세포일 수 있다.
- [0242] 구체적인 구현예에서, CD45를 표적화하는 CAR를 보유하는 상기 면역 세포 (예를 들어, T 세포)는 그것이 필요한 환자에서 발현된 CD45의 제 2 아이소폼을 인식하고, CD45의 제 1 아이소폼은 인식하지 않는다. 특히 상기 면역 세포는 서열번호 1의 아미노산 E230, Y232, N255, N257, E259, T264, N267, E269, N286, S287, D292, I328, T330, F331, D334, Y340, K352, E353, E360, E364, Y372 또는 Y373을 포함하는 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다. 더욱 바람직하게는, 상기 면역 세포는 서열번호 1의 아미노산 E73, V120, D121, R122, S123, K127, K193, S239, Y259 및/또는 S261를 포함하는 에피토프에 특이적으로 결합한다. 더 더욱 바람직하게는, 상기 면역 세포는 서열번호 1의 아미노산 N286, F331, K352 또는 E353를 포함하는 에피토프에 특이적으로 결합한다.
- [0243] 구체적인 구현예에서, 상기 항-CD45 제제는 하기를 포함하는 항원-결합 부위, 예를 들어, scFv를 포함하는 CAR를 보유하는 면역 세포 (예를 들어, T 세포)일 수 있다
- [0244] a) 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 4, VHCDR2는 서열번호 5 및 VHCDR3는 서열번호 6인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및
- [0245] b) 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 8, VLCDR2는 서열번호 9 및 VLCDR3는 서열번호 10인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL).
- [0246] 구체적인 구현예에서, 상기 항-CD45 제제는 하기를 포함하는 항원-결합 부위, 예를 들어, scFv를 포함하는 CAR를 보유하는 면역 세포 (예를 들어, T 세포) 일 수 있다
- [0247] a) 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 4, VHCDR2는 서열번호 5 및 VHCDR3는 서열번호 6인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및
- [0248] b) 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 60, VLCDR2는 서열번호 61 및 VLCDR3는 서열번호 9인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL).
- [0249] 더 특정한 구현예에서, 상기 항-CD45 제제는 상기 제 1 항원-결합 부위, 예를 들어, 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 scFv를 포함하는 CAR를 보유하는 면역 세포 (예를 들어, T 세포)일 수 있다.

- [0250] 또 다른 더욱 특정한 구현예에서, 상기 항-CD45 제제는 상기 제 1 항원-결합 부위, 예를 들어, 서열번호 58의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열번호 59의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 scFv를 포함하는 CAR를 보유하는 면역 세포 (예를 들어, T 세포)일 수 있다.
- [0251] 본 개시 내용에 따르면, 상기 항-CD45 제제는 특정 CD45의 아이소폼을 표적화하는 CAR와 같은 CD45를 표적화하는 항원 수용체를 보유하는 면역 세포일 수 있으며, 상기 항원 수용체는 상기한 바와 같이 항원 결합 부위를 포함하고 상기 면역 세포는 CD45를 발현하지 않거나 상기 CAR에 의해 인식되지 않는 CD45의 아이소폼을 발현한다.
- [0252] 구체적인 구현예에서, 상기 항-CD45 제제는 하기를 포함하는 항원-결합 부위, 예를 들어, scFv를 포함하는 특정 CD45의 아이소폼을 표적화하는 CAR를 보유하는 면역 세포 (예를 들어, T 세포)일 수 있으며:
- [0253] a) 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 12, VHCDR2는 서열번호 13 및 VHCDR3는 서열번호 14인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및
- [0254] b) 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 15, VLCDR2는 서열번호 16 및 VLCDR3는 서열번호 17인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL);
- [0255] 및 상기 면역 세포는 CD45를 발현하지 않거나 상기 CAR에 의해 인식되지 않는 CD45의 아이소폼을 발현한다.
- [0256] 보다 특정한 실시예에서, 상기 항-CD45 제제는 상기 제 1 항원-결합 부위, 예를 들어, 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 11의 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 scFv를 포함하는 CAR를 보유하는 면역 세포 (예를 들어, T 세포)일 수 있고, 상기 면역 세포는 상기 CAR에 의해 인식되지 않는 CD45의 아이소폼을 발현한다.
- [0257] 더욱 바람직한 구현예에서, 상기 항-CD45 제제는 실시예에 기술된 바와 같이 항체 Refmab #1이다.
- [0258] 또 다른 바람직한 구현예에서 상기 항-CD45 제제는 실시예에 기술된 바와 같이 특정 CD45의 아이소폼을 표적화하는 CAR를 보유하는 면역 세포일 수 있다.
- [0259] 특히, 개시 내용은 또한 그것이 필요한 대상에서 숙주 세포 또는 전달된 세포를 각각 선택적으로 고갈시키는 데 사용하기 위한 제 1 또는 제 2 항원 결합 부위를 포함하는 상기 기술된 바와 같은 고갈 항-CD45 제제 (예를 들어 CAR 세포 조성물 또는 항체)에 관한 것이다.
- [0260] **CD45 의 제 1 아이소폼을 발현하는 세포**
- [0261] 본 개시 내용은 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 포유동물 세포, 바람직하게는 조혈세포, 또는 세포의 집단에 관한 것이며, 상기에서 상기 세포 또는 세포의 집단은 상기 제 1 아이소폼을 암호화하는 핵산에서 하나 이상의 다형성의 대립유전자를 포함하는 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하고, 상기에서 상기 제 1 아이소폼은 본 발명에 기술된 바와 같은 제 1 항원 결합 부위를 포함하는 고갈제에 의해 인식되지 않는다. 바람직하게는 상기 포유동물 세포는 인간 세포이다.
- [0262] 상기 세포 또는 세포의 집단은 CD45의 제 2 아이소폼을 발현하는 환자의 의학적 치료에 특히 유용하다.
- [0263] 특정 구현예에서, 고갈제에 의해 인식되지 않는 (예를 들어, 조혈세포) CD45의 상기 제 1 아이소폼을 암호화 또는 발현하는 상기 세포 (예를 들어, 조혈 줄기세포)는 상기 제 2 아이소폼을 발현하는 환자에 입양 세포 전달 (adoptive cell transfer)과 같은 면역요법 후에 정상 조혈작용을 회복하기 위한 의학적 치료에 특히 유용하며, 특히 상기에서 치료는 CD45의 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 치료적으로 유효한 양의 상기 조혈세포를 CD45의 상기 제 2 아이소폼을 표적화하는 치료적으로 유효한 양의 고갈제와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 특히, 상기 조혈세포, 바람직하게는 조혈 줄기세포는 상기 고갈제에 순차적으로 투여된다. 또 다른 특정 구현예에서, 상기 조혈세포, 바람직하게는 조혈 줄기세포는 상기 고갈제를 이전에 또는 동시에 투여될 수 있다.
- [0264] 또 다른 특정 구현예에서, CD45의 제 2 아이소폼에 결합하지 않거나 실질적으로 더 약하게 결합하는 고갈제에 의해 특이적으로 인식되는 CD45의 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포는 CD45의 상기 제 2 아이소폼을 발현하는 환자의 의학적 치료에 특히 유용하고, 특히 제 1 아이소폼을 포함하는 이식된 세포와 관련된 심각한 부작용을 피하기 위해 (안전 스위치) 유용하며, 상기에서 치료는 CD45의 상기 제 1 아이소폼을 표적화하는 치료적으로 유효한 양의 고갈제를 투여하는 것을 포함한다. 특히, CAR를 보유한 상기 조혈세포, 바람직하게는 면역 세포가 상기 고갈제에 앞서 투여된다.

- [0265] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 세포는 포유동물 세포, 바람직하게는 인간 세포에 관한 것이다.
- [0266] 특정 구현예에서, 상기 세포는 조혈세포이다. 조혈세포는 B 세포 및 T 세포와 같은 림프구, 자연살해세포(natural killer cell), 단핵구(monocytes)와 같은 골수세포, 대식세포, 호산구(eosinophils), 비만 세포(mast cells), 호염구(basophils), 과립구(granulocytes), 수지상 세포(dendritic cells, DC) 및 형질세포성 수지상 세포(plasmacytoid dendritic cells, pDCs)를 포함하는 면역 세포를 포함한다.
- [0267] 바람직한 구현예에서, 상기 면역 세포는 T 세포이다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 상기 면역 세포는 일차 T 세포이다. 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "**T 세포(T cell)**"는 T 세포 수용체 (T cell receptor, TCR)를 보유한 세포 또는 TCR을 보유한 T 세포로부터 유래한 세포를 포함한다. 개시 내용에 따른 T 세포는 염증성 T-림프구(inflammatory T-lymphocytes), 세포독성 T-림프구(cytotoxic T-lymphocytes), 조절 T-림프구(regulatory T-lymphocytes), 기억 T-림프구(memory T-lymphocytes), 종양 침윤 림프구(tumor infiltrating lymphocytes) 및 타입 1 및 2 보조 T 세포를 모두 포함하는 보조 T-림프구(helper T- lymphocytes) 및 보조 Th17 세포(Th17 helper cells)로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 상기 세포는 CD4+ T- 림프구 및 CD8+ T-림프구 또는 MR1 제한 T 세포와 같은 비-전형적(non-classical) T 세포, MAIT 세포, NKT 세포, 감마 델타 T 세포 또는 선천적-유사 T 세포(innate-like T cells)로 구성되는 군으로부터 유래될 수 있다.
- [0268] T-세포는 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cells), 골수(bone marrow), 림프절 조직(lymph node tissue), 제대혈(cord blood), 흉선 조직(thymus tissue), 감염 부위 유래 조직, 복수(ascites), 흉수(pleural effusion), 비장 조직(spleen tissue), 및 종양(tumors)을 포함하는 다수의 비-제한적 공급원으로부터 얻을 수 있다. 특정 구현예에서, T-세포는 통상의 기술자에게 공지된 많은 기술을 이용하여 대상으로부터 수집된 혈액 단위로부터 얻을 수 있다. 대안적으로, T 세포는 iPS 세포로부터 분화될 수 있다.
- [0269] 또 다른 바람직한 구현예에서, 상기 조혈세포는 조혈 줄기세포이다. 줄기 세포는 성체 줄기세포, 배아 줄기세포(embryonic stem cells), 더욱 특히 비-인간 줄기세포, 제대혈 줄기세포, 전구체 세포, 골수 줄기세포, 유도 만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells), 전능성 줄기세포(totipotent stem cells) 또는 조혈 줄기세포일 수 있다. 대표적인 인간 줄기세포는 CD34⁺ 세포이다. 조혈 줄기세포는 iPS 세포로부터 분화될 수 있거나, 제대혈(umbilical cord blood), 골수 또는 동원되거나(mobilized) 동원되지 않은 말초 혈액(peripheral blood)으로부터 수집될 수 있다.
- [0270] 특정 구현예에서, 세포는 세포를 받는 사람의 HLA 유전자형(genotype)과 동일, 유사 또는 상이한 HLA 유전자형을 나타내는 공여자(donor)로부터 유래된 세포를 지칭하는 동종 이계의(allogeneic) 세포이다. 공여자는 관련되거나 관련되지 않은 사람일 수 있다. 특정 구현예에서, 세포는 세포를 받는 사람과 동일한 사람으로부터 유래된 세포를 지칭하는 자가(autologous) 세포이다.
- [0271] 상기 세포는 건강한 도너 또는 환자, 특히 암, 유전병 또는 자가-면역 질환(auto-immune disease)에 걸린 것으로 진단받은 환자 또는 감염으로 진단된 환자에서 유래될 수 있다. 조혈세포는 혈액, 골수로부터 추출되거나 줄기세포로부터 유래될 수 있다. HSC는 예를 들어 iPS (유도 만능 줄기세포)에서 유래될 수 있다.
- [0272] 통상의 기술자는 환자 또는 이식될 대상에 따라 더욱 적절한 세포를 선택할 수 있다.
- [0273] 개시 내용은 추가로 본 발명에 개시된 요법(therapy)에 사용하기 위한 세포의 조성물 또는 세포의 집단에 관한 것이다.
- [0274] CAR
- [0275] 입양 세포 전달 요법에 사용하기 위해, 본 개시 내용에 따른 CD45의 제 1 아이소폼 발현하는 세포는 원하는 특이성 및 향상된 기능성을 보이도록 변형될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 상기한 바와 같이 이의 세포 표면 상에 항원 수용체라고도 불리는 재조합 항원 결합 부위를 발현할 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 재조합 항원 수용체는 키메라항원수용체 (CAR)이다. 본 개시 내용에 따르면, CD45의 제 1 아이소폼 및 CAR를 발현하는 상기 면역 세포는 CD45의 상기 제 1 아이소폼에 특이적으로 결합하나 CD45의 상기 제 2 아이소폼에는 결합하지 않는 제 2 항원 결합 부위를 포함하는 치료적으로 유효한 양의 제제를 투여함으로써 특이적으로 고갈될 수 있고, 그렇게 함으로써 상기 면역 세포의 이식에 기인한 궁극적으로 심각한 부작용을 피할 수 있다.
- [0276] 특정 구현예에서, 면역 세포는 암 항원에 대해 재유도된다. "**암 항원(cancer antigen)**"이란 암과 관련된 임의의 항원 (즉, 면역 반응을 유도할 수 있는 분자)을 의미한다. 본 발명에서 정의된 바와 같이 항원은 면역 반응을 유도하는 임의의 유형의 분자일 수 있으며, 예를 들어 다당류 또는 지질일 수 있으나, 가장 바람직하게는 펩타

이드 (또는 단백질)이다. 인간 암 항원은 인간 또는 인간 유래일 수 있다. 암 항원은 종양-특이적 항원(Tumor-specific antigens)일 수 있으며, 이는 건강한 세포에서 발견되지 않는 항원을 의미한다. 종양-특이적 항원은 일반적으로 돌연변이, 특히, 건강한 인간 단백질체(proteome)에서 발견되지 않는 완전히 새로운 아미노산 서열을 생성하는 프레임-쉬프트 돌연변이(frame-shift mutations)로부터 발생한다.

[0277] 또한 암 항원은 종양-관련 항원을 포함하며, 이는 이의 발현 또는 생산이 종양 세포와 관련된 항원이나, 이에 한정되지 않는다. 종양-관련 항원의 예는 예를 들어, Her2, 전립선 줄기세포 항원(prostate stem cell antigen, PSCA), 알파-태아단백질(alpha-fetoprotein, AFP), 암배아 항원(carcinoembryonic antigen, CEA), 암 항원-125 (CA-125), CA19-9, 칼레티닌(calretinin), MUC-1, 상피막 단백질(epithelial membrane protein, EMA), 상피 종양 항원(epithelial tumor antigen, ETA), 티로시네이스(tyrosinase), 흑색종-관련 항원(melanoma-associated antigen, MAGE), CD34, CD45, CD99, CD117, CD123, 크로모그라닌(chromogranin), 사이토케라틴(cytokeratin), 데스민(desmin), 신경교섬유질산성단백질(glial fibrillary acidic protein, GFAP), 충 낭포증 유체 단백질(gross cystic disease fluid protein, GCDPF-15), HMB-45 항원, 단백질 멜란(protein melan)-A (T 림프구에 의해 인식되는 흑색종 항원; MART-1), myo-D1, 근육-특이적 액틴(muscle-specific actin), 신경미세섬유(neurofilament), 신경-특이적 에놀레이스(neuron-specific enolase, NSE), 태반 알칼리성 포스파테이스(placental alkaline phosphatase), 시냅토파이신(synaptophysin), 티로글로불린(thyroglobulin), 갑상선 전사인자-1(thyroid transcription factor-1), 피루베이트 카이네이스 이소엔자임 타입 M2(pyruvate kinase isoenzyme type M2)DML 이량체 형태 (tumor M2- PK), CD 19, CD22, CD33, CD123, CD27, CD30, CD70, GD2 (강글리오사이드 G2(ganglioside G2)), EGFRvIII (표피 성장 인자 변이체(epidermal growth factor variant) III), 정자 단백질(sperm protein) 17 (Sp17), 메소텔린(mesothelin), PAP (전립선 산성 인산분해효소(prostatic acid phosphatase)), 프로스테인(prostein), TARP (T 수용체 수용체 감마 대체 리딩 프레임 단백질(T cell receptor gamma alternate reading frame protein)), Trp-p8, STEAP1 (전립선 1의 6-막관통 상피 항원(six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 1)), 비정상적인 ras 단백질, 또는 비정상적인 p53 단백질을 포함한다. 또 다른 특정 구현예에서, 상기 종양-관련 항원 또는 종양-특이적 항원은 인테그린(integrin) $\alpha v \beta$ (CD61), 갈락틴(galactin), K-Ras (V-Ki-ras2 Kirsten 랫 육종 바이러스 종양유전자(V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene)), 또는 Ral-B이다.

[0278] 특정 구현예에서, 입양 세포 전달 요법에 사용하기 위해, 바람직하게는 급성골수성백혈병 (AML) 또는 B-급성림프구성백혈병 (B-ALL)과 같은 악성 조혈 질환의 치료를 위해, 본 개시 내용에 따른 면역 세포는 CD45를 표적화하는 CAR와 같은 재조합 항원 결합 부위를 발현한다. 제 1 아이소폼을 발현하고 CAR (예를 들어, CAR-CD45)를 발현하는 상기 세포는 CD45의 제 1 아이소폼에 특이적으로 결합하나 CD45의 제 2 아이소폼에는 결합하지 않거나 실질적으로 약하게 결합하는 제 2 항원-결합 부위를 포함하는 고갈제를 투여함으로써 추가로 특이적으로 고갈될 수 있으며, 그렇게 함으로써 이식에 기인한 이식편대숙주병과 같은 궁극적으로 심각한 부작용을 피할 수 있다.

[0279] 구체적인 구현예에서, 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 면역 세포 (예를 들어, T 세포)는 CD45를 표적화하는 CAR를 보유하며, 상기 CAR는 항원-결합 부위, 예를 들어, N-말단 도메인 내에, 또는 서열번호 1의 아미노산 E230, Y232, N255, N257, E259, T264, N267, E269, N286, S287, D292, I328, T330, F331, D334, Y340, K352, E353, E360, E364, Y372 및/또는 Y373, 더욱 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 E230, N257, E259, F331, K352 및/또는 E353 을 포함하는 폴리펩타이드 내에 위치한 CD45의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항원-결합 부위를 포함하는 scFv를 포함한다.

[0280] 특히, 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 면역 세포 (예를 들어, T 세포)는 하기를 포함하는 항원-결합 부위, 예를 들어, scFv를 포함하는 CD45를 표적화하는 CAR를 보유하며

[0281] a) 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 20, VHCDR2는 서열번호 21 및 VHCDR3는 서열번호 22인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및

[0282] b) 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 23, VLCDR2는 서열번호 24 및 VLCDR3는 서열번호 25인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL),

[0283] 더욱 바람직하게는 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항원-결합 부위를 포함한다.

[0284] 제 1 아이소폼을 발현하는 세포의 생체외(In vitro) 제조 방법

[0285] 본 개시 내용에 따른 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 세포는 상기 세포에 상기한 바와 같은 유전자 편집 효소

및/또는 HDR 주형을 포함하는 하나 이상의 유전자 편집 효소 또는 리보뉴클레오프로테인(ribonucleoprotein) 복합체를 암호화하는 핵산 컨스트럭트 (예를 들어, mRNA)를 도입함으로써 유전적으로 조작될 수 있다. 대안적으로, 유전자 편집 시스템은 아데노바이러스 시스템과 같은 바이러스 시스템을 통해 상기 세포로 형질도입(transduce)된다. 또한 상기 세포는 상기 세포에 상기한 바와 같은 CAR를 암호화하는 핵산 컨스트럭트를 추가적으로 도입함으로써 유전적으로 조작될 수 있다. 특히, 상기 방법은 세포의 배양물에 수행되는 생체의 방법이다.

[0286] 본 발명에서 사용된 바와 같이 용어 "**핵산 컨스트럭트(nucleic acid construct)**"는 재조합 DNA 기술을 사용하여 발생된 핵산 분자를 지칭한다. 핵산 컨스트럭트는 자연에 존재하지 않았을 방식으로 결합되고 병치(juxtapose)된, 핵산 서열의 세그먼트(segment)를 함유하도록 변형된 단일- 또는 이중-가닥의 핵산 분자이다. 핵산 컨스트럭트는 종종 "**벡터(vector)**", 즉, 숙주 세포로 외인성으로 생성된 DNA를 전달하는데 사용되는 핵산 분자이다.

[0287] 바람직하게는, 핵산 컨스트럭트는 하나 이상의 제어 서열(control sequence)에 작동 가능하게 연결된 상기 유전자 편집 효소, HDR 주형 및/또는 CAR를 포함한다. 상기 제어 서열은 표적 장기의 세포 (즉, 조혈세포)에서 기능성인 편재적(ubiquitous), 조직-특이적 또는 유도성 프로모터(inducible promoter)일 수 있다. 통상의 기술 분야에 공지된 이러한 서열은 특정 프로모터, 및 추가적으로 인핸서(enhancer), 터미네이터(terminator), 인트론(intron), 사일런서(silencer)와 같은 전이유전자(transgene)의 발현을 추가로 제어할 수 있는 조절 서열을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0288] 상기한 바와 같은 핵산 컨스트럭트는 발현 벡터를 함유할 수 있다. 벡터는 자기복제(autonomously replicating) 벡터, 즉, 염색체-외 독립체(entity)로서 존재하고, 이의 복제가 염색체 복제와 독립적인 벡터, 예를 들어, 플라스미드, 염색체-외 요소(extra-chromosomal element), 미니-염색체, 또는 인공 염색체일 수 있다. 벡터는 자기-복제를 보장하는 임의의 수단을 함유할 수 있다. 대안적으로, 벡터는 숙주 세포에 도입될 때 유전체에 통합되고 그것이 통합된 염색체(들)과 함께 복제되는 것일 수 있다.

[0289] 적절한 벡터의 예는 재조합 통합(ecombinant integrating) 또는 비-통합 바이러스 벡터 및 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA로부터 유래된 벡터를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 바람직하게는, 벡터는 재조합 통합 또는 비-통합 바이러스 벡터이다. 재조합 바이러스 벡터의 예는 헤르페스(herpes) 바이러스, 레트로바이러스(retroviruses), 렌티바이러스(lentivirus), 백신시아(vaccinia) 바이러스, 아데노바이러스(adenoviruses), 아데노-연관(adeno-associated) 바이러스 또는 소 유두종 바이러스(bovine papilloma viruses)로부터 유래된 벡터를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0290] 본 개시 내용은 상기한 바와 같은 유전자 편집 효소 및/또는 HDR 주형을 포함하는 유전자 편집 효소 또는 리보뉴클레오프로테인 복합체를 암호화하는 핵산 컨스트럭트 (예를 들어, mRNA)를 세포에 도입함으로써 상기 세포 표면 단백질의 제 1 아이소폼을 세포에서 발현시키는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 상기 세포에 CAR를 암호화하는 핵산 컨스트럭트를 도입하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 방법은 Cas 단백질, 염기 편집기 또는 프라임 편집기와 같은 유전자 편집 효소 및 가이드 RNA (crRNA, tracrRNA, 또는 융합 가이드 RNA 또는 pegRNA)를 세포에 도입하는 것을 포함한다. 특히, 상기 유전자 편집 효소는 상기한 바와 같은 CRISPR/Cas 유전자 편집 효소이다. 더 특정한 구현예에서, 상기 유전자 편집 효소는 위치-특이적 뉴클레아제, 더욱 바람직하게는 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 포함하는 CRISPR/Cas 뉴클레아제이며, 상기에서 Cas 단백질과 조합된 상기 가이드 RNA는 상기한 바와 같은 제제 결합에 관련된 표면 단백질 부위를 암호화하는 핵산을 포함하는 상기 표적 서열을 절단하고 절단을 유도한다.

[0291] 상기 Cas 뉴클레아제는 고성능 Cas9 뉴클레아제와 같은 고-성능(high-fidelity) Cas 뉴클레아제일 수 있다.

[0292] 상기 유전자 편집 효소, 바람직하게는 상기한 바와 같은 가이드 RNA 및/또는 Cas 단백질, 염기 편집기 또는 프라임 편집기는 세포에서 핵산 컨스트럭트의, 바람직하게는 상기한 바와 같은 가이드 RNA 및/또는 Cas 단백질, 염기 편집기 또는 프라임 편집기와 같은 상기 유전자 편집 효소를 암호화하는 발현 벡터를 세포로의 도입한 결과로서 현장에서(in situ) 합성될 수 있다. 대안적으로, 가이드 RNA 및/또는 Cas 단백질, 염기 편집기 또는 프라임 편집기와 같은 상기 유전자 편집 효소는 세포 밖에서 생산된 후 이들에 도입될 수 있다.

[0293] 상기 핵산 컨스트럭트 또는 발현 벡터가 통상의 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 세포에 도입될 수 있으며, 비-제한적인 예로서, 핵산 컨스트럭트 또는 발현 벡터가 세포의 유전체 내로 통합되는 안정적 형질도입 방법(stable transduction methods), 핵산 컨스트럭트 또는 발현 벡터가 세포의 유전체 내로 통합되지 않는 일시적 형질전환 방법(transient transfection methods) 및 바이러스-매개 방법을 포함한다. 예를 들어, 일시적

(transient) 형질전환 방법은 예를 들어, 미세주입(microinjection), 전기천공(electroporation), 세포 압착(cell squeezing), 입자 충격(particle bombardment) 또는 생체내 표적화 접근법들을 포함한다.

[0294] 생체내(In vivo) 편집

[0295] 또한 본 개시 내용에 따른 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 세포는 생체내 편집될 수 있다. 바이러스 벡터, 지질 나노입자 및 바이러스-유사 입자를 포함하는, 치료적 생체내 유전자 편집을 가능하게 하는 다양한 기술들이 존재한다 (예를 들어, Cell (2022) 185: 2806-27 참조). 고갈제에 의해 인식되지 않는 CD45의 제 1 아이소폼으로 CD45를 전환(convert)하는 분자 기계(machinery)는 임의의 이들 방법에 의해 달성될 수 있다.

[0296] 특정 구현예에서, 본 개시 내용은 유전자를 생체내 편집할 수 있는 분자 기계 및 고갈제를 포함하는 그것이 필요한 환자의 의학적 치료에 사용하기 위한 약학적 조성물에 관한 것으로,

[0297] 상기에서 유전자를 생체내 편집할 수 있는 상기 분자 기계는 표적 세포에서 야생형 CD45의 점 돌연변이(point mutation)를 CD45 아이소폼에 도입하는데 필요한 모든 요소를 포함하며, 및

[0298] 상기에서 상기 고갈제는 야생형 CD45에 결합하나, 상기 CD45의 아이소폼에는 결합하지 않는다.

[0299] 바람직하게는 CD45의 상기 아이소폼은 야생형 CD45의 352 위치에서 라이신(lysine)의 글루탐산(glutamic acid)으로의 치환을 특징으로 한다. 대안적으로, 상기 CD45의 상기 아이소폼은 야생형 CD45의 352 위치에서 라이신의 아스파르트산(aspartic acid)으로의 치환을 특징으로 한다. 대안적으로, 상기 CD45의 상기 아이소폼은 야생형 CD45의 352 위치에서 라이신의 히스티딘(histidine)으로의 치환을 특징으로 한다. 대안적으로, 상기 CD45의 상기 아이소폼은 야생형 CD45의 353 위치에서 라이신의 라이신으로의 치환을 특징으로 한다. 대안적으로, 상기 CD45의 상기 아이소폼은 야생형 CD45의 353 위치에서 라이신의 아르지닌(arginine)으로의 치환을 특징으로 한다.

[0300] 또한 바람직하게는, 상기 고갈제는 하기를 포함한다

[0301] i. 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 4, VHCDR2는 서열번호 5 및 VHCDR3는 서열번호 6인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH), 및

[0302] ii. 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 7, VLCDR2는 서열번호 8 및 VLCDR3는 서열번호 9인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL).

[0303] 대안적으로, 상기 고갈제는 하기를 포함한다

[0304] i. 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 4, VHCDR2는 서열번호 5 및 VHCDR3는 서열번호 6인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH), 및

[0305] ii. 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 60, VLCDR2는 서열번호 61 및 VLCDR3는 서열번호 9인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL).

[0306] 또한 바람직하게는 CD45의 상기 아이소폼은 야생형 CD45의 위치(position) 257에서 아스파라긴의 글루탐산으로의 아미노산 치환을 특징으로 한다. 대안적으로, CD45의 상기 아이소폼은 야생형 CD45의 위치 257에서 아스파라긴의 라이신(lysine)으로의 아미노산 치환을 특징으로 한다. 대안적으로, CD45의 상기 아이소폼은 야생형 CD45의 위치 257에서 아스파라긴의 아르기닌으로의 아미노산 치환을 특징으로 한다. 대안적으로, CD45의 상기 아이소폼은 야생형 CD45의 위치 257에서 아스파라긴의 트레오닌으로의 아미노산 치환을 특징으로 한다. 대안적으로, CD45의 상기 아이소폼은 야생형 CD45의 위치 259에서 글루탐산의 발린으로의 아미노산 치환을 특징으로 한다. 대안적으로, CD45의 상기 아이소폼은 야생형 CD45의 위치 259에서 글루탐산의 글라이신으로의 아미노산 치환을 특징으로 한다. 대안적으로, CD45의 상기 아이소폼은 야생형 CD45의 위치 232에서 타이로신의 시스테인으로의 아미노산 치환을 특징으로 한다. 대안적으로, CD45의 상기 아이소폼은 야생형 CD45의 위치 286에서 아스파라긴의 아스파르트산으로의 아미노산 치환을 특징으로 한다.

[0307] 또한 바람직하게는, 상기 고갈제는 하기를 포함한다

[0308] i. 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 20, VHCDR2는 서열번호 21 및 VHCDR3는 서열번호 22인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH), 및

[0309] ii. 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 23, VLCDR2는 서열번호 24 및 VLCDR3는 서열번호 25인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL).

- [0310] 또한 바람직하게는, 상기 고갈제는 하기를 포함한다
- [0311] i. 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 12, VHCDR2는 서열번호 13 및 VHCDR3는 서열번호 14인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH), 및
- [0312] ii. 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 15, VLCDR2는 서열번호 16 및 VLCDR3는 서열번호 17인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL).
- [0313] 특정 구현예에서, 본 개시 내용은 그것이 필요한 환자의 의학적 치료에 사용하기 위한 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 인간 세포 또는 인간 세포의 집단에 관한 것이며, 상기 환자는 상기 환자는 CD45의 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가지며,
- [0314] 상기에서 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 인간 세포는 하나 이상의 다형성 또는 유전적으로 조작된 대립유전자를 가지는 유전체 DNA를 포함하고,
- [0315] 상기에서 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 CD45의 상기 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가지는 환자의 유전체에 존재하지 않으며, 및
- [0316] 상기에서 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 E230, Y232, N255, N257, E259, T264, N267, E269, N286, S287, D292, I328, T330, F331, D334, Y340, K352, E353, E360, E364, Y372 또는 Y373 위치에 있는 하나 이상의 아미노산 치환을 특징으로 한다. 특정 구현예에서 상기 의학적 치료는 CD45의 상기 제 2 아이소폼을 발현하는 환자 세포를 특이적으로 고갈시키기 위해, 치료적으로 유효한 양의 CD45의 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포 또는 세포의 집단을 CD45의 상기 제 2 아이소폼에 특이적으로 결합하는 항원-결합 부위를 포함하는 치료적으로 유효한 양의 고갈제(depleting agent)와 조합하여 상기 그것이 필요한 환자에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0317] 특정 구현예에서 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 N286, F331, K352 또는 E353 위치에서 아미노산의 하나 이상의 치환을 특징으로 한다.
- [0318] 특정 구현예에서 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 N286, F331, K352 또는 E353 위치에서 아미노산의 하나 이상의 치환을 특징으로 하며, 및 상기 고갈제는 하기로부터 선택된 항원-결합 부위를 포함하며
- [0319] a) 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 4, VHCDR2는 서열번호 5 및 VHCDR3는 서열번호 6인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 7, VLCDR2는 서열번호 8 및 VLCDR3는 서열번호 9인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL),
- [0320] 더욱 바람직하게는 상기에서 상기 제 1 항원 결합 부위는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인을 포함하고; 또는
- [0321] b) 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 4, VHCDR2는 서열번호 5 및 VHCDR3는 서열번호 6인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 60, VLCDR2는 서열번호 61 및 VLCDR3는 서열번호 9인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL),
- [0322] 더욱 바람직하게는 상기에서 상기 제 1 항원 결합 부위는 서열번호 58의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열번호 59의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0323] 특정 구현예에서 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 F331, K352 또는 E353 위치에서 아미노산의 하나 이상의 치환을 특징으로 하고, 및 상기 고갈제는 하기에서 선택된 항원-결합 부위와 동일한(same) 에피토프에 결합한다:
- [0324] a) 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 4, VHCDR2는 서열번호 5 및 VHCDR3는 서열번호 6인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 7, VLCDR2는 서열번호 8 및 VLCDR3는 서열번호 9인 항체 경쇄 가변 도메인

(VL),

- [0325] 더욱 바람직하게는 상기에서 상기 제 1 항원 결합 부위는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인을 포함하고; 또는
- [0326] b) 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 4, VHCDR2는 서열번호 5 및 VHCDR3는 서열번호 6인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 60, VLCDR2는 서열번호 61 및 VLCDR3는 서열번호 9인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL),
- [0327] 더욱 바람직하게는 상기에서 상기 제 1 항원 결합 부위는 서열번호 58의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열번호 59의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0328] 바람직한 구현예에서, 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 K352 위치에서 아미노산 치환을 특징으로 한다. 특정 구현예에서 서열번호 1의 K352 위치에서 아미노산의 상기 치환은 K352E, K352H, K352I, K352L, K352M, K352N, K352Q, K352S 및 K352T로부터 선택되고, 바람직하게는 상기에서 상기 치환은 K352D, K352E 및 K352H이며, 및 더욱 바람직하게는 상기에서 상기 치환은 K352E이다.
- [0329] 특정 구현예에서 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 E230, Y232, N257, E259 또는 N286 위치에서 아미노산의 하나 이상의 치환을 특징으로 한다.
- [0330] 특정 구현예에서 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 E230, Y232, N257, E259 또는 N286 위치에서 아미노산의 하나 이상의 치환을 특징으로 하며, 및 상기 고갈제는 하기를 포함하는 항원-결합 부위를 포함한다
- [0331] 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 20, VHCDR2는 서열번호 21 및 VHCDR3는 서열번호 22인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 23, VLCDR2는 서열번호 24 및 VLCDR3는 서열번호 25인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL),
- [0332] 더욱 바람직하게는 상기에서 상기 제 1 항원 결합 부위는 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0333] 특정 구현예에서 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 E230, Y232, N257, E259 또는 N286 위치에서 아미노산의 하나 이상의 치환을 특징으로 하며, 및 상기 고갈제는 하기를 포함하는 항원-결합 부위와 동일한 에피토프에 결합한다:
- [0334] 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 20, VHCDR2는 서열번호 21 및 VHCDR3는 서열번호 22인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 23, VLCDR2는 서열번호 24 및 VLCDR3는 서열번호 25인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL),
- [0335] 더욱 바람직하게는 상기에서 상기 제 1 항원 결합 부위는 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0336] 바람직한 구현예에서, 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 N257 위치에서 아미노산 치환을 특징으로 한다. 특정 구현예에서 서열번호 1의 N257 위치에서 아미노산의 상기 치환은 N257E, N257K, N257R 또는 N257T 치환이고, 바람직하게는 상기에서 상기 치환은 N257R 치환이다.
- [0337] 바람직한 구현예에서, 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 E259 위치에서 아미노산 치환을 특징으로 한다. 특정 구현예에서 서열번호 1의 E259 위치에서 아미노산의 상기 치환은 E259N, E259Q, E259V 또는 E259G 치환이며, 바람직하게는 상기에서 상기 치환은 E259V 치환이다.
- [0338] 바람직한 구현예에서, 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 Y232 위치에서 아미노산 치환을 특징으로 하며, 바람직하게는 상기에서 상기 치환은 Y232C 치환이다.

- [0339] 바람직한 구현예에서, 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 N286 위치에서 아미노산 치환을 특징으로 하며, 바람직하게는 상기에서 상기 치환은 N286D이다.
- [0340] 특정 구현예에서 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 N257 위치에서 아미노산 치환을 특징으로 한다. 특정 구현예에서 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 N257 위치에서 아미노산 치환을 특징으로 하며, 및 상기 고갈제는 하기를 포함하는 항원-결합 부위를 포함한다
- [0341] 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 12, VHCDR2는 서열번호 13 및 VHCDR3는 서열번호 14인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 15, VLCDR2는 서열번호 16, VLCDR3은 서열번호 17인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL)
- [0342] 바람직하게는 상기에서 상기 제 1 항원 결합 부위 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0343] 특정 구현예에서 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 N257 위치에서 아미노산 치환을 특징으로 하며, 및 상기 고갈제는 하기를 포함하는 항원-결합 부위와 동일한 에피토프에 결합한다:
- [0344] 3개의 CDRs VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하며, 상기에서 VHCDR1은 서열번호 12, VHCDR2는 서열번호 13 및 VHCDR3는 서열번호 14인 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 및 3개의 CDRs VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하며, 상기에서 VLCDR1은 서열번호 15, VLCDR2는 서열번호 16, VLCDR3은 서열번호 17인 항체 경쇄 가변 도메인 (VL)
- [0345] 바람직하게는 상기에서 상기 제 1 항원 결합 부위 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0346] 바람직한 구현예에서, 상기 다형성의 또는 유전적으로 조작된 대립유전자는 서열번호 1의 N257 위치에서 아미노산 치환을 특징으로 한다. 특정 구현예에서 서열번호 1의 위치 N257에서 아미노산의 상기 치환은 N257E, N257K, N257R 또는 N257T 치환이며, 바람직하게는 상기에서 상기 치환은 N257R 치환이다.
- [0347] **약학적 조성물 및 치료 용도**
- [0348] 추가적인 측면에서, 본 개시 내용은 또한 하나 이상의 약학적으로 또는 생리학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제와 함께 상기한 바와 같은 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 세포 또는 세포의 집단을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0349] 특정 구현예에서, CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포는 조혈 줄기세포이다.
- [0350] 또 다른 특정 구현예에서, CD45의 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포는 면역 세포, 바람직하게는 T-세포, 더욱 바람직하게는 키메라항원수용체 (CAR), 바람직하게는 상기한 바와 같은 상기 환자의 세포에 의해 발현된 CD45의 제 2 아이소폼을 표적화하는 CAR를 보유하는 일차 T 세포이다.
- [0351] 약학적 조성물은 추가로 상기한 바와 같은 제 1 또는 제 2 항원 결합 부위를 포함하는 고갈제를 포함할 수 있다.
- [0352] 약학적 조성물은 투여 경로에 따라 약학적으로 허용가능한 담체로 제제화(formulated)된다. 바람직하게는, 조성물은 정맥 주사(intravenous injection)에 의해 투여되도록 제제화된다. 이러한 투여에 적합한 약학적 조성물은 상기한 바와 같은 제 1 아이소폼을 발현하는 세포를 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 멸균 등장성(isotonic) 수성 또는 비수성 용액 (예를 들어, 평형염액(balanced salt solution, BSS)), 분산제(dispersions), 현탁제(suspensions) 또는 유액(emulsions), 또는 사용 바로 전에 주사가 가능한 용액 또는 분산제로 재구성될 수 있는 멸균 산제(powders)와 조합하여 포함할 수 있으며, 이는 항산화제(antioxidants), 완충제(buffers), 세균발육억제제(bacteriostats), 용제(solutes) 또는 현탁(suspending) 또는 증점(thickening) 제제를 함유할 수 있다.
- [0353] 임의로, CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 세포를 포함하는 조성물은 보관을 위해 세포 보관에 적절한 임의의 온도에서 동결될 수 있다. 예를 들어, 세포는 약 -20℃, -80℃ 또는 임의의 다른 적절한 온도에서 동결될 수 있다. 극저온 동결된 세포는 세포 손상의 위험을 감소시키고 해동시 세포가 생존할 가능성을 최대화하기 위해 적절한 용기에서 보관되거나 보관을 위해 준비될 수 있다. 대안적으로, 세포는 또한 냉장보관 온도, 예를 들어, 약 4℃ 에서 유지될 수 있다.

- [0354] 본 개시 내용은 의약(medicament)에 사용하기 위한, 특히, 환자의 입양 세포 전달 요법과 같은 면역요법에 사용하기 위한 상기한 바와 같은 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포 또는 세포의 집단에 관한 것이다.
- [0355] 본 개시 내용에 따르면, 상기한 바와 같은 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포 또는 세포의 집단 (예를 들어, 조혈세포)는 그것이 필요한 환자의 의학적 치료에 사용되며, 상기에서 상기 의학적 치료는 CD45의 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 치료적으로 유효한 양의 상기 세포 또는 세포의 집단을, 각각 환자 또는 이식된 세포를 특이적으로 고갈시키기 위해 CD45의 제 2 아이소폼 또는 제 1 아이소폼에 특이적으로 결합하는 치료적으로 유효한 양의 고갈제 (예를 들어, CAR 세포 또는 항체)와 조합하여 투여하는 것을 포함한다.
- [0356] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "**조합(in combination)**" 또는 "**조합 요법(in combination therapy)**"은 대상이 장애(disorder)로 고통받는 동안 두 가지 (또는 그 이상) 상이한 치료가 대상에 전달되는 것, 예를 들어, 대상이 장애를 진단받은 후 및 장애가 치료 또는 제거되기 전 또는 다른 이유로 치료가 중단되기 전에 두 가지 이상의 치료가 전달되는 것을 의미한다. 일부 구현예에서, 투여 면에서 겹치도록, 두 번째 치료의 전달이 시작될 때 한 가지 치료의 전달이 여전히 일어난다. 본 발명에서는 이를 때때로 "**동시(simultaneous)**" 또는 "**병행 전달(concurrent delivery)**"이라고 지칭한다. 다른 구현예에서, 한 가지 치료의 전달이 다른 치료의 전달 시작 전에 끝난다. 제 2 치료가 전달되었을 때 전달된 제 1 치료의 효과가 여전히 감지가능하도록 전달될 수 있다. 일 구현예에서, CD45의 제 2 아이소폼 또는 제 1 아이소폼에 결합하는 고갈제는 본 발명에 기술된 용량(dose) 및/또는 투여 일정으로 투여되며, 제 1 아이소폼을 발현하는 세포는 본 발명에 기술된 용량 및/또는 투여 일정으로 투여된다. 일부 구현예에서, "와 조합하여"는 CD45의 제 2 (예를 들어, CD45의 제 2 아이소폼을 인식하는 CAR 세포 또는 항체) 또는 제 1 아이소폼을 표적화하는 고갈제 및 CD45의 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 세포의 조성물이 동시에 투여되는 및/또는 함께 전달하기 위해 제제화되는 것을 의미하려는 의도가 아니나, 이들 전달 방법이 본 개시 내용의 범위 내에 있다. 고갈제 (예를 들어, CD45의 제 2 아이소폼을 표적화하는 CAR 세포 또는 항체)는 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 1회분(a dose of)의 조혈 줄기세포와 병행하여(concurrently), 이전에 또는 이후에 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, 각 제제는 특정 제제에 대해 결정된 용량 및/또는 일정으로 투여될 것이다.
- [0357] 개시 내용에 따른 입양 세포 전달 요법이 암, 유전병, 자가면역 질환, 감염 질환, 조혈 줄기세포 이식(조혈 줄기세포 transplantation, HSCT)을 필요로 하는 질환, 장기 거부(organ rejection)의 방지, 종양 컨디셔닝 요법(tumor conditioning regimen), 종양 유지 치료(tumor maintenance treatment), 최소 잔존질병(minimal residual disease), 재발의 방지(prevention of relapse)를 진단받은 환자의 치료에 사용될 수 있다
- [0358] 또한, 본 개시 내용은 상기한 바와 같은 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 세포의 환자에서 입양 전달 세포 요법을 위한 의약 제조 용도에 관한 것이다.
- [0359] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "**대상(subject)**", 또는 "**환자(patient)**"는 동물, 바람직하게는 인간, 돼지, 침팬지, 개, 고양이, 소, 마우스, 토끼 또는 랫트를 포함하는 면역 반응이 유도될 수 있는 포유동물을 지칭한다. 더욱 바람직하게는, 환자는 성인, 어린이 및 태아기(prenatal stage) 단계의 인간을 포함하는 인간이다.
- [0360] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "**치료(treatment)**", "**치료하다(treat)**" 또는 "**치료하는(treating)**"은 질병의 치료(therapy), 방지, 예방 및 지연과 같은 환자의 건강 상태를 개선하려는 임의의 행동을 지칭한다. 특정 구현예에서, 이러한 용어는 질병 또는 질병과 관련된 증상의 개선(amelioration) 또는 근절(eradication)을 지칭한다. 다른 구현예에서, 이 용어는 이러한 질병에 걸린 대상에게 하나 이상의 치료제(therapeutic agent)의 투여로 인해 발생한 질병의 확산 또는 악화를 최소화하는 것을 지칭한다.
- [0361] 치료될 수 있는 암은 혈관발달이 되지 않은, 또는 아직 실질적으로 혈관발달이 되지 않은, 및 혈관발달된(vascularize) 종양을 포함한다. 암은 비-고형 종양 (재발 및 치료-관련된 종양, 예를 들어, 세포독성 요법 및 조혈 줄기세포 이식(HSCT)의 사용 후 이차 악성 종양을 포함하는 혈액 종양(hematological tumors), 예를 들어, 백혈병(leukemias) 및 림프종(lymphomas)과 같은)을 포함할 수 있거나 고형 종양을 포함할 수 있다.
- [0362] 본 발명에서 사용된 바와 같이 용어 "**자가면역 질환(autoimmune disease)**"은 자가면역 반응으로 인해 발생하는 장애로 정의된다. 자가면역 질환은 자가-항원에 대한 부적절하고 과도한 반응의 결과이다.
- [0363] 감염 질환은 박테리아, 바이러스, 기생충 또는 균류와 같은 병원성 미생물에 의해 야기되는 질환이다. 특정 구현예에서, 개시 내용에 따른 감염은 HSCT 후 환자 또는 고형 장기 이식을 받은 환자와 같은 면역억제된 환자에서 발생한다.

- [0364] 바람직한 구현예에서, 본 개시 내용은 혈액암(hematological cancer), 바람직하게는, 백혈병 또는 림프증식성 장애(lymphoproliferative disorders)에 이용하기 위한 상기한 바와 같은 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 세포에 관한 것이다. 상기 백혈병은 하기로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다: 급성 골수성 백혈병 (AML), 골수이형성증후군 (MDS), 모구형질세포양수지세포종양 (BPDCN), chronic myelogenous leukemia (CML)를 포함하는 골수증식성 신생물(myeloproliferative neoplasms, MPN), 만성골수단핵구백혈병(chronic myelomonocytic leukemia, CMML)을 포함하는 골수이형성증후군/골수증식성 신생물 (MDS/MPN) 중복 증후군(overlap syndromes), 만성 림프성 백혈병(chronic lymphoid leukemia, CLL), B- 및 T-세포 비-호지킨 림프종(non-hodgkin lymphomas), 급성 이중표현형 백혈병(acute biphenotypic leukemia), 털세포백혈병(hairy cell leukemia), 인터루킨-3 수용체 서브유닛 알파 양성 백혈병(interleukin-3 receptor subunit alpha positive leukemia), B-세포 급성림프구성백혈병(acute lymphoblastic leukemia) (B-ALL), T-세포 급성림프구성백혈병 (T-ALL), 호지킨 림프종(hodgkin lymphoma, HL), 전신비만세포증 및 바람직하게는 MDS, 바람직하게는 AML 또는 BPDCN.
- [0365] 특정 구현예에서, 종양에서 골수 세포가 면역억제성(immunosuppressive)일 수 있으므로, 면역 체크포인트 억제제(immune checkpoint inhibitors), CAR T-세포 또는 종양 침윤 림프구(tumor infiltrating lymphocytes)와 같은 면역치료제(immunotherapy agent)가 종양에 접근 가능하도록, CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포 또는 세포의 집단 (예를 들어, 조혈세포)이 고형 종양의 치료, 특히, 환자의 고형 종양에서 골수 세포의 선택적인 고갈에 사용될 수 있다. 이 상황에서 상기한 바와 같은 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포 또는 세포의 집단 (예를 들어, 조혈세포)는 고형 종양에서 골수 세포를 고갈시키려는 치료에 의해 영향받을 수 있는 조혈 시스템을 보충하는 기능을 할 수 있다
- [0366] 또 다른 특정 구현예에서, 상기한 바와 같은 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포 또는 세포의 집단 (예를 들어, 조혈세포)이 루프스, 다발성 경화증, 경피증(scleroderma) 또는 전신경화증(systemic sclerosis)과 같은 자가면역 질환의 치료에 사용될 수 있다.
- [0367] 또한, 개시 내용은 그것이 필요한 대상에서 숙주 세포 또는 전달된 세포를 각각 선택적으로 고갈시키는데 사용하기 위한 제 1 또는 제 2 항원 결합 부위를 포함하는 고갈제 (예를 들어 CAR 세포 조성물 또는 항체)에 관한 것이다.
- [0368] 이식된 세포가 아닌 환자 세포를 특이적으로 고갈시키는 방법
- [0369] 본 개시 내용에 따르면, 상기한 바와 같은 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포 또는 세포의 집단 (예를 들어, 조혈세포)은 그것이 필요한 환자의 의학적 치료에 사용되며, 상기에서 상기 의학적 치료는 CD45의 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 치료적으로 유효한 양의 상기 세포 또는 세포의 집단을, CD45의 제 2 아이소폼에 특이적으로 결합하는 치료적으로 유효한 양의 고갈제 (예를 들어, CAR 세포 또는 항체)와 조합하여 투여하는 것을 포함한다.
- [0370] 실제로, 면역요법 동안, 종양성(tumoral) 세포를 표적화하고 사멸시키기 위해 CD45에 대한 CAR 발현 면역 세포와 같은 면역 고갈제가 환자에게 투여될 수 있다. 그러나, 종양성 표면 단백질이 정상 조혈세포의 표면에서도 발현되기 때문에, 이 전략은 조혈작용을 변화시켜 환자에게 심각한 부작용을 유발할 수 있다. 환자에서 조혈작용을 회복하기 위해, 조혈세포는 환자에게 순차적으로 이식될 수 있다. 그러나, 이들 세포는 이에 의해 표적화되지 않기 위해, 상기 제제, 즉, CD45를 발현하는 세포에 대한 고갈제에 저항성일 필요가 있다.
- [0371] 따라서, 대안적으로, 본 개시 내용에 따르면, CD45의 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 이식된 세포가 아닌 CD45의 상기 제 2 아이소폼을 발현하는 환자 세포를 특이적으로 제거하기 위해 CD45의 제 2 아이소폼에 특이적으로 결합하는 제 1 항원 결합 부위를 포함하는 고갈제가 투여될 수 있다. 이식된 세포가 아닌 환자 세포의 선택적 고갈은 면역 고갈제에 의해 더 이상 고갈되지 않는 건강한 조혈 시스템을 가진 환자로 돌아가게 할 수 있게 한다. 따라서, 본 치료 용도에 따르면, 환자는 장기적인 단계의 면역억제(immunodepression)를 겪는 것 보다는 기능적인 면역 시스템을 가진다. 본 개시 내용에 따른 세포의 용도는 현재 HSC 이식의 주요 합병증(complication)인 감염을 제거하는 것이다.
- [0372] 또 다른 구현예에서, 본 개시 내용은 하기를 포함하는 CD45의 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가지는 환자에서 정상 조혈작용을 회복시키기 위한 입양 세포 전달 요법을 위한, 바람직하게는 조혈 줄기세포 이식을 위한 방법에 관한 것이다:
- [0373] (i) 유효한 양의 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 세포 (예를 들어, 조혈 줄기세포) 또는 이의 약학적 조성물을 투여하는 것, 상기에서 CD45의 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포는 하나 이상의 다형성의 대립

유전자를 가진 유전체 DNA, 바람직하게는 단일염기 다형성 (SNP) 대립유전자, 또는 상기 제 1 아이소폼을 암호화하는 핵산에서 유전적으로 조작된 대립유전자를 포함하며, 상기에서 상기 다형성은 CD45의 상기 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가진 환자의 유전체에 존재하지 않고; 및

- [0374] (ii) CD45의 상기 제 2 아이소폼을 발현하는 세포 (환자의 세포)를 특이적으로 고갈시키기 위해 CD45의 상기 제 2 아이소폼에 특이적으로 결합하고 CD45의 상기 제 1 아이소폼에 결합하지 않거나 실질적으로 약하게 결합하는 적어도 제 1 항원-결합 부위를 포함하는 치료적으로 유효한 양의 제제를 투여하는 것.
- [0375] CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포 또는 이의 약학적 조성물은 상기한 바와 같은 제 1 항원 결합 부위를 포함하는 제제와 조합하여 (예를 들어, 이전에, 동시에 또는 이후에) 대상에 투여된다.
- [0376] 바람직한 구현예에서, 고갈제 (예를 들어, CD45의 제 2 아이소폼을 표적화하는 CAR 세포 또는 항체)가 상기 표면 단백질 (예를 들어, CD45의 제 1 아이소폼)의 제 1 아이소폼을 발현하는 1회분(a dose of)의 조혈 줄기세포의 이전에 (예를 들어, 5 분, 15 분, 30 분, 45 분, 1 시간, 2 시간, 4 시간, 6 시간, 12 시간, 24 시간, 48 시간, 72 시간, 96 시간, 1 주, 2 주, 3 주, 4 주, 5 주, 6 주, 8 주, 12 주, 또는 16 주 전), 또는 이후에 (예를 들어, 5 분, 15 분, 30 분, 45 분, 1 시간, 2 시간, 4 시간, 6 시간, 12 시간, 24 시간, 48 시간, 72 시간, 96 시간, 1 주, 2 주, 3 주, 4 주, 5 주, 6 주, 8 주, 12 주, 또는 16 주 후)에 투여될 수 있다.
- [0377] "치료적으로 유효한 양(therapeutically efficient amount)" 또는 "유효한 양(effective amount)"이란 상기 정의된 바와 같은 치료되기에, 특히, 환자의 정상 조혈작용이 회복시키기에 충분한 대상에 투여되는 다수의 세포, 특히, 상기한 바와 같은 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 조혈 줄기세포를 의미한다.
- [0378] 본 개시 내용에 따른 세포 또는 약학적 조성물의 투여는 주사(injection), 수혈(transfusion), 주입(implantation) 또는 이식(transplantation)을 포함하는 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 본 발명에 기술된 조성물은 환자에게 피하(subcutaneously), 피내(intradermal), 종양내(intratumorally), 결절내(intranodally), 골수내(intramedullary), 근육내(intramuscularly), 정맥내(intravenous) 또는 림프내(intralymphatic) 주사에 의해, 또는 복강내(intraperitoneally) 투여될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 본 개시 내용의 세포 또는 약학적 조성물은 바람직하게는 정맥내 주사에 의해 투여된다. 본 개시 내용의 세포 또는 약학적 조성물은 종양, 림프절(lymph node) 또는 감염 부위에 직접적으로 주사될 수 있다.
- [0379] 세포 또는 세포의 집단의 투여는 범위 내의 세포수의 모든 정수값을 포함하는 체중 kg 당 10^4 - 10^9 세포, 바람직하게는 10^5 내지 10^7 세포/체중kg, 더욱 바람직하게는 체중 kg 당 2×10^6 - 5×10^6 세포의 투여로 구성될 수 있다. 투여되는 투여량(dosage)은 연령, 건강 및 수령자(recipient)의 체중, 병행 치료(concurrent treatment)의 종류 (있는 경우), 치료의 빈도 및 원하는 효과의 성질에 의존한다. 투여 시기는 담당 의사의 판단 및 대상의 임상적 상태에 달려있다. 세포 또는 세포의 집단은 혈액 은행 또는 공여자와 같은 임의의 공급원으로부터 얻을 수 있다. 개인의 니즈가 다르나, 특정 질병 또는 질환에 대한 특정(given) 세포 유형의 유효한 양의 최적 범위의 결정은 통상의 기술 분야 내이다.
- [0380] 특히, 개시 내용은 또한 그것이 필요한 대상에서 숙주 세포를 선택적으로 고갈하는데 사용하기 위한 제 1 항원 결합 부위를 포함하는 상기 기술된 바와 같은 고갈 항-CD45 제제 (예를 들어, CAR 세포 조성물 또는 항체)에 관한 것이다.
- [0381] 환자의 세포가 아닌 이식된 세포를 특이적으로 고갈시키는 방법 (안전 스위치(safety switch)).
- [0382] 본 개시 내용에 따르면, 상기한 바와 같은 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포 또는 세포의 집단 (예를 들어, 조혈세포)는 그것이 필요한 환자의 의학적 치료에 사용되며, 상기에서 상기 의학적 치료는 CD45의 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 치료적으로 유효한 양의 세포 또는 세포의 집단을, 상기 제 1 아이소폼 CD45에 특이적으로 결합하는 치료적으로 유효한 양의 고갈제 (예를 들어, CAR 세포 또는 항체)와 조합하여 투여하는 것을 포함한다.
- [0383] 상기 세포 또는 세포의 집단, 바람직하게는 본 개시 내용의 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 면역 세포는 특히 환자로의 입양 전달 세포 전달 요법에 사용된다. 이식에 의한 이식편대숙주병과 같은 궁극적으로 심각한 부작용을 피하기 위해 CD45의 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 이식된 세포는 환자에서 특히 CD45의 제 1 아이소폼에 특이적으로 결합하고 환자의 세포에 의해 발현된 CD45의 제 2 아이소폼에 결합하지 않거나 실질적으로 약하게 결합하는 제 2 항원 결합 부위를 포함하는 치료적으로 유효한 양의 고갈제 투여에 의해 추가로 고갈될 수 있다. 이 경우에, 환자 세포가 아닌 이식된 세포를 특이적으로 고갈시키기 위해 CD45의 상기 제 1 아이소폼 (이

식된 세포에 의해 발현된)에 특이적으로 결합하는 제 2 항원-결합 부위를 포함하는 상기 제제가 투여된다. 이식된 세포의 선택적 고갈은 "안전 스위치(safety switch)"를 제공함으로써 중요한 안전 특징을 구성한다.

- [0384] 이식편대숙주병 (GvHD)은 유전적으로 상이한 사람로부터 이식된 조직을 받은 후의 의학적 합병증과 관련된다. 공여된 조직 (이식편(graft))에서 면역 세포가 수여자(recipient) (숙주(host))를 외래(foreign)로 인식한다. 특정 구현예에서, 의학적 질환은 조혈 줄기세포 이식 또는 면역세포가 환자에게 전달되는 입양 세포 전달 요법에 의해 유발된 이식편대숙주병이다.
- [0385] 또한 상기 부작용은 CAR를 보유한 이식된 세포, 특히, 면역 세포가 사이토카인 방출 증후군(cytokine release syndrome) 및/또는 신경독성(neurotoxicity)과 같은 심각한 부작용을 가질 때 발생할 수 있다. 이 경우에, 상기 세포가 악성이 되거나 임의의 유형의 원하지 않는 정확한(on-target) 또는 부정확(off-target) 손상을 야기할 때 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 이식된 세포가 안전 스위치로서 제거될 수 있다.
- [0386] 본 개시 내용은 하기를 포함하는 CD45의 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가지는 환자에서 입양 세포 전달 요법을 위한 방법에 관한 것이다:
- [0387] (i) 유효한 양의 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 세포 또는 이의 약학적 조성물을 투여하는 것, 상기에서 CD45의 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포는 하나 이상의 다형성 대립유전자, 바람직하게는 단일염기 다형성 (SNP) 대립유전자, 또는 상기 제 1 아이소폼을 암호화하는 핵산에서 유전적으로 조작된 대립유전자 CD45를 가지는 유전체 DNA를 포함하며, 상기에서 상기 다형성은 CD45의 상기 제 2 아이소폼을 발현하는 세포를 가진 환자의 유전체에 존재하지 않고; 및
- [0388] (ii) CD45의 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 세포를 특이적으로 고갈시키기 위해, CD45의 상기 제 1 아이소폼에 특이적으로 결합하고 CD45의 상기 제 2 아이소폼에 결합하지 않거나 실질적으로 약하게 결합하는 하나 이상의 제 2 항원-결합 부위를 포함하는 치료적으로 유효한 양의 제제를 투여하는 것.
- [0389] CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 세포 또는 이의 약학적 조성물은 상기한 바와 같은 제 2 항원 결합 부위를 포함하는 제제와 조합하여 (예를 들어, 이전에, 동시에 또는 이후에) 대상에 투여된다.
- [0390] 바람직한 구현예에서, 고갈제 (예를 들어, CD45의 제 2 아이소폼을 표적화하는 CAR 세포 또는 항체)가 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 1회분(a dose of)의 조혈 줄기세포의 이전에 (예를 들어, 5 분, 15 분, 30 분, 45 분, 1 시간, 2 시간, 4 시간, 6 시간, 12 시간, 24 시간, 48 시간, 72 시간, 96 시간, 1 주, 2 주, 3 주, 4 주, 5 주, 6 주, 8 주, 12 주, 또는 16 주 전), 또는 이후에 (예를 들어, 5 분, 15 분, 30 분, 45 분, 1 시간, 2 시간, 4 시간, 6 시간, 12 시간, 24 시간, 48 시간, 72 시간, 96 시간, 1 주, 2 주, 3 주, 4 주, 5 주, 6 주, 8 주, 12 주, 또는 16 주 후)에 투여될 수 있다.
- [0391] 본 개시 내용에 따른 세포 또는 약학적 조성물의 투여는 주사(injection), 수혈(transfusion), 주입(implantation) 또는 이식(transplantation)을 포함하는 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 본 발명에 기술된 조성물은 환자에게 피하(subcutaneously), 피내(intradermal), 종양내(intratumorally), 결절내(intranodally), 골수내(intramedullary), 근육내(intramuscularly), 정맥내(intravenous) 또는 림프내(intralymphatic) 주사에 의해, 또는 복강내(intraperitoneally) 투여될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 본 개시 내용의 세포 또는 약학적 조성물은 바람직하게는 정맥내 주사에 의해 투여된다. 본 개시 내용의 세포 또는 약학적 조성물은 종양, 림프절(lymph node) 또는 감염 부위에 직접적으로 주사될 수 있다.
- [0392] 세포 또는 세포의 집단의 투여는 범위 내의 세포수의 모든 정수값을 포함하는 체중 kg 당 10^4 - 10^9 세포, 바람직하게는 10^5 내지 10^7 세포/체중kg의 투여로 구성될 수 있다. 투여되는 투여량(dosage)은 연령, 건강 및 수여자(recipient)의 체중, 병행 치료(concurrent treatment)의 종류 (있는 경우), 치료의 빈도 및 원하는 효과의 성질에 의존한다. 투여 시기는 담당 의사의 판단 및 대상의 임상적 상태에 달려있다. 세포 또는 세포의 집단은 혈액 은행 또는 공여자와 같은 임의의 공급원으로부터 얻을 수 있다. 개인의 니즈가 다르나, 특정 질병 또는 질환에 대한 특정(given) 세포 유형의 유효한 양의 최적 범위의 결정은 통상의 기술 분야 내이다.
- [0393] 따라서, 구체적인 구현예에서, 개시 내용은 상기한 바와 같은 CD45의 제 1 아이소폼을 발현하는 세포를 받은 환자에서 심각한 부작용의 위험을 방지 또는 감소에 사용하기 위한 고갈제 (예를 들어, CAR 세포 또는 항체)에 관한 것이며, 상기에서 상기 환자는 CD45의 제 2 아이소폼을 발현하는 본래의 세포를 가지고, 및 상기에서 포함하는 상기 고갈제는 CD45의 상기 제 1 아이소폼에 특이적으로 결합하고 CD45의 상기 제 2 아이소폼에 결합하지 않거나 실질적으로 약하게 결합하는 하나 이상의 제 2 항원-결합 부위를 포함한다.

[0394] 또 다른 측면에서, 본 개시 내용은 상기한 바와 같은 CD45의 제 1 아이소폼을 세포에서 발현시키기 위한 키트에 관한 것이며, 상기 키트는 Cas 단백질과 조합된 가이드 RNA, 염기 편집기 또는 프라임 편집기, 핵산 컨스트럭트, 상기한 바와 같은 발현 벡터와 같은 유전자 편집 효소 또는 본 개시 내용에 따른 분리된 세포를 포함한다.

[0395] 또 다른 측면에서, 본 개시 내용은 의학적 용도를 위한 본 개시 내용에 따른 인간 세포 또는 인간 세포의 집단에 관한 것이며, 상기에서 상기 의학적 용도는 CD45의 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 전달된 세포를 특이적으로 고갈시키기 위해 상기 CD45의 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 치료적으로 유효한 양의 상기 인간 세포 또는 인간 세포의 집단을 그것이 필요한 환자에게 CD45의 상기 제 1 아이소폼에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 제 2 항원-결합 부위를 포함하는 치료적으로 유효한 양의 고갈제와 조합하여 투여하는 것을 포함하며, 바람직하게는 입양 세포 전달 요법에 사용하기 위해, 더욱 바람직하게는, 급성골수성백혈병 (AML), 골수이형성증후군 (MDS), T-세포 비-호지킨 림프종(T-cell non-Hodgkin lymphomas, T-NHLs), 만성골수성백혈병 (CML), 털세포백혈병(hairy cell leukemias, HCL), T-세포 급성림프구성백혈병(T-cell acute lymphoblastic leukemia, T-ALL), 비-호지킨 림프종 (NHL) 또는 소포성 림프종(follicular lymphomas, FL)과 같은 악성 조혈 질환의 치료를 위해, 다시 더욱 바람직하게는, 상기에서 상기 고갈제는 이식에 기인한 이식편대숙주병과 같은 궁극적으로 심각한 부작용을 피하기 위해 CD45의 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 인간 세포 또는 인간 세포의 집단 다음에 투여된다. 특정 구현예에서 상기 제 1 아이소폼을 발현하는 상기 인간 세포 또는 인간 세포의 집단은 면역세포, 바람직하게는 키메라항원수용체(chimeric antigen receptor, CAR)를 보유한(bearing) T-세포이다.

[0396] **실시예**

[0397] **실시예 1: 항-CD45 Fabs 및 MAbs의 생성**

[0398] 공개적으로 이용가능한 서열 정보 또는 공급원에 기반하여 5가지의 상이한 항-CD45 항체를 Fab 및 MAb 포맷으로 생성하였다. 항체 (Refmab's #1, #2 및 #5)의 가변 사슬(Variable chains) 및 CDRs (Kabat)가 표 5에 표시된다. Refmab #3 (HI30)는 Biolegend (#304001)에서 구할 수 있는 마우스 하이브리도마(hybridoma) 항체이다. Refmab #5 (2D1)는 R&D Systems (#MAB1430)에서 구할 수 있는 마우스 하이브리도마 항체이다.

표 5

Refmab #1		
서열번호	설명	서열
2	VH	EVQLVESGGDLV KPGGSLKLSCAASGFAFSN YDMSWVRQTPEKRLWVAYISSGGVS TYPDITVKGRFTISR DNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARR YDVWWYFDVWGAG TTVTVSS
3	VL	DVLMTQTP LSLPVS LGDQASISC RSSQSIVHSN GNTY LEWYLQKPGQSPKLLIYKVSN RFGVDPDRFGSGSGSDTDFTLKISRVEAEDLGVYYC FQGSHVPMYTFGGGTKLEIK
4	HCDR1	NYDMS
5	HCDR2	YISSGGVSTYPDITVKG
6	HCDR3	RYDVWWYFDV
7	LCDR1	RSSQSIVHSNGNTYLE
8	LCDR2	KVSNRFS
9	LCDR3	FQGSHPVPMY
Refmab #2		
10	VH	EVQLVESGGD RVQPGRLSLTLCVTS GFTFNN YWMTWIRQVPGKG LEWVASISGGG SIYYPDSVKGRTISR DNAKNTLYLQMNSLRSEDTATYYCARDERWAGAMDAWGQ GTSVTVSS
11	VL	DIQMTQSPPVLSASVGD RVTLSCKASQININ KNL DWYQKQHGEAPKLLIYETNNLQT GIPSRFGSGSGSDTDFTLTISSLQPEDVATYYCYQHNSRFTFGSGTKLEIK
12	HCDR1	NYWMT
13	HCDR2	SISSGGSIYYPDSVKG
14	HCDR3	DERWAGAMDA
15	LCDR1	KASQININKNLD
16	LCDR2	ETNNLQT
17	LCDR3	YQHNSRFT
Refmab #4		
18	VH	EVKLLSGGGLVQPGGSLKLSCAASGDFSR YWMSWVRQAPGKLEWIGEINPTSTI NFTPSLKDVKRISR DNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCARGNYYRYGDAMDYWGQ GTSVTVSSAK
19	VL	DIALTQSPASLAVSLGQRATISCRAS KSVSTSGYSYLHWYQKPGQPPKLLIYASNL SGVPARFSGSGSGSDTDFTLNHPVEEEDAAATYYCQHSRELPLFTFGSGTKLEIK
20	HCDR1	RYWMS
21	HCDR2	EINPTSTINFTPSLKD
22	HCDR3	GNYRYGDAMDY
23	LCDR1	RASKSVSTSGYSYLH
24	LCDR2	LASNLES
25	LCDR3	QHSRELPLFT

[0399]

[0400]

항체의 추가적인 특징뿐만 아니라 전장의 항체의 포맷 및 아이소타입이 표 6에 표시된다.

표 6

[0401]

항체	포맷(Format)/아이소타입	공급처(Source)
Refmab #1	인간 IgG1	Biozym/BioLegend (#393411)
Refmab #2	인간 IgG1	W02020092654A1, SEQ ID NO 1 & 5
Refmab #3	마우스 IgG1	Biolegend (#304001)
Refmab #4	마우스 IgG1	IchorBio (#ICH1155)
Refmab #5	마우스 IgG1	R&D Systems (# MAB1430)

[0402]

실시예 2: MAbs의 CD45에 대한 결합 및 분석 조건의 최적화

[0403]

DF-1 세포 (ATCC 번호 CRL-12203)를 야생형 CD45 (서열번호 1)를 포함하는 컨스트럭트 또는 빈 벡터로 형질전환시켰다. 항체의 형질전환된 세포에 대한 결합 및 최적 분석 조건을 384-웰 포맷에서 평가하였다. 고-처리(high-throughput) 유세포 분석을 통해 세포 발현의 검출을 측정하였다. CD5 또는 벡터 단독을 발현하는 세포에 대한 각 항체의 연속 희석물의 면역반응성을 시험하였다. 원신호값(raw signal values) 및 신호-대-백그라운드 계산

에 기반하여 각 항체에 대한 최적 스크리닝 농도를 결정하였다. 결과는 도 1에 표시된다. 각 점수는 4회 반복의 평균에 해당한다.

[0404] Mab 포맷에서 모든 5개의 항체는 인간 CD45에 농도 의존적으로 결합한다. 빈 벡터로 형질전환된 세포는 항-인간 CD45 항체에 대한 어떠한 결합도 나타내지 않았다.

[0405] 유세포 분석에 최적화된 분석 조건은 표 7에 표시된다.

표 7

매개변수	시험 항체	시험 항체	시험 항체	시험 항체	시험 항체
세포 유형	DF-1	DF-1	DF-1	DF-1	DF-1
픽사티브(Fixative)	무	무	무	무	무
블로킹(Blocking) 완충액	10% 고 트 (Goat) 혈청	10% 고 트 혈청	10% 고 트 혈청	10% 고 트 혈청	10% 고 트 혈청
일차 항체					
명칭	Refmab #1	Refmab #2	Refmab #3	Refmab #4	Refmab #5
표적	CD45	CD45	CD45	CD45	CD45
최적 농도(Conc.)	0.063 µg/mL	0.25 µg/mL	0.5 µg/mL	0.125 µg/mL	1.0 µg/mL
인큐베이션 (Incubation) (25°C)	60 분	60 분	60 분	60 분	60 분
이차 항체					
표적	인간 IgG	인간 IgG	마우스 IgG	마우스 IgG	마우스 IgG
최적 농도	1:400 (3.75 µg/mL)	1:400 (3.75 µg/mL)	1:400 (3.75 µg/mL)	1:400 (3.75 µg/mL)	1:400 (3.75 µg/mL)
인큐베이션 (25°C)	30 분	30 분	30 분	30 분	30 분
제조사	Jackson ImmunoResearch	Jackson ImmunoResearch	Jackson ImmunoResearch	Jackson ImmunoResearch	Jackson ImmunoResearch
카탈로그 #	109-545-003	109-545-003	109-545-003	109-545-003	109-545-003
항체 ID	AlexaFluor® 488 AffiniPure 고트 항-인간 IgG (H+L)	AlexaFluor® 488 AffiniPure 고트 항-인간 IgG (H+L)	AlexaFluor® 488 AffiniPure 고트 항-인간 IgG (H+L)	AlexaFluor® 488 AffiniPure 고트 항-인간 IgG (H+L)	AlexaFluor® 488 AffiniPure 고트 항-인간 IgG (H+L)
세척 완충액	PBS (Ca2+, Mg2+ 불포함)	PBS (Ca2+, Mg2+ 불포함)	PBS (Ca2+, Mg2+ 불포함)	PBS (Ca2+, Mg2+ 불포함)	PBS (Ca2+, Mg2+ 불포함)
신호:백그라운드(Signal:Background)	9:1	13:1	12:1	6:1	10:1

[0406]

[0407] 실시예 3: CD45에 대한 Fabs의 결합 및 분석 조건 최적화

[0408] 전-장(full-length)의 항체 대신에 Fab 단편을 시험한 것을 제외하고 실시예 2에 기술된 것과 유사하게 실험이 수행되었다. 야생형 CD45 또는 벡터 단백을 발현하는 세포에 대한 각 Fab의 연속 희석액의 면역반응성을 시험하였다. 원신호값 및 신호-대-백그라운드 계산에 기반하여 Fab 에 대한 최적 스크리닝 농도를 결정하였다. 결과는 도 2에 표시된다. 각 점수(point)는 4회 반복의 평균에 해당한다.

[0409] Mab 포맷에서 모든 4개의 항체는 인간 CD45에 농도 의존적으로 결합한다. 빈 벡터로 형질전환된 세포는 항-인간 CD45 항체에 대한 어떠한 결합도 나타내지 않았다.

[0410] 고처리 유세포 분석에 최적화된 분석 조건은 표 8에 표시된다.

표 8

매개변수	시험 항체	시험 항체	시험 항체	시험 항체
세포 유형	DF-1	DF-1	DF-1	DF-1
픽사티브	무	무	무	무
블로킹 완충액	10% 고트(Goat) 혈청	10% 고트 혈청	10% 고트 혈청	10% 고트 혈청
알자 항체				
명칭	Refmab #1	Refmab #2	Refmab #3	Refmab #4
표적	CD45	CD45	CD45	CD45
최적 농도	0.063 µg/mL	0.25 µg/mL	0.5 µg/mL	0.125 µg/mL
인큐베이션 (25°C)	60 분	60 분	60 분	60 분
이차 항체				
표적	인간 F(ab') ₂	인간 F(ab') ₂	인간 F(ab') ₂	인간 F(ab') ₂
최적 농도	1:200 (7.5 µg/mL)	1:200 (7.5 µg/mL)	1:200 (7.5 µg/mL)	1:200 (7.5 µg/mL)
인큐베이션 (25°C)	30 분	30 분	30 분	30 분
제조사	Jackson ImmunoResearch	Jackson ImmunoResearch	Jackson ImmunoResearch	Jackson ImmunoResearch
카탈로그 #	109-546-006	109-546-006	109-546-006	109-546-006
항체 ID	AlexaFluor® 488 AffiniPure 고트 항-인간 IgG F(ab') ₂ 단편	AlexaFluor® 488 AffiniPure 고트 항-인간 IgG F(ab') ₂ 단편	AlexaFluor® 488 AffiniPure 고트 항-마우스 IgG F(ab') ₂ 단편	AlexaFluor® 488 AffiniPure 고트 항-마우스 IgG F(ab') ₂ 단편
세척 완충액	PBS (Ca ²⁺ , Mg ²⁺ 불포함)	PBS (Ca ²⁺ , Mg ²⁺ 불포함)	PBS (Ca ²⁺ , Mg ²⁺ 불포함)	PBS (Ca ²⁺ , Mg ²⁺ 불포함)
신호:백그라운드	8:1	9:1	5:1	7:1

[0411]

[0412] 실시예 4: 알라닌 스캐닝

[0413] 조사된 항체와의 결합과 관련된 CD45 상의 잔기를 결정하기 위해 인간 CD5에 대한 알라닌 스캔이 수행되었다. Immunology (2014) 143, 13-20에 기술된 바와 같이 샷건 돌연변이 유발 에피토프 맵핑 (shotgun mutagenesis epitope mapping) (Integral Molecular, Philadelphia/PA, USA)을 통해 알라닌 스캔이 수행되었다. 간략하게, CD45의 돌연변이 라이브러리를 고-처리, 위치-유도 돌연변이 유발(site-directed mutagenesis)을 통해 생성하였다. 각 잔기를 개별적으로 알라닌으로 돌연변이시켰으며, 알라닌 코돈은 세린으로 돌연변이시켰다. 돌연변이 라이브러리를 384-웰 마이크로플레이트에 배열하고 DF-1 세포에 일시적으로 형질전환시켰다. 형질전환 후에, 야생형 CD45에 대한 독립적인 면역형광 적정 곡선을 이용하여 미리-결정된 농도로 표시된 항체 (IgG 또는 Fab)와 세포를 인큐베이션하였다. Alexa Fluor 488-접합된 이차 항체를 이용하여 항체를 검출하였고, Intellicyt iQue 유세포 분석 플랫폼 (Intellicyt/Sartorius)을 이용하여 평균 세포 형광을 결정하였다. 이들이 시험 항체의 반응성을 유지(support)하지 않지만 대조군 항체(control antibody)의 반응성을 유지한 경우 돌연변이된 잔기가 항체 에피토프에 중요한 것으로 식별되었으며, 이는 각 경우에 또 다른 항-CD45 RefMab, 예를 들어, RefMab #1의 경우 RefMab #2가 대조군 항체로 사용되었고, RefMab #3의 경우 RefMab #4가 대조군 항체로 사용되었다. 이 카운터스크린(counter-screen) 전략은 국소적으로 잘못 접히거나(misfold) 발현 결함을 가진 돌연변이의 배제를 가능하게 한다. 각 돌연변이 클론에 대한 각 항체의 결합을 중복 결정하였다. 각 점수에 대해, 원 데이터에서 백그라운드 형광을 뺀 뒤, 야생형 CD45와의 항체 반응성에 대해 정규화하였다.

[0414] 매우 고-친화도인 항체의 라이브러리 스크리닝(screens)이 항체 결합에 중요한 잔기를 산출하는데 종종 실패하므로, 결합에 중요한 잔기를 식별할 수 있을만큼 충분히 결합을 약화시키기 위해 고-친화도 항체를 Fab 포맷으로 전환하였다. 표준 조건 하에 Fab 스크린이 결합에 중요한 잔기를 식별하기에 여전히 불충분한 경우, 고 엄격

조건(stringency condition)을 시행하였다. 이들 조건은 증가된 pH, 증가된 염도, 증가된 온도, 및/또는 증가된 세척 횟수의 조합을 포함한다. 고 엄격 조건에 필요한 항체는 "HS"로 표시된다.

[0415] 각 돌연변이 클론에 대해, 평균 결합 값을 발현의 함수 (대조군 반응성으로 나타낸)로 플로팅되었다. 도 3 참조. 예비 일차 중요한 클론들 (원)을 식별하기 위해, 대조군 항체에 대한 야생형 결합 >70% 및 시험 항체에 대한 야생형 결합 <20%의 임계값 (점선)이 적용되었다. 설정된 임계값에 충족되지 않았으나 결합 활성이 감소하고 중요한 잔기에 가까워, 돌연변이된 잔기가 항체 에피토프의 일부일 수 있음을 암시하는 클론들에 대해 이차 클론들 (원)을 강조하였다.

[0416] 알라닌 스캔의 결과는 표 9에 요약되었다. 모든 식별된 중요한 잔기에 대한 평균 결합 반응성 (및 범위)를 나열하였다. 항체 결합에 중요한 잔기 (진회색으로 나타낸)은 이의 돌연변이가 시험 Abs에 대한 결합은 음성이나, 대조군 항체에 대한 결합은 양성인 잔기이다. 임계 지표(threshold guideline)는 충족하지 않았으나, 이의 결합 활성이 감소되고 중요한 잔기에 가까워 이들이 항체 에피토프의 일부일 수 있음을 암시하는 추가적인 이차 잔기들 (연회색으로 나타낸)이 식별되었다.

표 9

	평균 결합 (야생형 대비 %)				
돌연변이	Refmab #1	Refmab #2	Refmab #3	Refmab #4	Refmab #5
S27A	138,6	125,8	117,4	101,5	66,4
P28A	98,4	112,8	107,8	153,4	73,6
T29A	135,5	156,4	188,3	146,9	109,3
P30A	79,1	80,0	117,4	192,6	55,4
S31A	108,5	102,0	118,8	171,0	57,5
P32A	108,6	135,1	125,4	216,2	148,4
T33A	170,6	127,9	87,4	110,8	76,5
G34A	33,7	76,5	108,7	87,7	73,0
L35A	138,6	121,4	118,1	104,4	103,8
T36A	86,5	103,2	113,8	144,6	63,1
T37A	135,9	115,9	84,6	116,8	107,3
A38S	98,9	119,5	99,8	130,7	53,1
K39A	158,4	133,9	113,8	116,7	45,0
M40A	60,2	55,2	71,4	65,5	90,8
P41A	95,8	82,0	101,3	85,1	72,1
S42A	159,0	130,1	144,4	195,7	90,4
V43A	146,4	152,1	109,8	207,2	137,4
P44A	91,3	81,7	122,7	160,9	61,8
L45A	169,5	240,3	313,9	262,4	166,6
S46A	88,1	121,8	132,1	115,0	123,4
S47A	119,0	158,4	232,4	122,6	94,4
D48A	46,5	55,3	45,5	113,4	115,6
P49A	145,8	231,3	191,1	298,6	143,0

[0417]

L50A	76,2	80,4	105,8	164,8	85,3
P51A	103,8	85,1	106,4	111,9	77,9
T52A	140,2	170,8	212,0	165,4	110,3
H53A	168,7	179,3	197,3	294,3	134,1
T54A	118,1	136,5	121,2	147,7	117,6
T55A	125,2	162,7	198,8	140,5	108,5
A56S	126,8	123,7	111,1	98,2	76,3
F57A	115,7	114,9	151,5	137,2	103,3
S58A	101,4	114,3	85,4	93,4	97,1
P59A	210,2	133,1	173,9	168,7	113,3
P59A	136,5	101,7	120,1	132,6	72,8
A60S	86,1	52,7	52,3	75,5	64,5
S61A	78,8	94,9	93,8	114,2	83,1
T62A	98,4	110,2	108,5	154,7	84,3
F63A	93,9	88,5	71,8	92,5	67,2
E64A	58,1	74,6	80,6	133,4	60,0
R65A	111,3	131,3	121,9	120,3	98,1
E66A	63,4	75,6	66,9	117,1	68,1
N67A	208,0	167,0	234,9	153,7	57,9
D68A	135,4	131,6	116,7	124,4	77,4
F69A	91,8	37,6	85,0	198,9	86,2
S70A	229,3	171,7	210,3	159,5	143,4
E71A	130,6	100,8	105,7	113,3	87,1
T72A	119,1	85,9	124,3	121,8	113,6
T73A	154,4	150,1	173,3	188,6	124,6
T74A	37,7	62,0	58,1	96,1	56,9
S75A	121,2	90,9	93,0	87,0	51,1

[0418]

L76A	145,1	122,2	128,2	147,6	128,6
S77A	167,8	188,4	280,7	215,1	110,5
P78A	60,9	54,2	60,8	104,7	73,9
D79A	74,2	82,9	80,3	148,1	64,8
N80A	61,7	45,8	56,3	92,8	66,5
T81A	91,0	75,5	97,1	144,9	70,0
S82A	81,6	56,2	67,7	98,9	54,2
T83A	64,2	53,2	60,0	72,2	52,9
Q84A	53,6	64,5	114,4	79,9	48,8
V85A	171,1	109,1	117,5	128,2	88,3
S86A	78,3	59,6	67,0	87,9	59,1
P87A	163,7	147,7	103,7	155,4	93,2
D88A	59,8	50,7	64,4	46,6	33,1
S89A	72,5	130,9	102,0	148,1	93,6
L90A	124,5	110,7	100,6	87,1	64,9
D91A	64,2	67,6	119,5	110,3	57,2
N92A	144,0	159,8	175,2	179,4	209,0
A93S	101,7	100,7	125,4	115,6	79,7
S94A	215,5	203,1	372,0	166,5	148,2
A95S	121,2	129,6	215,8	168,1	68,1
F96A	137,0	114,7	118,8	125,0	122,4
N97A	57,7	77,8	70,5	48,6	44,1
T98A	88,2	94,9	105,8	200,6	82,6
T99A	135,5	108,3	112,4	126,2	60,9
G100A	123,8	99,4	119,3	109,6	112,0
V101A	103,9	133,3	150,0	139,6	68,6
S102A	100,5	84,6	77,6	120,9	87,6

[0419]

S103A	74,6	78,8	72,5	130,2	53,8
V104A	98,1	90,0	96,2	193,0	71,5
Q105A	63,7	88,9	91,8	94,9	55,0
T106A	79,4	82,6	81,1	98,5	64,7
P107A	135,9	138,9	155,1	150,3	84,5
H108A	102,0	69,4	85,1	86,1	46,9
L109A	80,5	89,5	90,8	99,6	51,0
P110A	142,3	108,1	75,4	138,9	72,0
T111A	131,2	110,7	91,7	165,5	51,1
H112A	72,2	103,9	81,2	150,6	125,0
A113S	42,7	85,4	65,0	139,9	92,3
D114A	134,9	109,5	159,5	213,5	111,1
S115A	86,0	65,0	88,6	102,0	56,8
Q116A	159,2	159,1	190,8	226,9	87,9
T117A	79,4	107,4	112,5	105,2	66,5
P118A	137,1	182,0	170,0	192,3	80,8
S119A	161,0	157,1	148,7	179,6	56,7
A120S	122,0	155,1	161,7	335,1	60,3
G121A	99,0	99,6	105,5	106,6	50,9
T122A	88,4	107,6	110,4	121,8	54,8
D123A	118,5	103,0	142,6	85,4	52,7
T124A	154,1	127,2	155,1	186,1	82,8
Q125A	66,4	77,8	85,7	166,0	45,2
T126A	106,2	95,4	122,5	107,8	76,9
S128A	170,0	152,0	168,1	277,7	114,8
G129A	162,5	197,5	182,4	289,1	88,0

[0420]

S130A	141,1	103,2	123,1	111,3	56,2
A131S	103,9	95,3	128,1	145,2	79,9
A132S	243,0	190,8	166,2	163,8	81,9
N133A	74,3	60,5	78,9	180,2	54,9
A134S	51,2	56,1	65,0	111,3	53,1
K135A	85,7	72,8	78,8	201,5	62,7
L136A	79,2	75,8	125,9	131,4	64,7
N137A	72,3	79,1	95,7	125,7	52,3
P138A	181,1	198,2	202,1	197,0	90,2
T139A	132,1	136,7	131,3	210,8	85,3
P140A	205,8	151,9	175,9	175,5	85,5
G141A	110,7	143,1	154,0	176,6	87,3
S142A	110,3	102,5	100,3	160,1	78,5
N143A	159,9	165,7	156,6	171,8	81,0
A144S	147,9	98,1	134,1	120,3	94,4
I145A	107,9	116,2	98,9	125,3	96,2
S146A	105,0	106,3	164,7	111,5	111,8
D147A	73,6	74,3	105,4	131,4	90,0
V148A	130,1	116,1	155,2	104,9	84,4
P149A	161,0	123,5	148,9	153,6	110,0
G150A	116,9	81,9	96,6	123,5	74,2
E151A	114,2	101,8	158,8	183,3	76,4
R152A	103,5	107,2	145,8	98,7	81,3
S153A	69,1	54,7	54,4	111,5	48,7
T154A	-1,0	1,6	4,7	6,9	-2,0

[0421]

A155S	137,1	102,4	128,6	103,4	49,5
S156A	65,6	51,7	93,8	155,5	65,2
T157A	76,7	61,5	116,2	142,4	71,6
F158A	102,0	129,0	144,8	148,4	74,2
P159A	154,8	129,8	214,1	196,4	58,3
T160A	54,0	74,2	88,4	137,8	65,0
D161A	107,4	105,0	111,5	109,9	55,0
P162A	183,7	147,8	171,2	126,5	77,1
V163A	52,2	61,7	81,8	181,8	92,7
S164A	114,1	164,7	191,8	146,7	106,8
P165A	158,6	177,7	189,3	128,2	116,0
L166A	161,1	155,9	187,8	142,6	110,7
T167A	107,8	116,5	217,1	153,0	128,1
T168A	141,4	144,4	209,6	189,3	91,2
T169A	95,6	64,0	90,4	127,4	47,4
L170A	181,2	175,2	207,1	4,6	54,5
S171A	108,6	105,5	101,3	133,4	59,0
L172A	170,1	170,4	169,8	161,2	123,8
A173S	1,8	7,1	-3,7	-2,5	1,2
H174A	75,7	138,4	131,9	131,5	119,2
H175A	134,0	131,2	183,7	136,6	108,0
S176A	105,5	103,1	153,8	120,7	85,8
S177A	88,3	105,5	136,5	180,0	97,8
A178S	148,7	143,0	196,7	107,5	163,1
A179S	124,4	145,0	159,8	111,3	98,0

[0422]

L180A	216,0	208,7	204,5	140,4	108,0
P181A	144,3	113,6	116,7	152,0	92,1
A182S	103,6	118,5	183,5	125,0	78,2
R183A	137,8	134,3	164,5	150,5	100,5
T184A	157,9	148,7	146,7	133,7	79,8
S185A	-0,5	1,8	1,2	4,6	-6,9
N186A	162,8	150,8	114,2	188,0	98,0
T187A	162,4	115,7	193,3	159,5	98,0
T188A	125,2	124,6	149,1	199,3	93,1
I189A	127,8	95,1	129,6	82,2	37,4
T190A	191,3	146,5	148,1	160,7	91,2
A191S	85,2	99,4	107,3	122,1	88,0
N192A	79,7	85,3	88,4	116,1	78,4
T193A	135,7	164,1	153,3	131,0	110,1
S194A	122,3	141,2	192,0	150,2	87,5
D195A	93,6	142,7	155,8	154,4	94,3
A196S	108,2	128,2	124,0	92,6	94,4
Y197A	94,5	105,4	124,2	148,0	77,9
L198A	113,3	115,6	176,8	150,1	78,7
N199A	114,9	120,2	127,8	122,4	73,0
A200S	119,6	119,4	98,1	148,0	65,7
S201A	111,9	124,8	108,8	111,5	61,0
E202A	129,1	96,4	163,2	115,0	80,8
T203A	120,8	131,5	187,3	144,3	76,8
T204A	102,0	82,2	108,1	103,8	52,4
T205A	104,2	89,6	136,2	124,4	98,8

[0423]

L206A	113,4	138,1	145,2	158,3	90,2
S207A	128,3	127,2	116,2	186,0	86,1
P208A	75,7	81,8	100,4	153,8	59,1
S209A	103,8	94,9	133,7	91,5	101,3
G210A	104,9	136,6	143,5	94,7	77,1
S211A	131,1	152,9	163,1	141,7	81,7
A212S	99,8	105,1	121,3	88,0	68,6
I214A	121,0	79,3	101,5	91,9	73,4
T216A	104,5	94,8	93,5	105,1	83,0
T217A	115,6	110,1	165,2	240,2	77,7
T218A	105,8	108,1	148,7	137,7	68,7
I219A	117,9	149,1	128,3	175,6	76,1
A220S	114,8	100,9	26,4	17,9	57,8
T221A	128,2	110,0	139,8	216,4	75,0
T222A	54,2	112,4	92,9	182,8	72,7
P223A	118,1	93,5	176,4	96,6	73,4
S224A	115,0	103,2	105,1	105,2	104,8
K225A	139,9	114,0	237,5	79,5	128,5
P226A	109,9	79,0	123,9	103,2	99,1
T227A	95,4	98,8	88,0	144,4	35,3
C228A	1,0	-0,6	-1,9	1,3	-2,0
D229A	61,4	137,0	-2,7	149,8	-2,1
E230A	92,3	90,6	2,0	146,6	-1,8
K231A	63,0	80,8	77,5	145,2	55,8
Y232A	16,9	6,7	-1,2	5,6	-2,9

[0424]

Y232A	16,9	6,7	-1,2	5,6	-2,9
A233S	98,0	62,8	86,6	94,6	42,4
N234A	141,7	125,4	225,9	160,9	68,0
I235A	102,4	44,9	91,6	116,9	86,8
T236A	205,8	163,9	248,8	147,4	72,4
V237A	86,5	88,1	96,2	138,8	59,0
D238A	64,1	95,5	73,4	115,0	70,1
Y239A	3,1	2,2	2,3	1,5	1,4
L240A	99,3	88,6	106,7	137,1	43,2
Y241A	75,2	79,7	54,9	83,4	54,1
N242A	121,2	102,6	101,2	112,0	104,1
K243A	157,8	144,0	147,8	181,5	93,0
E244A	135,7	119,9	172,5	136,9	78,9
T245A	97,7	109,2	110,8	170,9	36,5
K246A	28,8	29,0	28,7	30,9	15,8
L247A	75,9	82,2	130,0	159,3	46,6
F248A	67,5	55,0	46,4	69,8	46,4
T249A	103,0	83,3	116,5	196,6	45,4
A250S	75,7	73,3	92,0	73,8	51,6
K251A	30,3	33,8	43,3	77,5	23,2
L252A	40,6	49,5	38,5	24,4	16,6
N253A	102,3	115,0	88,1	81,6	57,7
V254A	113,7	20,0	177,7	8,5	52,7
N255A	85,3	63,5	103,5	122,7	43,6
E256A	63,4	44,5	55,9	11,9	32,8

[0425]

N257A	178,2	2,4	113,2	0,0	75,6
V258A	99,9	40,5	98,1	27,6	49,8
E259A	111,2	32,6	165,0	0,3	57,0
N262A	68,5	65,8	84,7	79,4	10,3
N263A	100,7	111,6	76,2	227,9	80,8
T264A	128,6	121,6	132,6	36,9	68,2
C265A	44,0	7,9	55,5	1,7	46,4
T266A	78,6	73,7	123,4	20,8	61,3
N267A	90,5	2,2	132,3	3,0	74,4
N268A	86,5	43,2	87,3	34,1	60,3
E269A	106,9	127,1	123,0	186,2	75,9
V270A	82,2	51,3	116,0	10,8	84,4
H271A	95,6	95,0	136,7	68,6	115,2
N272A	114,1	111,4	132,1	103,1	59,7
L273A	25,1	30,8	34,3	70,6	48,9
T274A	71,9	112,7	120,9	160,6	69,4
E275A	47,5	87,7	94,0	147,3	80,1
C276A	0,3	4,5	1,1	17,7	5,6
K277A	60,3	48,1	82,4	142,7	61,0
A279S	116,9	103,0	83,6	126,0	63,8
S280A	53,5	40,5	88,3	117,4	69,4
V281A	75,7	39,3	61,7	32,4	64,9
S282A	100,3	95,2	100,2	99,5	86,0
I283A	45,2	18,0	62,8	30,0	89,1
S284A	79,1	135,9	271,5	74,5	107,6
H285A	109,3	126,6	112,8	4,8	90,9

[0426]

N286A	127,3	96,3	183,7	0,1	95,4
S287A	134,6	155,4	142,1	26,1	81,0
C288A	3,5	1,3	-3,2	-3,5	-4,0
T289A	107,3	115,2	40,3	74,7	-3,3
A290S	122,1	111,9	29,8	58,3	77,2
P291A	55,5	68,0	-3,9	54,9	-3,5
D292A	64,3	178,0	3,3	216,6	-2,9
K293A	133,3	132,7	108,4	168,4	46,0
T294A	89,3	83,2	130,2	161,4	56,2
L295A	104,2	123,6	143,2	82,7	71,8
I296A	99,6	134,4	122,0	151,1	96,3
L297A	60,0	50,7	50,3	35,2	30,7
D298A	111,8	123,1	111,5	68,1	54,0
V299A	135,8	95,8	116,1	95,7	67,9
P300A	35,5	44,1	39,7	62,1	32,3
P301A	85,3	77,3	109,3	96,8	52,9
G302A	110,6	136,2	212,9	176,6	106,5
V303A	63,6	106,9	110,2	147,2	65,8
E304A	101,4	102,8	136,2	82,8	73,0
K305A	59,8	75,9	107,7	216,1	69,9
F306A	3,9	46,4	64,6	66,4	22,6
Q307A	76,9	96,7	92,0	184,6	49,4
L308A	17,9	21,5	18,8	17,0	21,2
H309A	293,6	304,6	457,7	235,6	107,9
D310A	15,1	30,7	30,8	34,5	37,8

[0427]

C311A	56,9	50,7	54,1	57,9	42,6
T312A	75,8	53,1	93,0	80,8	30,3
Q313A	16,7	9,9	12,3	8,3	10,7
V314A	101,3	88,4	90,1	137,3	69,7
E315A	90,2	90,8	70,0	67,5	49,3
K316A	128,2	152,6	194,9	197,5	113,2
A317S	128,0	150,9	201,2	190,8	96,3
D318A	118,3	114,1	171,2	171,1	86,9
T319A	104,0	67,9	133,1	109,7	78,6
T320A	103,3	122,3	170,7	99,6	69,0
I321A	152,0	124,3	192,1	146,0	63,6
C322A	111,7	65,9	71,4	53,3	53,0
L323A	69,3	86,4	87,2	47,8	68,0
K324A	33,5	111,5	96,1	117,5	57,3
W325A	5,6	32,3	51,1	44,7	43,1
N327A	91,0	144,8	105,3	120,8	59,4
I328A	12,9	40,0	39,9	59,7	57,8
E329A	4,0	20,8			3,4
F331A	0,8	132,4	170,5	202,9	84,0
T332A	58,2	78,5	96,1	135,9	61,7
T335A	7,3	139,8	74,0	109,9	61,4
Q336A	100,9	142,4	193,2	156,3	94,1
N337A	79,0	82,1	176,8	159,0	71,6
I338A	7,9	63,0	35,9	26,2	45,2
T339A	96,3	84,1	143,6	227,4	70,7
Y340A	-0,6	97,1	82,3	101,1	52,8

[0428]

R341A	96,5	93,6	99,9	120,2	77,1
F342A	34,9	127,2	90,5	98,8	81,8
Q343A	159,2	124,0	100,9	129,2	42,2
C344A	22,6	32,9	32,9	41,5	35,5
G345A	126,4	88,1	104,1	90,1	47,0
N346A	118,6	92,0	93,4	92,0	69,4
I348A	157,8	149,6	117,2	104,7	69,5
F349A	50,6	94,1	102,5	81,4	55,8
D350A	85,7	83,0	73,6	50,7	52,4
N351A	144,8	162,8	228,1	265,3	68,6
K352A	0,2	163,3	185,1	196,0	53,6
E353A	2,5	108,6	135,5	202,8	72,4
I354A	26,0	119,1	202,9	150,8	87,9
K355A	135,3	120,0	143,7	110,2	64,2
L356A	186,7	87,5	126,5	127,4	72,5
N358A	99,5	136,0	146,6	159,7	69,8
L359A	113,5	98,2	114,1	72,8	40,9
E360A	114,2	105,0	94,4	75,9	58,5
P361A	149,3	105,9	113,7	111,3	60,3
E362A	81,9	83,5	80,0	118,1	67,5
H363A	143,1	109,8	171,5	178,6	85,0
E364A	98,2	63,5	85,2	117,6	57,8
Y365A	75,5	74,3	91,8	79,3	52,9
K366A	111,9	98,7	111,7	78,0	64,4
C367A	10,4	12,3	25,5	21,9	27,1

[0429]

D368A	113,0	85,2	126,4	137,5	74,9
S369A	94,4	95,9	88,7	153,3	79,3
E370A	119,9	111,2	153,6	134,6	62,5
I371A	26,1	67,9	82,2	138,4	65,5
L372A	134,3	129,4	123,2	148,0	75,5
Y373A	17,6	90,6	129,7	111,6	84,6
N375A	110,6	112,4	127,4	128,0	56,4
H376A	63,6	80,9	112,0	111,5	73,4
K377A	129,3	147,6	127,0	135,2	63,7
F378A	46,8	56,2	63,7	82,3	48,2
T379A	89,4	110,1	148,2	181,2	63,8
N380A	133,5	92,8	95,4	111,9	69,4
A381S	97,0	96,9	130,9	133,8	48,9
S382A	104,5	85,3	115,8	131,6	51,6
K383A	78,1	71,0	81,3	52,7	48,0
I384A	100,7	98,3	84,9	94,7	51,2
I385A	98,2	89,8	111,8	154,6	54,7
T387A	55,3	57,0	74,3	84,7	41,3
D388A	56,1	32,7	49,3	48,7	39,8
F389A	122,6	94,5	115,8	190,8	49,4
G390A	79,4	78,3	106,0	95,4	51,5
S391A	130,2	119,9	137,5	108,7	66,1
P392A	38,0	29,2	31,9	59,9	25,2
G393A	130,3	106,5	116,2	93,1	68,2
E394A	132,4	112,0	124,1	170,5	71,8

[0430]

P395A	99,9	64,4	125,1	132,6	63,3
Q396A	79,5	84,7	94,5	141,4	51,2
I397A	102,0	105,0	93,4	95,0	47,1
I398A	30,7	38,2	74,8	75,2	35,4
F399A	145,2	126,0	118,3	104,0	64,8
C400A	14,4	15,4	19,8	24,3	13,0
S402A	74,3	78,9	102,8	153,0	49,6
A404S	105,2	50,6	59,2	93,4	51,1
A405S	157,6	124,3	96,5	154,0	69,3
H406A	154,9	93,3	95,5	92,1	64,2
Q407A	24,8	22,0	21,9	31,4	8,6
G408A	94,7	88,2	115,6	103,1	58,8
V409A	125,9	128,1	79,6	76,2	54,9
I410A	2,1	4,0	10,3	20,1	4,8
T411A	129,5	126,8	116,4	115,5	91,7
W412A	0,9	4,7	0,9	6,4	-3,1
P414A	80,6	79,8	110,3	117,2	54,9
P415A	70,1	68,7	74,2	83,6	28,3
Q416A	93,4	86,1	104,4	163,4	41,9
R417A	162,7	125,6	114,2	113,9	81,0
S418A	114,1	92,3	145,7	96,5	75,4
F419A	75,4	75,2	69,9	128,8	56,9
H420A	82,3	70,6	94,5	64,2	31,4
N421A	76,0	58,0	74,5	70,1	69,6
F422A	24,3	23,7	31,6	20,5	37,3
T423A	62,5	70,5	69,5	71,6	32,0
C425A	-0,1	1,7	-3,1	99,9	-0,8

[0431]

Y426A	156,5	111,2	128,9	106,0	73,4
I427A	213,9	126,9	145,1	95,8	81,4
K428A	119,0	117,3	86,0	99,3	65,3
E429A	82,0	77,9	110,7	204,0	50,9
T430A	82,3	124,7	111,2	95,7	48,1
E431A	102,8	94,0	124,9	96,6	44,0
D433A	67,6	78,7	73,3	108,6	48,3
L435A	43,0	54,8	55,9	70,7	37,8
N436A	37,8	73,6	98,3	103,4	78,3
L437A	33,5	24,8	35,5	34,1	29,4
D438A	120,5	91,5	99,1	64,4	46,2
K439A	63,0	59,6	82,0	93,7	50,0
N440A	83,8	84,7	103,8	69,4	12,6
L441A	86,1	74,5	86,0	140,6	44,5
I442A	102,6	91,0	101,4	87,5	43,8
K443A	93,9	93,5	82,3	119,5	29,3
Y444A	82,6	85,7	54,4	101,4	59,9
D445A	82,0	98,4	102,7	122,3	61,5
L446A	84,1	76,3	52,9	84,4	71,1
Q447A	75,5	66,6	59,1	92,9	43,9
N448A	69,9	79,7	88,5	79,9	52,4
K450A	140,7	114,9	132,3	73,6	51,0
P451A	96,1	78,1	118,6	81,0	59,1
Y452A	77,6	55,2	55,5	101,3	52,2

[0432]

T453A	48,4	56,6	67,7	70,5	47,7
K454A	98,4	97,7	120,7	94,3	67,7
Y455A	10,7	12,4	16,1	23,8	19,8
V456A	94,1	86,0	105,1	117,4	44,0
S458A	79,2	74,9	77,0	119,1	38,7
L459A	1,9	2,3	-0,1	2,6	6,6
H460A	98,8	105,1	102,3	84,2	60,2
A461S	55,9	55,2	58,4	74,6	39,3
Y462A	98,3	78,3	70,1	80,7	48,9
I463A	128,0	106,3	119,5	83,2	73,3
I464A	24,8	49,6	48,6	109,2	46,3
A465S	146,6	181,5	243,5	201,4	59,0
K466A	115,5	84,1	92,6	81,6	39,3
V467A	74,4	66,7	83,1	94,6	39,7
Q468A	85,9	83,5	89,4	135,8	37,4
R469A	1,7	4,6	3,3	9,9	4,8
N470A	75,9	56,6	97,8	108,4	51,5
G471A	41,5	28,5	21,8	27,9	33,7
S472A	125,7	116,5	137,9	86,6	85,9
A473S	75,8	35,3	77,0	143,4	31,1
A474S	2,3	1,6	11,7	40,1	3,7
M475A	141,5	112,1	87,7	99,9	50,3
C476A	2,2	4,5	4,4	7,5	-1,9
H477A	41,1	64,2	67,1	141,4	41,2
F478A	5,0	3,6	1,9	19,1	3,1

[0433]

T479A	77,7	87,9	72,7	76,4	46,2
T480A	51,9	48,2	31,8	28,2	50,5
K481A	61,6	63,7	49,7	59,2	27,8
S482A	88,0	75,0	69,4	113,8	47,2
P484A	88,9	84,7	92,9	135,0	45,0
P485A	87,2	74,5	66,4	133,3	49,3
S486A	83,0	94,5	111,1	113,4	59,7
Q487A	156,7	103,8	138,8	92,9	75,3
V488A	6,1	5,8	7,0	8,5	1,2
W489A	140,3	136,5	197,7	108,8	72,2
N490A	75,4	89,4	65,9	126,9	26,9
M491A	110,2	131,5	98,7	100,4	70,8
T492A	52,1	38,7	52,0	61,2	22,0
V493A	54,7	54,2	61,1	73,4	53,5
S494A	118,4	111,5	113,5	97,6	62,9
M495A	79,6	77,7	102,9	217,0	55,8
T496A	94,6	92,2	95,0	95,4	45,3
S497A	98,4	87,5	126,2	139,3	37,7
D498A	71,4	99,0	101,2	128,3	58,3
N499A	60,1	46,3	54,8	87,0	42,6
S500A	2,2	1,5	7,4	30,9	-3,4
M501A	119,3	98,1	135,9	88,9	29,9
H502A	61,6	87,2	77,1	83,3	49,4
V503A	51,7	43,7	31,5	58,9	34,4
K504A	110,0	131,8	108,5	113,0	61,7
R506A	87,8	73,7	110,9	117,5	47,2
P507A	136,1	109,8	119,3	127,4	76,0

[0434]

P508A	51,9	30,7	69,6	51,6	32,2
R509A	91,8	121,6	153,0	117,3	77,1
D510A	103,7	118,5	142,4	166,4	62,0
R511A	88,4	109,9	121,8	115,4	48,0
N512A	70,1	63,1	56,1	109,9	64,7
G513A	2,3	2,1	3,9	3,8	-2,0
P514A	73,4	78,1	77,7	100,8	43,7
H515A	46,6	69,4	65,6	144,8	49,2
E516A	79,1	59,3	112,5	115,4	61,1
R517A	79,3	61,4	66,0	99,4	41,7
Y518A	6,2	5,5	8,2	14,1	9,2
H519A	49,4	44,7	52,1	105,9	42,7
L520A	1,0	0,7	2,0	-2,2	-4,1
E521A	62,3	41,3	89,4	79,0	51,7
V522A	27,4	30,4	37,4	44,0	33,3
E523A	86,5	69,6	113,3	104,3	59,1
A524S	26,0	15,7	27,0	65,8	27,1
G525A	76,0	58,5	97,9	69,0	57,6
N526A	74,8	102,1	61,2	188,8	55,3
T527A	62,1	52,9	84,6	89,9	59,4
L528A	51,3	64,4	75,5	131,5	49,1
V529A	63,5	83,1	69,8	119,6	50,0
R530A	83,8	58,5	102,4	76,5	62,5
N531A	89,9	86,3	135,9	141,4	64,2
E532A	99,4	105,5	146,5	158,4	63,7
S533A	106,7	87,3	85,5	84,7	53,6

[0435]

H534A	112,0	94,1	135,2	166,7	54,3
K535A	87,3	82,6	92,7	171,5	60,2
N536A	82,1	62,4	99,4	164,6	58,5
C537A	0,3	-0,6	-6,0	-12,9	-3,4
D538A	60,6	58,3	49,1	97,4	62,7
F539A	3,7	3,0	-2,2	4,1	-2,1
R540A	77,0	80,5	66,8	186,4	43,8
V541A	26,9	28,8	14,1	48,3	27,4
K542A	99,5	89,3	88,6	88,1	64,5
D543A	80,5	61,1	80,9	113,7	64,9
L544A	27,2	24,9	36,4	81,9	23,7
Q545A	108,4	85,0	95,9	197,3	70,0
Y546A	59,4	52,3	114,0	55,6	54,2
S547A	123,2	95,5	99,4	86,4	72,9
T548A	130,2	86,1	62,6	2,0	46,0
D549A	102,9	80,3	127,1	96,6	64,4
Y550A	0,6	2,0	-5,3	5,7	2,2
T551A	146,8	129,0	112,1	131,7	70,3
F552A	36,0	29,2	19,7	29,6	17,9
K553A	81,8	93,8	75,5	96,5	40,6
A554S	56,1	42,5	60,8	64,7	73,8
Y555A	26,0	21,2	36,0	30,6	40,3
F556A		74,9	66,5	102,8	72,6
H557A	13,5	21,6	16,4	42,1	30,6
N558A	-2,5	0,2	-8,2	2,8	1,9
G559A	7,2	14,7	6,0	17,0	17,1

D560A	53,1	53,6	56,3	99,9	68,8
Y561A	61,5	56,9	69,6	45,9	27,3
P562A	74,3	70,7	96,4	88,2	84,2
E564A	48,6	55,7	57,3	121,3	72,2
P565A	69,0	62,1	57,4	75,0	86,1
F566A	142,2	111,9	106,3	145,6	80,1
I567A	35,3	49,2	48,2	72,5	53,8
L568A	67,1	44,6	68,7	72,0	69,1
H569A	103,3	117,3	88,1	99,0	41,8
H570A	89,3	69,8	96,1	150,3	61,5
S571A	175,6	130,8	128,2	98,8	67,5
T572A	27,5	23,3	44,4	42,1	37,3
S573A	9,3	8,8	17,5	24,0	38,0
Y574A	156,2	124,1	100,1	89,7	60,5
S576A	54,9	60,5	83,7	98,1	54,2
K577A	140,0	138,1	133,5	98,4	65,6

표 10은 시험된 항체 각각에 대해 중요한 잔기를 요약한다. 이의 돌연변이가 특정 항체와 가장 낮은 반응성을

부여한 잔기를 볼드체 및 밑줄로 강조하였다. 검증된 중요한 잔기는 이의 측쇄(side chain)가 항체-에피토프 상호작용에 대해 가장 높은 에너지 기여(energetic contribution)를 하는 아미노산을 나타내며 (J. Mol. Biol. (1998) 280, 1-9; J. Mol. Biol. (1999) 285, 2177-2198); 따라서, 강조된 잔기가 결합에 주요한 에너지 기여자일 가능성이 있다.

표 10

[0439]

항체	중요한 잔기
Refmab #1	K324, F331 , T335 , F342, K352 , E353 , I354, Y340 , Y373
Refmab #2	V254, N257 , E259, N267
Refmab #3	D229 , E230 , D292
Refmab #4	L170 , V254 , N257 , E259 , T264, T266, N267 , H285 , N286 , S287

[0440]

실시예 5: 포괄적(Comprehensive) 돌연변이 분석(mutational analysis)

[0441]

실시예 4에서 확인된 중요한 잔기를 더 자세히 조사하였다. 우선, 결합 활성의 재현성, 표면 접근성, 구조적 위치 및 다른 중요한 위치와의 거리, 및 치환된 아미노산의 성질 및 생화학적 특성 (예를 들어, 이황화 브릿지(disulfide bridges)를 형성하는 시스테인 또는 번역 후 변형(post-translational modification) 위치)을 고려하여 식별된 중요한 잔기를 검증하는 단계가 수행되었다. 검증 후, 각 중요한 잔기는, 치환된 아미노산뿐만 아니라 새로 도입된 아미노산의 서열 및 구조-관련 특성에 기반하여 선택된 생물물리화학적으로 적절한 비-알라닌 아미노산에 대한 포괄적 돌연변이 유발을 겪었다.

[0442]

인간 CD45 변이체에 대한 결합에 대해 항체를 IgG 포맷으로 스크리닝하였다. 실시예 4와 같이, 고-처리 유세포 분석에 의해 포괄적인 라이브러리에서 각 시험된 항체의 각 돌연변이 클론에 대한 결합이 중복 결정되었다. 각 돌연변이에 대해, 원 데이터에서 백그라운드 형광을 뺀 뒤, 야생형 CD45와의 항체 반응성에 대해 정규화하였다. 모든 돌연변이 클론들에 대한 평균 결합 반응성 및 범위를 표 11에 나열하였다. 20% 미만의 결합을 야기한 돌연변이들은 회색으로 강조하였다.

표 11

	Refmab #1		Refmab #2		Refmab #3		Refmab #4		Refmab #5	
변이	평균 % WT 결합	범위 % WT 결합	평균 % WT 결합	범위 % WT 결합	평균 % WT 결합	범위 % WT 결합	평균 % WT 결합	범위 % WT 결합 g	평균 % WT 결합	범위 % WT 결합
D229										
G	91,2	6,8	261,4	84,4	-6,1	1,8	105,9	89,2	60,4	2,6
D229T	87,4	54,8	195,8	9,9	-0,2	6,8	147,7	12,3	7,4	6,8
D229										
V	91,7	60,8	150,4	51,6	0,3	1,3	115,5	34,1	5,4	4,9
E230H	90,1	6,6	186,8	16,6	-7,7	2,3	224,2	23,3	1,8	0,1
E230K	81,1	30,6	189,3	91,2	2,3	21,9	1,8	0,5	5,2	9,3
E230N	117,6	34,2	176,9	29,6	3,4	19,5	26,0	7,2	10,4	17,5
E230Q	62,6	27,9	192,8	46,4	-3,1	1,6	161,6	14,6	10,5	5,4
E230S	78,3	76,4	87,7	48,9	9,0	35,0	190,3	22,6	1,9	0,3
E230T	45,4	16,9	101,6	21,5	1,8	9,0	134,6	2,0	4,3	7,4

[0443]

V254											
D	68,3	67,9	70,5	20,1	81,9	6,6	69,6	7,7	132,1	65,0	
V254											
F	78,5	42,6	156,8	5,0	99,5	6,5	104,2	19,5	152,3	44,4	
V254											
G	83,7	63,5	99,1	3,6	127,8	2,4	71,6	43,3	167,9	16,8	
V254I	52,4	2,0	169,1	45,6	123,3	31,9	43,2	18,7	140,9	3,1	
V254											
L	67,2	0,6	161,9	20,2	119,6	6,1	51,3	11,7	140,6	40,3	
V254											
P	91,7	62,1	147,2	15,8	128,6	13,4	67,3	129,7	177,9	30,1	
V254											
T	113,2	25,1	245,9	70,7	163,4	28,4	256,5	129,6	209,2	47,9	
V254											
Y	93,8	17,6	52,4	4,7	109,4	7,4	178,2	64,7	130,8	11,4	

[0444]

N257D	78,2	8,6	3,8	0,8	126,1	15,3	140,7	36,9	170,5	22,2
N257E	78,2	5,1	2,1	2,3	93,0	1,1	134,4	15,6	126,6	9,2
N257F	29,5	18,3	11,4	7,2	24,2	16,9	78,4	6,9	32,9	9,2
N257G	67,9	12,7	12,3	3,5	66,4	18,2	49,0	25,3	104,1	9,4
N257H	53,4	12,7	14,3	11,4	22,0	7,3	52,8	31,0	50,2	7,3
N257I	84,1	53,1	10,8	0,2	133,5	75,0	163,6	50,3	191,6	38,5
N257L	78,9	8,2	16,5	6,2	90,7	20,4	80,1	5,7	148,6	42,1
N257M	91,2	38,3	19,7	5,1	127,8	17,2	-0,2	0,5	174,4	26,1
N257P	77,3	4,0	56,9	22,9	81,4	7,9	1,0	1,5	141,6	13,8
N257Q	66,5	16,0	34,0	13,1	82,6	47,7	85,6	10,5	97,8	22,8
N257R	66,4	24,4	3,4	0,3	98,8	8,0	170,4	39,6	141,0	1,0
N257S	60,5	13,8	22,7	0,6	86,0	26,9	64,0	7,3	100,8	42,6
N257T	109,5	9,8	6,3	2,2	134,8	69,3	2,5	1,1	154,9	4,3
N257V	44,7	25,5	12,5	2,2	30,6	6,9	64,2	2,4	75,3	2,7
N257Y	137,2	13,8	43,6	22,4	112,7	29,4	161,4	39,5	153,0	17,5

[0445]

E259											
G	4,2	0,3	5,6	0,5	-2,1	2,3	6,5	5,3	22,4	36,3	
E259I	116,0	10,8	71,5	17,1	141,9	36,5	176,0	10,3	156,3	43,4	
E259K	149,3	52,5	91,7	8,9	114,8	11,1	150,7	17,4	137,3	2,7	
E259											
M	67,0	2,8	108,7	13,1	86,8	4,3	153,1	10,7	102,0	12,0	
E259											
N	72,3	17,3	98,7	8,8	104,0	30,2	2,6	1,7	105,7	10,3	
E259P	62,0	7,2	26,5	4,7	83,2	30,5	19,4	40,3	143,9	6,2	
E259											
Q	80,4	18,8	166,1	19,9	159,0	96,6	1,4	2,0	173,0	14,9	
E259S	98,7	43,1	72,3	1,9	136,1	36,4	36,8	12,7	146,6	35,7	
E259T	26,9	42,6	2,1	0,0	65,5	36,1	24,1	9,0	52,6	4,6	
E259											
V	59,3	2,9	66,7	16,6	50,9	20,2	159,5	33,5	64,5	18,0	

T264											
D	69,2	29,6	180,1	25,2	123,7	30,6	12,7	18,0	156,9	14,6	
T264											
G	87,6	46,7	258,2	57,0	103,0	42,3	26,0	16,5	163,9	88,7	
T264I	114,9	24,4	184,4	13,4	110,3	8,6	107,3	3,1	191,2	63,7	
T264											
K	87,9	20,9	220,7	45,9	139,2	0,8	189,1	28,7	177,5	32,1	
T266											
E	96,2	28,1	199,7	15,4	156,4	4,2	51,2	24,0	142,6	29,7	
T266I	73,2	5,7	125,0	0,5	77,0	20,8	48,0	27,7	121,2	47,7	
T266											
K	130,7	39,2	163,4	24,5	181,4	32,0	177,0	24,1	193,6	22,8	
T266											
V	66,1	30,0	174,5	101,5	109,8	12,1	45,6	22,5	127,0	7,6	

N267										
D	103,9	27,4	165,3	35,1	109,0	15,3	148,8	56,3	132,3	25,2
N267E	86,6	19,5	85,7	3,9	109,8	20,8	136,8	10,9	128,9	16,2
N267										
G	116,2	22,6	165,3	14,4	101,9	4,9	96,9	135,1	162,3	12,6
N267										
H	108,2	52,0	57,9	20,8	106,9	6,2	4,3	3,1	167,8	15,9
N267I	476,0	117,4	596,1	116,6	421,0	15,9	361,9	79,0	386,6	121,9
N267										
K	46,6	29,8	72,3	25,7	60,3	16,8	17,0	1,4	73,8	1,1
N267L	88,4	0,8	87,7	8,2	108,4	6,7	12,6	11,9	150,9	9,7
N267										
M	50,5	13,3	85,6	47,6	75,6	36,8	94,7	109,3	104,5	25,0
N267										
P	59,5	4,9	30,4	8,2	34,4	5,0	219,8	18,4	96,7	30,6
N267										
Q	96,0	12,3	187,0	1,0	165,5	26,4	92,7	56,8	186,5	49,0
N267										
R	83,7	8,5	40,1	4,6	82,7	1,1	45,5	16,0	122,8	25,1
N267										
S	117,9	66,6	181,4	25,3	99,5	19,4	5,3	1,5	175,6	14,8
N267										
T	31,8	0,9	64,9	43,1	19,3	20,2	156,3	13,7	48,1	15,4
N267										
V	53,5	17,2	99,7	4,2	78,8	6,4	4,4	0,7	96,9	50,9
N267										
Y	93,0	12,2	25,1	15,3	121,9	4,9	83,8	101,1	194,0	23,3

[0448]

H285D	81,8	13,2	150,5	8,5	83,4	33,8	131,8	41,7	156,6	7,1
H285G	82,3	36,1	192,1	50,1	87,4	1,7	32,5	10,1	120,2	16,1
H285Q	117,8	10,5	148,0	39,4	122,5	22,6	178,3	42,8	166,4	8,7
H285R	104,6	41,9	148,0	2,0	151,0	23,0	176,1	4,3	158,6	34,4
H285S	94,8	25,7	243,3	110,1	115,7	6,8	139,6	25,0	156,7	1,7
N286D	142,3	48,2	114,0	16,1	108,0	29,6	584,1	3,0	170,3	10,1
N286G	14,6	0,7	20,9	1,4	-6,8	1,9	59,0	7,8	5,4	4,2
N286H	362,9	134,9	469,8	7,1	261,2	10,4	889,8	187,1	298,1	39,8
N286L	152,8	18,9	202,2	36,7	160,8	12,7	4,2	3,3	186,7	48,5
N286P	147,8	25,0	157,9	17,8	108,6	41,3	47,2	14,4	135,7	12,0
N286R	77,6	25,4	202,6	23,4	109,8	18,4	3,8	1,1	139,3	56,3
N286S	69,6	6,5	150,3	41,8	98,5	17,6	151,3	31,7	125,1	9,3
N286T	99,8	36,6	106,1	34,8	90,1	14,2	72,1	27,7	107,0	14,3

[0449]

S287Q	79,3	16,7	178,0	27,6	85,5	3,3	87,6	51,3	113,8	6,5
S287T	112,0	35,4	226,0	60,6	142,8	2,2	4,8	4,3	191,3	15,1
D292F	129,4	72,3	186,4	48,0	45,7	14,6	161,8	26,8	33,7	11,3
D292H	103,9	93,7	219,7	42,9	10,1	4,4	137,1	17,5	21,4	6,8
D292K	112,0	17,6	197,4	21,1	-4,2	5,4	16,8	23,5	1,7	0,5
D292L	82,9	0,4	154,4	49,0	9,9	7,6	127,2	84,5	22,4	8,5
D292P	67,7	0,8	202,4	40,7	0,4	10,5	82,4	47,6	4,1	0,9
D292Q	104,7	8,3	226,7	63,8	86,2	46,1	10,6	17,2	15,2	8,2
D292S	42,1	18,7	117,7	21,2	-0,5	0,1	105,4	53,2	5,6	0,5
D292T	31,1	1,1	82,4	3,5	2,7	2,4	57,8	19,8	5,7	6,6
D292Y	61,4	0,5	190,9	25,9	6,0	2,2	156,8	24,0	63,5	14,9

K324D	42,1	13,5	158,2	4,0	124,9	27,2	132,2	0,1	169,4	10,4
K324E	30,8	12,3	159,9	8,2	98,6	14,8	137,5	51,6	120,2	31,2
K324M	67,7	24,8	175,5	60,3	109,9	7,5	127,9	67,9	139,8	20,0
K326D	46,4	17,5	142,6	16,1	124,6	21,8	127,7	184,3	191,0	90,0
K326E	46,1	7,6	131,1	9,4	110,1	24,6	131,9	10,0	149,3	37,6
I328F	43,3	6,6	130,6	24,8	69,9	4,5	129,5	126,9	113,3	21,1
I328V	14,4	5,7	38,1	14,9	16,9	4,5	89,5	117,4	23,4	19,9
E329K	45,9	15,1	155,1	43,0	70,2	2,0	130,5	29,8	129,0	8,3
E329V	35,8	17,4	111,7	21,3	61,5	10,1	162,0	28,3	99,6	12,6
T330D	64,4	14,0	97,2	50,0	71,8	14,9	44,6	6,5	91,8	4,3
T330F	14,4	9,5	79,1	8,7	26,2	1,0	65,5	16,0	56,4	39,0
T330R	31,1	2,6	230,5	14,8	135,0	58,9	165,5	31,9	164,3	6,5
T330Y	99,5	7,0	176,2	17,8	124,7	4,0	205,3	3,8	142,5	28,9

F331											
G	1,7	4,0	199,1	57,3	140,3	51,8	162,8	42,3	167,5	4,3	
F331											
H	34,6	29,5	112,3	27,2	57,0	6,5	58,9	4,0	100,0	16,4	
F331I	36,1	33,6	141,3	9,3	107,5	28,0	239,1	10,0	128,0	15,5	
F331L	56,0	20,7	217,0	98,8	134,4	6,3	190,1	50,2	173,4	77,9	
F331											
M	67,7	8,3	201,5	40,6	124,1	27,4	184,5	11,4	163,7	16,7	
F331											
N	28,8	23,9	163,2	53,6	142,0	19,6	19,1	7,1	139,9	38,0	
F331S	51,3	42,5	189,8	40,9	153,9	6,1	211,3	0,5	154,6	42,6	
F331											
V	40,6	29,3	169,9	5,9	111,2	15,6	134,8	15,3	111,7	13,1	
T332I	68,6	0,2	122,9	4,8	69,7	6,9	124,5	31,3	108,6	4,2	

D334A	56,7	33,3	105,7	13,1	43,8	17,0	15,1	5,7	95,3	18,8	
D334F	27,2	4,5	73,6	24,3	24,1	20,7	44,7	17,7	42,5	15,4	
D334H	83,1	47,7	118,2	0,6	67,3	11,7	179,7	32,9	107,5	3,1	
D334I	54,7	16,6	141,8	9,8	81,7	12,0	147,7	55,6	142,7	3,0	
D334K	72,1	5,8	173,9	30,1	132,7	22,8	158,5	38,2	142,3	74,9	
D334L	83,6	7,3	162,0	5,6	109,8	3,6	192,8	75,3	142,7	36,2	
D334											
M	16,9	19,0	59,8	75,4	26,8	7,6	3,2	1,9	17,3	23,8	
D334R	14,0	10,9	39,1	7,2	6,2	4,3	70,8	20,0	20,4	6,0	
D334S	38,4	7,7	73,8	14,8	20,3	9,7	30,3	16,5	63,8	10,4	
D334T	81,7	27,0	168,1	65,0	121,5	22,5	7,5	8,3	126,9	39,2	
D334V	57,8	25,8	159,5	9,3	111,5	14,7	161,2	2,4	116,9	12,9	
D334Y	91,7	57,5	146,5	18,5	100,9	13,1	169,4	46,1	137,7	12,0	

T335E	25,2	3,6	57,4	5,7	15,9	6,9	52,7	28,8	43,4	7,1
T335I	74,8	2,3	189,0	35,7	77,9	21,6	95,4	4,6	109,4	0,6
T335K	73,1	3,7	208,2	56,6	135,6	38,0	145,8	50,0	164,0	40,1
T335L	81,1	19,8	157,6	25,3	118,8	27,6	155,1	69,2	132,7	20,5
T335M	80,4	6,2	215,8	28,4	122,3	12,8	247,7	16,9	155,8	6,6
T335N	71,1	13,9	128,7	22,1	90,7	1,6	69,6	43,9	116,9	42,7
T335P	39,4	12,8	54,1	4,9	34,2	21,7	1,6	1,8	35,2	18,3
T335R	99,8	72,0	187,3	34,3	142,5	1,0	224,6	72,9	158,0	39,6
T335S	31,5	44,8	75,9	44,6	21,4	17,5	52,2	48,9	41,8	30,8
T335Y	30,1	28,5	157,0	59,9	135,3	16,7	17,0	15,4	149,2	21,6

Y340F	90,0	49,6	224,2	6,7	118,2	30,1	122,5	15,9	141,5	2,6
Y340G	-0,4	1,2	9,7	5,8	1,2	3,6	60,0	31,6	9,8	5,7
Y340I	39,6	17,3	111,4	10,6	59,6	8,4	0,5	1,6	76,5	27,1
Y340M	49,8	4,1	149,4	66,3	80,7	20,1	31,9	21,2	110,4	3,1
Y340N	4,4	1,8	19,7	4,2	5,0	9,3	160,6	21,6	16,2	4,0
Y340Q	2,0	9,1	20,3	11,8	2,7	8,1	90,7	37,0	15,1	11,7
Y340S	-0,7	1,0	25,6	18,8	25,8	40,7	104,8	8,3	31,2	26,8

K352D	-0,6	4,9	184,3	41,1	116,3	3,4	57,6	6,1	179,5	34,6
K352E	1,4	0,7	255,5	136,1	148,4	7,2	153,7	28,0	207,4	57,8
K352G	2,0	8,9	190,0	33,2	135,5	3,2	6,6	1,6	152,3	5,4
K352H	5,8	0,3	147,5	45,7	154,6	44,3	77,0	35,8	125,8	11,0
K352I	3,2	4,4	259,2	54,7	134,0	33,8	160,0	1,2	156,1	23,8
K352L	4,4	7,7	275,6	153,9	213,2	48,2	182,9	37,5	245,2	7,4
K352M	9,5	7,5	216,1	59,7	119,5	9,9	142,3	23,2	192,3	11,0
K352N	4,4	3,2	277,8	82,2	140,3	13,0	173,8	95,2	169,7	14,0
K352Q	7,7	4,9	183,1	22,9	115,4	6,9	138,2	58,9	154,8	4,8
K352S	5,7	0,2	247,5	145,5	172,7	59,6	129,1	6,7	219,3	5,8
K352T	2,7	1,1	251,3	27,7	160,0	39,7	162,2	26,9	248,4	60,5
K352Y	1,3	2,4	208,9	1,2	162,9	96,6	4,8	0,5	250,5	91,5

[0456]

E353G	24,0	0,1	90,3	26,0	51,4	26,9	2,2	0,2	65,7	22,5
E353I	-2,5	2,0	67,3	19,7	39,5	6,2	142,2	65,3	82,5	1,1
E353K	-1,6	0,1	81,1	22,8	36,7	2,8	8,1	1,5	51,4	13,1
E353L	3,3	1,9	100,2	74,2	31,6	39,1	22,7	16,6	45,0	27,3
E353M	21,2	41,7	154,1	7,1	67,7	2,8	156,3	98,0	123,7	21,4
E353N	39,0	31,1	134,7	26,6	67,7	5,6	181,7	16,3	95,1	24,0
E353Q	59,5	6,9	148,5	34,5	91,1	8,1	136,7	52,2	131,8	18,8
E353R	4,9	3,5	112,6	21,3	50,7	29,7	127,4	17,5	85,8	14,5
E353S	7,2	0,4	68,2	22,7	14,7	3,1	15,1	10,8	39,9	2,8
E353T	11,1	1,8	167,7	66,0	78,9	4,8	127,1	44,2	95,0	4,3
E353Y	99,8	34,4	204,1	3,7	116,3	45,7	77,4	19,7	105,4	26,9

[0457]

Y372										
F	14,2	3,5	19,4	17,7	20,3	13,9	154,6	59,5	3,1	1,5
Y373										
C	15,6	7,3	40,7	19,5	26,8	10,0	155,5	26,9	39,5	9,4
Y373										
F	73,6	21,6	170,3	21,3	96,2	17,6	115,3	35,3	134,9	18,4
Y373										
T	9,3	6,2	56,0	20,5	33,2	13,4	16,7	23,0	60,9	15,0
Y373										
V	21,0	6,5	62,3	8,2	48,7	10,2	47,5	33,9	51,7	13,7

[0458]

[0459] 표 12는 시험된 항체의 결합을 20 미만으로 감소시킨 변이체를 요약한다.

표 12

잔기	돌연변이	이 잔기에 결합하는 항체
D229	G, T, V	Refmab #3
		Refmab #5 (not G)
		Refmab #3
E230	H, K, N, Q, S, T	Refmab #4 (only K)
		Refmab #5
		Refmab #2 (not P)
N257	D, E, F, G, H, I, L, M, P, R, T, V	Refmab #4 (M, P 및 T)
		Refmab #1 (only G)
		Refmab #2 (G 및 T)
E259	G, N, P, Q, T	Refmab #3 (only G)
		Refmab #4 (not T)
T264	D	Refmab #4
		Refmab #3 (only T)
N267	H, K, L, S, T, V	Refmab #4 (not T)
		Refmab #1 (only G)
		Refmab #3 (only G)
N286	G, L, R	Refmab #4 (L 및 R)
		Refmab #5 (only G)
S287	T	Refmab #4
		Refmab #3 (not Q)
D292	H, K, L, P, Q, S, T, Y	Refmab #4 (K 및 Q)
		Refmab #5 (not H, L 및 Y)
		Refmab #1
I328	V	Refmab #3
T330	F	Refmab #1
		Refmab #1 (only G)
F331	G, N	Refmab #4 (only N)
		Refmab #1 (M 및 R)
		Refmab #3 (only R)
D334	A, M, R, T	Refmab #4 (not R)
		Refmab #5 (only M)
		Refmab #3 (only E)
T335	E, P, Y	Refmab #4 (P 및 Y)
		Refmab #1 (not I)
		Refmab #2 (G 및 N)
Y340	G, I, N, Q, S	Refmab #3 (G, N 및 Q)
		Refmab #4 (only I)
		Refmab #5 (G, N 및 Q)
K352	D, E, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, Y	Refmab #1
		Refmab #4 (G 및 Y)
		Refmab #1 (not G)
E353	G, I, K, L, R, S, T	Refmab #3 (only S)
		Refmab #4 (G, K 및 S)
		Refmab #1
Y372	F	Refmab #2
		Refmab #5
		Refmab #1
Y373	C, T	Refmab #4 (only T)

[0460]

[0461] 실시예 6: 식별된 변이체의 분석 및 비교

[0462] 도 4는 인간 CD45의 3D 구조 상에서의 식별된 변이체의 위치를 개략적으로 도시한다.

[0463] Refmab #1는 다른 시험된 항체의 다른 부위에 결합하고, 식별된 주요 변이체는 위치 328 및 373 사이에 위치한다. 구체적으로, Refmab #1이 야생형 CD45에 비해 20% 미만의 결합을 나타낸 하기 위치의 변이체가 식별되었다: 잔기 E259, N286, I328, T330, F331, D334, Y340, K352, E353, Y372 및 Y373. 이러한 변이체 중 일부에 대해 시험된 항체의 결합의 비교 결과가 도 5에 표시된다. 예를 들어, 예를 들어, 접근성이 낮은 측쇄에서 비-보존된 루프의 일부인 F331G와 같은 식별된 변이체 중 일부는 덜 바람직한 것처럼 보인다. 변이체 F331, 특히, F331G, 변이체 K352, 특히, 변이체 K352E, K352H, K352I, K352L, K352M, K352N, K352Q, K352S 및 K352T, 및 변이체 K353, 특히, 변이체 E353H, E353K 및 E353R가 특히 바람직한 변이체이다.

[0464] Refmab #2의 결합을 CD45 야생형에 비해 20% 미만으로 억제하는 4종의 변이체가 식별되었다: N257, E259, Y340

및 Y372. 이러한 변이체 중 일부에 대해 시험된 항체의 결합 비교 결과가 도 6에 표시된다. 변이체 N257, 특히, 변이체 N257D, N257E, N257R 및 N257T가 특히 바람직한 변이체이다. 또한, 시험되지 않은 변이체 N257K가 유추에 의해 선호되는 변이체이다.

[0465] Refmab #4의 결합을 CD45 야생형에 비해 20% 미만으로 억제하는 다양한 변이체가 식별되었다: E230, N257, E259, T264, N267, N286, S287, D292, F331, D334, Y340, K352, E353 및 Y373. 이러한 변이체 중 일부에 대해 시험된 항체의 결합 비교 결과가 도 7에 표시된다. 변이체 E230, 특히, 변이체 E230K 및 E230R, 변이체 E259, 특히, 변이체 E259N 및 E259Q, 및 변이체 N257, 특히, 변이체 N257M, N257P, N257T, N257H, N257R, N257S 및 N257V가 특히 바람직한 변이체이다.

[0466] 지금까지 얻은 데이터는 추가적으로 인 실리코(in silico) 돌연변이 유발(mutagenesis)을 통해 분석되었다. 목표는 단백질 서열 변이가 단백질 기능에 영향을 미치는지를 분석하는 것이다. 그렇게 하기 위해, CD45의 선택된 위치에서의 단일 아미노산 치환 후보에 대해 PROVEAN 점수 (PLoS ONE (2012); 7(10): e46688; Choy (2012), In Proceedings of the ACM Conference on Bioinformatics, Computational Biology and Biomedicine (BCB '12). ACM, New York, NY, USA, 414-417)가 생성되었다. 우선, 밀접하게 연관된 서열, 즉, 지원 서열 세트 (supporting sequence set)의 상위 클러스터에 속한 각 서열에 대한 델타 정렬 점수(delta alignment score)를 계산하였다. 그 뒤, 델타 점수를 클러스터 내 및 전체에서 평균을 내 최종 PROVEAN 점수를 생성하였다. 예측된 PROVEAN 점수가 주어진 임계값 (-2.5)과 동일하거나 미만(below)(이상(above))인 경우, 단백질 변이체는 단백질 기능에 유해한(중립적인) 영향을 미칠 것으로 예측된다.

[0467] 결과는 도 8에 표시된다. 실험적으로 식별된 변이체 대부분은 인 실리코로 확인할 수 있었다. 오직 변이체 E259G만이 -2.5 임계값 미만이다.

[0468] 실시예 7: 염기 편집에 의한 CD45 변이체의 생성

[0469] 인간 CD45가 염기 편집을 통한 돌연변이에 용이한(amenable) 지 시험하고 확인하기 위해 염기 편집이 사용되었다.

[0470] 이를 위해, 우리는 여러 염기 편집기 (ABEmax-SpG, xCas9(3.7)-BE4, CBE4max-SpCas9-NG, SPACE-NG, ABEmax-SpRY, CBE4max-SpG 및 ABE8e-NG)에 대해 CD45의 선택된 부위를 표적화하도록 설계된 여러 sgRNA 및 NG(N) 프로토스페이서 인접 모티프(protospacer adjacent motifs, PAM)를 스크리닝하였다. 각 스크리닝 항목(screening entry)에 대해, 우리는 염기 편집기를 암호화하는 5ug의 플라스미드 및 1.5ug의 sgRNA 플라스미드를 2백만개의 K562 세포 (ATCC CCL-243)에 Neon Transfection System 100 μ L Kit (ThermoFisher Scientific) 및 이의 전용 T 완충액 (Invitrogen Ref: MPK10096Tb)를 이용하여 맞춤 프로그램으로 공동-전기천공하였다: 1450V, 10ms, 3 펄스(pulses). 공동-전기천공 24시간 후, BD FACS Aria III Cell Sorter (BD Bioscience)를 이용하여 염기 편집기 플라스미드의 GFP 카세트를 이용한 GFP 양성 세포에 대해 모든 조건을 분류하였다. 그 후 GFP양성 세포를 10% FCS 및 100X GlutaMAX (ThermoFisher Scientific Ref:35050061) 및 페니실린-스트렙토마이신 (1/1000)으로 보충된 1mL의 RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Ref:R8758-500ML)에서 2일 더 확장시켰다. 처음 공동-전기천공 72h 후, 우리는 각 조건에 대해 gDNA를 추출하고 해당 스크리닝된 엑손(exons) (9, 10 및 11)의 PCR 수행하였다. 그 후 PCR 산물을 맞는 정방향 프라이머를 사용한 생어 시퀀싱을 위해 보냈다.

[0471] 관심 CD45 엑손(exons)의 PCR/시퀀싱(Sequencing)을 위한 프라이머쌍(Primer pairs):

[0472] hCD45_Exon9_For = ACAAGCTGAGGTCCTTGTTAG (서열번호 26)

[0473] hCD45_Exon9_Rev = AGCAGAAAGTTACCCACTTG (서열번호 27)

[0474] hCD45_Exon10_For = CCATAGCAATCTCAATCCTTGCC (서열번호 28)

[0475] hCD45_Exon10_Rev = TGCCTGTGTATAACAATTGCCAAG (서열번호 29)

[0476] hCD45_Exon11_For = TGACCTCAAGCTATGTATATGAGG (서열번호 30)

[0477] hCD45_Exon11_Rev = GAGACTGTTACCTCACACCATATAC (서열번호 31)

[0478] 표 13 및 도 9는 스크리닝에서 가장 흥미로운 결과 (단일 아미노산 변이 및 다른 관련 변이체 후보들)를 나타낸다.

[0479] 생성될 변이체는 컴퓨터 지원 합리적 설계(computer aided rational design)로 선택되었다. 하기 변이체는 각

염기 편집기 및 언급된 sgRNA로 생성되었다:

표 13

변이체	염기 편집기	sgRNA	서열
I328V	ABEmax-SpG	sg15	AATATTGAAACCTTTACTTG (서열번호 32)
E259G	ABEmax-SpG	sg7	TGGAATGTGGAAACAATACT (서열번호 33)
N253G	ABEmax-SpG	sg1	GCTAAATGTTAATGAGAATG (서열번호 34)
N255G	ABEmax-SpG	sg3	GTTAATGAGAATGTGGAATG (서열번호 35)
T264I	CBE4max-SpCas9-NG	sg10	AATACTTGCACAAACAATGA (서열번호 36)
E364K	CBE4max-SpCas9-NG	sg40	ATACTCATGTTCTGGGTTCAA (서열번호 37)
P361L	SPACE-NG	sg24	AACCCGAACATGAGTATAAG (서열번호 38)
C367R	ABEmax-SpG	sg41	TCACACTTATACTCATGTTT (서열번호 39)
E269G	ABEmax-SpG	sg13	AATGAGGTGCATAACCTTAC (서열번호 40)
P361F	CBE4max-SpCas9-NG	sg23	TGAACCCGAACATGAGTATA (서열번호 41)
C367Y	SPACE-NG	sg38	CACACTTATACTCATGTTT (서열번호 42)
I371M	ABEmax-SpG	sg27	AATACTCTATAATAACCACA (서열번호 43)
E362G +	ABEmax-SpG	sg25	CCCGAACATGAGTATAAGTG (서열번호 44)
H361R			
Y365H +	ABEmax-SpRY	sg42	GTCACACTTATACTCATGTT (서열번호 45)
C365R			
N263G +	ABEmax-SpG	sg11	AACAATACTTGCACAAACAA (서열번호 46)
T262A			
D368N +	CBE4max-SpCas9-NG	sg43	CTGAGTCACACTTATACTCA (서열번호 47)
E368K			
C367Y +	CBE4max-SpCas9-NG	sg42	GTCACACTTATACTCATGTT (서열번호 45)
D366H			
N253G	ABE8e-NG	sg6	AAGCTAAATGTTAATGAGAA (서열번호 48)
E259G	ABE8e-NG	sg7	TGGAATGTGGAAACAATACT (서열번호 33)
M247V	ABE8e-NG	sg18	AATATGATATTTGATAATAA (서열번호 49)
E357G	ABE8e-NG	sg21	AAATTAGAAAACCTTGAACC (서열번호 50)
E269G	ABE8e-NG	sg13	AATGAGGTGCATAACCTTAC (서열번호 40)
I328V	ABE8e-NG	sg15	AATATTGAAACCTTTACTTG (서열번호 32)
E360G	ABE8e-NG	sg23	TGAACCCGAACATGAGTATA (서열번호 41)

[0480]

[0481]

결과는 도 9에 표시된다. 요약하면, 인간 CD45가 염기 편집에 용이함이 확인되었다. 특히 변이체 I328V, N255G, E360G, E259G, E364K, E269G가 염기 편집기를 통해 성공적으로 편집될 수 있다. 이들 잔기는 CD45의 기능을 보존하면서 K562 세포 및 인간 T 세포에서 효율적으로 편집될 수 있다. 따라서 이 유전자 편집 기술은 본 개시 내용에서 식별된 변이체와 호환 가능하며, 각 임상 환경(clinical setting)에서, 예를 들어, 안전 스위치 또는 보호를 위해 사용될 수 있다.

[0482]

실시예 8: 염기 편집이 생체외(*in vitro*) 항체-약물 접합체 매개된 사멸로부터 인간 T 세포를 보호할 수 있다.

[0483]

인간 일차 T 세포는 제조사의 권장사항에 따라 EasySep Human T Cell Isolation Kit (Stemcell Technologies Ref:17951)를 이용하여 공여자의 PBMC로부터 분리되었다. 그 후 분리된 인간 T 세포를 96 웰 플레이트의 인간 배지 200 μ L (1.5e6 cells/mL)에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 다음 날, IL-2 (150U/mL), IL-7 (5ng/mL), IL-15 (5ng/mL) 및 Dynabead Human T-Activator CD3/CD28 for T Cell Expansion and Activation (Gibco Ref:11132D)를 제조사의 권장사항 (비드:세포 1:1 비율)에 따라 첨가하여 1.5e6 cells/mL의 농도로 세포를 활성화하였다. 48시간의 인큐베이션 후, 세포에서 비드를 제거하고 전기천공을 준비하였다.

[0484] 1백만개의 활성화된 인간 T 세포를 P3 Primary Cell 4D-Nucleofector X Kit L (Lonza)를 이용하여 제조사의 권장사항에 따라 7.5 μg의 ABE8e-NG mRNA (TriLink) 및 7.5 μg의 sg7-E259G (서열번호 33) 또는 sg44-I283M+H285R+N286D (ATATCTCATAATTCATGTAC; 서열번호 64; Synthego)로 전기천공하였다. 전기천공된 세포를 5일 동안 500U/mL의 IL-2로 보충된 인간 배지 1 mL에서 48-웰 플레이트에서 확장하고, 배지를 48시간 마다 교체 (renewal)하였다.

[0485] 염기 편집된 인간 활성화 T 세포가 항체-독소 접합체로부터 보호되는지 시험하기 위해, 5,000개의 대량 염기 편집된 T 세포들을 상이한 농도의 Refmab#4-비오틴-스트렙타비딘-사포린 (웰에 첨가하기 전에 상온에서 30분 동안 미리 인큐베이션한 Refmab#4-비오틴(biotin):사포린(saporin)-스트렙타비딘(streptavidin) 1:1)을 첨가한 100 μL의 인간 배지에서 3일 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 3일 후, 각 조건의 모든 세포를 수집하고, Refmab#4-Ax647, Refmab#1-Ax488으로 및 생존성(viability)에 대해 염색하였으며, 유세포 분석을 위해 200uL의 FACS 완충액에 재현탁하였다. 그 후 각 조건에 대한 전체 재현탁 부피를 BD FACSAria III Cell Sorter (BD Biosciences)를 이용하여 분석하였다. 살아있는 세포를 분류하고 Refmab#4-비오틴-스트렙타비딘-사포린의 농도 증가와 관련된 염기 편집의 농축(enrichment)을 측정하기 위해 생어 시퀀싱을 보냈다.

[0486] 결과는 도 10에 표시된다. PBS 단독 및 비접합된 사포린 (SAP)를 음성 대조군으로 사용하였다. 약 1/3의 염기 편집된 세포들이 Refmab#4에 대한 결합이 손실되었다 (편집된 세포). Refmab#4-비오틴-스트렙타비딘-사포린의 농도 증가는 편집되지 않은 세포의 고갈 증가를 초래했다. 최고 농도 (1nM)에서, 항체-독소가 첨가되었을 때 편집되지 않은 세포 (Refmab #4+ 세포)의 완전한 고갈이 관찰된 반면, 편집된 세포는 지속되었다 (도 10A, Refmab #4 낮은 세포). 이는 생어 시퀀싱으로 확인되었다: Refmab#4-비오틴-스트렙타비딘-사포린의 농도 증가가 A4->G4 염기 편집을 가지는 세포의 %를 증가시켜 아미노산 변이 E259G를 초래하였다 (도 10B). sg44 (서열번호 64)에 대해 유사한 결과를 얻어 I283M+H285R+N286D를 초래하였다. 따라서, 두 독립적인 실시예에서 입증된 바와 같이 인간 T 세포에서의 염기 편집이 세포를 항체-약물-접합체로부터 보호하여 편집된 세포의 농축을 초래할 수 있다.

[0487] **실시예 9: HDR-기반 유전자 편집은 인간 T 세포가 독소에 접합된 Refmab #1에 의한 사멸에 저항하도록 만든다**

[0488] EasySep™ Human T Cell Isolation Kit (Stemcell Technologies ; Cat# 17951)을 이용하여 음성 선택에 의해 인간 T 세포를 PBMCs(말초혈액 단핵세포)로부터 분리하였다. 세포를 37℃에서 12시간 동안 둔 뒤, 1:1의 비율로 IL2, IL7 및 IL15를 보충한 Dynabeads Human-T cells Activator CD23/CD28 (Thermo Fischer; Cat. No. 111.31D)로 2일 동안 활성화하였다. 그 뒤, 활성화된 T 세포를 Nucleofector 4D unit (Lonza)를 이용하여 P3 완충액에서 펄스 EH115로 120pmol의 sgRNA에 접합된 60pmol의 Cas9로 전기천공하였다. PGA를 RNP에 gRNA:PGA:Cas9 = 1 : 0.8 : 1의 비율로 첨가하였다. 녹-인의 경우, RNP 혼합물을 50pmol의 상동인도복구 (HDR) 주형으로 보충하였다. 전기천공 4일 후, 녹-인 효율 분석을 위해 FACS로 세포를 스크리닝하였다. 세포를 항-CD4 (OKT4), 항-CD8 (RTPA-8), 항 CD45 (Refmab #3) 및 항-CD45 (Refmab #1)로 염색하였다.

[0489] 이 실험에 사용된 변이체는 F331del, 즉, 위치 331에서 페닐알라닌(phenylalanine) 잔기가 결핍된(lacking) CD45 변이체이다. 세포를 RNP 단독으로 전기 천공하면, CD45이 녹-아웃되고, Refmab's #1 및 #3의 결합 손실 (loss-of-binding)로 나타난다 (도 11). 점 돌연변이를 암호화하는 HDR 주형으로 형질전환된 세포는 Refmab #1에 대한 결합을 손실하였으나, 여전히 Refmab #3에 반응하였다.

[0490] 편집 CD45에 대한 이 실험에서 사용된 gRNA: CTTACCACACTGAAATCTGT (서열번호 51)

[0491] 인간 T 세포 조작에 사용된 HDRT는 표 14에 표시된다:

표 14

변이체	HDRT 서열
T332del	Alt-R- /HDR1/T*T*TTAAATGGAAAAATATTGAAACCTTTTgcGAcAcTCAaAAcATcACaTAtAGATTTCAGTGTGGTAAGAATA TAACATTGACCAGAGAATTTTTTTTGT*G*G/Alt-R-HDR2/ (서열번호 52)
T330K	/Alt-R- HDR1/T*T*TTAAATGGAAAAATATTGAAAAATTcACgTgcGAcAcTCAaAAcATcACaTAtAGATTTCAGTGTGGTAAGAAT ATAACATTGACCAGAGAATTTTTTTTGT*G*G/Alt-R-HDR2/ (서열번호 53)

F331T332del	/Alt-R- HDR1/T*T*AAAAATGGAAAAATATTGAAACCTGcGAcACtCAaAAcATcACaTAtAGATTTTCAGTGTGGTAAGAATATAACA TTGACCAGAGAATTTTTTTTGT*G*G/Alt-R-HDR2/ (서열번호 54)
T330del	/Alt-R- HDR1/T*T*AAAAATGGAAAAATATTGAATTcACgTgGcGAcACtCAaAAcATcACaTAtAGATTTTCAGTGTGGTAAGAATATA ACATTGACCAGAGAATTTTTTTTGT*G*G/Alt-R-HDR2/ (서열번호 55)
F331del	/Alt-R- HDR1/T*T*AAAAATGGAAAAATATTGAAACCACTTgGcGAcACtCAaAAcATcACaTAtAGATTTTCAGTGTGGTAAGAATATA ACATTGACCAGAGAATTTTTTTTGT*G*G/Alt-R-HDR2/ (서열번호 56)

[0493] 다음으로, 5000개의 조작되고 분류된 인간 T 세포를 96 웰 플레이트의 50U/ml IL2 보충된 100ul의 배지에 분배하였다. PBS에서 비오틴화된 Refmab #1를 스트렙타비딘-결합된 ZAP에 1:1의 비율로 접합하였다. 세포를 37℃에서 3일 동안 50nM의 Refmab #1-ZAP 혼합물과 인큐베이션하였다. 인큐베이션이 끝나고, 100ul의 CellTiter Glow (Promega Cat Nr: G9241)를 각 웰에 첨가하였다. 발광(Luminescence)을 1초의 통합 시간(integration time of 1s)으로 판독하였다.

[0494] 결과는 도 12에 표시된다. 야생형 세포는 낮은 발광을 나타내, 항체 약물 접합체에 의한 사멸을 나타냈다. 반면, CD45 녹-아웃 세포 및 CD45 변이체를 발현하는 세포는 사멸로부터 보호되었다.

[0495] 유사하게, F331del 발현하도록 CD34+ HSPCs를 조작하였다. 그 후 세포를 항체 *Optimus Prime*-tesirine 와 인큐베이션하였다 (실시예 18 참조). 비-편집된 세포를 고갈된 반면, CD45 KO 및 CD45 F331del 세포는 보호되었다.

[0496]

[0497] 실시예 10: 세포에서의 CD45 녹 아웃 및 세포주에서의 CD45 변이체 재-발현

[0498] Nucleofector 4D unit (Lonza)를 이용하여 K562 세포 (ATCC CCL-243)를 CD45를 표적화하는 RNP로 전기천공하였다. gRNA는 실시예 9에서 사용한 것 (서열번호 51)과 동일하다. 전기천공 4일 후, CD45KO에 대해 세포를 분류하고 한계 희석(limiting dilution)을 통해 분리하여 단일 클론을 받았다. 클론을 성장시키고 시퀀싱하였다. CD45 유전자에서 삽입-결실(indel)을 나타낸 모든 대립유전자를 가지는 클론을 선별하였다.

[0499] 선택된 클론으로부터 번식(propagate)된 세포를 Neon transfection system (Thermo Fisher)로 전기천공하였다. CD45의 변이체 형태를 암호화하는 6.5ug의 플라스미드를 2백만개의 세포와 혼합하였다. 하기 변이체를 암호화하는 플라스미드가 사용되었다.

표 15

변이체	플라스미드	변이체
Mut1	p459_CD45RO_E329I	E329I
Mut2	p460_CD45RO_E329K	E329K
Mut 3	p461_CD45RO_T330E	T330E
Mut 4	p462_CD45RO_T330D	T330D
Mut 5	p468_CD45RO_T330R	T330R
Mut 6	p470_CD45RO_T330K	T330K
Mut 7	p469_CD45RO_T330I	T330I
Mut 8	p471_CD45RO_2aadel	2aa-del
Mut9	p511_CD45RO_F331del	F331del
Mut10	p512_CD45RO_T332del	T332del
Mut11	p552_CD45RO_T330A	T330A
Mut12	p553_CD45RO_F331S	F331S
Mut13	p554_CD45RO_F331I	F331I
Mut14	p555_CD45RO_F331L	F331L
Mut15	p598_CD45RO_T330del	T330del
Mut16	p599_CD45RO_F331A	F331A
Mut17	p600_CD45RO_T332A	T332A
WT CD45RO	p453_pCMV3_CD45RO	야생형
대조군(Ctrl)	DNA 없이 전기전공(electroporation)	n/a

[0500]

[0501]

전기천공 24시간 후 FACS를 위해 세포를 항-CD45 (Refmab #3) 및 항-CD45 (Refmab #1) 항체로 염색하였다. 단백질의 CD45RO (야생형) 형태가 두 항체에 결합한 반면, CD45 변이체에 대한 Refmab #1에서 결합 손실이 관찰되었다. 모든 변이체가 Refmab #3와의 결합을 유지하여, 단백질이 전기천공된 세포에 의해 발현된 것을 검증하였다. 결과는 도 13에 표시된다.

[0502]

또한 동일한 실험이 Jurkat 세포로도 수행되어 실질적으로 동일한 결과를 얻었다.

[0503]

실시예 11: HDR을 이용하여 인간 CD34+ HSPCs에서 CD45를 보호하는 조작

[0504]

제조사의 권장사항에 따라 CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec)를 이용하여 인간 CD34 세포를 G-CSF 동원한 건강한 공여자로부터 분리하였다. 그 뒤, 분리된 인간 CD34 세포를 2일 동안 배양물(culture) (HSC Brew GMP medium supplemented with 100 ng/mL rhSCF, rhFlt3L, rhTPO 및 60 ng/mL rhIL3)에서 미리-자극하고, CliniMACS Prodigy Electroporator를 이용하여 CRISPR/Cas9 유전자 편집 시약 (SpyFi Cas9 단백질 + gRNA = RNP 복합체, 및 HDR 주형)으로 전기천공하였다. HDR 주형은 하기 서열이다:

[0505]

TTTAAATGGAAAAATATTGAAACCACTTGcGAcAcTCAaAAcATcAcATatAGATTTTCAGTGTGGTAAGAATATAACATTGACCAGAGAATTTTTTTTGTGG (서열번호 56).

[0506]

전기천공된 세포를 7일 동안 확장하고 FACS로 분석하였다. 세포를 상이한 두 가지 CD45 항체, 돌연변이의 부위에 결합하는 첫 번째 항체 (Refmab #1) 및 다른 부위에 결합하는 두 번째 항체 (Refmab #3)로 염색하였다. 결과는 50% 녹-아웃 및 5-6% HDR-매개 녹-인 세포의 존재를 나타낸다 (돌연변이된 에피토프를 표적화하는 항체의 결합의 손실 및 두 번째 항체의 결합의 유지로 확인됨). 도 14 참조.

[0507]

실시예 12: DF-1 세포에서 변이체의 발현

[0508]

DF-1 세포 (ATCC 번호 CRL-12203)는 인간 CD45에 대한 항체와 인큐베이션시 염색이 나타나지 않는다. 따라서, 인간 야생형 또는 돌연변이 CD45 변이체를 발현시키기에 적합한 세포주이다. DF-1 세포를 야생형 CD45 (서열번호 1)를 포함하는 컨스트럭트 또는 돌연변이 CD45 변이체를 포함하는 컨스트럭트로 형질전환하였다.

- [0509] Lipofectamine Lipofectamine™3000 Transfection Reagent (Thermo Fischer Scientific, cat. L3000008)를 이용하여 선택된 CD45 변이체 (K352E, K352H, N257R 또는 N257T) 또는 야생형 CD45로 DF-1 세포를 형질전환하였다. 72시간 후, 형질전환 효율 및 CD45의 발현을 AlexaFluor 647 (APC)로 직접 표지된 항체 Refmab #4 및 AlexaFluor 488 (FITC)로 직접 표지된 항체 Refmab #1을 이용하여 FACS로 분석하였다. Refmab #1 및 Refmab #4는 CD45의 상이한 부위에 결합한다. 이 항체 조합을 이용하면, CD45의 특정 돌연변이에 대한 관심 항체의 결합의 손실을 평가하면서, 두 번째 항체의 결합의 유지를 측정하여 변이체 CD45가 세포에 의해 여전히 발현되고, 구조적으로 폴딩된다는 것을 알 수 있다.
- [0510] 결과는 도 19 (패널 A: 야생형, 패널 B: K352E, 패널 C: K352H, 패널 D: N257R, 패널 E: N257T)에 표시된다. 야생형 단백질은 두 항체, Refmab #1 및 Refmab #4에 결합하는 반면, K352E, K352H 변이체는 Refmab #4에 의해서만, 및 N257R 및 N257T 변이체는 Refmab #1에 의해서만 검출되었다. 이는 잔기 K352의 돌연변이가 Refmab #1의 결합 손실을 초래하고, 잔기 N257의 돌연변이가 Refmab #4의 결합 손실을 초래하는 것을 확인시켜준다.
- [0511] 추가적인 실험을 시험하면서 동일한 실험이 반복되었다. 시험된 변이체는 K352E, K352H, K352S, K352T, N257D, N257R, N257S, N257T, E353K, E259G, E259Q 및 E259N이다. 결과는 도 21 (K352E, K352H, K352S, K352T, N257D, N257R, 각각 패널 A-F) 및 22 (N257S, N257T, E353K, E259G, E259Q, E259N, 각각 패널 A-F)에 표시된다.
- [0512] **실시예 13: CD45 D1-D2 단편 및 변이체의 발현 및 정제**
- [0513] 정확한 항체-단백질 친화도 측정 및 구조적 특성화를 위해, 야생형 및 돌연변이 d1-d2 CD45의 엑토도메인 (ectodomain)을 생산하였다. 단백질 서열 (잔기 225-394)은 C-말단에 히스티딘 태그되어 있고, 크리스탈 패킹 (crystal packing)에 중요한 아미노산이 추가된 N- 및 C-말단을 거의 포함하지 않는다 (전체 wt 서열 ETGIEGRKPTCDKYANITVDYLYNKETKLF TAKLVNENVECGNNTCTNNEVHNLTECKNASVSI SHNSCTAPDKTLILDVPPGVEKFQLHDC TQVEKADT TICLWKNIETFTCDTQNI TYRFQCGNMIFDNKEIKLENLEPEHEYKCDSEILYNNHKFTNASKI IKTD FGSPGEGTKHHHHHHH 서열번호 57/Uniprot ID P08575). N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이스(acetylglucosaminyltransferase) I (GnTI) 활성이 결핍되어 N-글라이칸 복합체(complex)가 결핍된 Expi293F GnTI 세포 (Thermo Fisher; #A39240)가 단백질 발현에 사용되었다. 수집 후, Ni-NTA 크로마토그래피를 이용하여 단백질을 정제한 뒤, 37℃에서 밤새 엔도글리코시데이즈(endoglycosidase) H (EndoHf (New England BioLabs, P0703S))로 고수준 만노스 글라이칸(high mannose glycan)을 분해하였다. 아밀로스 레진으로 단백질 용액으로부터 EndoHf를 제거하고 CD45 단백질을 크기 배제 크로마토그래피로 완충액 150mM NaCl, 20mM Hepes pH7.4에서 추가 정제하였다. 피크 단량체 (c7-c10) 및 이량체 분획 (필요한 경우)을 10kDa cut off Amicon 원심분리 필터(centrifugal filter)를 이용하여 농축하였으며 단백질 분액(aliquot)을 액체 질소에서 급속 냉동한 후 -150℃에서 보관하였다. **예*,** CD45 D1-D2 야생형 단백질을 생산하였다. 같은 실험 과정을 이용하여 변이체 CD45 단백질이 생산되었다. 각 단백질에 대한 단량체 함량 %을 크기 배제 크로마토그램 (분획 c5-c11)으로부터 얻었다. 도 15는 크기 배제 크로마토그래피의 대표적인 크로마토그램 (패널 A) 및 정제된 비-당화된 wt 단백질의 SDS-PAGE (패널 B)를 나타낸다.
- [0514] **실시예 14: CD45 변이체의 Refmab에 대한 결합**
- [0515] 선정된 변이체에 대한 결합 분석을 Refmab #1, Refmab #2 및 Refmab #4로 수행하였다. 항체의 CD45 야생형 및 변이체에 대한 결합을 1x 동역학 완충액(kinetic buffer) (Sartorius, PN: 18-1105)를 사용하여 25 °C에서 1,000 rpm으로 진탕하면서 Octet system RED96e (Sartorius) 또는 R8에서 측정하였다. 상이한 농도의 CD45 (야생형 또는 변이체)를 이용하여 이들의 Refmab #1 및 Refmab #2에 결합하는 능력에 대해 선정된 변이체를 스크리닝하였다. 0.5 내지 1 ug/mL 농도에서 300초 동안 항체가 항-인간 Fc 포획 바이오센서 (Anti-Human Fc capture biosensor, AHC) (Sartorius, PN: 18-5060)에 의해 포획(capture)되었다. 피분설물로서, 도메인 1, 2 (CD45 D1-2)만을 함유하는 인간 CD45 wt 및 변이체를 3-7의 상이한 농도 (2000 nM 내지 1 nM)에서 적정되었다. 피분석물의 항체에 대한 결합(Association)이 300 또는 600초 동안 모니터링되었고 피분석물의 항체로부터의 해리(dissociation)가 900 또는 1800초 동안 모니터링되었다. 완충액 단독 웰에 대해 참조 빼기(Reference subtraction)가 수행되었다. 10 mM Gly-HCl pH 1.7를 이용하여 AHC 팁(AHC tips)이 재생되었다. Octet Data Analysis 소프트웨어 HT 12.0를 이용하여 데이터를 분석하였다. 데이터를 1:1 결합 모델에 맞추었다. 동역학 속도(Kinetic rates) k_a 및 k_d 를 전체적으로 맞추거나(globally fitted) 정상 상태(steady state) 분석을 수행하였다.
- [0516] Refmab #4에 대한 결합을 분석하기 위해, 스트렙타비딘 (SA) 바이오센서 (Sartorius, PN: 18-5020)를 먼저 1

ug/mL의 CaptureSelect™ 비오틴 항-LC-kappa (murine) 접합체 (Thermo Scientific, PN: 7103152100) 로 600초 동안 코팅하였다. 그 뒤, 0.5-1.0 ug/mL에서 Refmab #4를 300초 동안 코팅된 SA 바이오센서로 포획하였다. Refmab #1 및 #2에 대해 피분석물 적정, 결합 및 해리가 수행되었다.

[0517] 결과는 표 16 및 도 20에 표시된다. Refmab에 대한 %결합은 hCD45 변이체의 nm 이동을 hCD45 wt로 나눠 계산된다. 이 계산에 사용되는 nm 이동은 결합 종료 (300초)시 최고 hCD45 농도 (500 nM)에 대한 것이다. 별표로 표시된 것은 50 nM (500 nM 대신) hCD45 변이체의 nm 이동을 50 nM (500 nM 대신) hCD45 wt의 nm 이동으로 나눠 계산된 %결합 결과이다. ND는 측정되지 않음을 나타내고 NA는 분석되지 않음을 나타낸다. 위치 230, 257, 259, 및 267에서의 돌연변이는 Refmab #1에 대한 결합에 실질적으로 영향을 미치지 않은 반면, K352D, K352E, K352H, K352I, K352L, K352N, K352T, E353K, E353R 및 이중 돌연변이 N351D K352E에 대해서는 결합이 관찰되지 않았다 (피분석물 농도 500 nM 까지). 또한 위치 T330 및 F331가 결실되었을 때 결합이 관찰되지 않았다. 더 낮은 Refmab #1 결합이 K352S 및 F331A에 대해 관찰되었다.

[0518] 단일 점 돌연변이 E230K, E259N, H285R, N286D뿐만 아니라 삼중 돌연변이 I283M H285R N286D도 Refmab #4에 대한 결합이 감소한 반면, hCD45 D1-2 변이체 (N257D, N257E, N257K, N257R, N257G, N257T, E259G, E259Q, E259V, N267S 및 이중 돌연변이 H285R N286D)에 대해서는 피분석물 농도 500 nM까지 Refmab #4에 대한 결합이 관찰되지 않았다.

[0519] N257D 및 N257T에 대해 낮은 Refmab #2 결합이 관찰되었으며 N257E, N257K, N257R, 및 N257G에 대해 Refmab #2 결합이 관찰되지 않았다 (피분석물 농도 500 nM까지).

표 16

	Refmab #1	Refmab #2	Refmab #4	단량체
	결합%	결합%	결합%	함량%
WT	100	100	100	55
당화된 WT	119 (*)	NA	103	54
E230K	119	98	49	23
N257D	118	11	0	55
N257E	108	0	0	62
N257K	101	0	0	50
N257R	100	0	0	47
N257G	95	0	0	23
N257T	90	17	0	83
E259G	88	84	0	27
E259N	114	81	9	49
E259Q	110	78	0	49
E259V	110 (*)	NA	0	60
N267S	105	79	0	12
K352D	0	104	115	59
K352E	0	121	87	50
K352H	0	105	70	50
K352I	0	97	49	32
K352L	0	120	57	20
K352N	0	131	68	34
K352S	4	86	69	63
K352T	0	130	52	34
E353A	95	87	57	22
E353K	0	129	47	32
E353R	0	112	66	19
I283M	129	NA	44	21
H285R	105	NA	4	12
N286D	144	NA	7	55
H285R N286D	ND	NA	0	12
I283M H285R N286D	44	NA	5	17
N351D	119	NA	123	59
K352E	8	NA	108	43
N351D K352E	0	NA	93	40
F331A	40	NA	139	28
T330 결실 F331 결실	0	NA	104	26

[0520]

[0521] 실시예 15: 나노DSF에 의한 CD45 변이체의 특성화

[0522]

Nanotemper Prometheus NT.48 NanoDSF (NanoTemper Technologies)를 이용한 시차 주사 형광측정법 (differential scanning fluorimetry)에 의해 CD45 D1-D2 변이체의 열안정성(Thermostability)이 분석되었다. 150mM NaCl, 20mM Hepes pH7.4에서 0.25-1.0 mg/mL의 CD45 D1-D2 야생형 및 변이체를 이용한 트립토판 형광이 측정되었으며 온도는 20 °C에서 95 °C로 증가되었다. 용해 온도는 S자 곡선의 변곡점(inflexion point)으로 결정되었으며 CD45 D1-2 wt과 비교되었다. 결과는 도 17 및 도 18에 표시된다.

[0523]

실시예 16: 기능적 분석

[0524]

CD45에 의한 표적 단백질의 탈인산화(dephosphorylation)가 AlphaLISA 면역분석(immunoassay) (Perkin Elmer)과 같은 통상적으로 사용되는 분석으로 통상의 기술자에 의해 시험될 수 있다. CD45 야생형 또는 아이소폼을 발현하는 세포는 세포 파쇄 전에 항-CD3 항체로 다양한 시점 동안 (5-20분) 활성화된다. 위치 Tyr505 또는 전체 Lck에서의 Lck의 인산화가 검출되고 플레이트 리더에 의해 판독된다.

[0525]

AlphaLISA 분석을 이용하여 CD45에 의한 위치 Tyr505에서의 Lck의 탈인산화 또는 전체 Lck가 측정되었다. 세포, 예를 들어, Jurkat 세포 (이의 야생형 또는 변이체)가 수집되고, HBSS 배지와 37°C에서 2시간 동안 미리 인큐베이션된다. 분석 플레이트 (96-웰 플레이트)가 37°C에서 2시간 동안 또는 4°C에서 밤새 웰 당 100uL 배지 중 10ug/mL 항-CD3 항체로 코팅된다. 분석 플레이트를 멸균 PBS로 2회 세척하고 세포를 80uL의 HBSS 배지에 웰 당

10.000-50.000 세포의 농도로 분주한다. 나머지 분석은 모든 필요한 시약 (PerkinElmer AlphaLISA #ALSU-PLCK-A-HV 및 #ALSU-TLCK-A-HC)을 포함하는 제조사 (Perkin Elmer)에 따른 Assay Kit Protocol에 따라 수행되었다. 5-30분 후 20uL의 5x Lysis 완충액을 웰에 첨가하고 10분 동안 플레이트 교반기 상에서 350rpm으로 인큐베이션하였다. 5uL의 파쇄물을 384-백색 웰 플레이트로 옮기고 5uL의 Acceptor Mix (제조사의 프로토콜에 따른)를 웰에 첨가하고, 호일로 밀봉하고, 플레이트 교반기 상에서 2분 동안 인큐베이션하고 상온에서 1시간 이상 인큐베이션하였다. 5uL의 Donor Mix (제조사의 프로토콜에 따른)를 웰에 첨가하고, 플레이트를 호일로 밀봉하고, 플레이트 교반기 상에서 2분 동안 혼합하고 상온에서 1시간 이상 인큐베이션하였다. 그 후 플레이트를 Envision 플레이트 리더 (Perkin Elmer)에서 관독하여 총 Lck 및 인산화된 Lck를 검출하였다.

[0526] AlphaLISA 분석을 통해 위치 Tyr505에서 Lck의 인산화를 측정하는 분석 결과가 도 16에 표시된다. 10.000-50.000 Jurkat 야생형 또는 Jurkat CD45 녹-아웃 세포를 20분 동안 항-CD3 항체로 코팅된 플레이트에서 인큐베이션한 후 세포 파쇄 및 인산화된 Lck를 검출하였다. 항-CD3 항체를 이용한 Jurkat 세포의 활성화는 CD45 활성화를 초래하여 결국 Lck를 탈인산화한다. Jurkat CD45 녹-아웃 세포는 활성화시 Lck를 탈인산화할 수 없다. 도는 엑셀터 신호 (수)를 나타내며 두 번의 기술적으로 반복된 실험이 포함된 한 생물학적 실험을 표시한다.

[0527] **실시예 17: 인간 세포로의 항체의 내재화(Internalization)**

[0528] FACS와 같은 통상적으로 사용되는 분석으로 통상의 기술자에 의해 항체 내재화가 시험될 수 있다. CD45를 발현하는 세포가 형광단(fluorophore), 예를 들어, Alexa Fluor 488 (AF488)로 표지된 항체와 다양한 시점 동안 (1-24h) 인큐베이션된 후, 세척 및 항-AF488 항체로 한 시간 동안 소광(quenching)된다. 내재화된 항체는 FACS 관독에 신호를 줄 수 있는 반면, 세포 표면에 결합된 항체의 신호는 소광되고 검출 불가능하다.

[0529] CD45 또는 이의 변이체를 발현하는 TF-1 또는 Jurkat 세포로의 항체 내재화를 FACS로 측정한다. TF-1 세포가 1백만 세포/mL의 밀도로 96-웰 플레이트의 0.1mL의 배지 (TF-1 세포: GlutaMAX + 10% 열 불활성화된 FBS + 2ng/mL GM-CSF 로 보충된 RPMI1640; Jurkat 세포: RPMI ATCC 변형 + 10% 열 불활성화된 FBS)에 분주된다. 다음 날, 37℃ 또는 4℃에서 1-24 시간 동안 세포에 Alexa Fluor 488 (AF488; Alexa Fluor®488 Conjugation Kit (Fast) - Lightning-Link®Abcam)로 표지된 2-20 µg/mL 항체를 처리한 후, 세포를 수집하고 얼음처럼 찬 PBS로 세척한다. 20-200µg/mL 항-AF488 항체 (Alexa Fluor 488 다클론(Polyclonal) 항체, ThermoFisher Scientific)를 함유하는 얼음처럼 찬 PBS로 세포를 한 시간 동안 재현탁한 뒤, FACS 기계 (NovoCyte, Agilent)로 데이터를 획득한다. 내재화된 항체의 신호는 FACS로 측정되는 반면, 세포 외부의 항체의 신호는 소광된다. 항체 내재화 백분율은 소광제와 인큐베이션된 세포의 신호를 소광제 없이 인큐베이션된 세포의 신호로 나뉘 계산된다.

[0530] **실시예 18: 개선된(Improved) Refmab 항체**

[0531] 항체 Refmab #1의 개선된 버전이 생성되었다. 예시적인 개선된 결합체(binder)인, 항체 Optimus Prime의 아미노산 서열이 표 17에 표시된다.

표 17

[0532]

Optimus Prime		
서열번호	설명	서열
58	VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSNYDMSWIRQAPGKGLEWVSYISSGGVSTYYPDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRYDVWWYFDVWGRGLTVTVSS
59	VL	DVVMTQSPSLPVTTLGQPASISCRSSQSIVHSNAKTYLEWYQRPQGSPRLLIYKVSNFLFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVMTFGQGTKLEIK
4	HCDR1	NYDMS
5	HCDR2	YISSGGVSTYYPDTVKG
6	HCDR3	RYDVWWYFDV
60	LCDR1	RSSQSIVHSNAKTYLE
61	LCDR2	KVSNFLFS
9	LCDR3	FQGSHPVMT

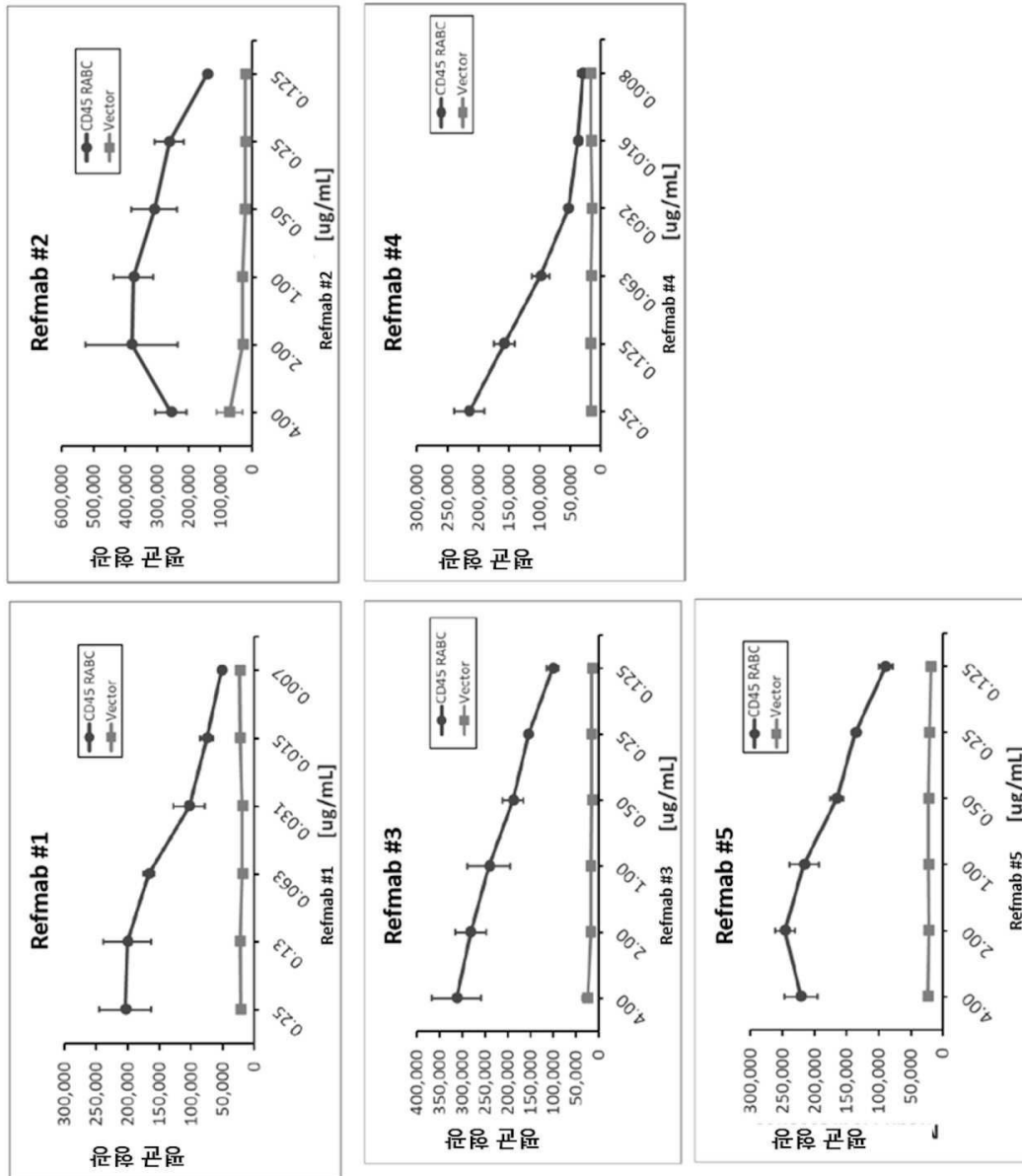
[0533] 항체 Optimus Prime은 Refmab #1과 동일한 결합 특이성을 가지는 것으로 입증되었다

[0534] **실시예 19: 염기 편집에 의한 HSCs 보호**

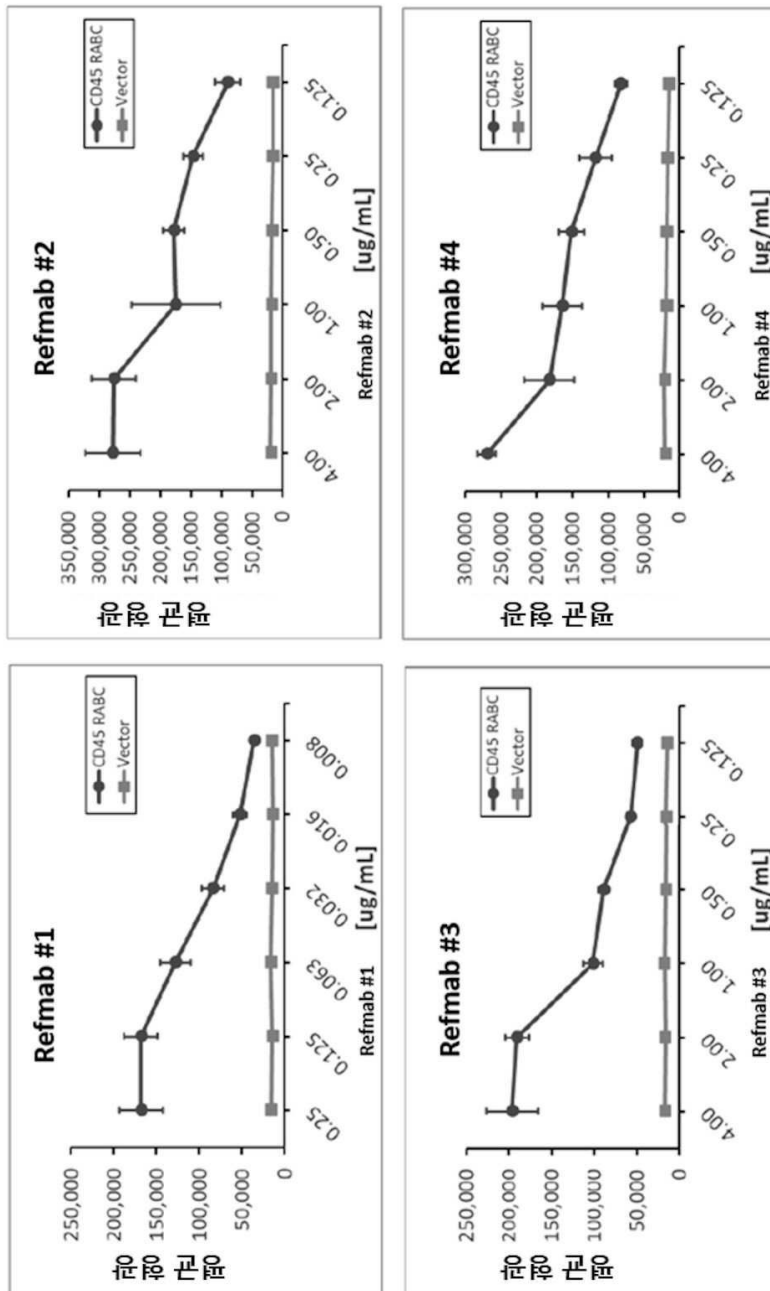
- [0535] 염기 편집에 의해 K352E를 발현하도록 조작된 인간 HSCs의 보호를 시험하기 위해, 1백만개의 hCD34+ HSPCs를 해당 48시간 후 P3 Primary Cell 4D-Nucleofector X Kit L (Lonza)를 이용하여 Lonza CA-137 펄스 프로그램에 대한 제조사의 권장사항에 따라 7.5 μ g의 염기 편집기 mRNA (Trilink) 및 13.6 μ g의 sgRNA (Synthego) (BE:sgRNA 1:100 분자비)로 전기천공하였다. 전기천공된 CD34+ HSPCs를 6-웰 플랫 바텀 플레이트(flat-bottom plate) (Corning #3516) 에서 5일마다 교체되는 줄기세포 배지 (StemSpan SFEM II (StemCell #09655) + 1uL/mL hSCF (Miltenyi #130-096-695) + 1mL/mL hFlt3-Ligand (Miltenyi #130-096-479) + 1uL/mL hTPO (Miltenyi #130-095-752)에서 mL 당 0.5e6 세포로 계속 배양하였다. 편집은 전기천공 5일 뒤 유세포 분석을 이용하여 분석되었다.
- [0536] K352E는 ABE8e-NG mRNA (Trilink) 및 sgRNA-49 (서열번호 33; Synthego)를 이용한 염기 편집에 의해 CD34+ HSPCs에서 조작될 수 있다. 이는 <1%의 Refmab#1 염색되지 않은 CD34+ HSPCs를 초래했다 (도 23A). 편집률을 증가시키기 위해, ABE8e를 프로토스페이서의 염기 편집 창(base editing window) 내의 더욱 바람직한 위치로 재위치 설정하려고 했다. 이를 위해, 우리는 SpRY Cas9 변이체의 더 적게 제한적인(restrictive) PAM 인식능을 이용하였다 (Science (2020) 368: 190-6). 우리는 관심 부위에서 gRNA를 1 nt씩 이동하면서 타일(tiled)하였다. 이로 인해 원하는 편집 활성이 크게 증가했다. 유세포 분석은 sgRNA-49.3 (서열번호 62) 또는 sgRNA-49.4 (서열번호 63)와 결합된 ABE8e-SpRY mRNA가 Refmab#4 결합 변화 없이 33% 및 26%의 Refmab #1 음성 세포 집단을 각각 생성한 것으로 나타났다 (도 23B). ABE8e-NG+sgRNA-49와 유사하게, ABE8e-SpRY+sgRNA-49의 결합이 <1%의 보호된 세포를 초래했다. 대량의 염기 편집된 CD34+ HSPCs의 생어 시퀀싱이 sgRNA-49.3 및 sgRNA-49.4를 이용하여 개선된 K352E 염기 편집을 확인하였다.
- [0537] sgRNA-49 서열: TGGAATGTGGAAACAATACT (서열번호 33; ABE8e-NG 및 ABE8e-SpRY 모두가 표적화 가능한 (targetable))
- [0538] sgRNA-49.3 서열: GGAATGTGGAAACAATACTA (서열번호 62; ABE8e-SpRY만이 표적화 가능한)
- [0539] sgRNA-49.4 서열: GAATGTGGAAACAATACTAG (서열번호 63; ABE8e-SpRY만이 표적화 가능한)

도면

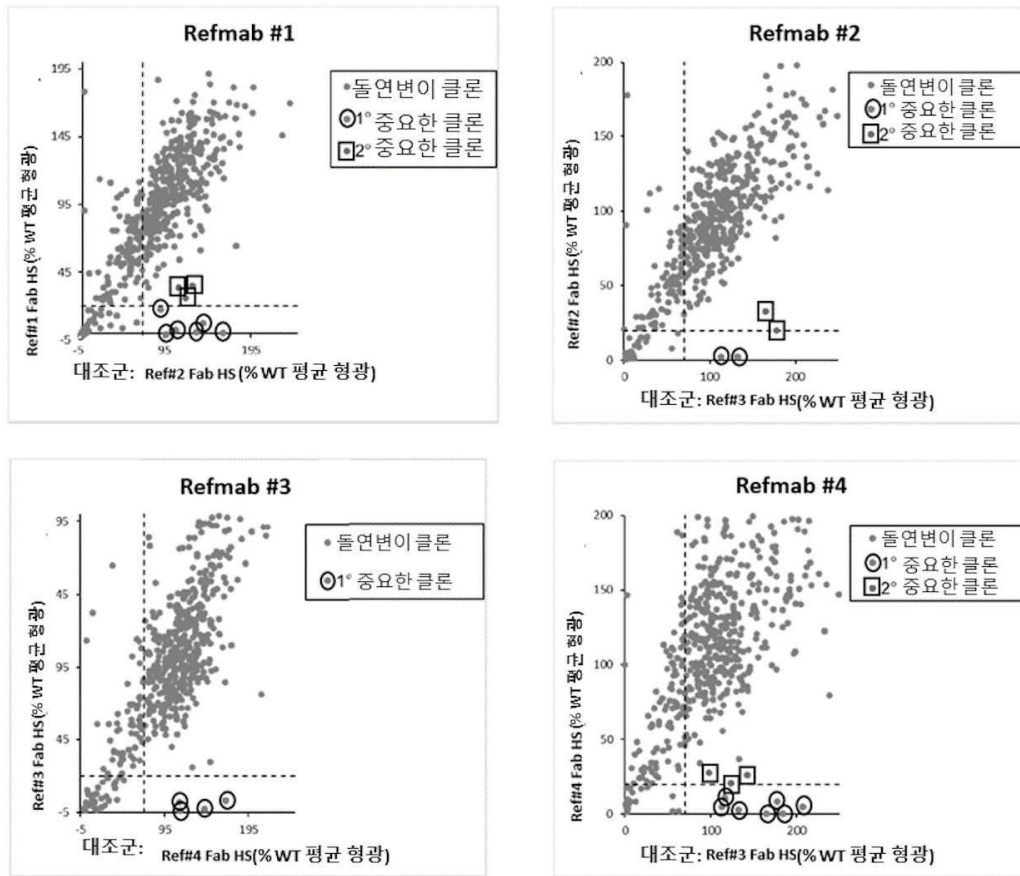
도면1



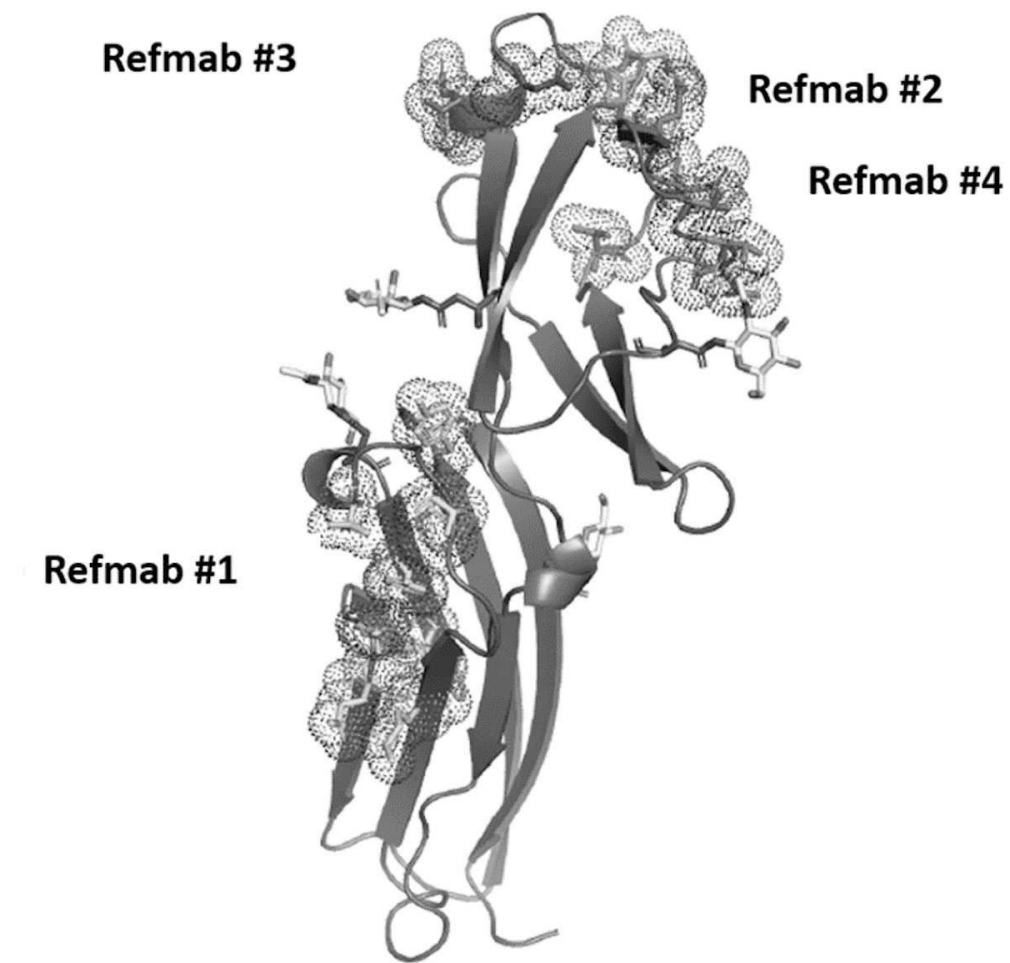
도면2



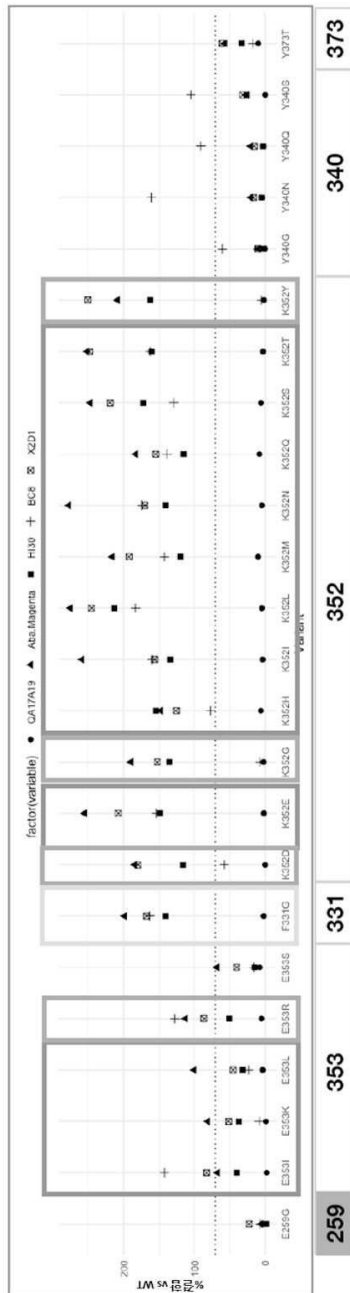
도면3



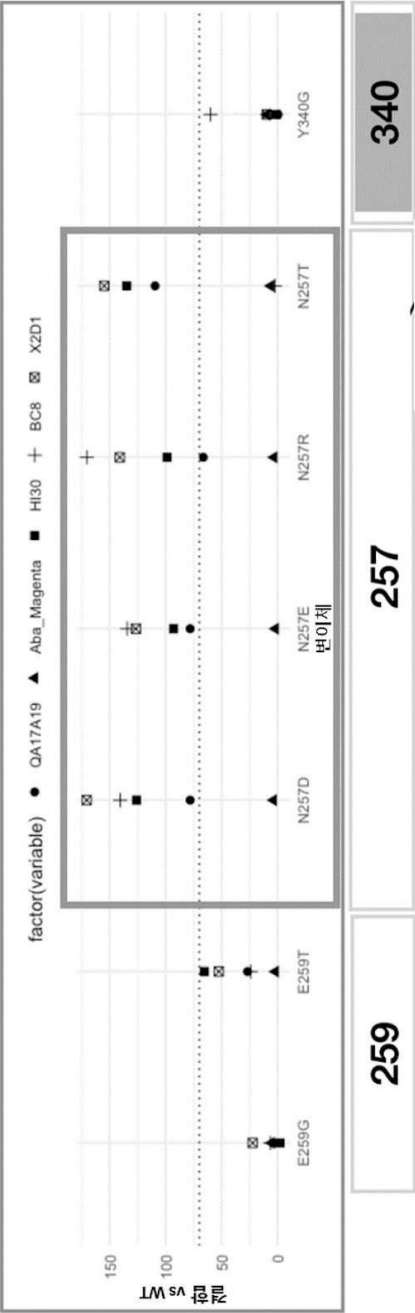
도면4



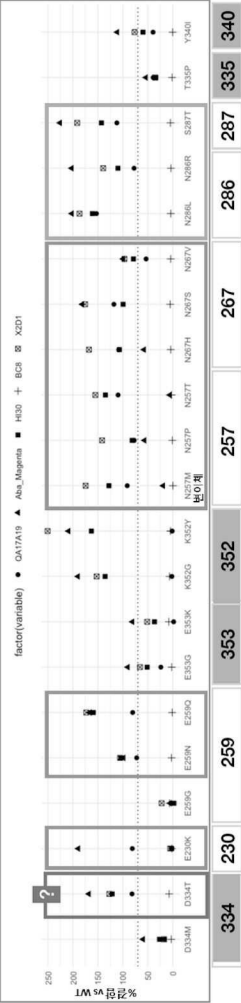
도면5



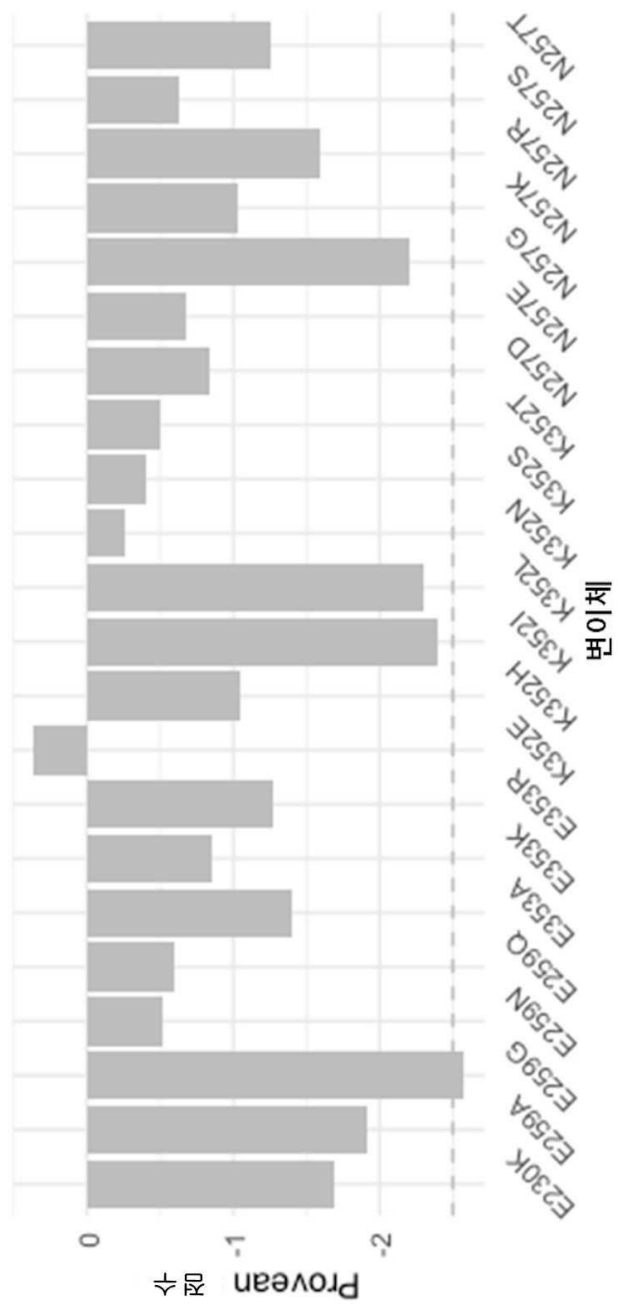
도면6



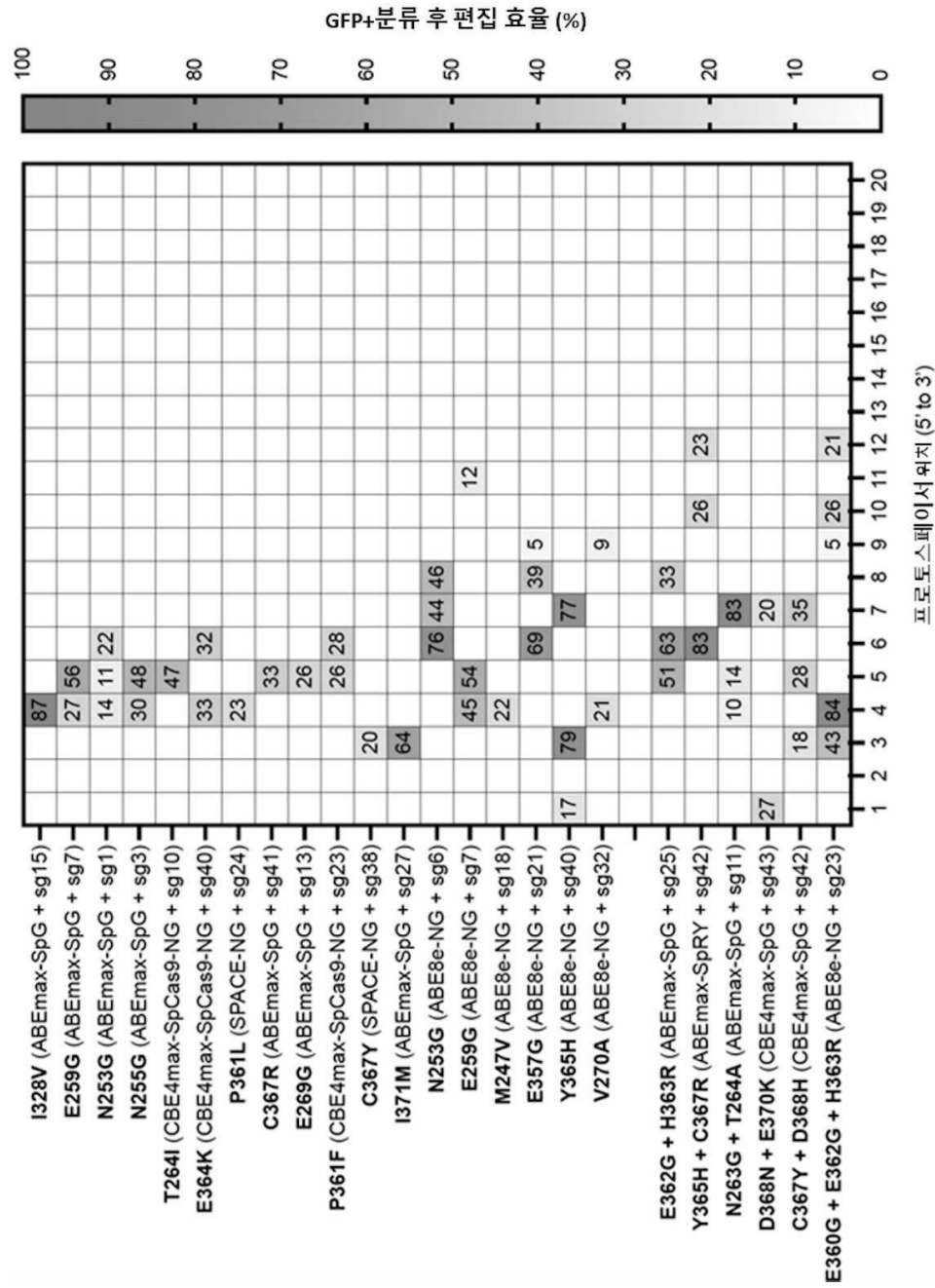
도면7



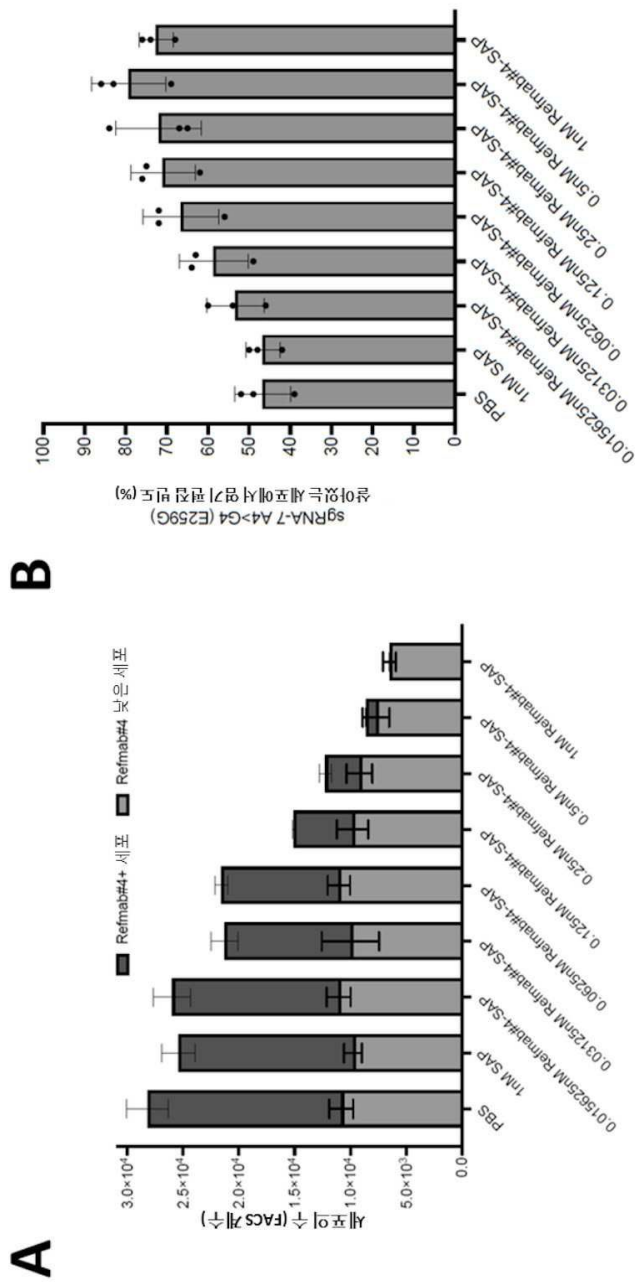
도면8



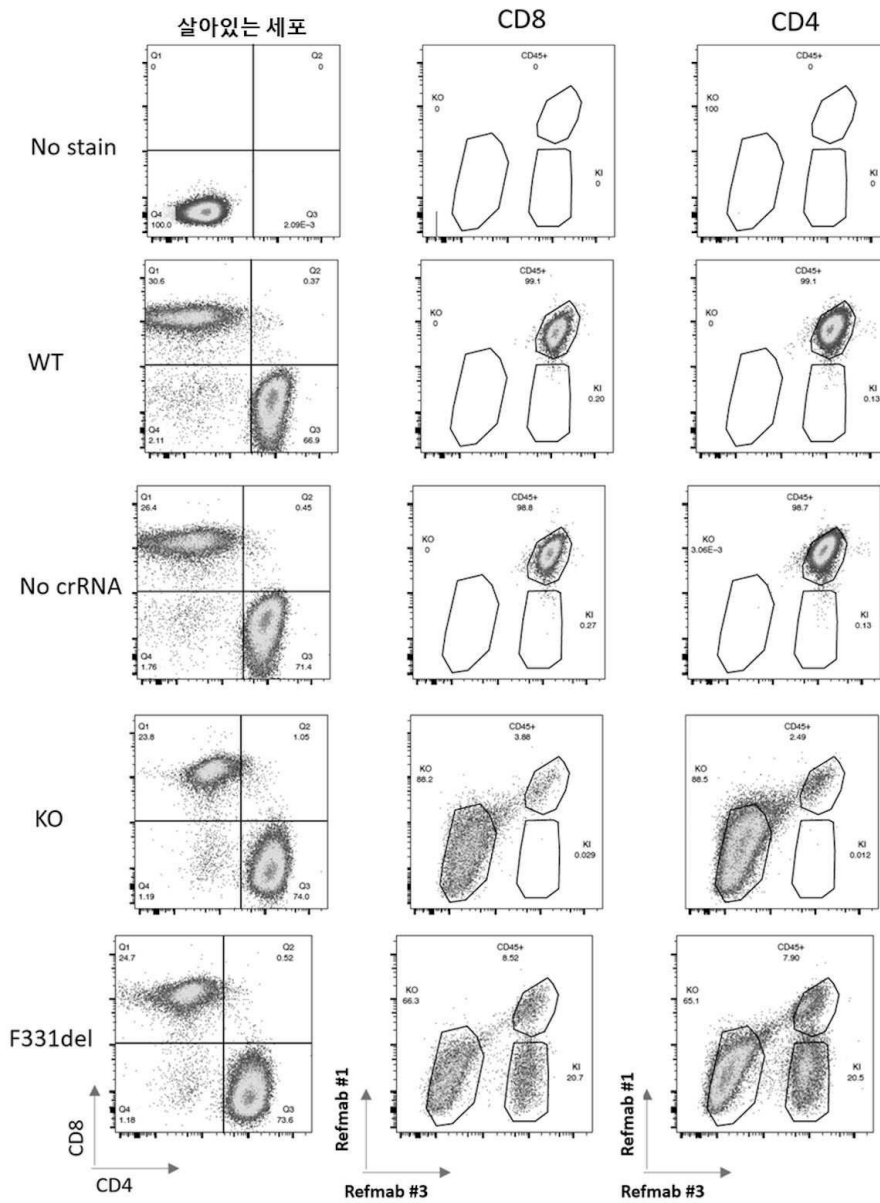
도면9



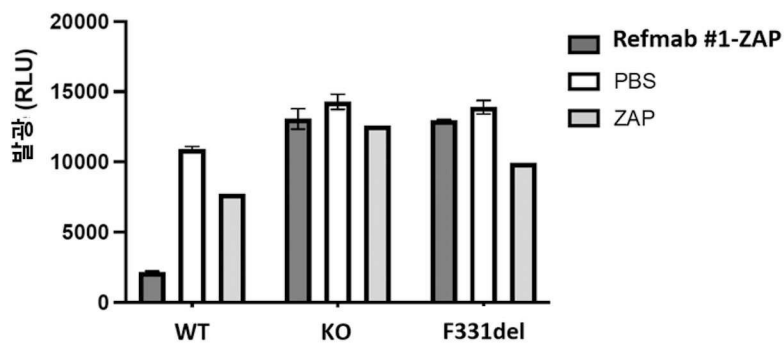
도면10



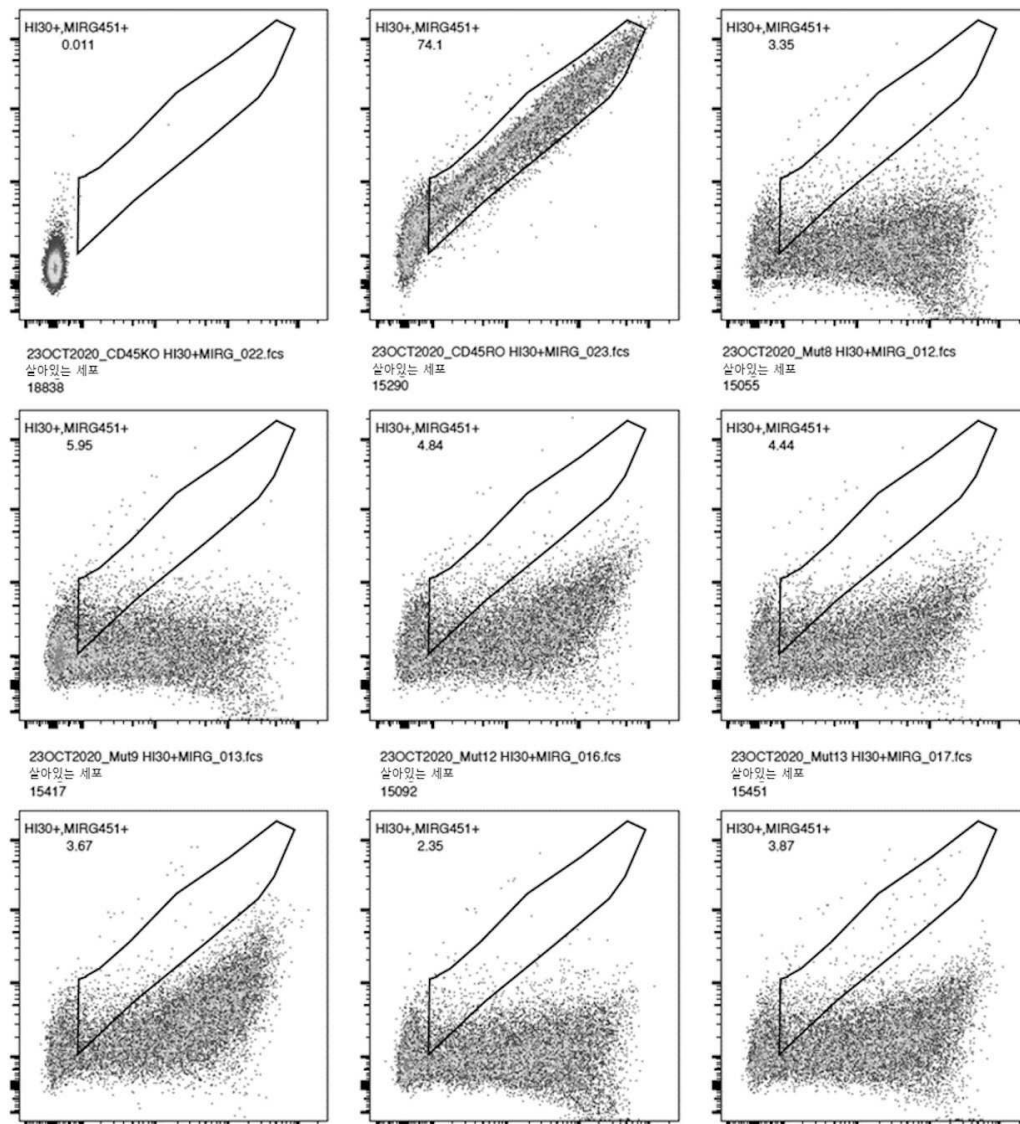
도면11



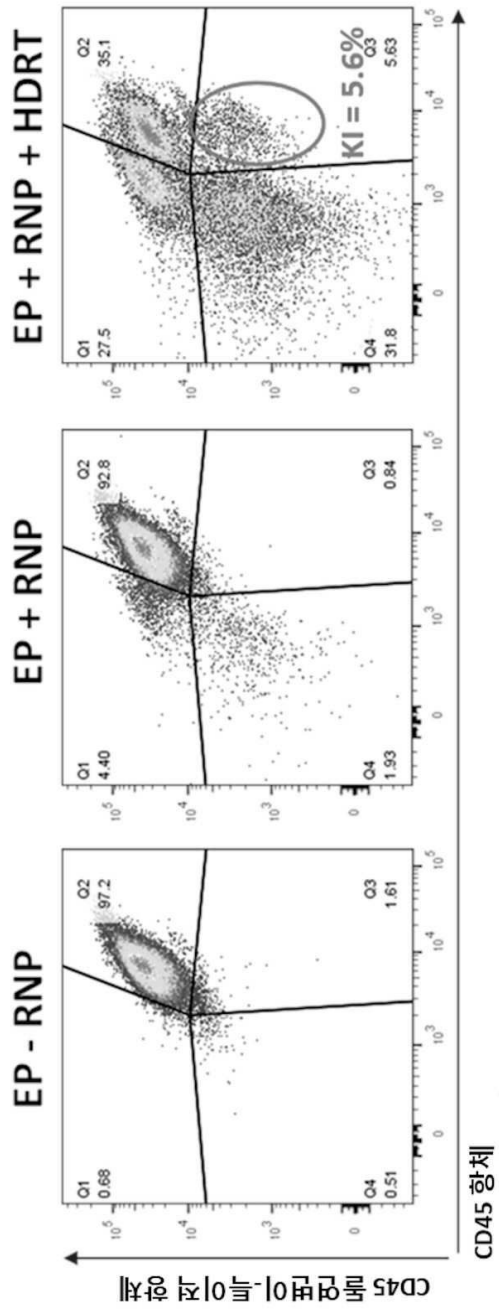
도면12



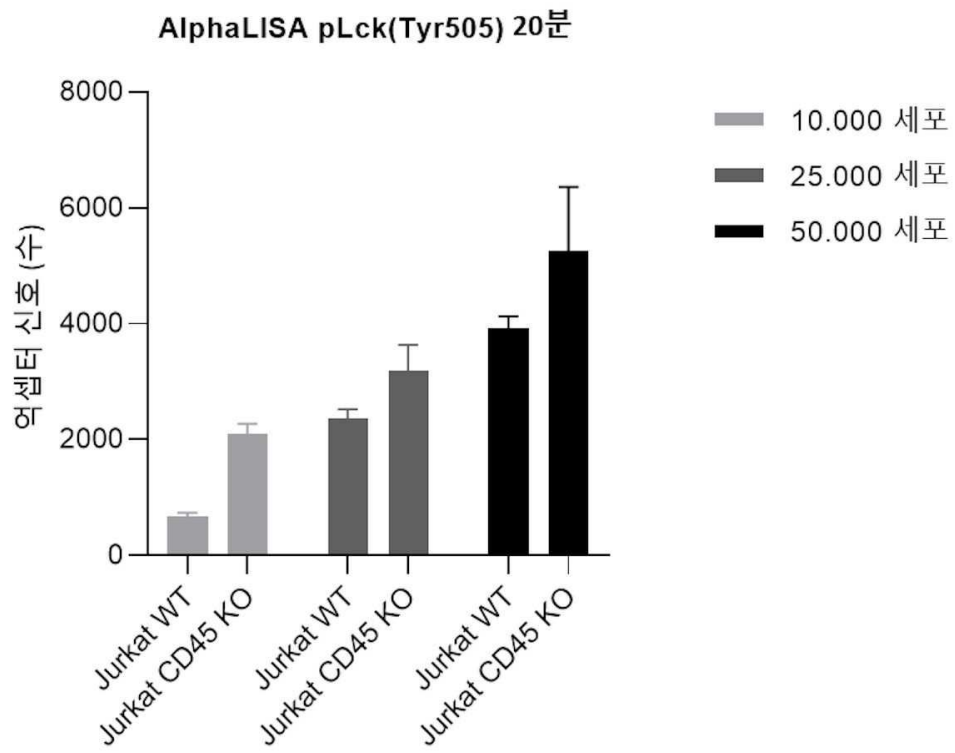
도면13



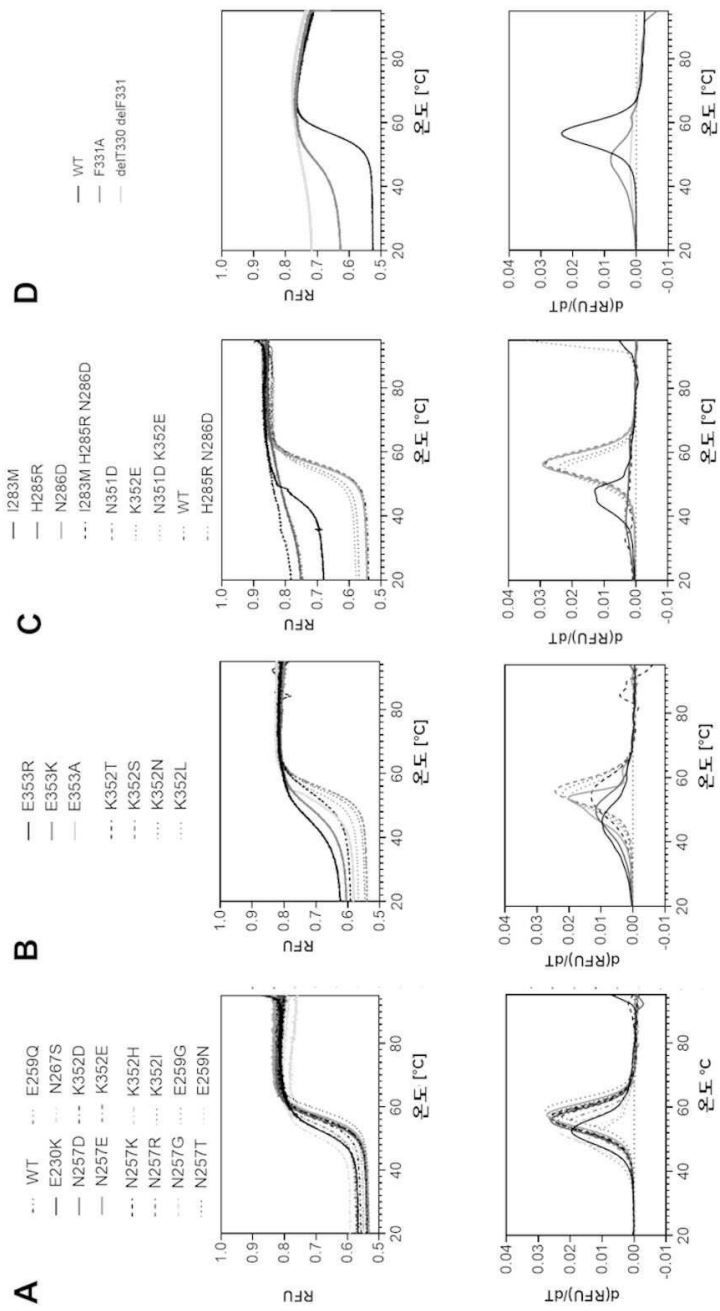
도면14



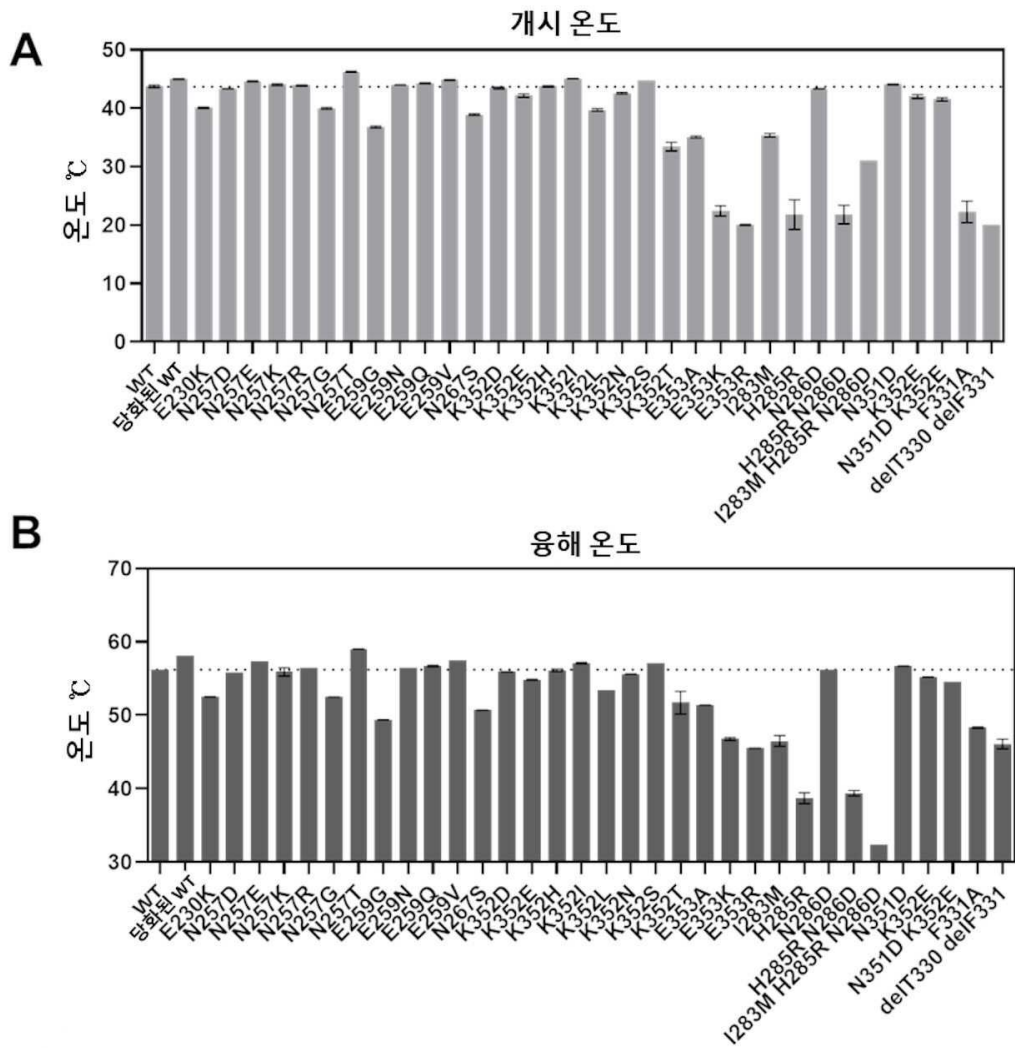
도면16



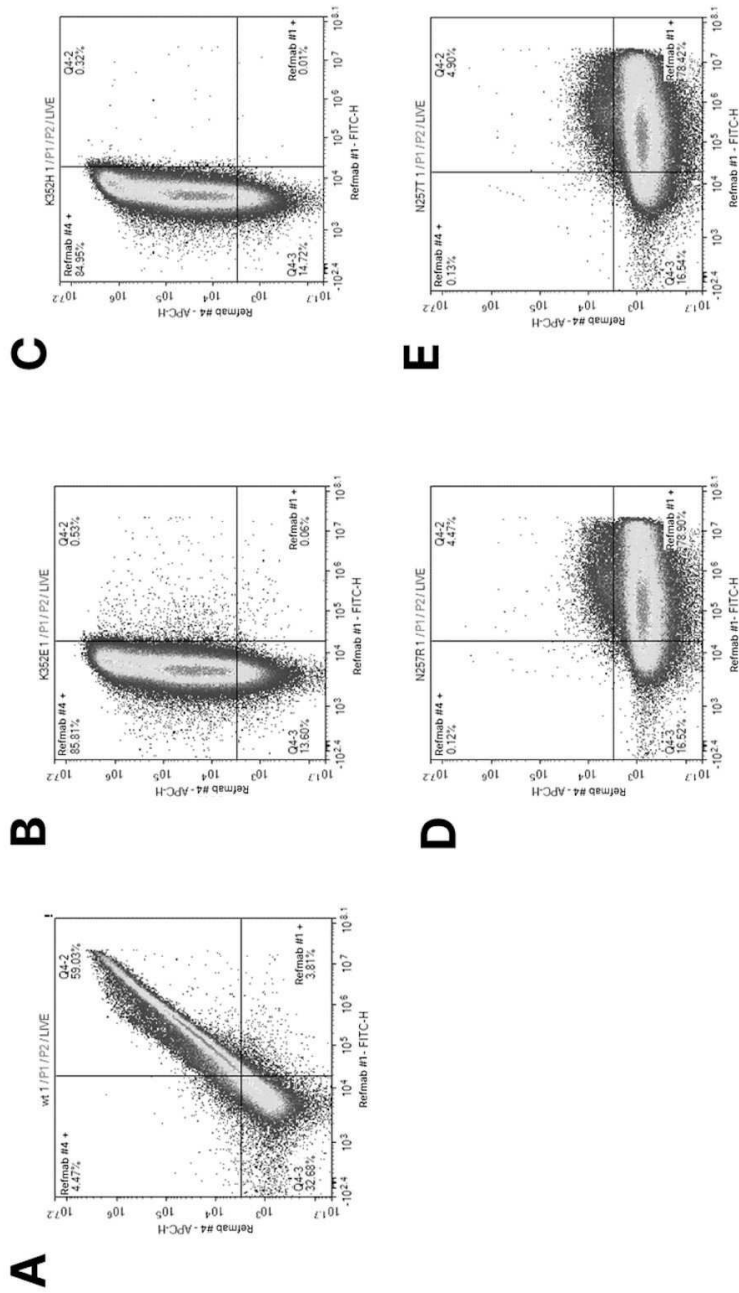
도면17



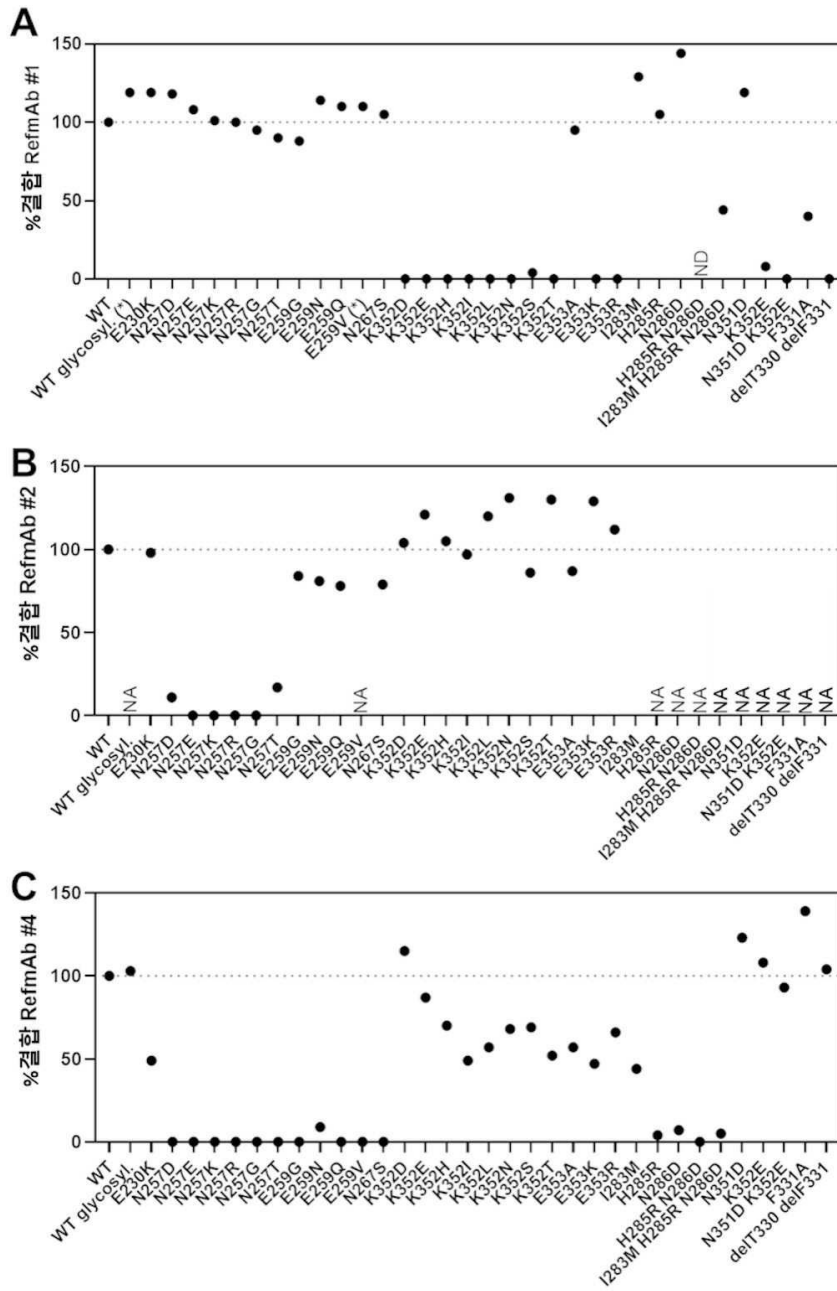
도면18



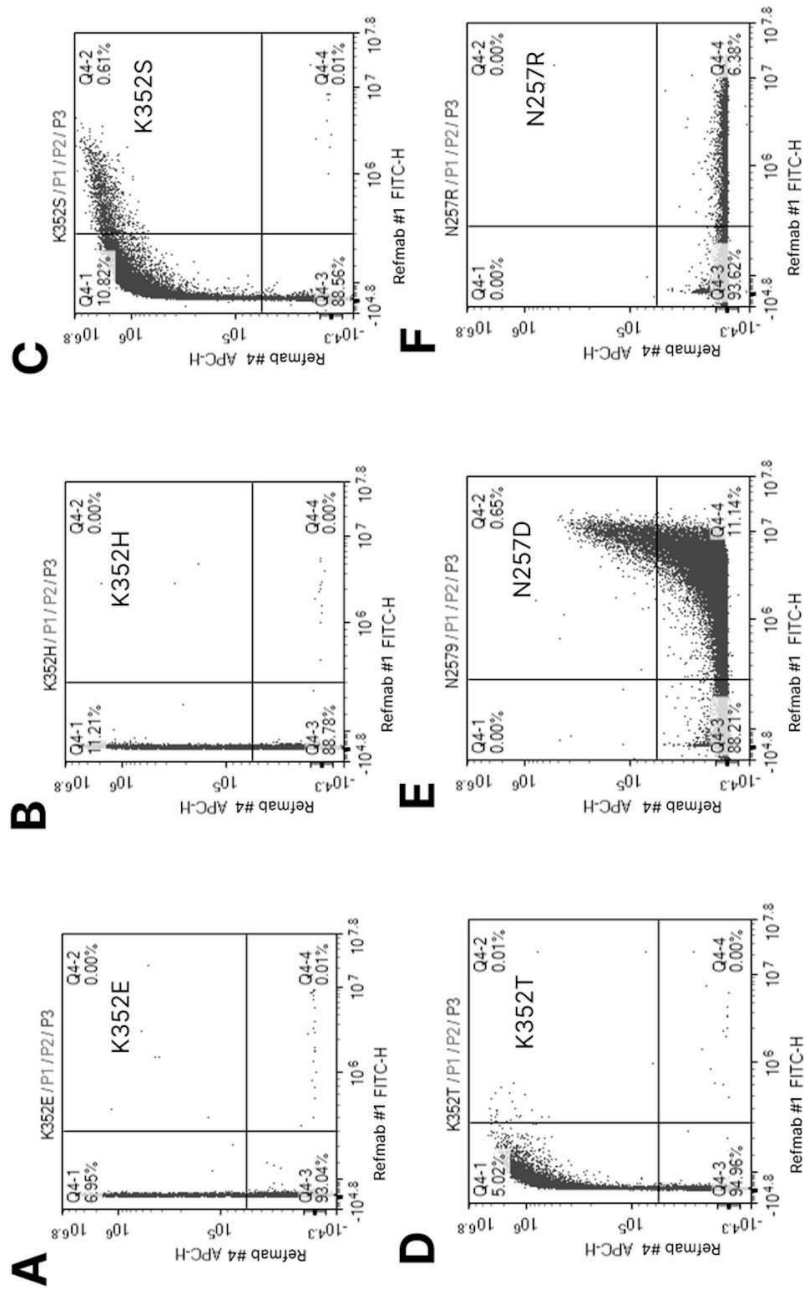
도면19



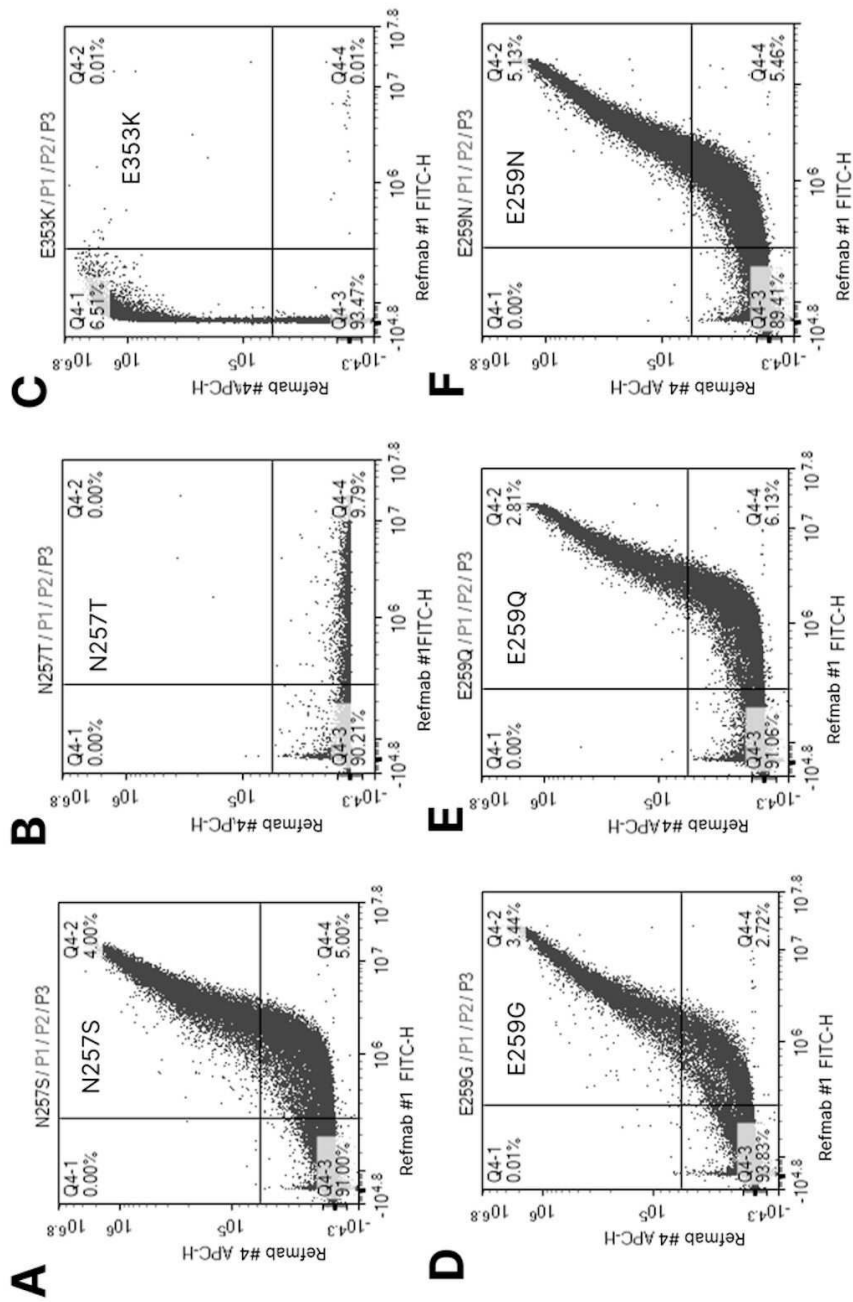
도면20



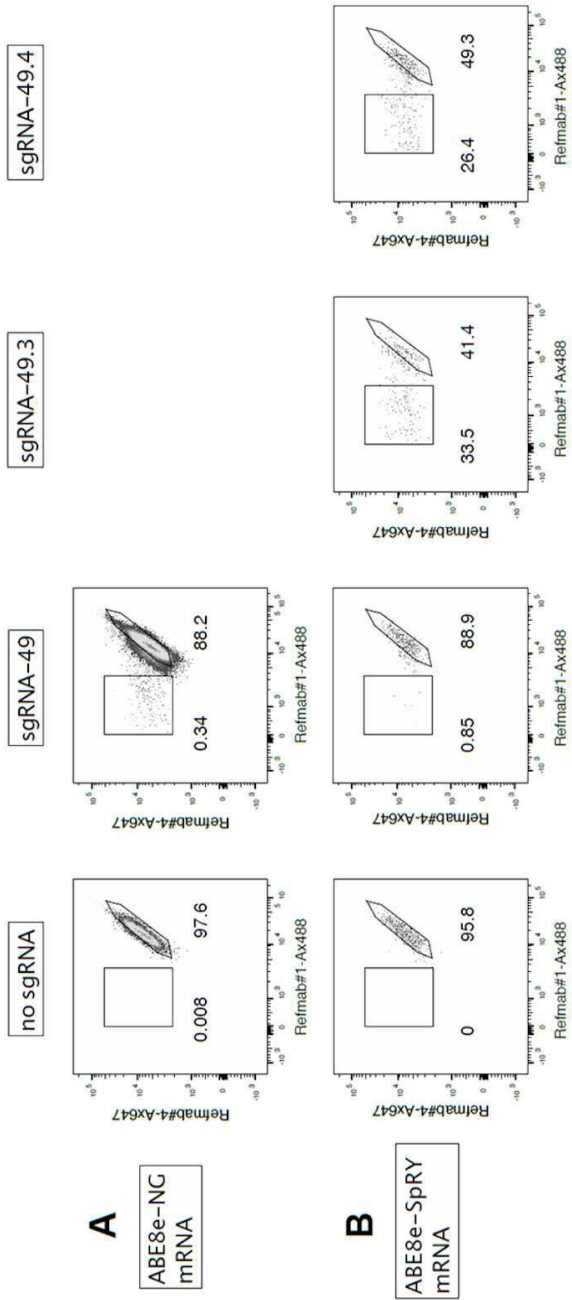
도면21



도면22



도면23



B
ABE8e-SpRY mRNA

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.